

Bài báo nghiên cứu

**KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG SINH ENZYME
VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH CHẤT PECTINASE
ĐƯỢC TIẾT BỞI NẤM MỐC PHÂN LẬP TỪ VỎ BÀN****Đoàn Thị Ngọc Thanh, Trần Ngọc Chi**

Trường Đại học Tiền Giang, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Đoàn Thị Ngọc Thanh – Email: dtntThanh@tgu.edu.vn

Ngày nhận bài: 08-5-2025; Ngày nhận bài sửa: 04-6-2025; Ngày nhận đăng: 06-6-2025

TÓM TẮT

Pectinase là nhóm enzyme xúc tác phản ứng phân giải pectin và được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, được thu nhận từ nhiều nguồn như thực vật và vi sinh vật. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm định danh phân tử nấm mốc sản sinh pectinase từ mẫu bàn, khảo sát các điều kiện nuôi cấy vi nấm trong môi trường bán rắn như cơ chất, pH, độ ẩm cho hoạt tính pectinase tốt nhất. Sau đó các điều kiện tủa protein được khảo sát và ảnh hưởng của điều kiện pH, nhiệt độ và thời gian phản ứng đến hoạt tính của enzyme sau tủa được đánh giá. Kết quả cho thấy nấm mốc sinh pectinase tốt nhất phân lập từ vỏ bàn được định danh là *Penicillium chrysogenum* hoặc *Penicillium citrinum*. Môi trường chứa cùi bưởi, độ ẩm 40%, pH 5 là điều kiện cho nấm sinh trưởng và sinh pectinase tốt nhất. Sau khi tủa bằng ethanol 75%, lượng pectinase được thu hồi nhiều nhất và enzyme có hoạt tính tốt nhất ở pH 5, 40°C sau 90 phút với $149,91 \pm 6,54$ UI/ml.

Từ khóa: hoạt tính; vỏ bàn; pectinase; *Penicillium chrysogenum*

1. Giới thiệu

Pectinase là enzyme phân giải pectin, được ứng dụng nhiều trong công nghiệp như được ứng dụng làm trong dịch quả, sản xuất nước ép trái cây, sản xuất rượu vang, trong quá trình xử lý nguyên liệu có sợi, xử lý nước thải, khai thác dầu khí, sản xuất giấy, lên men và xử lý vỏ cà phê và lên men trà và nhiều ứng dụng khác (Kashyap et al., 2001). Vi sinh vật là nguồn chính để thu pectinase hiện nay, trong đó nấm mốc đã và đang được nghiên cứu nhiều nhất. Các chủng nấm mốc sinh pectinase thường được phân lập từ những cơ chất có chứa pectin như vỏ cam, vỏ chuối, vỏ cà rốt và những loài sau định danh thường gặp là: *Penicillium glaucum*, *P. ehrlichii*, *P. chrysogenum*, *P. expanam*, *P. cilrimim*, *Aspergillus awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. terrus*, *A. saitoi*, *A. aureus*, *A. oryzae*, *A. japonicus*, *A. wentii*, *Fusarium moniliforme* (Haile & Ayele, 2022). Vỏ bàn (*Sonneratia caseolaris*) chứa

Cite this article as: Doan, T. N. T., & Tran, N. C. (2025). Investigation of enzyme production condition and characterization of Pectinase secreted by fungi isolated from mangrove apple peel. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 22(7), 1245-1255. [https://doi.org/10.54607/hcmue.js.22.7.4953\(2025\)](https://doi.org/10.54607/hcmue.js.22.7.4953(2025))

hàm lượng pectin khá cao, đến 21,05% (Ranisiska, 2024) và là một nguồn thu nhận pectin cũng như vi sinh sản sinh pectinase tiềm năng. Mặc dù bản là cây mọc tự nhiên dọc theo các bờ sông vùng đồng bằng sông Cửu Long nhưng chưa được nghiên cứu về vấn đề này.

Nấm mốc sản sinh pectinase thường được nuôi trong môi trường bán rắn hoặc môi trường lỏng và các nhân tố ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme là cơ chất, pH, nhiệt độ và độ ẩm (Haile & Ayele, 2022). Một nghiên cứu cho thấy nuôi *Aspergillus niger* IBT-7 trong môi trường bán rắn chứa cám gạo và được làm ẩm bằng môi trường dinh dưỡng Czapek cho sản lượng pectinase cao nhất, và sau khi khảo sát các điều kiện nuôi cho thấy ở pH 5, 30°C, ủ sau 72 giờ cho sản lượng pectinase tốt nhất (Abdullah et al., 2018). Tran và cộng sự (2016) đã nghiên cứu thu nhận pectinase từ *Aspergillus niger* trên môi trường bán rắn chứa cùi bưởi để nâng cao hiệu quả bóc vỏ tiêu. Hoạt tính pectinase tốt nhất được ghi nhận trên môi trường chứa 12% bột cùi bưởi, lượng nước bổ sung vào môi trường 40%, hoạt độ pectinase đạt 4,82 UI/g. Do (2018) đã nghiên cứu khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase từ *Aspergillus niger* trên nguồn cơ chất vỏ cam đã 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), nguồn nitrogen thích hợp là peptone 4% (w/v), tỉ lệ giống 2% (v/v), pH 5,0 và thời gian nuôi cấy là 3 ngày. Từ một số loại vỏ củ, quả giàu pectin như cam, chanh, bưởi, quýt, chuối, xoài, táo, khoai tây, cà rốt được thu gom tại các chợ, quây nước ép trái cây ở thành phố Huế, Do và Huynh (2020) đã phân lập nấm mốc *Aspergillus niger*, sau đó tinh sạch bằng các phương pháp khác nhau: rửa muối, rửa bằng dung môi hữu cơ, lọc màng; và ứng dụng enzyme pectinase để xử lý nước ép táo và nho, kết quả cho thấy enzyme pectinase được tinh sạch với hoạt tính 194 UI/mL. Một nghiên cứu gần đây đã báo cáo *Penicillium citrinum* được phân lập từ vỏ cà chua hư, sau đó khảo sát điều kiện nuôi cấy và thu nhận pectinase trong môi trường bán rắn chứa bột vỏ cà chua sau 6 ngày nuôi cho kết quả tốt nhất (Shaibu & Abah, 2024). Một nghiên cứu tối ưu hóa môi trường nuôi cấy lỏng cho thấy việc bổ sung 3% vỏ cam và 4,5 g/l pepton giúp *Penicillium chrysogenum* MF318506 sản sinh pectinase cao hơn 6,04 lần (Nehad & Rahman, 2021). Một số nghiên cứu đặc tính pectinase sinh ra từ nấm mốc cho thấy có sự khác biệt về khoảng pH và nhiệt độ hoạt động tối thích của enzyme thu từ nhiều loại nấm mốc và nhiều nguồn khác nhau (Banu et al., 2010; Do & Huynh, 2020).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nấm mốc MB2 phân lập từ vỏ bản (Doan & Nguyen, 2022). Môi trường vi sinh và hóa chất đo hoạt tính pectinase được mua từ Himedia, Ấn Độ.

Chuẩn bị môi trường bán rắn nuôi nấm mốc:

+ Chuẩn bị bột cơ chất: vỏ chuối già, vỏ bí đỏ dài, vỏ trắng bưởi được thu nhận, rửa sạch, sấy nhiệt khô đến khi độ ẩm nhỏ hơn 10%, nghiền và sàng qua rây 0,5 mm; bột cám gạo được mua từ cám gạo thô có độ ẩm thấp hơn 10%.

+ Chuẩn bị môi trường bán rắn: cân 15 g bột (bột vỏ chuối, bột vỏ bí đỏ, bột cùi bưởi và bột cám gạo theo công thức của thí nghiệm) cho vào bình tam giác đã được hấp khử trùng. Bổ sung vào túi 10 ml môi trường khoáng (0,6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở pH 4 và điều chỉnh độ ẩm đến 50% (giá trị pH và độ ẩm được thay đổi tùy vào nghiệm thức của thí nghiệm).

Chủng nấm mốc: nấm mốc thuần từ môi trường trữ giống được hoạt hóa trong 5 ml môi trường NB, sau 2 ngày cấy chuyển vào 150 ml môi trường NB. Nuôi lắc nấm mốc ở 150 vòng/phút ở 30°C. Sau 36 giờ nuôi cấy, thu nhận hệ sợi của chủng làm nguồn giống để chủng vào môi trường bán rắn.

Thu nhận enzyme thô và xác định hoạt tính pectinase sinh ra: Sau thời gian nuôi cấy trên môi trường bán rắn ở các thông số thí nghiệm, 50 ml nước cất vô trùng được cho vào bình tam giác, lắc đều, lọc, dịch lọc là dịch enzyme thô để xác định hoạt tính hoặc sử dụng cho các bước tua enzyme.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định danh nấm mốc

Mẫu nấm mốc MB2 có khả năng sản sinh pectinase được gửi đi Công ty Nam khoa để giải trình tự đoạn ITS rRNA, trình tự được so sánh trên ngân hàng gen NCBI để xác định chủng loài có trình tự tương đồng và xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm Mega7.

2.2.2. Đo hoạt tính enzyme pectinase

Hoạt tính pectinase được đo bằng phương pháp xác định sản phẩm tạo thành qua máy quang phổ ở bước sóng 540 nm. Enzyme tác dụng với cơ chất pectin, sản phẩm tạo thành là D-galacturonic acid phản ứng màu với thuốc thử DNS. Sử dụng dung dịch chuẩn là D-galacturonic acid nồng độ 10 $\mu\text{mol/ml}$ hòa trong đệm acetate pH 5. Một đơn vị hoạt tính (UI) pectinase là lượng enzyme tối thiểu (μg) thủy phân pectin trong 1 phút tạo ra 1 μmol D-galacturonic acid (Ezike et al., 2014).

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của cơ chất và thời gian nuôi đến khả năng sinh pectinase

Thí nghiệm được thiết kế 1 nhân tố với 4 nghiệm thức cơ chất (vỏ chuối, vỏ bí đỏ, cùi bưởi, cám gạo). Mỗi nghiệm thức lặp lại 4 lần, mỗi lần là 4 bình tam giác, mỗi bình chứa 25 g cơ chất. Điều kiện cố định: pH 4, độ ẩm 50%, nhiệt độ phòng. Sau khi chủng giống mỗi 2, 3, 4, 5 ngày, một bình được thu nhận enzyme thô và đo hoạt tính.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của pH và độ ẩm môi trường bán rắn đến khả năng sinh pectinase

Thí nghiệm được thiết kế 2 nhân tố, nhân tố ẩm độ (40%, 50%, 60% và 70%) và nhân tố pH (4, 5, 6, 7 và 8), số nghiệm thức là $4 \times 5 = 20$, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần là một bình tam giác chứa 25 g cơ chất. Điều kiện cố định: cơ chất và thời gian được chọn từ thí nghiệm trên, nuôi nấm mốc ở nhiệt độ phòng.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của tác nhân tua lên việc thu nhận pectinase

Mẫu enzyme thô sau khi lọc sẽ được tua để thu nhận enzyme tinh sạch hơn. Thí nghiệm được thiết kế 1 nhân tố là tác nhân tua với 13 nghiệm thức sau: ethanol (tỉ lệ enzyme: ethanol là 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5), muối amonium sulfate (40%, 50%, 60% và 70% bão hòa), muối

sodium chloride (10%, 20%, 30% và 35%), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần 10 ml dịch enzyme thô (Tran, 2013).

Phương pháp rửa

Tua bằng dung môi: cho từ từ dịch pectinase thô vào ethanol đã được làm lạnh đến 4°C với 5 tỉ lệ đã nêu, khuấy đảo nhẹ và để yên ở 4°C trong 2 giờ. Tiến hành li tâm 4000 rpm trong 10 phút, loại dịch thu tua.

Tua bằng muối trung tính: Bổ sung từ từ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hoặc NaCl ở nồng độ thấp nhất vào cốc có chứa dịch enzyme thô, khuấy liên tục trên máy khuấy từ. Để yên 4°C trong 2 giờ và tiến hành li tâm 4000 rpm trong 10 phút. Phần dịch được tiếp tục tua phân đoạn với nồng độ muối cao hơn. Phần tua ở mỗi phân đoạn được hòa tan vào 3 mL đệm acetate, sau đó được loại muối bằng thẩm tích với đệm acetate và để tiến hành xác định hoạt tính enzyme pectinase.

2.2.6. Khảo sát pH tối ưu của enzyme thu được sau tua

Sau khi chọn tác nhân tua cho hoạt tính enzyme cao nhất, tiến hành nuôi cấy nấm mốc để thực hiện tua enzyme. Enzyme sau khi tua được pha trong các dung môi có 8 giá trị pH khác nhau: acetate (pH 3,0; 4,0), citrate-phosphate (pH 5,0; 6,0; 7,0), tris-HCl (pH 8,0) và glycine-NaOH (pH 9,0; 10,0). Tiến hành phản ứng phân giải pectin trong ống nghiệm 10 ml (9,5 ml đệm, 0,5 ml dịch enzyme và pectin 1%). Sau đó đo hoạt tính phân giải pectin để xác định pH thích hợp và so sánh hoạt tính của enzyme thu được.

2.2.7. Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian phản ứng lên hoạt tính của enzyme

Chọn pH từ thí nghiệm trên, thiết kế thí nghiệm với 9 giá trị nhiệt độ (35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C), mỗi giá trị nhiệt độ có 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại là 1 ống nghiệm 10 ml (9,5 ml đệm, 0,5 ml dịch enzyme và pectin 1%). Tại các mốc thời gian 30 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút, 150 phút, 1 ml phản ứng được đem đo hàm lượng D-galacturonic acid để xác định nhiệt độ và thời gian tối ưu cho hoạt tính của pectinase.

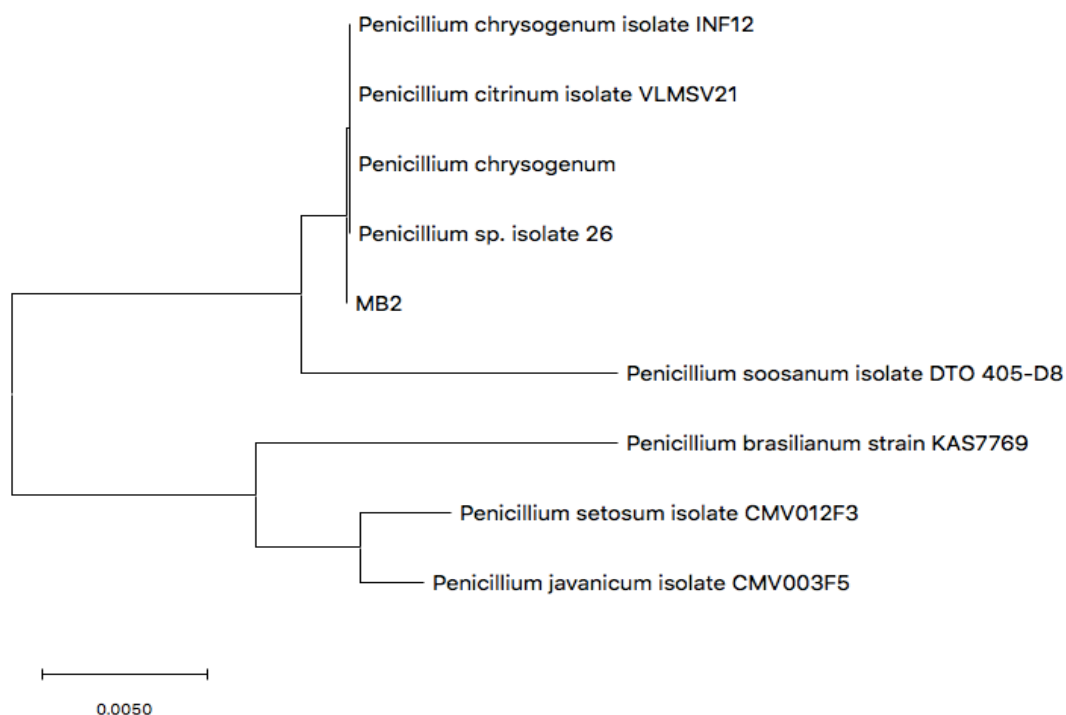
2.2.8. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Statistical Product and Services Solutions (SPSS), phiên bản 20 dùng cho Windows với phương pháp tính trung bình và phân tích Oneway Anova.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả định danh chủng nấm mốc ML3

Sau khi giải trình tự vùng ITS rRNA của chủng MB2, tiến hành so sánh trình tự thu được với các trình tự khác trên ngân hàng gen nhờ công cụ blast, sau đó xây dựng cây phân loại cho bằng phần mềm MEGA. Kết quả được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1. Cây phân loại của chủng MB2

Dựa vào cây phân loại này có thể thấy chủng nấm mốc MB2 nằm cùng nhánh với chủng *Penicillium chrysogenum* hoặc *Penicillium citrinum* với giá trị bootstrap là 100. Bên cạnh đó kết quả sắp giống cột trình tự nucleotide trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy mức độ tương đồng của ITS rRNA của từng cặp chủng đều có giá trị cao nhất 100%. Xét về mặt giá trị tin cậy và mức độ tương đồng thì hai loài này giống nhau. Chính vì vậy, kết hợp các đặc điểm sinh học và phương pháp sinh học phân tử, đưa ra kết luận chủng MB2 cùng loài với *Penicillium chrysogenum* hoặc *Penicillium citrinum*. Khi tra cứu các đặc điểm sinh học và những nghiên cứu về 2 loài nấm trên đều cho thấy 2 loài này có khả năng sản sinh pectinase và có thể dùng trong thực phẩm (Banu et al., 2010; Shaibu & Abah, 2024). Để định danh chính xác hơn, những nghiên cứu sâu hơn như phân tích các vùng gen 28rRNA hoặc ITS khác ngoài ITS1, 4 cần được thực hiện.

3.2. Kết quả ảnh hưởng của cơ chất và thời gian nuôi đến hoạt tính pectinase của chủng nấm mốc MB2

Kết quả trong Bảng 1 cho thấy trong môi trường nuôi có cùi bưởi là cơ chất sẽ cho hoạt tính pectinase cao nhất trong cả 5 thời điểm khảo sát. Sau 5 ngày, hoạt tính pectinase ở môi trường cùi bưởi cao nhất kể đến là môi trường chứa vỏ chuối, sau đó đến cám và thấp nhất ở môi trường vỏ bí đỏ. Trong môi trường bán rắn chứa cùi bưởi, vỏ chuối và cám gạo, hoạt tính enzyme vào ngày 2 và ngày 3 đo được có sự chênh lệch không đáng kể và tăng lên ở ngày 4, cao nhất vào ngày 5. Khi đó, nấm mốc đã lan hết môi trường nuôi. Riêng đối với bí đỏ, hoạt tính enzyme đo được cao nhất ở ngày 2 và giảm dần vào những ngày sau. Điều này có thể do môi trường vỏ bí đỏ giúp nấm mốc sinh trưởng nhưng không sản sinh nhiều pectinase.

Bảng 1. Hoạt tính pectinase (UI/g) trong môi trường có cơ chất và thời gian ủ khác nhau

Thời gian/ (ngày)	2	3	4	5
Cơ chất				
Vỏ bí đỏ	51,18±4,34 ^b	49,70±8,6 ^b	48,01±1,21 ^c	26,75±5,01 ^d
Cùi bưởi	71,70±1,4 ^a	62,69±13,3 ^a	71,10±1,12 ^a	96,93±11,61 ^a
Vỏ chuối	50,15±1,20 ^b	54,46±6,73 ^b	56,38±2,53 ^b	74,52±6,64 ^b
Cám gạo	37,64±10,20 ^c	27,96±7,23 ^c	51,86±1,70 ^b	49,72±2,23 ^c

Các chữ cái theo sau chữ số trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

Nhiều nghiên cứu về nấm mốc sinh pectinase chủ yếu tập trung vào giống *Aspergillus* trong môi trường vỏ cam, vỏ chuối, cùi bưởi (Do, 2018; Phan et al., 2018; Davanso et al., 2019) nhưng có ít nghiên cứu về điều kiện sinh pectinase của *Penicillium*. Nghiên cứu của Nehad và Rahman (2021) cho thấy nuôi *Penicillium chrysogenum* trong môi trường lỏng chứa 3% vỏ cam sau 6 ngày sẽ cho hoạt tính enzyme cao nhất. Trong môi trường bán rắn của nghiên cứu này, cùi bưởi được chọn làm cơ chất chính nuôi nấm sau 5 ngày để thu được hoạt tính enzyme cao nhất là 96,93±11,61 UI/g.

3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH và độ ẩm môi trường đến hoạt tính pectinase

Nấm mốc MB2 được nhân nuôi trong môi trường bán rắn chứa cùi bưởi, với pH và độ ẩm được điều chỉnh theo các giá trị thí nghiệm như phần 2.2.4. Sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng, thu nhận enzyme thô và đo hoạt tính. Kết quả phân tích hai nhân tố thể hiện trong Bảng 2 cho thấy khi nuôi nấm trong môi trường bán rắn có độ ẩm khác nhau sẽ ảnh hưởng đến khả năng sinh pectinase, ngược lại, giá trị pH của môi trường không ảnh hưởng đến khả năng sinh pectinase của nấm MB2. Điều này có thể do môi trường bán rắn, độ ẩm ảnh hưởng đến sự phát triển và khả năng tiết enzyme của nấm *Penicillium*, còn pH của dịch bổ sung ban đầu không ảnh hưởng đến quá trình tiết enzyme này. Trong đó, hoạt tính được ghi nhận cao nhất ở độ ẩm 40% với giá trị trung bình là 196,55 UI/g, thấp nhất ở độ ẩm 60% với giá trị trung bình là 158,09 UI/g.

Bảng 2. Hoạt tính pectinase (UI/g) của nấm mốc được nuôi từ các điều kiện pH và độ ẩm khác nhau

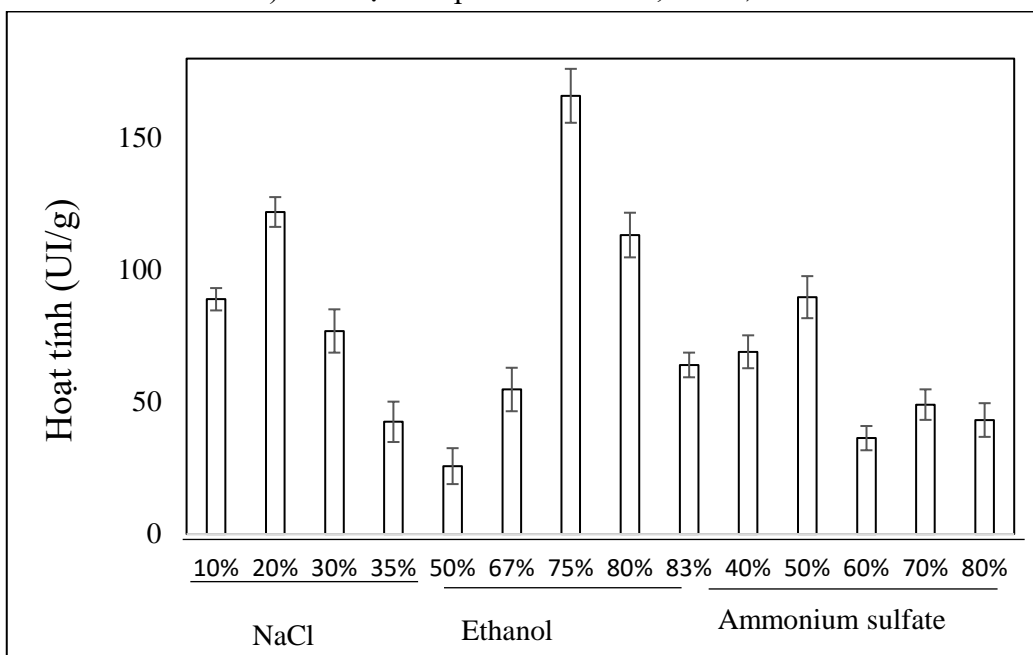
Giá trị pH (A)	4	5	6	7	8	Trung bình (độ ẩm)
Độ ẩm (%) (B)						
40	200,10±10,20	209,92±4,67	187,83±5,67	192,97±11,23	191,94±4,77	196,55 ^a
50	189,75±4,76	187,72±8,72	182,89±12,70	177,69±12,11	172,37±4,18	182,08 ^b
60	164,4±5,83	148,43±6,15	159,6±10,52	160,23±13,10	157,78±4,78	158,09 ^c
70	163,8±11,23	175,3±4,18	186,49±8,34	210,5±12,23	197,93±7,58	186,8 ^{ab}
Trung bình (pH)	179,52	180,35	179,2	185,35	180,00	
F			F(A) ^{ns}	F(B)**	F(A)xF(B)**	

Các chữ cái theo sau chữ số trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$. F^{ns}: không khác biệt, F^{**}: khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Trong nghiên cứu khảo sát điều kiện nuôi *Aspergillus* cũng cho thấy độ ẩm 40% cho hoạt tính enzyme cao nhất, và pH 5 được chọn như đặc tính của giống nấm này (Tran et al., 2016). Trong nghiên cứu này, điều kiện môi trường pH 5 và độ ẩm 40% cho hoạt tính tốt nhất với $209,92 \pm 4,67$ UI/g.

3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng tác nhân rửa lên việc thu nhận pectinase

Sau khi chọn điều kiện nuôi cấy trong môi trường cùi bưởi là cơ chất chính, pH 5, độ ẩm 40%, nấm mốc được hoạt hóa và chủng vào môi trường nuôi trong 5 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau khi nuôi cấy, nước cất vô trùng được bổ sung vào môi trường nuôi và lọc thu dịch lọc, sau đó dịch lọc được rửa bằng các tác nhân khác nhau, phần rửa được huyền phù với 5 ml đệm acetate pH 5. Phần huyền phù của mẫu được rửa bằng muối sẽ được thẩm tích bằng màng thẩm tích có kích thước 25 kDa. Tất cả các mẫu huyền phù được đo hoạt tính pectinase, kết quả được trình bày ở hình 2 cho thấy đối với mỗi tác nhân rửa có một nồng độ rửa cho hoạt tính cao nhất. Đối với muối NaCl, phân đoạn rửa tốt nhất ở nồng độ 20% ($121,93 \pm 5,64$ UI/ml), đối với ammonium sulfate là 50% ($89,69 \pm 7,96$ UI/g) và ethanol là 75% (tương ứng tỉ lệ dịch enzyme thô: ethanol là 1:3) với hoạt tính pectinase là $165,91 \pm 10,21$ UI/ml.



Hình 2. Hoạt tính pectinase của các phân đoạn rửa

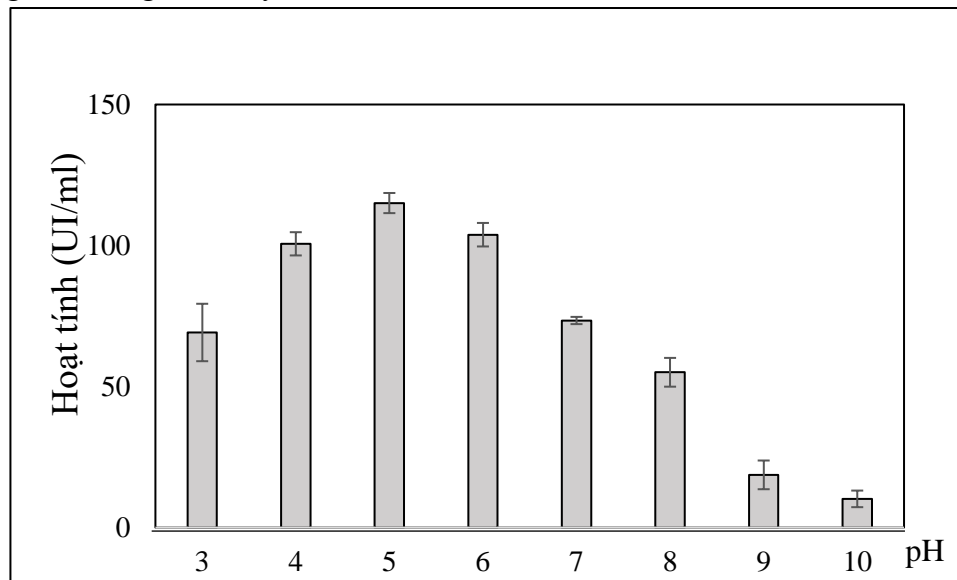
Khi phân tích bằng công cụ ANOVA, hoạt tính pectinase từ phân đoạn rửa với ethanol 75% có giá trị cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả tương tự được quan sát khi dung môi rửa cho hoạt tính pectinase từ *Aspergillus* tốt nhất theo nghiên cứu của Barman và cộng sự (2015) là ethanol 75%. Trong khi tác nhân rửa tốt nhất cho hoạt tính pectinase từ *Penicillium citrinum* là ammonium sulfate 80% (Christopher Shaibu, et al., 2024). Một nghiên cứu khác trên pectinase của *Aspergillus niger* cho thấy acetone tỉ lệ 1:3 tốt nhất là tác nhân rửa tốt nhất (Do, 2020). Như vậy, các điều kiện nghiên

cứu khác nhau, các chủng nấm mốc khác nhau, môi trường nuôi khác nhau làm ảnh hưởng đến hiệu quả tủa của các tác nhân khác nhau.

3.5. Hoạt tính pectinase trong các điều kiện pH khác nhau

Chọn tác nhân tủa là ethanol 75%, nuôi vi nấm với quy trình tương tự, phần tủa sẽ được huyền phù với các dung môi có giá trị pH khác nhau và tiến hành đo hoạt tính trong các điều kiện pH tương ứng. Kết quả trên hình 2 cho thấy pectinase từ nấm MB2 hoạt động tốt trong pH thấp, hoạt tính tăng từ 3 và cao nhất ở pH 5 ($115,06 \pm 3,57$ UI/ml). Hoạt tính vẫn duy trì ở tốt ở pH 6 và giảm dần từ pH 7 và rất thấp ở pH 9 và 10 ($10,18 \pm 2,94$ UI/ml).

Mặc dù giá trị pH trong môi trường nuôi ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê đến khả năng sinh pectinase của nấm mốc (mục 3.3) nhưng ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến khả năng hoạt động của enzyme.



Hình 3. Hoạt tính pectinase trong các điều kiện pH khác nhau

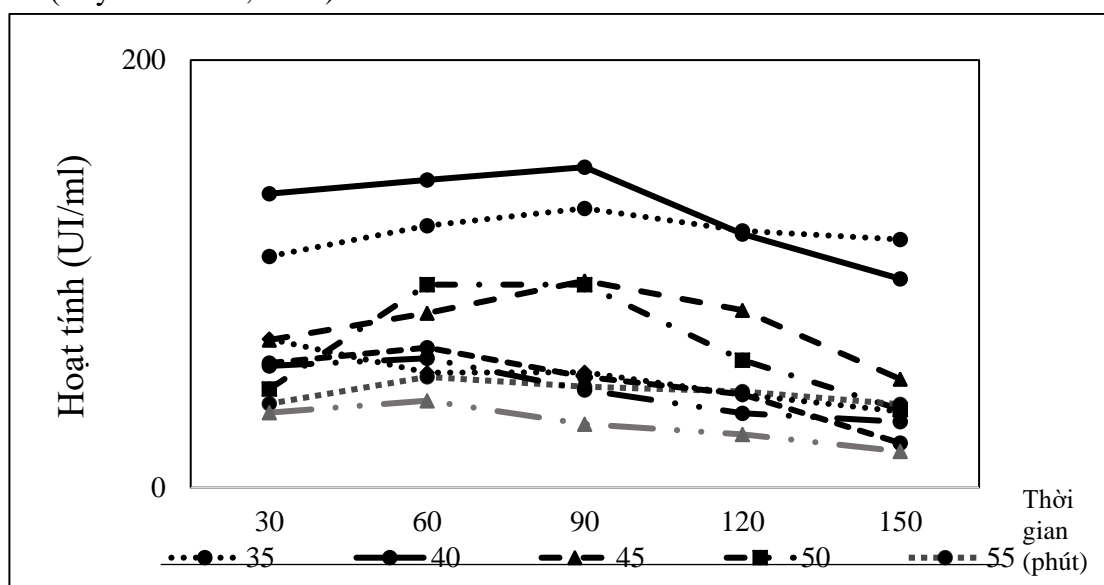
Pectinase thu nhận từ *Penicillium citrinum* hoạt động tốt ở pH 4 và pH 5,5 ($47,95$ U/ml) trong phạm vi khảo sát từ pH 3 đến pH 5,5 (Shaibu & Abah, 2024); trong khi pectinase thu nhận từ *Penicillium chrysogenum* có hoạt tính tối ưu ở pH 5,5 và hoạt tính thấp nhất ở pH 4 (Bayu & Maria, 2022). Điều này cho thấy những pectinase thu từ nhiều nguồn nấm khác nhau có tính chất khác nhau.

3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian phản ứng tối ưu của pectinase sau tủa

Dịch enzyme sau tủa được bổ sung vào phản ứng ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau. Sau mỗi mốc thời gian thí nghiệm, sản phẩm được đo để tính toán hoạt tính pectinase. Nhiệt độ phản ứng tối ưu của pectinase được ghi nhận ở 40°C ($149,91 \pm 6,54$ UI/ml), kể đến là 35°C , ở nhiệt độ trên 40°C , hoạt tính pectinase giảm dần và vẫn ghi nhận được hoạt tính ở 75°C , cho thấy enzyme thu được có khoảng nhiệt độ rộng, tương tự với pectinase thu từ *Bacillus firmus* (nhiệt độ tối ưu là 50°C và vẫn quan sát được hoạt tính ở 80°C) (Khan & Barate, 2016). Đối với pectinase thu được từ *Penicillium citrinum*, hoạt tính

ghi nhận cao nhất ở 50°C (280 U/ml), và hoạt tính giảm nhưng vẫn được ghi nhận đến 70°C (Shaibu & Abah, 2024).

Thời gian phản ứng cho hoạt tính tốt nhất là 90 phút trong khoảng thời gian khảo sát. Từ 30 phút đến 90 phút hoạt tính ghi nhận tăng dần và giảm dần ở 120 đến 150 phút. Sự thay đổi này rõ nhất ở nhiệt độ thấp, đối với nhiệt độ cao từ 70°C và 75°C, hoạt tính được ghi nhận cao nhất ở 60 phút và giảm dần từ 90 phút trở đi. Điều này có thể giải thích là do thời gian càng lâu sự ổn định của enzyme càng giảm và nhiệt độ càng cao làm ảnh hưởng đến tính chất của enzyme do đó thời gian càng lâu và nhiệt độ càng cao thì hoạt tính càng giảm (Bayu & Maria, 2022).



Hình 4. Hoạt tính pectinase trong các điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau

4. Kết luận

Vi nấm phân lập từ vỏ bần được định danh bằng sinh học phân tử là loài *Penicillium chrysogenum* hoặc *Penicillium citrinum*. Trong môi trường bán rắn chứa cùi bưởi là cơ chất chính với độ ẩm 40% và pH 5, vi nấm được nuôi sau 5 ngày tiết ra enzyme có hoạt tính pectinase cao nhất trong các điều kiện đã khảo sát. Sau khi rửa dịch lọc nuôi nấm bằng ammonium sulfate, ethanol và NaCl với các nồng độ khác nhau, phân đoạn rửa với ethanol 75% cho hoạt tính pectinase cao nhất. Pectinase sau rửa hoạt động ở khoảng pH từ 4 đến 6 và giảm dần đến pH 10, nhiệt độ hoạt động tốt nhất ở 40°C ở 90 phút ở điều kiện khảo sát.

Các nghiên cứu tiếp theo cần định danh sâu hơn chủng nấm mốc phân lập, nghiên cứu động học pectinase sau rửa và tinh sạch và ứng dụng enzyme trong quá trình làm trong nước ép trái cây.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdullah, R., Farooq I., Kaleem A., Iqtedar M., & Iftikhar T. (2018). Pectinase production from *Aspergillus niger* IBT-7 using solid state fermentation. *Bangladesh Journal of Botany*, 47(3), 473-478.
- Banu A. R., Devi M. K., Gnanaprabhal G. R., Pradeep B. V., & Palaniswamy M. (2010). Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(4), 377-381.
- Barman, S., Nandan, S., Laxmikant, S. B., & Sankar, C. D. (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. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1413-8>
- Bayu, S., & Maria, M. H. (2022). Effect of *Penicillium chrysogenum* concentration on the production and characteristic of pectinase enzyme from pineapple (*Ananas comosus*) peel waste. *Jurnal Teknik Pertanian Lampung*, 11(2), 174-183.
- Davanso, M., Atsakou, A. E., Gattas, E. A. L., & de Paula, A. V. (2019). Assessment of pectinase-producing fungi isolated from soil and the use of orange waste as a substrate for pectinase production. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 40, Article e635.
- Doan, T. N. T., & Nguyen, T. A. T. (2022). Phân lập nấm mốc sinh pectinase từ một số vỏ quả và mật hoa dừa tại tỉnh Tiền Giang [Isolation of pectinase-producing molds from some fruit peels and coconut nectar in Tien Giang province]. *Proceedings of the National Conference on Biotechnology*.
- Do, T. H. (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 pectinase biosynthesis by *Aspergillus niger* using orange peel substrate]. *Journal of Science, Technology and Food*, 16, 79-88.
- Do, T. H., & Huynh, P. P. T. (2020). Bán tinh sạch và ứng dụng enzyme pectinase từ nấm mốc *Aspergillus niger* vào xử lý nước ép táo và nho [Partial purification and application of pectinase from *Aspergillus niger* in processing apple and grape juice]. *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science*, 15(1), 58-71.
- Ezike, T. C., Eze, S. O. O., Nsude, C. A., & Chilaka, F. (2014). Production of pectinases from *Aspergillus niger* using submerged fermentation with orange peels as carbon source. *Sylwan*, 158(8), 434-440.
- Haile, S., & Ayele, A. (2022). Pectinase from microorganisms and its industrial applications. *Scientific World Journal*, 2022, 1-15.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Application of pectinase in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
- Khan, I. G., & Barate, D. L. (2016). Effect of various parameters on activity of pectinase enzyme. *International Journal of Advanced Research*, 4(1), 853-862.
- Nehad, E. A. N., & Rahman, H. M. M. A. E. (2021). Optimizing the production of pectinase of orange peel waste by *Penicillium chrysogenum* MF318506 using response surface methodology in submerged fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(1), Article e3931. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.3931>

- Phan, T. T., Pham, T. N. L., Ngo, T. B. C., & Tran, Q. D. (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 several mold strains for research on cloning and expression of the pectinase gene]. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 127(1C), 95-106.
- Ranisiska, R., Pare, S., Langit, S., & Cahyani, R. T. (2024). A comparative study of pectins from peel and pulp of mangrove apple fruit: The functional properties and bioactivities. *Journal of Research in Pharmacy*, 28(6), 2027-2037.
- Shaibu, C., & Abah, M. A. (2024). Production and extraction of pectinase from *Penicillium citrinum* using tomato peel as a carbon source. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 11(6), 186-190.
- Tran, N. H., Nguyen, A. D., Mai, T. N. L. T., & Tran, T. N. N. (2016). Nghiên cứu thu nhận pectinase từ *A. niger* nuôi cấy trên môi trường bán rắn chứa cùi bưởi để nâng cao hiệu quả bóc vỏ tiêu [Study on obtaining pectinase from *A. niger* cultured on semi-solid medium containing pomelo peel to improve pepper peeling efficiency]. *Thu Dau Mot University*, 5(30), 82-83.
- Tran, T. T. (2013). Phân lập và tuyển chọn dòng *Aspergillus niger* sinh pectin methylesterase hoạt tính cao [Isolation and selection of *Aspergillus niger* strains producing high-activity pectin methylesterase] [Doctoral dissertation, Can Tho University].

**INVESTIGATION OF ENZYME PRODUCTION CONDITION
AND CHARACTERIZATION OF PECTINASE SECRETED BY FUNGI ISOLATED
FROM MANGROVE APPLE PEEL**

Doan Thi Ngoc Thanh*, Tran Ngoc Chi

Tien Giang University, Vietnam

*Corresponding author: Doan Thi Ngoc Thanh – Email: dtntanh@tgu.edu.vn

Received: May 08, 2025; Revised: June 04, 2025; Accepted: June 06, 2025

ABSTRACT

*Pectinase is an enzyme that catalyzes the pectin degradation reaction and is widely used in the food industry, obtained from many sources such as plants and microorganisms. This study aims to identify an isolated pectinase-producing fungus isolated from the mangrove apple peel, investigate the conditions of semi-solid-state, such as substrate, pH, and humidity for the best pectinase activity. Then, the conditions for protein precipitation and the effects of pH, temperature, and reaction time of the enzyme after precipitation were investigated. The results showed that the best pectinase-producing fungus isolated from the mangrove apple peel was identified as *Penicillium chrysogenum*. The environment containing grapefruit pulp, 40% humidity, and pH 4 was the best condition for the fungus to grow and produce pectinase. After precipitation with 75% ethanol, pectinase had the best activity at pH 5, 40°C after 90 minutes with 149,91 ± 6,54 UI/ml.*

Keywords: activity; mangrove apple peel; pectinase; *Penicillium chrysogenum*