

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

LÊ THỊ THU TRANG

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TỔNG HỢP
PECTINESTERASE VÀ POLYGALACTURONASE
CỦA *ASPERGILLUS NIGER*

Chuyên ngành: Công nghệ Thực phẩm và Đồ uống
Mã số : 60 54 02

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT

Đà Nẵng - Năm 2011

Công trình được hoàn thành tại
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: **PGS. TS. Trần Thị Xô**

Phản biện 1: **TS. Huỳnh Ngọc Thạch**

Phản biện 2: **PGS.TS. Lê Tự Hải**

Luận văn được bảo vệ tại Hội đồng chấm Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ kỹ thuật họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 03 tháng 12 năm 2011.

Có thể tìm hiểu luận văn tại:

- Trung tâm Thông tin - Học liệu, Đại học Đà Nẵng
- Trung tâm Học liệu, Đại học Đà Nẵng.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Enzyme pectinase bao gồm nhiều loại enzyme khác nhau như polygalacturonase, pectinesterase, pectolyase,... xúc tác thủy phân các phân tử pectin tạo các sản phẩm khác nhau. Trong đó, hai enzyme polygalacturonase (PG) và pectinesterase (PE) được nghiên cứu nhiều. PE xúc tác thủy phân liên kết ester của acid pectic với nhóm methyl giải phóng ra pectate và methanol. Các pectate dễ kết lắng, đặc biệt trong điều kiện có ion Ca^{2+} , làm sản phẩm kém ổn định đồng thời rượu methanol cũng là thành phần không mong muốn trong sản phẩm, do đó cần hạn chế hoạt động của PE. PG xúc tác thủy phân liên kết α -(1,4)-D-galacturonic trong phân tử pectin để tạo thành acid galacturonic có phân tử lượng nhỏ hơn và khó kết lắng hơn, giúp sản phẩm ổn định hơn. Vì vậy, một hệ enzyme có hoạt độ các enzyme PG cao và PE thấp là một yêu cầu cần thiết cho sản xuất.

Với ưu điểm là dễ nuôi cấy, sinh trưởng và phát triển nhanh cho nhiều enzyme trong một thời gian ngắn, vi sinh vật, đặc biệt là nấm mốc được sử dụng phổ biến để nuôi cấy thu enzyme pectinase thương mại, trong đó, *A. niger* là chủng sinh enzyme pectinase nhiều.

Xuất phát từ những vấn đề trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu, xây dựng đề tài: **“Nghiên cứu khả năng tổng hợp pectinesterase và polygalacturonase của *Aspergillus niger*”**

2. Mục đích nghiên cứu

- Phân lập chủng nấm mốc *A. niger* từ các nguồn trái cây giàu pectin.

- Xác định các điều kiện tối ưu để chủng nấm mốc *Aspergillus niger* có khả năng sinh tổng hợp enzyme polygalacturonase với hoạt độ cao và enzyme pectinesterase có hoạt độ thấp.

- Xác định đặc điểm của các enzyme.

3. Phạm vi nghiên cứu

Phân lập chủng nấm mốc *Aspergillus niger* từ tự nhiên.

Đánh giá hoạt độ enzyme pectinase từ các chủng nấm mốc đã phân lập được.

Nghiên cứu ảnh hưởng của sự thay đổi hàm lượng pectin, pH ban đầu và thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp enzyme polygalacturonase và pectinesterase của chủng *A.niger*.

Tối ưu hoá khả năng sinh tổng hợp enzyme polygalacturonase và pectinesterase của *A. niger*.

4. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp hóa học:

Phương pháp chuẩn độ xác định hoạt độ enzyme.

- Phương pháp hóa lý:

Sử dụng pH kế để đo pH của môi trường trước lên men;

Phương pháp so màu để xác định hoạt độ enzyme.

- Phương pháp vi sinh vật:

Phương pháp cấy trên môi trường đặc để phân lập nấm mốc;

Phương pháp quan sát đặc tính sinh lý của vi sinh vật;

Phương pháp nuôi cấy bề mặt để lên men tổng hợp enzyme.

- Phương pháp toán học:

Sử dụng quy hoạch thực nghiệm toàn phần 3 yếu tố để khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố đến hoạt độ enzyme PG và PE;

Sử dụng công cụ Solver tìm các điều kiện lên men tối ưu cho sinh tổng hợp polygalacturonase và pectinesterase.

- Phương pháp tinh sạch enzyme qua cột sắc kí và điện di SDS-PAGE

5. Ý nghĩa khoa học của đề tài

Xác định được điều kiện nuôi cấy tối ưu để chủng nấm mốc *A.niger* tổng hợp enzyme PG và PE có hoạt độ thích hợp bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm và tối ưu hoá.

Xác định được các đặc điểm của enzyme polygalacturonase của chủng *A.niger*.

6. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Đặt ra được cơ sở cho việc xác định các điều kiện sản xuất enzyme pectinase có hoạt độ thích hợp, phù hợp với yêu cầu sản xuất, góp phần phát triển ngành công nghiệp vi sinh ở nước ta.

7. Cấu trúc của luận văn

Ngoài phần mở đầu, kết luận và tài liệu tham khảo, trong luận văn bao gồm các chương, mục sau:

- + Chương 1: Tổng quan;
- + Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu;
- + Chương 3: Kết quả và thảo luận.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. ENZYME PECTINASE

1.1.1. Đặc điểm cơ chất

1.1.1.1. Giới thiệu về pectin

1.1.1.2. Cấu tạo pectin

Pectin là những polysaccharide chứa acid α -(1-4) polygalacturonic ở mạch chính, có thể bị methyl hóa hoặc acetyl hóa một cách ngẫu nhiên.

Có ba loại pectin khác nhau được chiết tách từ thành tế bào thực vật.

* **Homogalacturonan**

* **Rhamnogalacturonan I (RG I)**

* **Rhamnogalacturonan II (RG II)**

1.1.1.3. Phân loại pectin

* **Acid pectic**

* **Acid pectinic**

* **Pectin (Polygalacturonate)**

1.1.2. Phân loại và cơ chế phản ứng của enzym pectinase

1.1.2.1. Enzyme pectinesterase (PE) (EC.3.1.11.1)

Pectinesterase hay còn được gọi với một số tên khác như pectinmethylesterase, pectase, pectin methoxylase, pectin demethoxylase và pectolipase, thuộc nhóm enzyme thủy phân.

Enzyme PE xúc tác quá trình thủy phân liên kết ester trong phân tử pectin, giải phóng ra methanol và acid pectic hoặc acid pectinic.

1.1.2.2. Enzyme polygalacturonase (PG)

PG là enzyme xúc tác sự thủy phân liên kết α -(1-4) glycoside trong phân tử pectin. Polygalacturonase là một phức hệ enzyme gồm nhiều enzyme và thường có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất.

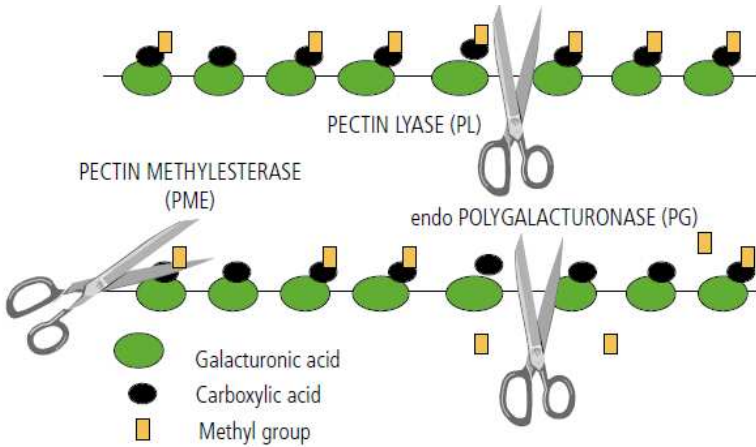
* **Polymethylgalacturonase** tác dụng chủ yếu lên các ester methylic của các acid polygalacturonic. Các enzyme này được chia làm hai nhóm nhỏ tùy theo liên kết glycoside bị cắt đứt:

- *Endo-glucosidase-polymethylgalacturonase* kiểu I
- *Exo-glucosidase-polymethylgalacturonase* kiểu III

* **Polygalacturonase** là các enzyme tác động chủ yếu lên acid pectinic và acid pectic. Các enzyme này cũng được chia làm hai nhóm dựa vào vị trí liên kết glycoside bị thủy phân.

- *Endo-glucosidase-polygalacturonase* kiểu II
- *Exo-glucosidase-polygalacturonase* kiểu IV

1.1.2.3. Pectin lyase (PEL)



Hình 1.7: Mô hình hoạt động của hệ enzyme pectinase

1.1.3. Ứng dụng của enzym pectinase

1.1.3.1. Ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm

- * Sản xuất nước quả
- * Sản xuất rượu vang đỏ
- * Lên men trà và cà phê
- * Sản xuất tinh dầu

1.1.3.2. Ứng dụng trong các ngành công nghiệp khác

- * Trong công nghiệp dệt và xử lý sinh học cotton
- * Trong xử lý nước thải
- * Trong sản xuất thức ăn chăn nuôi

1.1.4. Vi sinh vật tổng hợp pectinase

- * Pectinesterase
- * Polygalacturonase

1.2. NẤM MỐC *ASPERGILLUS NIGER*

1.2.1. Giới thiệu chung về nấm mốc

1.2.1.1. Hình thái và cấu tạo

1.2.1.2. Sinh sản của nấm mốc

***Sinh sản vô tính**

*** Sinh sản hữu tính**

1.2.2. Nấm mốc *Aspergillus niger*

1.2.2.1. Hình dạng, kích thước, cấu tạo của chủng *Aspergillus niger*

1.2.2.2. Dinh dưỡng và tăng trưởng của *Aspergillus niger*

1.2.3. Sinh sản của chủng *Aspergillus niger*

1.2.4. Vị trí và vai trò của *Aspergillus niger*

1.3. QUÁ TRÌNH THU NHẬN ENZYME PECTINASE TỪ VI SINH VẬT

1.3.1. Tuyển chọn và cải tạo giống

1.3.2. Nuôi cấy vi sinh vật

1.3.3. Thu nhận chế phẩm enzyme

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC VÀ TRÊN THẾ GIỚI VỀ ENZYME PECTINASE

1.4.1. Những nghiên cứu ngoài nước

1.4.2. Những nghiên cứu trong nước

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng

Các loại quả giàu pectin như chanh, cam, bưởi trên địa bàn thành phố Đà Nẵng.

Chủng *A. niger* ở phòng thí nghiệm vi sinh, khoa hóa trường Đại học Bách Khoa.

2.1.2. Hoá chất

2.1.3. Dụng cụ - Thiết bị

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp cấy trên môi trường đặc để phân lập nấm mốc

2.2.2. Phương pháp nuôi cấy nấm mốc trên môi trường thạch Czapek để quan sát đặc điểm sinh lý và xác định hoạt độ enzyme

* *Quan sát đại thể*

* *Quan sát vi thể*

* *Thử hoạt tính enzyme pectinase*

2.2.3. Phương pháp nuôi cấy bề mặt để lên men sinh enzyme

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt độ enzyme

2.2.4.1. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

2.2.4.2. Phương pháp xác định hoạt độ polygalacturonase

2.2.4.3. Phương pháp xác định hoạt độ pectinesterase

2.2.5. Phương pháp chiết tách và tinh sạch enzyme

2.2.6. Phương pháp xác định hàm lượng protein


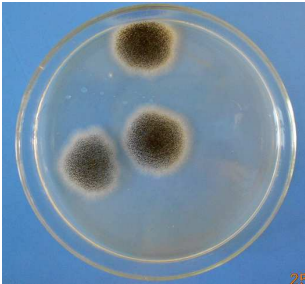
2.2.7. Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide

2.2.8. Phương pháp toán học

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP NẤM MỐC TỪ CÁC NGUỒN TỰ NHIÊN

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái của các chủng nấm mốc

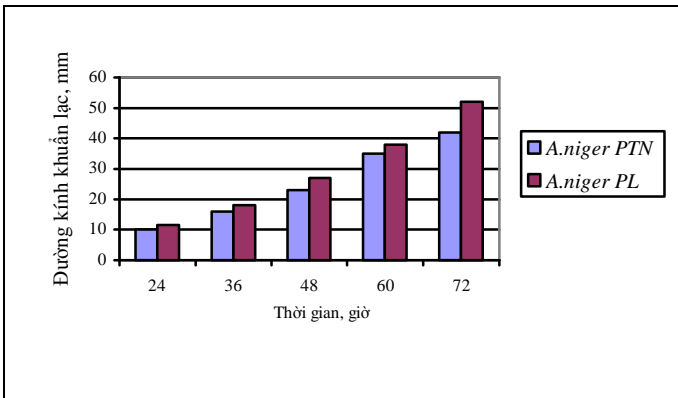
Đặc điểm	Chủng nấm mốc <i>A.niger</i> PTN	Chủng nấm mốc PL
Sợi nấm	Sợi nấm có màu trắng đục, hệ sợi cơ chất như rễ chùm của thực vật.	Sợi nấm có màu trắng đục, hệ sợi cơ chất trong môi trường như rễ cây.
Khuẩn lạc	<p>Khuẩn lạc chủ yếu có hình tròn, bề mặt lồi, xốp, mép khuẩn lạc dạng dày đều.</p> <p>Khóm nấm mốc có đường kính 5 cm sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch Czapek.</p> <p>Khóm nấm mốc có màu đen, lấm tẩm như bã cà phê.</p> 	<p>Khuẩn lạc có hình tròn, xốp, mép dày, đều.</p> <p>Khóm nấm mốc có đường kính 5,2 cm sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường thạch Czapek.</p> <p>Khóm nấm mốc có màu nâu đen, lấm tẩm như bã cà phê.</p> 

Bào tử đỉnh	Đỉnh bào tử tỏa đều ra các hướng. thể bình có hình chai, hai lớp. Cuống bào tử có vách trơn. Hạt đỉnh có hình cầu.	Bông hình cầu, có màu đen. Cuống bào tử có vách trơn. Hạt đỉnh gần cầu đến hình cầu.
----------------	--	---

Dựa vào những đặc điểm tương đồng về hình ảnh của khuẩn lạc và cuống bào tử, đỉnh bào tử của 2 chủng nấm mốc này, có thể kết luận sơ bộ chủng nấm mốc phân lập được thuộc chủng *A. niger* và kí hiệu là chủng *A. niger* PL.

3.2. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG PHÁT TRIỂN CỦA CHỦNG *A.NIGER*

3.2.1. Đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng nấm mốc phân lập



Hình 3.3: Tốc độ sinh trưởng của các chủng nấm mốc *A.niger*

Sau những khoảng thời gian như nhau, đường kính khuẩn lạc của chủng *A. niger* PL đạt được luôn lớn hơn khuẩn lạc của chủng *A. niger* PTN. Mức độ chênh lệch càng lớn khi thời gian nuôi cấy càng dài, và

sau 3 ngày, đường kính khuẩn lạc của chủng PL cao hơn chủng PTN 1,24 lần. Như vậy, khả năng sinh trưởng của chủng *A. niger* PL cao hơn so với chủng *A. niger* PTN.

3.2.2. Đánh giá khả năng sinh tổng hợp pectinase của hai chủng nấm mốc

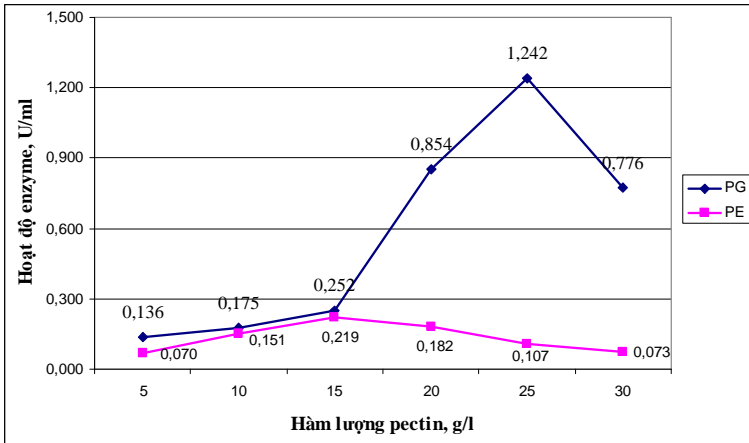
Bảng 3.2. Hoạt tính enzyme của hai chủng *A. niger* PL và *A. niger* PTN:

	<i>A.niger</i> PL	<i>A.niger</i> PTN
Vòng thủy phân xung quanh khuẩn lạc, mm	3,5	2
Đường kính vòng thủy phân (D/d), mm	17/6	16,5/6
Hoạt độ PG, U/ml	1,237	0,876
Hoạt độ PE, U/ml	0,086	0,093
Tỉ lệ PG/PE	14,38	9,41

Dựa vào bảng 3.2 ta thấy, chủng nấm mốc *A. niger* PL có khả năng sinh tổng hợp pectinase cao hơn và tỉ lệ hoạt độ PG và PE được tìm thấy cũng cao hơn hẳn so với chủng *A. niger* PTN. Do đó, chủng nấm mốc *A.niger* PL được chọn để khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme pectinesterase và polygalacturonase.

3.3. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME PECTINESTERASE VÀ POLYGALACTURONASE CỦA *A.NIGER*

3.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng pectin



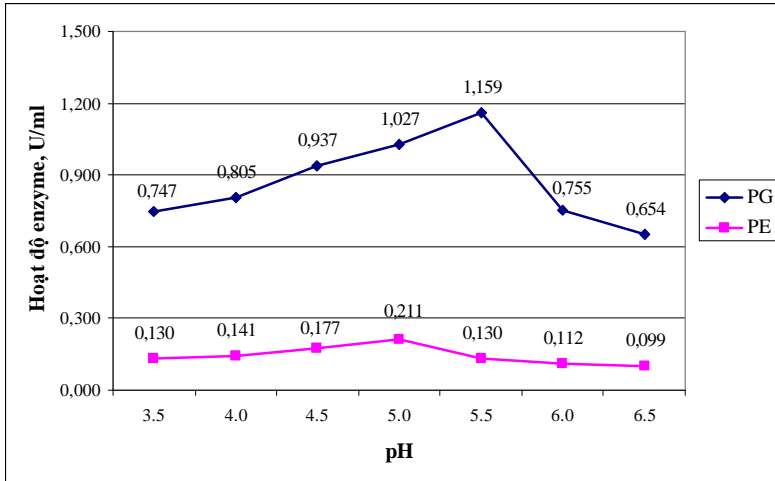
Hình 3.5: Ảnh hưởng của hàm lượng pectin đến khả năng tổng hợp polygalacturonase và pectinesterase của chủng *A. niger* PL

Khi hàm lượng pectin tăng từ 5–15 g/l, hoạt độ enzyme PG tăng không đáng kể, từ 0,136 U/ml lên 0,252 U/ml. Tuy nhiên, khi hàm lượng pectin trong môi trường tăng từ 15–25 g/l thì hoạt độ PG lại tăng mạnh và đạt cực đại 1,242 U/ml khi hàm lượng pectin là 25 g/l. Với hàm lượng pectin lớn hơn 25g/l, hoạt độ enzyme PG giảm.

Ngược lại với PG, hoạt độ enzyme PE tăng nhanh trong khoảng hàm lượng pectin 5-15 g/l từ 0,070 U/ml lên đạt cực đại 0,219 U/ml. Khi hàm lượng pectin tăng lên lớn hơn 15 g/l, hoạt độ của PE lại giảm xuống và chỉ còn 0,073 U/ml tương ứng với hàm lượng pectin 30 g/l.

sau khi khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ pectin trong môi trường nuôi cấy, chúng tôi xác định được khoảng hàm lượng pectin để chủng *A. niger* PL sinh tổng hợp enzyme PG cao là 20–30 g/l và đạt cực đại khi hàm lượng pectin 25 g/l trong khi đó hoạt độ PE thấp.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của pH

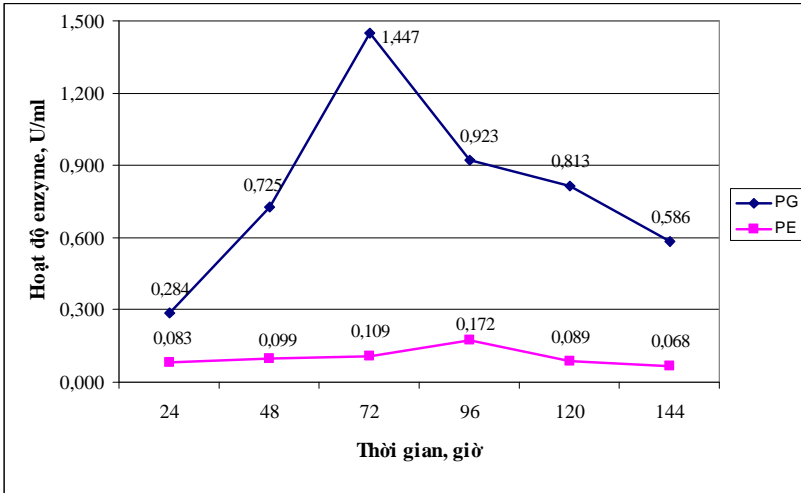


Hình 3.7: Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp polygalacturonase pectinesterase của chủng *A.niger* PL

Từ kết quả biểu diễn trên hình 3.6 cho thấy, chủng *A. niger* PL có khả năng sinh tổng hợp PG tốt trong khoảng pH 4,5–6,0 và đạt cực đại tại pH 5,5 (1,159 U/ml) và khả năng sinh enzyme PE của chủng *A. niger* PL cao trong khoảng pH 4,0 – 5,0 và đạt cực đại tại pH 5,0 (0,211 U/ml).

Như vậy, theo nghiên cứu này, chủng *A.niger* PL sinh tổng hợp PG và PE cao trong khoảng pH tương ứng là 4,5–6,0 và 4,0–5,0; trong đó, tại pH 5,5 hoạt độ enzyme PG đạt cực đại nhưng hoạt độ PE là thấp.

3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy



Hình 3.7: Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp polygalacturonase và pectinesterase của chủng *A. niger* PL

Theo kết quả trên hình 3.7 ta thấy khi thời gian nuôi cấy tăng từ 24 – 72 giờ thì hoạt độ của enzyme PG tăng từ 0,284 – 1,447 U/ml. Hoạt độ enzyme PG đạt giá trị cao nhất sau 72 giờ là 1,447 U/ml. Sau thời gian 72 giờ nếu tiếp tục kéo dài thời gian nuôi thì ta thấy hoạt độ enzyme PG giảm và giảm rất mạnh xuống 0,586 U/ml tại 144 giờ. Thời gian nuôi cấy không chỉ ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme PG mà còn ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme PE thu được. Ta thấy hoạt độ enzyme PE tăng từ 0,083–0,172 U/ml khi thời gian nuôi tăng từ 24 giờ – 96 giờ và đạt giá trị cao nhất là 0,172 U/ml sau 96 giờ nuôi. Khi thời gian nuôi kéo dài hơn 96 giờ thì hoạt độ enzyme PE không những không tăng mà còn giảm và giảm xuống 0,068 U/ml ở 144 giờ.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát được khoảng thời gian tối ưu để chủng *A.niger* PL sinh tổng hợp PG cực đại là 72 giờ, cũng sau khoảng thời gian này quá trình sinh tổng hợp PE thấp.

3.4. TỐI ƯU HOÁ ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP ENZYME PG VÀ PE CỦA CHỦNG NẤM MỐC *A.NIGER* PL

3.4.1. Chọn yếu tố ảnh hưởng

3.4.2. Chọn điều kiện thí nghiệm

$$y_n = b_{0(n)} + b_{1(n)}x_1 + b_{2(n)}x_2 + b_{3(n)}x_3 + b_{12(n)}x_1x_2 + b_{13(n)}x_1x_3 + b_{23(n)}x_2x_3 + b_{123(n)}x_1x_2x_3$$

Bảng 3.3. Điều kiện thí nghiệm

Yếu tố	Các mức			Khoảng biến thiên (λ)
	Mức trên	Mức cơ sở	Mức dưới	
	+1	0	-1	
Z_1	30	25	20	5
Z_2	6,5	5,5	4,5	1,0
Z_3	120	96	72	24

3.4.3. Tổ chức và thực hiện các thí nghiệm

Bảng 3.4. Mô hình và kết quả thí nghiệm quy hoạch nhân tố toàn phần 2^3

TT	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	y_1	y_2
1	+	+	+	+	+	+	+	1,046	0,172
2	-	+	+	-	-	+	-	0,989	0,201
3	+	-	+	-	+	-	-	1,469	0,135
4	-	-	+	+	-	-	+	1,126	0,130
5	+	+	-	+	-	-	-	1,475	0,122
6	-	+	-	-	+	-	+	1,116	0,135
7	+	-	-	-	-	+	+	1,424	0,070
8	-	-	-	+	+	+	-	1,239	0,156
T_1	0	0	0	0	0	0	0	1,372	0,125
T_2	0	0	0	0	0	0	0	1,292	0,138
T_3	0	0	0	0	0	0	0	1,343	0,133

3.4.4. Tính các hệ số hồi quy

Bảng 3.5. Giá trị các hệ số b trong phương trình hồi quy

Các hệ số b trong phương trình y_1		Các hệ số b trong phương trình y_2	
Hệ số	Giá trị	Hệ số	Giá trị
$b_{0(1)}$	1,235	$b_{0(2)}$	0,140
$b_{1(1)}$	0,118	$b_{1(2)}$	-0,015
$b_{2(1)}$	-0,079	$b_{2(2)}$	-0,017
$b_{3(1)}$	-0,078	$b_{3(2)}$	0,019
$b_{12(1)}$	-0,014	$b_{12(2)}$	0,005
$b_{13(1)}$	-0,018	$b_{13(2)}$	0,009
$b_{23(1)}$	-0,061	$b_{23(2)}$	-0,009
$b_{123(1)}$	-0,058	$b_{123(2)}$	0,002

3.4.5. Kiểm định tính ý nghĩa của các hệ số hồi quy và sự tương thích của phương trình

Bảng 3.6. Giá trị các chuẩn Student thực nghiệm t_m

Chuẩn student của các hệ số b trong phương trình y_1		Chuẩn student của các hệ số b trong phương trình y_2	
Hệ số	Giá trị	Hệ số	Giá trị
$t_{0(1)}$	86,87	$t_{0(1)}$	60,55
$t_{1(1)}$	8,28	$t_{1(1)}$	6,60
$t_{2(1)}$	5,53	$t_{2(1)}$	7,45
$t_{3(1)}$	5,50	$t_{3(1)}$	8,29
$t_{12(1)}$	1,01	$t_{12(1)}$	2,10
$t_{13(1)}$	1,24	$t_{13(1)}$	4,07
$t_{23(1)}$	4,32	$t_{23(1)}$	4,07
$t_{123(3)}$	4,02	$t_{123(3)}$	1,00

Giá trị của bảng tiêu chuẩn Student đối với mức ý nghĩa $p = 0,05$ và bậc tự do $f = 2$ là $t_p(f) = 4,3$.

*) So sánh với giá trị $t_{(p,f)}$:

- Nếu $t_j \geq t_p(f)$ thì hệ số b_j có nghĩa được giữ lại trong phương trình hồi quy.

- Nếu $t_j < t_p(f)$ thì hệ số b_j bị loại khỏi phương trình hồi quy.

Do $t_{12(1)}, t_{13(1)}, t_{23(1)} < t_p(f)$ nên hệ số $b_{12(1)}, b_{13(1)}, b_{23(1)}$ không có ý nghĩa, ta loại ra khỏi phương trình, lúc này phương trình hồi quy có dạng:

$$y_1 = 1,235 + 0,118x_1 - 0,079x_2 - 0,078x_3 - 0,061x_2x_3 \quad (3.9)$$

Do $t_{12(2)}, t_{13(2)}, t_{23(2)}, t_{123(2)} < t_p(f)$ nên hệ số $b_{12(2)}, b_{23(2)}, b_{13(2)}, b_{123(2)}$ không có ý nghĩa, ta loại ra khỏi phương trình, lúc này phương trình hồi quy có dạng:

$$y_2 = 0,140 - 0,015x_1 + 0,017x_2 + 0,019x_3 \quad (3.10)$$

Bảng 3.7. Các giá trị để tính độ lệch dư

y_1	\hat{y}_1	$(y_1 - \hat{y}_1)^2$	y_2	\hat{y}_2	$(y_2 - \hat{y}_2)^2$
1,046	1,197	0,0227	0,172	0,161	0,0001
0,989	0,961	0,0008	0,201	0,192	0,00007
1,469	1,354	0,0133	0,135	0,127	0,00007
1,126	1,118	0,00006	0,130	0,158	0,0007
1,475	1,353	0,0148	0,122	0,123	0,00001
1,118	1,117	0,00001	0,135	0,154	0,0003
1,424	1,510	0,0075	0,070	0,089	0,0003
1,239	1,275	0,0013	0,156	0,119	0,0014

$$F_{0,95}(4, 2) = 19,3, F_{0,95}(5; 2) = 19,3.$$

Do $F_{(1)}, F_{(2)} < F_{1-p}(f_1, f_2)$, do đó phương trình các phương trình thu được tương thích với thực nghiệm và được sử dụng để tìm kiếm tối ưu.

3.4.6. Tối ưu hoá các điều kiện để sinh tổng hợp PG và PE

Để tối ưu hóa các điều kiện lên men sinh tổng hợp enzyme PG và PE, chúng tôi sử dụng công cụ Solver của phần mềm excel.

Phương trình:

$$y_1 = 1,235 + 0,118x_1 - 0,079x_2 - 0,078x_3 - 0,061x_2x_3;$$

$$y_2 = 0,140 - 0,015x_1 + 0,017x_2 + 0,019x_3.$$

Miền giới hạn của các biến: Các biến được tìm kiếm tối ưu trong miền giá trị $[-1; 1]$.

Các giá trị khởi động khi tối ưu hóa: $x_1 = 1$; $x_2 = 1$; $x_3 = 1$.

Sau khi chạy phần mềm Excel với hai hàm mục tiêu, chúng tôi thu được kết quả như sau :

$y_1 \rightarrow \max$ với kết quả: $x_1 = 1$; $x_2 = -1$; $x_3 = -1$, $y_1 = 1,449$.

$y_2 \rightarrow \min$ với kết quả: $x_1 = 1$; $x_2 = -1$; $x_3 = -1$, $y_2 = 0,088$.

Với các giá trị biến mã, suy ra các giá trị thực như sau:

- Hàm lượng pectin: 30 g/l;
- pH: 4,5;
- Thời gian lên men: 72 giờ.

3.4.7. Thí nghiệm kiểm chứng

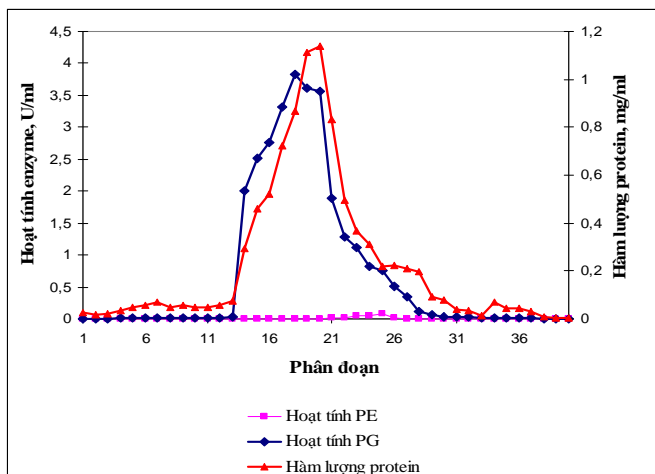
Để khẳng định lại kết quả của quá trình tối ưu, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm kiểm chứng tại các điều kiện tối ưu thu được như trên.

Kết quả thu được hoạt độ enzyme PG là 1,464 U/ml, hoạt độ PE là 0,078 U/ml. So với kết quả tối ưu ở lý thuyết thì có thấp hơn

nhưng không đáng kể, tồn tại sai số này có thể do nhiều yếu tố ảnh hưởng trong quá trình thực hiện thí nghiệm.

Như vậy, bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được phương trình toán học mô tả mối tương quan của các yếu tố trong quá trình lên men đến khả năng sinh tổng hợp enzyme PG và PE của chủng nấm mốc *A. niger* PL. Phương trình hồi qui trên cho thấy 3 yếu tố: nồng độ pectin, pH ban đầu của môi trường và thời gian lên men đều ảnh hưởng đến hoạt độ PG và PE của chủng *A. niger* PL.

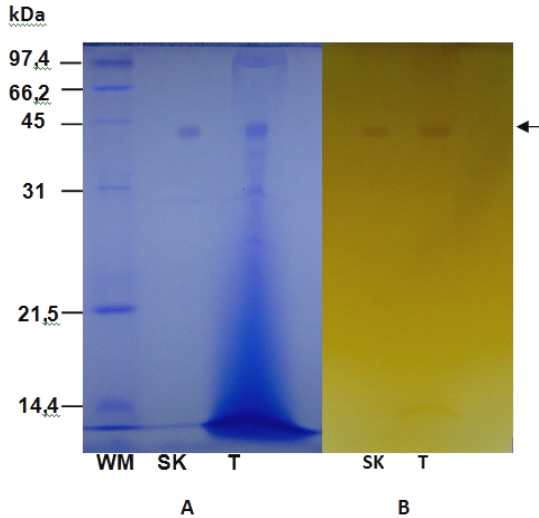
3.5. TINH SẠCH ENZYME



Hình 3.8. Đồ thị biểu diễn hàm lượng protein và hoạt độ enzyme PG và PE của dịch enzyme sau sắc kí

Sau khi qua cột silicagel, từ dịch enzyme thô đã tách được 1 đỉnh protein, xác định hoạt độ enzyme cũng có một đỉnh có hoạt độ PG, và hoạt độ của PE là không đáng kể. Hoạt độ PG cao nhất đạt 3,832 U/ml ở

phân đoạn 18, tăng 2,6 lần so với hoạt độ PG của mẫu enzyme thô (1,464 U/ml).



Hình 3.9. Hình ảnh điện di mẫu enzyme

A – Điện di SDS, B – Điện di cơ chất

Trong đó, WM: protein chuẩn (14,4 – 97,4 kDa);

SK: mẫu enzyme sau sắc kí;

T: mẫu enzyme thô.

Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE không có cơ chất cho thấy với mẫu enzyme thô sau kết tủa, có 5 băng protein xuất hiện. Nhưng với mẫu enzyme sau quá trình sắc kí tại phân đoạn có hoạt độ enzyme PG cao, chỉ thu được 2 băng protein có khối lượng phân tử 40 và 30 kDa. Tuy nhiên, băng protein có khối lượng phân tử 30 kDa khá mờ.

Khi điện di trên gel cơ chất acid polygalacturonic thì băng protein có khối lượng phân tử 30 kDa không có hoạt độ. Cả mẫu enzyme thô và mẫu sắc kí đều chỉ cho một băng protein có hoạt độ PG trùng với băng

có khối lượng phân tử 40 kDa. Như vậy, có thể kết luận, enzyme PG do chủng nấm mốc *A. niger* PL tổng hợp có khối lượng phân tử 40 kDa.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Từ kết quả đạt được của nhiều thí nghiệm đã thực hiện, chúng tôi rút ra được các kết luận sau:

- Sử dụng phương pháp nuôi cấy trên môi trường đặc thạch Czapek đã phân lập được chủng nấm mốc thuần khiết từ những nguồn tự nhiên có các đặc điểm hình thái: khuẩn lạc có màu nâu đen, lấm tẩm như bã cà phê; hình dạng khuẩn lạc chủ yếu là tròn, dày, bề mặt lồi, xốp, mép khuẩn lạc dạng dày đều; đầu sợi nấm phình to ra, cuống bào tử đính không phân nhánh, các tế bào hình chai và bào tử đính tỏa đều trên đầu sợi nấm như bông. Với những đặc điểm này, so sánh với chủng nấm mốc *A. niger* ở PTN, có thể sơ bộ kết luận chủng nấm mốc phân lập được là *A. niger* và được kí hiệu là *A. niger* PL.

- So sánh về khả năng sinh trưởng và phát triển và khả năng tổng hợp pectinase của chủng *A. niger* PL sau 72 giờ nuôi cấy cho thấy chủng này có khả năng phát triển mạnh hơn và hoạt độ các enzyme cũng cao hơn hẳn so với chủng *A. niger* đang giữ giống tại phòng thí nghiệm vi sinh Khoa hóa Đại học Bách Khoa.

- Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy để hoạt độ enzyme PG cao và PE thấp:

+ Hàm lượng pectin bổ sung vào môi trường: 25 g/l đạt hoạt độ PG là.

+ pH ban đầu của môi trường là 5,5.

+ Thời gian nuôi cấy là 72 giờ.

- Bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm để tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp PG và PE

của chủng *A. niger* PL, chúng tôi đã tìm được các điều kiện tối ưu sinh tổng hợp enzyme có hoạt độ PG cao và PE thấp từ chủng nấm mốc *A. niger* PL như sau: hàm lượng pectin 30g/l; pH ban đầu của môi trường 4,5; thời gian nuôi là 72 giờ với hoạt độ enzyme PG và PE thu được 1,449 U/ml và 0,087 U/ml.

- Bước đầu tinh sạch enzyme bằng phương pháp sắc kí qua cột silicagel, hoạt độ của enzyme PG sau tinh sạch đã tăng lên 2,7 lần so với mẫu enzyme thô.

- Điện di SDS-PAGE xác định được khối lượng phân tử của enzyme PG là 40 kDa.

2. Kiến nghị

- Nghiên cứu ảnh hưởng của sự thay đổi các thành phần môi trường như nguồn carbon, nguồn nitrogen cũng như thay thế bằng các thành phần tự nhiên đến quá trình sinh tổng hợp enzyme PG và PE của chủng nấm mốc *A. niger* PL.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện phản ứng như pH, nhiệt độ, nồng độ cơ chất, sự có mặt của các ion kim loại... đến hoạt độ của enzyme PG và PE sinh tổng hợp từ *A. niger* PL.

- Nghiên cứu ứng dụng enzyme PG và PE của chủng *A.niger* PL vào quá trình sản xuất nước quả và bóc vỏ cam, quýt,... để có thể phục vụ cho ngành công nghiệp thực phẩm.