

HOẠT TÍNH PECTINASE TỪ CHỦNG *BACILLUS LICHENIFORMIS* V114: ỨNG DỤNG XỬ LÝ NƯỚC ÉP HOA QUẢ VÀ BÓC VỎ CÂY

Nguyễn Nhật Linh¹, Đỗ Thị Tuyên^{1,2}, Lê Thanh Hoàng¹, Vu Thanh Tùng¹, Nguyễn Thị Thảo¹, Nguyễn Thị Ánh Tuyết¹, Nguyễn Thị Hiền Trang¹, Nguyễn Sỹ Lê Thanh¹, Lưu Minh Đức¹, Nguyễn Thị Trung², Đào Thị Mai Anh³, Nguyễn Thị Minh Phương¹, Phan Thị Hồng Thảo¹, Nguyễn Thị Hồng Liên^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Dược Hà Nội

TÓM TẮT

Pectinase là một enzyme đóng vai trò vô cùng quan trọng trong các ngành công nghiệp xanh. Trong nghiên cứu này, dịch nuôi cấy *Bacillus licheniformis* V114 được tinh sạch sơ bộ bằng các phương pháp kết tủa protein khác nhau, kết quả cho thấy phương pháp tủa muối amonium sulfat với nồng độ 60% cho hoạt tính pectinase cao nhất đạt $1319,656 \pm 63,688$ U/L. Điều kiện phản ứng thích hợp của pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 là 60°C trong pH trung tính. Không những vậy, enzyme này tương đối bền trong khoảng nhiệt độ từ 25 – 50°C khi giữ được hoạt tính trên 90% sau 75 phút ủ, tuy nhiên lại kém bền trong pH acid hoặc base. Với các chất dễ gây ảnh hưởng đến độ bền và hoạt tính của enzyme, pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 gần như không bị ảnh hưởng bởi DMSO và tăng nhẹ khi ủ với Tween 80 (115,4%), nhưng lại bị ức chế mạnh bởi CaCl₂, CuSO₄, và EDTA với hoạt tính còn lại lần lượt là 65,3%, 48,8% và 37,6%. Trong khi đó, SDS, HgCl₂ và FeSO₄ gây mất hoạt tính xúc tác phân hủy pectin của enzyme này chỉ sau 1 giờ ủ. Nước ép dưa được ủ với pectinase đạt được hiệu quả tốt nhất về hiệu suất thu hồi và độ trong ở nồng độ 10% trong 120 phút; trong đó, dịch enzyme tinh sạch sơ bộ cho hiệu quả tốt hơn. Kết quả thử nghiệm khả năng thủy phân của pectinase trên lớp cambi cho thấy hoạt tính cao nhất đạt $141,665 \pm 28,114$ U/L sau 30 phút ủ với vỏ cây, lượng đường khử tăng dần theo thời gian nhưng tốc độ phản ứng giảm dần trong khoảng thời gian ủ từ 30 phút đến 4 giờ.

Keywords: *Bacillus licheniformis* V114, bóc vỏ cây, pectinase, xử lý nước ép hoa quả.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, với sức tàn phá nặng nề từ các hóa chất, chất thải độc hại từ các nhà máy, xí nghiệp, trái đất đang phải đối mặt với hàng loạt các vấn đề nghiêm trọng như ô nhiễm không khí, thiếu hụt nước sạch, giảm đa dạng sinh học do ô nhiễm và mất nơi cư trú... Hệ lụy là biến đổi khí hậu khiến cho con người phải hứng chịu thời tiết khắc nghiệt và thiên tai với tần suất và hậu quả ngày càng lớn. Bởi vậy, vấn đề bảo vệ môi trường và phát triển bền vững đang là một tiêu điểm trong những thập kỷ gần đây. Enzyme, một chìa khóa xanh mang lại giải pháp cho các vấn đề môi trường đang ngày càng được quan tâm và ứng dụng. Một trong những enzyme được thương mại hóa và tiêu thụ lớn nhất chính là pectinase. Pectinase có ý nghĩa đặc biệt do chúng có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực quan trọng như thực phẩm, dệt may, đồ uống, bột giấy và giấy và các ngành công nghiệp nhiên liệu sinh học, khả năng tận dụng các chất thải nông nghiệp làm cơ chất và xử lý nước thải cho các ngành công nghiệp (Haile and Ayele, 2022). Các pectinase có nguồn gốc vi sinh vật chiếm 25% quy mô enzyme công nghiệp và thực phẩm trên toàn thế giới cũng như sự gia tăng thị trường theo thời gian. Pectinase, một enzyme thuộc nhóm hydrolase, là tập hợp của các enzyme thủy phân hợp chất pectic, chủ yếu có trong vi sinh vật và thực vật bậc cao. Các chất pectic là các polysaccharide phức tạp dạng keo, có tính acid, với mạch acid galacturonic dài và được liên kết với nhau bằng liên kết glycoside. Trong đó, pectin là một polysaccharide giàu đường rất quan trọng với thành phần chính là acid galacturonic và methanol, là một trong những thành phần chính của ngũ cốc, rau, trái cây và chất xơ. Pectinase tham gia vào quá trình trao đổi chất của thành tế bào cũng như sự phát triển của tế bào, sự lão hóa, quá trình chín của quả, quá trình sinh bệnh và rụng quả. Pectinase có thể được chiết xuất từ thực vật hay các loài vi sinh vật trong tự nhiên. Từ những năm 1970, pectinase đã được sản xuất thương mại từ vi sinh vật, đặc biệt là từ nấm (Haile and Ayele, 2022). Ngoài ra, vi khuẩn cũng là một nguồn pectinase tiềm năng. Trong đó, *Bacillus licheniformis* đã được báo cáo là vi khuẩn phân giải pectin rất tiềm năng với hoạt tính 341 U/mL, được phân lập từ rau củ đã hỏng (Rehman *et al.*, 2015). Tuy nhiên, độ bền và sự kém ổn định của enzyme được coi là một trong những hạn chế chính để đưa vào ứng dụng trong sản xuất. Tăng cường tính ổn định và duy trì mức độ hoạt động mong muốn trong thời gian dài là hai điểm quan trọng được xem xét khi lựa chọn pectinase. Bởi vậy, để góp phần tìm ra những ứng viên phù hợp, chúng tôi tiến hành nghiên cứu các đặc tính của pectinase từ chủng *Bacillus licheniformis* V114. Sau khi khám phá ra điều kiện thích hợp cho khả năng xúc tác

của pectinase, chúng tôi tiếp tục khảo sát tiềm năng của enzyme này vào ứng dụng làm trong nước hoa quả và bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống: Chủng *Bacillus licheniformis* V114 được cung cấp từ phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Vật liệu: Các mẫu vỏ cây được thu từ nhà máy giấy Bãi Bằng-Phú Thọ và An Hòa-Tuyên Quang. Dứa giống Queen (*Ananas comosus*) cung cấp bởi vựa dứa Ninh Bình, mua tại siêu thị WinMart. Các hóa chất sử dụng từ hãng Sigma-Aldrich (Mỹ), Merck, Serva (Đức), Himedia (Ấn Độ). Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều đạt tiêu chuẩn phân tích, ở dạng tinh khiết, được sử dụng trực tiếp hoặc pha loãng theo nồng độ phù hợp.

Môi trường nghiên cứu: Môi trường lên men pectinase (M2) (g/L): pectin 3,0; cao nấm men 5,0; ammonium sulphate 2,5; K_2HPO_4 2,5; KH_2PO_4 , 2,0 (pH 7,0) (Ghani *et al.*, 2013). Quá trình lên men sinh pectinase của chủng vi khuẩn được thực hiện ở 37°C trong 3 ngày với tốc độ lắc 180 vòng/phút. Dịch sau lên men được ly tâm 10000 vòng/phút, trong 10 phút, loại bỏ sinh khối thu dịch enzyme thô.

Tinh sạch sơ bộ bằng phương pháp kết tủa protein

Phương pháp tủa bằng dung môi: Sử dụng 4 loại dung môi khác nhau: methanol, ethanol, buthanol và aceton để tủa protein từ dịch enzyme thô của chủng *B. licheniformis* V114 theo tỷ lệ dung môi/dịch chiết là 4:1 (v/v). Giữ tủa trong điều kiện -20°C trong ít nhất 30 phút rồi ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút để thu lấy tủa.

Phương pháp tủa bằng muối amonium sunfat: Tủa protein ở 3 nồng độ muối: 30%, 60% và 80% (w/v). Cân một lượng muối đã tính toán theo nồng độ rồi đổ từ từ muối vào dung dịch protein trong điều kiện 0°C rồi để tủa ở -20°C qua đêm. Ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút rồi thu tủa (Wingfield, 2001). Tiến hành thẩm tích ở 0°C trong khoảng 8 - 9 giờ hoặc cho đến khi thử với $BaCl_2$ không còn tạo kết tủa trắng.

Điện di: Gel polyacrylamid được sử dụng để điện di protein với nồng độ 12,5% (Laemmli *et al.*, 1970). Mẫu protein được bổ sung đệm xử lý mẫu dye 5x với tỷ lệ mẫu/ dye là 5/1, biến tính ở 95°C trong 10 phút, sau đó để ở -20°C trong 1 phút. Tiến hành điện di bản gel rồi nhuộm bằng dung dịch nhuộm PAGE trong 1,5 - 2 giờ. Bản gel được tẩy màu bằng dung dịch tẩy PAGE đến khi hết màu xanh.

Xác định hoạt lực enzyme pectinase: Hoạt lực pectinase được xác định bằng phương pháp đo lượng đường khử sinh ra từ 0,5% (w/v) pectin phản ứng với 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA) hấp thụ cực đại ở 540 nm. Một đơn vị hoạt độ pectinase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol galacturonic acid trong điều kiện thí nghiệm (Alqahtani *et al.*, 2021).

Nghiên cứu tính chất lý hóa của pectinase

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính pectinase: Phản ứng của dịch enzyme và cơ chất pectin 0,5% (w/v) ở 50°C trong 30 phút được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau từ 25 - 60°C. Hoạt tính pectinase được xác định theo phương pháp quang phổ (Alqahtani *et al.*, 2021).

Khảo sát ảnh hưởng của pH lên hoạt tính và độ bền của pectinase: Dịch enzyme được pha loãng bởi đệm natri acetat 0,1 M pH 5,0; đệm 0,1 M Na citrate pH 6,5, đệm Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, sau đó tiến hành xác định hoạt tính theo phương pháp quang phổ (Alqahtani *et al.*, 2021). Với độ bền, dịch enzyme được ủ với đệm với các pH trên sau các khoảng thời gian 50 phút và 80 phút ở nhiệt độ phòng rồi xác định hoạt tính còn lại.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên độ bền của pectinase: Dịch enzyme được ủ từ 30 phút và 75 phút ở các nhiệt độ khác nhau từ 25 - 50°C. Xác định hoạt tính enzyme còn lại (Alqahtani *et al.*, 2021).

Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa lên hoạt tính của pectinase: Dịch enzyme được ủ với một số chất thường được sử dụng trong tẩy rửa như dimethyl sulfoxid (DMSO), Tween 80, SDS và EDTA với nồng độ 2% (v/v) trong 1 giờ. Xác định hoạt tính enzyme còn lại (Alqahtani *et al.*, 2021).

Ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính của pectinase: Dịch enzyme được ủ với các ion kim loại như $FeSO_4$, $CuSO_4$, $HgCl_2$ và $CaCl_2$ với nồng độ 2% (w/v) trong 1 giờ. Xác định hoạt tính enzyme còn lại (Alqahtani *et al.*, 2021).

Khảo sát ảnh hưởng của enzyme pectinase lên nước ép hoa quả

Các chỉ tiêu về chất lượng được khảo sát qua 5 nồng độ enzyme (0% - đối chứng, 4%, 6%, 8%, 10%) với 2 khoảng thời gian ủ là 60 phút và 120 phút trên mỗi 80 g nguyên liệu nước ép dứa. Tiến hành bất hoạt enzyme ở 85 - 90°C trong 5 phút, ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút, thu lấy dịch để đánh giá các tính chất tiếp theo.

Hiệu suất thu hồi: Là phần trăm khối lượng dịch ép hoa quả thu được sau khi xử lý bằng enzyme so với khối lượng ban đầu.

Độ trong: Đo quang phổ hấp thụ dịch quả ở bước sóng 450 nm: % Độ trong = $(OD_{DC} - OD_{TN}) / OD_{DC} \times 100\%$

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

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

Ảnh hưởng của enzyme đến quá trình bóc vỏ cây

Dịch enzyme pha loãng đến nồng độ 50 - 100 U/L, ủ với lớp cambi của vỏ cây theo tỷ lệ 500 mL/100 g. Mẫu đối chứng thay enzyme bằng nước máy. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ, lấy mẫu 30 phút/lần, đo pH dịch ngâm, kiểm tra hoạt lực enzyme còn lại và hàm lượng đường khử (glucose) (Raettoe *et al.*, 1993).

Xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý bằng phần mềm MS excel 2016, Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các giá trị được biểu diễn dưới dạng $\bar{A} \pm SD$ (\bar{A} là giá trị trung bình).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

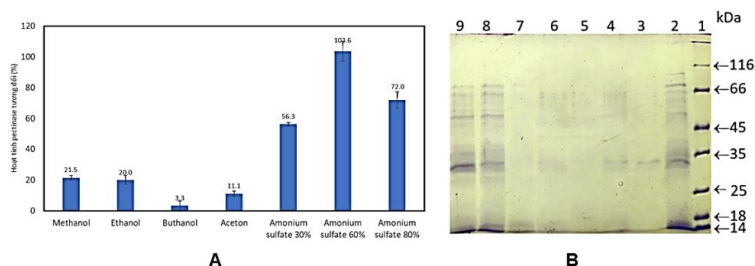
Kết quả nghiên cứu thu nhận enzyme pectinase từ dịch lên men

Các dịch enzyme thô được tinh sạch sơ bộ bằng 2 phương pháp: Phương pháp tủa bằng dung môi và phương pháp tủa muối amonium sulfate bão hòa. Kết quả được trình bày trong Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Hoạt tính pectinase sau khi tủa bằng các phương pháp khác nhau

Phương pháp tủa	Hoạt tính pectinase (U/L)	Hoạt tính tương đối (%)	Hàm lượng protein ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất (%)
Dịch enzyme thô	1268,445 \pm 63,672	100 \pm 1,4	161,949 \pm 8,159	100,0 \pm 5,0
Methanol	274,143 \pm 14,244	21,5 \pm 2,8	47,590 \pm 3,082	29,4 \pm 1,9
Ethanol	254,382 \pm 13,738	20,0 \pm 3,1	62,974 \pm 1,269	38,9 \pm 0,8
Buthanol	42,242 \pm 2,303	3,3 \pm 1,6	40,538 \pm 0,363	25,0 \pm 0,2
Aceton	141,363 \pm 7,365	11,1 \pm 1,1	72,077 \pm 2,176	44,5 \pm 1,3
Amonium sulfate nồng độ 30%	717,136 \pm 34,762	56,3 \pm 6,4	88,308 \pm 2,901	54,5 \pm 1,8
Amonium sulfate nồng độ 60%	1319,656 \pm 63,688	103,6 \pm 5,5	230,359 \pm 15,230	142,2 \pm 9,4
Amonium sulfate nồng độ 80%	916,620 \pm 44,931	72,0 \pm 1,5	233,949 \pm 29,010	144,5 \pm 17,9

Pectinase được chia thành ba nhóm: (1) Hydrolase bao gồm polygalacturonase, PG; (2) Lyase/trans-eliminase bao gồm pectin lyase, PNL và pectate lyase, PL và (3) Pectin esterase, PE. Các pectinase từ các chủng khác nhau cũng có các khối lượng phân tử khác nhau như pectinase từ chủng *Bacillus* sp. DT7 (thuộc nhóm pectin lyase) nặng 106 kDa (Kashyap *et al.*, 2000), một loại pectinase lyase khác từ *B. subtilis* có khối lượng phân tử là 38 kDa (Saharan and Sharma, 2019), một báo cáo khác về pectinase bền nhiệt và chịu được acid có khối lượng 36 kDa (Demir *et al.*, 2011). Ngoài ra, cũng có các nghiên cứu báo cáo khối lượng phân tử pectinase nhỏ hơn, chẳng hạn như chủng *Bacillus subtilis* BK-3 với kích thước chỉ khoảng 33kDa (Prajapati *et al.*, 2021). Các mẫu tủa dung môi và tủa muối đều xuất hiện một băng đậm có khối lượng < 35kDa, tuy nhiên các mẫu tủa khác nhau thì thu được hàm lượng protein là khác nhau, đậm nhất ở mẫu tủa muối amonium sulfate nồng độ 60% và 80% (w/v) (Hình 1).



Hình 1. Pectinase tủa bằng các phương pháp khác nhau

A. Hoạt tính tương đối của pectinase so với ban đầu; B. Điện di đồ SDS-PAGE các mẫu tủa protein: 1-Marker; 2-Pectinase gốc; 3-tủa methanol; 4-tủa ethanol; 5-tủa buthanol; 6-tủa aceton; 7-tủa muối 30%; 8-tủa muối 60%; 9-tủa muối 80% (w/v).

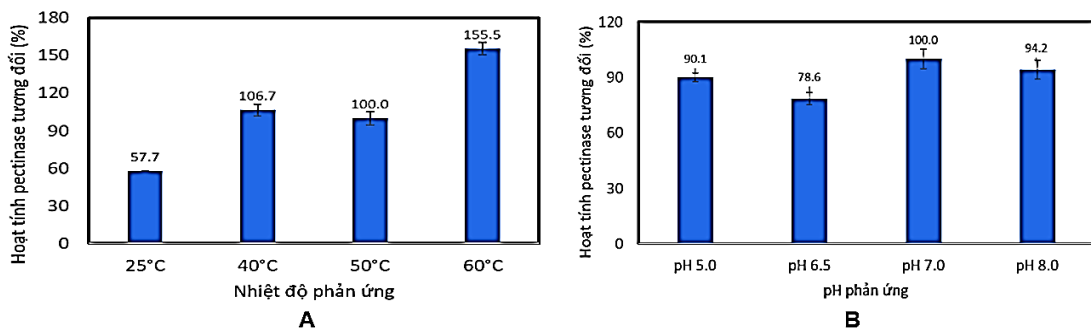
Phương pháp tủa muối đã không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme và là bước tinh sạch sơ bộ ban đầu thu nhận enzyme (Hình 1B). Từ những số liệu thu được, nhận thấy phương pháp tủa bằng muối amonium sulfate với nồng độ 60% (w/v) cho hoạt tính cao nhất, đạt 1319,656 \pm 63,688 U/L, tương đương với 103,6 \pm 5,5% so với

hoạt tính của dịch nuôi cấy ban đầu. Như vậy, phương pháp tủa muối amonium sulfate nồng độ 60% (w/v) được lựa chọn để thu dịch tinh sạch sơ bộ để đánh giá một số tính chất lý hóa trong các nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu một số tính chất của enzyme pectinase

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH phản ứng lên hoạt tính pectinase

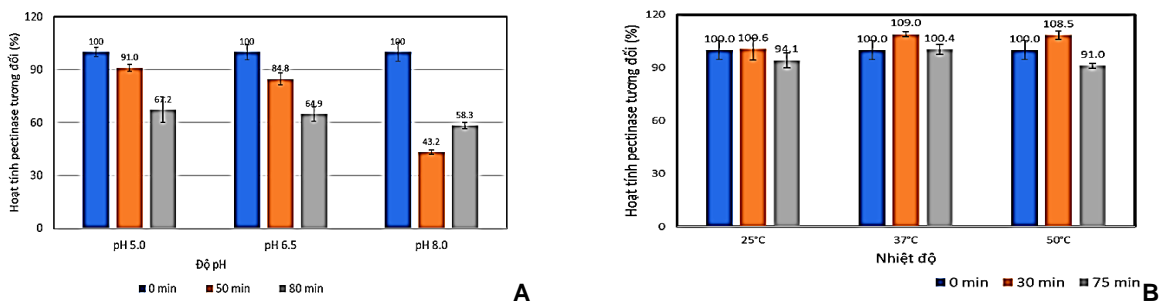
Phản ứng của dịch enzyme sau tủa muối amonium sulfate ở nồng độ 60% (w/v) và cơ chất pectin 0,5% (w/v) được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau từ 25 - 60°C để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng lên hoạt tính của pectinase. Song song, khảo sát pH phản ứng tối ưu sử dụng dịch enzyme pha loãng trong các đệm 0,1 M pH 5,0 - 8,0. Hoạt tính tương đối ở nhiệt độ 25°C tương đối thấp, chỉ còn 57,7%; trong khi đó, ở 60°C, hoạt tính của pectinase tăng mạnh đến trên 155% so với nhiệt độ phản ứng ở phương pháp gốc (50°C). Như vậy, nhiệt độ thích hợp cho phản ứng thử hoạt tính pectinase là 60°C. Một số nhóm nghiên cứu trước đây cho rằng pectinase từ chi *Bacillus*, hoạt động tối ưu trong khoảng nhiệt độ 45 - 60°C ((Rehman *et al.*, 2015), nhưng thấp hơn so với pectinase của *B. licheniformis* UNP-1 khi phản ứng ở 80°C (Jadhav and Pathak, 2019). Khảo sát pH phản ứng thích hợp, cho thấy hoạt tính pectinase tương đối đạt trên 70% trong khoảng pH phản ứng 5,0 - 8,0, Hoạt tính pectinase đạt cực đại ở pH trung tính 7,0. Kết quả này tương đồng với pectinase từ *Bacillus* hoạt động trong khoảng pH thích hợp 5,0 - 8,0 (Alqahtani *et al.*, 2021, Prajapati *et al.*, 2021).



Hình 2. Ảnh hưởng của điều kiện phản ứng lên hoạt tính pectinase
A. Ảnh hưởng của nhiệt độ; B. Ảnh hưởng của Ph.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến độ bền của pectinase

Pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 tương đối bền sau 50 phút ủ ở pH acid, ngược lại, enzyme kém bền hơn khi được ủ với pH 8,0 với hoạt tính giảm mạnh còn 43,2%; tuy nhiên sau 75 phút, hoạt tính còn lại đều không đến 70%. Như vậy, pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 không bền trong môi trường base cũng như môi trường acid khi tiếp xúc một khoảng thời gian dài.

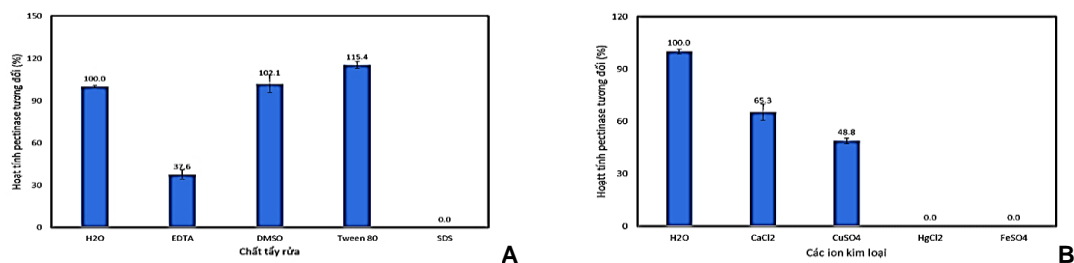


Hình 3. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên độ bền của pectinase
A: Ảnh hưởng của pH; B: Ảnh hưởng của nhiệt độ.

Trong khi đó, *B subtilis* BK-3 sản xuất được pectinase bền trong dải pH rộng từ 4,0 - 10,0 (Prajapati *et al.*, 2021), độ bền pH của pectinase từ *B. licheniformis* KIBGE-IB21 lại nằm trong vùng base 8,0 - 10,0 (Rehman *et al.*, 2015). Pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 tương đối bền ở nhiệt độ từ 25°C đến 50°C khi giữ được hoạt tính trên 90% sau khi ủ 75 phút ở cả 3 nhiệt độ (Hình 3B), kết quả này đồng thuận với các pectinase khác có nguồn gốc từ *Bacillus* (Rehman *et al.*, 2015, Prajapati *et al.*, 2021).

Ảnh hưởng của các chất tẩy rửa và ion kim loại lên hoạt tính của pectinase

Dịch enzyme được ủ với một số chất thường được sử dụng trong tẩy rửa như dimethyl sulfoxid (DMSO), Tween 80, SDS và EDTA nồng độ 2% (w/v); ủ với FeSO₄, CuSO₄, HgCl₂ và CaCl₂ nồng độ 2% (w/v) trong 1 giờ.



Hình 4. Ảnh hưởng của các chất ức chế lên hoạt tính pectinase

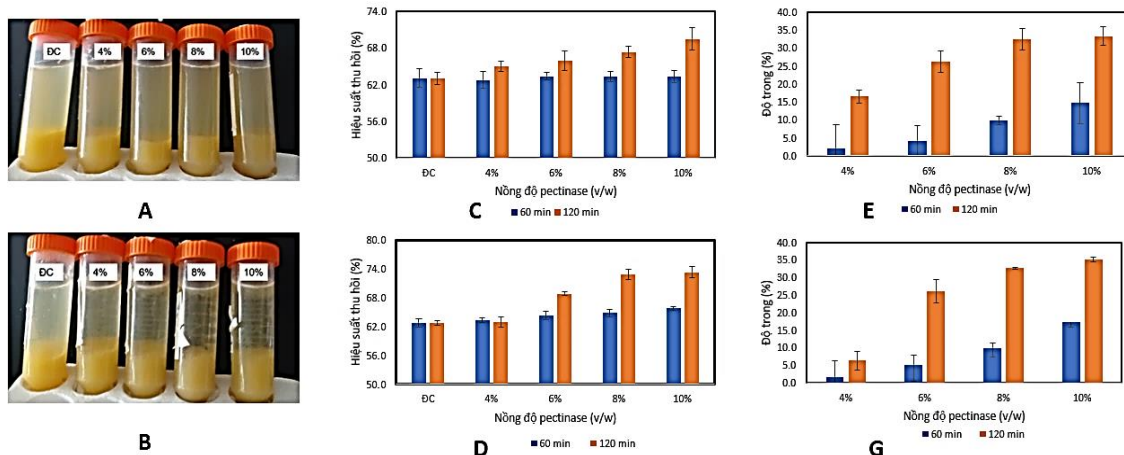
A. Chất tẩy rửa; B. Ion kim loại.

Trong các loại chất diện hoạt, SDS làm mất khả năng phân giải pectin sau 1 giờ ủ và EDTA gây giảm hoạt tính đáng kể, còn 37,6 ± 3,4 %. Mặt khác, DMSO gần như không ảnh hưởng hoạt tính pectinase còn Tween 80 có xu hướng giúp tăng hoạt tính của pectinase. Dựa vào tính chất này, có thể phối hợp pectinase vào các chất hoạt động bề mặt để tăng hiệu quả làm sạch (trong tẩy rửa) hay bóc vỏ (trong công nghiệp nhẹ) cũng như ứng dụng trong các ngành công nghiệp thích hợp. Kết quả cũng cho thấy ion Ca²⁺ và Cu²⁺ làm giảm đáng kể hoạt tính của pectinase sau 1 giờ ủ, trong khi HgCl₂ và FeSO₄ làm mất hoàn toàn hoạt tính của enzyme. Một số nghiên cứu pectinase từ *Bacillus* khác lại cho thấy Ca²⁺ không ảnh hưởng hoặc làm tăng hoạt tính của pectinase, trong khi Hg, Fe, Cu và một số kim loại nặng khác đều có tác động tiêu cực đến hoạt tính của enzyme này (Alqahatani *et al.*, 2021, Prajapati *et al.*, 2021).

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pectinase lên nước ép hoa quả

Sau khi ủ pectinase với dịch ép dứa 60 phút và 120 phút, hiệu suất thu hồi được thể hiện trong hình 5. Qua hình 5A và 5B, nồng độ pectinase 8% và 10% (w/v) trong 120 phút làm cho dịch ép dứa trở nên trong suốt rõ rệt. Điều này cũng được chứng minh thông qua với kết quả đo độ thu hồi và độ trong của dịch ép sau khi xử lý bằng pectinase.

Với dịch pectinase thô, trừ mẫu đối chứng không thay đổi hiệu suất thu hồi theo thời gian ủ, các mẫu nước ép dứa có ủ với pectinase đều có hiệu suất và độ trong tăng dần theo thời gian. Trong đó, hiệu suất tốt nhất đạt được ở nồng độ 10% sau khi ủ 120 phút, cao hơn mẫu đối chứng 6,4% (Hình 5C); cũng tại nồng độ này, độ trong cao nhất đạt 33,4% sau 120 phút ủ (Hình 5E). Xu hướng tương tự cũng xảy ra khi sử dụng pectinase tủa muối ở nồng độ 60%. Nồng độ và thời gian tối ưu cho xử lý nước ép trái cây là 10% trong 120 phút, với độ trong đạt 35,1% và độ thu hồi đạt 73,3%, cao hơn so với kết quả của dịch enzyme ban đầu (Hình 5D và 5G).



Hình 5. Ảnh hưởng của pectinase lên nước ép dứa

A, B: Cảm quan dịch ép dứa sau khi ủ với các nồng độ khác nhau ở lần lượt 60 phút và 120 phút; C: Hiệu suất thu hồi khi ủ với pectinase thô; D: Hiệu suất thu hồi sau khi ủ với pectinase tinh sạch sơ bộ; E: độ trong dịch ép dứa khi ủ với pectinase thô; G: Độ trong của dịch ép dứa khi ủ với pectinase tinh sạch sơ bộ.

Mặt khác, hiệu suất thu hồi dịch dứa khi ủ với pectinase Fluka ở nồng độ 0,03% (w/w) đạt 85,29%; còn độ trong có thể lên đến gần 40% (Tochi *et al.*, 2009). Như vậy, khả năng làm trong của pectinase từ *B. licheniformis* V114 tương đối tốt khi sử dụng ở nồng độ cao, giúp tăng giá trị thẩm mỹ và hiệu quả trong xử lý nước ép hoa quả.

Ảnh hưởng của pectinase đến khả năng bóc vỏ cây

Để có thể ứng dụng pectinase vào quá trình bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng ở quy mô pilot và nâng lên quy mô công nghiệp, cần có đánh giá ban đầu về tác động của pectinase đến vỏ cây. Thử nghiệm khả năng thủy phân pectin trên lớp cambi của vỏ cây gỗ keo, sử dụng pectinase ban đầu có hoạt lực là 54,782 ± 1,368 U/L.

Lượng đường khử mà pectinase tạo ra ở mẫu thí nghiệm (có enzyme) tăng dần theo thời gian và luôn cao hơn so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, tốc độ phản ứng giảm dần và hoạt tính pectinase chỉ còn $61,251 \pm 1,235$ U/L sau 4 giờ ủ. Hoạt tính cao nhất đạt $141,665 \pm 28,114$ U/L sau 30 phút ủ với với vỏ cây theo tỷ lệ 50mL enzyme/10 g vỏ cây ở nhiệt độ phòng, cao hơn nhiều so với hoạt tính ban đầu khi phân hủy cơ chất pectin ở 50°C. Như vậy, pectinase từ chủng *B. licheniformis* V114 hoàn toàn có khả năng thủy phân pectin trong lớp cambi của vỏ cây gỗ keo, cho thấy tiềm năng ứng dụng pectinase trong quá trình bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng. Mặt khác, Raetoe và đồng tác giả (1993) khi sử dụng pectinase nồng độ 185 nkat/mL, năng lượng tiêu thụ trong quá trình bóc vỏ cây vãn sam đã giảm tới 80% (Raetoe *et al.*, 1993). Do thành phần phức tạp của lớp cambi, có thể cần phối hợp với các hydroxylase khác thủy phân các thành phần vỏ bên trong khác nhau để tách vỏ cây hiệu quả hơn.

Bảng 2. Kết quả hoạt tính pectinase phân hủy lớp cambi của vỏ cây

Thời gian (phút)	Nồng độ đường khử ($\mu\text{mol/mL}$)		Hoạt tính (U/L)
	Mẫu enzyme	Mẫu đối chứng	
30	$11,092 \pm 1,066$	$7,352 \pm 0,306$	$141,665 \pm 28,114$
60	$15,648 \pm 0,720$	$8,212 \pm 0,300$	$123,934 \pm 12,002$
120	$19,497 \pm 1,038$	$9,765 \pm 0,388$	$81,104 \pm 8,647$
180	$19,323 \pm 0,319$	$6,933 \pm 0,242$	$68,833 \pm 1,773$
240	$21,531 \pm 0,296$	$6,831 \pm 0,296$	$61,251 \pm 1,235$

KẾT LUẬN

Pectinase từ chủng *Bacillus licheniformis* V114 được tinh sạch sơ bộ bằng phương pháp tủa muối amonium sulfate nồng độ 60% để thu được hoạt tính cao nhất đạt $103,6 \pm 5,5\%$. Enzyme này tương đối bền trong khoảng nhiệt độ từ 25 – 50°C, tuy nhiên kém bền trong pH acid hoặc base. Ngoài DMSO và Tween 80 không làm giảm hoạt tính, SDS, EDTA và các ion kim loại đều ức chế hoạt tính phân hủy pectin sau 1 giờ ủ. Trong xử lý nước ép hoa quả, ở nồng độ 10% và sau 2 giờ ủ, pectinase từ *B. licheniformis* V114 cho hiệu quả làm trong tốt nhất. Bên cạnh đó, khi ngâm với lớp cambi của vỏ cây, hoạt tính phân hủy pectin hoạt động hiệu quả với hoạt tính cao nhất đạt được sau 30 phút ủ ($141,665 \pm 28,114$ U/L) và tốc độ phản ứng giảm dần theo thời gian.

Lời cảm ơn: Công trình được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu quy trình công nghệ và mô hình thiết bị sản xuất chế phẩm enzyme pectinase và hemicellulase ứng dụng bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng” mã số ĐTKHCN.017/22 cấp Bộ Công thương và trang thiết bị của Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alqahtani F, Aly M, Bokhari F, El-Nouet B, Alshehri W (2021). Isolation and Characterization of Exopectinase from *Bacillus licheniformis* FMB9 Isolated from Agricultural Soil. *J Contemp Med Sci*, 7(5): 308-314.
- Demir N, Nadaroglu H, Tasgin E, Adiguzel A & Gulluce M (2011). Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its application in fruit juice production. *Ann Microbiol*, 61: 939-946.
- Ghani M, Ansari A, Aman A, Zohra RR, Siddiqui NN, Qader SAU (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak J Pharm Sci*, 26(4): 691-697.
- Haile S and Ayele A (2022). Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *Sci World J*, Article ID 1881305, 15 pages.
- Jadhav SR, Pathak AP (2019). Production and characterization of a thermo-pH stable pectinase from *Bacillus licheniformis* UNP-1: A novel strain isolated from Unapdev hot spring. *Indian J Geo Mar Sci*, 48(5): 670-677.
- Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R (2000). Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J Microbiol Biotechnol*, 16: 277-282.
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*, 47(1): 69-85.
- Prajapati J, Dudhagara P and Patel K (2021). Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification. *Biocatal Agric Biotechnol*, 35: 102063.
- Raetoe M, Kantelinen A, Bailey A, Viikari L (1993). Potential of enzymes for wood debarking. *Tappi J* (United States), 76:2.
- Rehman HU, Aman A, Nawaz MA, Qader SA (2015). Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. *Food Hydrocoll*, 43: 819-824.
- Saharan R and Sharma KP (2019). Production, purification and characterization of pectin lyase from *Bacillus subtilis* isolated from moong beans leaves (*Vigna radiata*). *Biocatal Agric Biotechnol*, 21: 101306.
- Tochi BN, Wang Z, Xu SY and Zhang W (2009). The Influence of a Pectinase and Pectinase/hemicellulases Enzyme Preparations On percentage Pineapple Juice Recovery, Particulates and Sensory Attributes. *Pak J Nut*, 8: 1184-1189.
- Wingfield P (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci*, Appendix 3: p. Appendix 3F.

PECTINASE ACTIVITY FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS* V114 STRAIN: APPLICATION IN FRUIT JUICE TREATMENT AND WOOD DEBARKING

Nguyen Nhat Linh¹, Do Thi Tuyen^{1,2}, Le Thanh Hoang¹, Vu Thanh Tung¹, Nguyen Thi Thao¹,
Nguyen Thi Anh Tuyet¹, Nguyen Thi Hien Trang¹, Nguyen Sy Le Thanh¹, Luu Minh Duc¹,
Nguyen Thi Trung², Dao Thi Mai Anh³, Nguyen Thi Minh Phuong¹, Phan Thi Hong Thao¹, Nguyen Thi Hong Lien^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Department of Biochemistry, Hanoi University of Pharmacy

SUMMARY

Pectinase is an enzyme that is of crucial importance in ecologically responsible industries. In this study, *Bacillus licheniformis* V114 culture supernatant was preliminarily purified utilizing several protein precipitation techniques, ammonium sulfate salt precipitation at 60% concentration resulted in the highest pectinase activity of 1319.656 ± 63.688 U/L, which retained the initial activity with $103.6 \pm 5.5\%$. Pectinase from *B. licheniformis* strain V114 reacted optimally at 60°C and neutral pH. After 75 minutes of incubation, this enzyme maintained about 90% of its activity at 25–50°C; however, its stability decreased at acidic or basic pH. *B. licheniformis* strain V114 pectinase was unaffected by DMSO and activated by Tween 80 (115.4%). While CaCl₂, CuSO₄, and EDTA severely inhibited this enzyme, yielding 65.3%, 48.8%, and 37.6% residual activity; SDS, HgCl₂, and FeSO₄ totally inhibited the catalytic activity. The highest recovery efficiency and clarity were achieved by incubating pineapple juice with 10% pectinase enzymes for 120 minutes, in which, the initially purified enzyme solution yielded improved outcomes. The pectinase hydrolysis capability on the cambium layer peaked at 141.665 ± 28.114 U/L after 30 minutes. During the 30 minutes to 4 hours incubation period, the reducing sugar concentration increased but the response rate decreased.

Keywords: *Bacillus licheniformis* V114, fruit juice treatment, pectinase, wood debarking.

* Author for correspondence: Tel: 024.37916882; Email: nhlien@ibt.ac.vn