Tạp chí Khoa học và Kinh tế Phát triển
Trường Đại học Nam Cần Thơ
Website: jsde.nctu.edu.vn

NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO ENZYME PECTIN METHYLESTERASE TỪ NẤM ASPERGILLUS NIGER

Trần Duy Khang[1*], Nguyễn Hoàng Sinh[2], Nguyễn Châu Hoàng Nam[3]

[1, 2, 3] *Trường Đại học Nam Cần Thơ*

** Người chịu trách nhiệm bài viết: Trần Duy Khang (email: tdkhang2601@gmail.com)*

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/9/2022

Ngày chấp nhận: 15/9/2022

Ngày duyệt đăng: 30/9/2022

Ngày xuất bản: 5/10/2022

Title: *Study on the factors affecting the ability of Aspergillus niger fungus to produce pectin methylesterase*

Keywords: *Aspergillus, grapefruit peel, papaya peel, PME enzyme*

Từ khóa: *Aspergillus, men PME, vỏ bưởi, vỏ đu đủ*

ABSTRACT

The study was conducted to examine the factors affecting the ability of Aspergillus niger fungus to produce pectin methylesterase (PME enzyme). Surveyed factors include: (i) mixing ratio between papaya and grapefruit peel substrates with water; (ii) pH adjustment in the culture medium; (iii) tempering temperature and time. The results showed that the highest activity of pectin methylesterase enzyme production was found in the ratio of papaya skin and pomelo peel (70/30) with a dilution ratio of 1:1.5, pH 4.0, and at high temperature. 32°C for 96 hours.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo pectin methylesterase (men PME) từ nấm Aspergillus niger. Các yếu tố khảo sát bao gồm: (i) tỷ lệ phối trộn giữa cơ chất vỏ đu đủ và vỏ bưởi với nước; (ii) điều chỉnh pH trong môi trường nuôi cấy; (iii) nhiệt độ và thời gian ủ. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng tạo men pectin methylesterase hoạt tính cao tốt nhất ở tỷ lệ vỏ đu đủ và vỏ bưởi là (70/30) với tỷ lệ pha loãng là 1:1,5, pH 4.0 và ở nhiệt độ 32°C trong thời gian 96 giờ.

1. GIỚI THIỆU

Cùng với sự tiến bộ của khoa học kỹ thuật, enzyme (men) ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp nói chung và công nghiệp thực phẩm nói riêng. Các chế phẩm enzyme phổ biến như protease, amylase, cellulase, catalase, lipase, glucose oxidase,... được sử dụng rất nhiều. Trong đó, pectin methylesterase (PME) là một enzyme quan trọng và được dùng phổ biến trong công nghệ thực phẩm thường dùng để trích ly và làm trong dịch quả, cải thiện cấu trúc dung dịch nhằm làm tăng hiệu quả kinh tế. Việt Nam là nước giàu tiềm năng về nông sản, nhu cầu các loại enzyme phục vụ trong chế biến thực phẩm là rất lớn. Tuy nhiên, do Việt Nam hoàn toàn chưa có các nhà máy sản xuất chế phẩm enzyme nên vẫn phải nhập ngoại một khối lượng lớn loại enzyme này (Đặng Thị Thu, 2012) [1], lượng pectinase được sản xuất ra hàng năm chủ yếu được sản xuất ở các nước phát triển như: Anh, Mỹ, Pháp,... chiếm khoảng 10% thị trường enzyme thế giới và đang có xu hướng tăng dần.

Pectin methylesterase (PME) - một loại enzyme thuộc nhóm pectinase đã được quan tâm sử dụng ở nhiều quốc gia trên thế giới với mục đích như tăng cường sự phá hủy cấu trúc của tế bào thực vật, tăng hiệu suất trích ly nước quả được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực chế biến các sản phẩm rau quả và công nghiệp rượu. Giúp tăng độ nhớt trong sản xuất nước quả và puree cà, góp phần cải thiện cấu trúc và độ cứng chắc trong quá trình chế biến một số loại rau quả (Pilnik and Voragen, 1993) [8]. Việc ứng dụng PME trong công nghiệp chế biến các sản phẩm có nguồn gốc thực vật ở Việt Nam chưa được quan tâm, đồng thời vẫn có sự nhầm lẫn trong hiểu biết về PME và pectinase. Việc nghiên cứu có hệ thống, sự thu nhận PME và khả năng ứng dụng vào thực tiễn của enzyme này trong điều kiện hiện tại của Việt Nam là vấn đề cần thiết mang ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Ngày nay, vi sinh vật là nguồn cung cấp enzyme chủ yếu do có những ưu điểm vượt trội như: tốc độ sinh sản nhanh, nguồn vật liệu rẻ tiền, dễ thu hồi, cùng lúc thu được nhiều loại enzyme,... PME có thể được sản xuất từ rất nhiều loại vi khuẩn và nấm mốc bao gồm: *Aspergillus sp, Botrytis cinerea, Fusarium moniliforme, Rhizopus stolonifer, Trichoderma* sp... (Polizeli et al.,1991) [9], nhưng *Aspergillus* là nguồn chủ yếu (Torres et al., 2005) [12]. Trong nhóm này, việc ly trích PME từ nấm *Aspergillus niger* cũng được ưu tiên chọn lựa. Nấm *Aspergillus niger* được sử dụng phổ biến trong công nghệ thực phẩm trong nhiều thập kỷ qua và nó được đánh giá là an toàn đối với sức khỏe con người (Taylor et al.,1979) [11]. Thêm vào đó, sản phẩm từ nấm *Aspergillus niger* cũng được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm của Mỹ (FDA) chứng nhận là an toàn (GRAS). Ngoài ra, *Aspergillus niger* còn là một loại nấm mốc có khả năng phát triển

rất nhanh chóng trên các cơ chất rẻ tiền và tiết ra enzyme vào trong môi trường và dễ dàng thu hồi.

Việc sản xuất PME từ nấm *Aspergillus niger* có thể thực hiện bởi phương pháp lên men bề mặt trên môi trường rắn - Solid Surface Fermentation (SSF) và lên men bề mặt trên môi trường lỏng - Submerged Fermentation (SmF). Trong trường hợp này, ảnh hưởng của cơ chất lên men là có ý nghĩa đối với hiệu quả và tính kinh tế của quá trình lên men. Có nhiều phụ phẩm nông nghiệp đã được sử dụng làm cơ chất cho quá trình lên men như: bã cam, bã táo, vỏ đu đủ, vỏ cam, bã cà phê (Martin et al., 2004 [6]; Joshi et al., 2006 [5]; Mukesh Kumar Patidar et al., 2016 [7]; Silva et al., 2005 [10]; Boccas et al., 1994) [3].... Một số nghiên cứu trước cũng khảo sát ảnh hưởng của việc sử dụng hỗn hợp rác thải nông nghiệp làm cơ chất cho quá trình lên men sản xuất pectinase.

PME có thể được tìm thấy ở rất nhiều thực vật, vi sinh vật. Tùy thuộc vào nguồn gốc của PME, các thông số tối ưu cho hoạt động của enzyme như: pH, nhiệt độ tối thích, các chất hoạt hóa của PME,...cũng thay đổi, đặc biệt là sự khác nhau về phương thức hoạt động của PME. Do đó, để có thể ứng dụng enzyme PME từ *A. niger* một cách hiệu quả nhất, bản chất cũng như điều kiện hoạt động tối thích của enzyme cần phải được hiểu rõ. Vì vậy, việc nghiên cứu để tìm hiểu các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của *A. niger* PME là rất cần thiết.

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

Nguyên liệu chính gồm đu đủ ruột đỏ và bưởi Năm Roi được thu mua tại vườn trái cây thuộc Thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long, sau đó được gọt để lấy vỏ sử dụng cho việc nghiên cứu.

Nấm *Aspergillus niger* từ vỏ bưởi Năm Roi được phân lập 6 lần và nuôi cấy vào môi trường. Cách thức: Cân 10g mẫu *A.niger* đã được nuôi cấy sau 4 ngày vào ống nghiệm có chứa 9mL dung dịch NaCl 0,9% để thu nhận dung dịch có chứa bào tử nấm *A. niger*. Dung dịch thu nhận được pha loãng đến khi mật độ đạt 10^5 bào tử/mL.

2.2 Bố trí thí nghiệm

2.2.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn cơ chất vỏ đu đủ và vỏ bưởi với tỉ lệ pha loãng cơ chất đến khả năng sinh PME từ A. niger

Cân 5 g hỗn hợp vỏ bưởi và vỏ đu đủ ở các tỉ lệ cần khảo sát cho vào các bình tam giác 250 mL. Sử dụng dung môi là nước cất để thay đổi hàm lượng ẩm của môi trường nuôi cấy. Nhân tố A: Tỉ lệ vỏ đu đủ:vỏ bưởi ở các mức 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 0:100; Nhân tố B: Tỉ lệ pha loãng của cơ chất và nước cất sẽ thay đổi từ 1:1; 1:1,5 và 1:2.

Tiệt trùng các bình tam giác chứa cơ chất ở 121°C trong 20 phút. Làm mát các bình sau khi thanh trùng, cho 2 mL huyền phù bào tử nấm mốc vào mỗi bình cấy (10^5 bào tử/mL) và ủ ở nhiệt độ phòng trong 96 giờ. Sau khi ủ, trích lấy

dịch chứa enzyme PME bằng dung dịch đệm citrate/phosphate pH 4,5 (khuấy gián đoạn trong 1 giờ). Sau đó xác định hoạt tính PME bằng phương pháp do Duvetter (2007) [4] giới thiệu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của việc điều chỉnh pH đến khả năng trích ly PME từ A. niger

Thí nghiệm được tiến hành tương tự như thí nghiệm 1. Tỉ lệ cơ chất và mức độ pha loãng được sử dụng cho khảo sát dựa trên kết quả tối ưu của thí nghiệm trước. Điều chỉnh pH môi trường lên men bằng cách sử dụng dung dịch đệm citrat/phosphate ở các giá trị pH ứng với từng nghiệm thức để pha loãng cơ chất (Nhân tố C: Mức độ pH = 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5), cho 2 mL huyền phù bào tử nấm mốc vào mỗi bình cấy (10^5 bào tử/mL) và ủ ở nhiệt độ phòng. Thời gian nuôi cấy được cố định ở 96 giờ. Sau khi ủ, trích lấy dịch chứa enzyme PME bằng dung dịch đệm citrate/phosphate pH 4,5 (khuấy gián đoạn trong 1 giờ). Sau đó xác định hoạt tính PME bằng phương pháp do Duvetter (2007) [4] giới thiệu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian ủ đến khả năng sinh tổng hợp PME từ A. niger

Thí nghiệm được chuẩn bị tương tự như thí nghiệm 1. Tiến hành cân cơ chất, pha loãng môi trường đến độ ẩm và pH thích hợp theo các kết quả tối ưu từ các thí nghiệm 1 và 2. Sau khi cấy nấm mốc, mẫu khảo sát được tiến hành lên men ở các tủ ủ có nhiệt độ khảo sát (Nhân tố D: Nhiệt độ ủ 30°C, 32°C, 37°C, 42°C) tương ứng với thời gian lên men thay đổi (Nhân tố E: Thời gian nuôi cấy 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ). Tiến hành thu dịch chứa enzyme tương ứng với từng mức thời gian khảo sát để đo đạc PME có trong dịch trích. Sau khi ủ, trích lấy dịch chứa enzyme PME bằng dung dịch đệm citrate/phosphate pH 4,5 (khuấy gián đoạn trong 1 giờ). Sau đó xác định hoạt tính PME bằng phương pháp do Duvetter (2007) [4] giới thiệu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3 Phương pháp xác định hoạt tính của enzyme PME

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân dung dịch pectin bởi enzyme PME. Hoạt tính PME được xác định bằng cách đo lường lượng acid galacturonic giải phóng ra trên đơn vị thời gian ở nhiệt độ và pH không đổi (Duvetter, 2007) [4].

Cân Pectin 3,5 g/L hòa trong dung dịch NaCl 0,12 M. Trộn đều NaCl và pectin (để tránh pectin vón cục), rắc từ từ hỗn hợp vào cốc nước cất đã được đun nóng sẵn đồng thời khuấy đều bằng máy khuấy từ. Để yên 2 giờ ở nhiệt độ phòng để pectin trương nở và hòa tan, sau đó để khoảng 14 giờ ở nhiệt độ 4 - 6°C. Sau đó dung dịch được làm nóng đến 20°C và chuyển vào bình định mức có dung tích thích hợp và định mức tới vạch ngấn bằng nước cất, lắc đều và lọc qua hai lớp vải màn có bông ở giữa. Bảo quản dung dịch nhận được trong tủ lạnh trong thời gian 2 ngày.

Chuẩn bị 2 cốc thủy tinh nhỏ. Lấy 30 mL dung dịch pectin đã pha sẵn cho vào mỗi cốc, điều chỉnh pH dung dịch pectin đến 4,5 bằng dung dịch NaOH 0,01 N. Sau đó bổ sung 350 µL dung dịch enzyme vào 1 cốc, cốc còn lại bổ sung 350µL dung dịch enzyme đã bị vô hoạt (100^{o}C, 30 phút) làm mẫu đối chứng. Trong suốt quá trình enzyme thủy phân pectin (trong 60 phút ở nhiệt độ 45^{o}C), pH dung dịch được giữ không đổi (pH 4.5 ở nhiệt độ 30 ±1^{o}C) bằng cách bổ sung NaOH 0,01 N.

Hoạt tính PME là số mili đương lượng của ester được thủy phân trong 1 phút bởi 1g enzyme.

2.4. Phân tích thống kê

Sử dụng phần mềm Excel 2019 và IBM SPSS 20 để xử lý số liệu và phân tích thống kê.

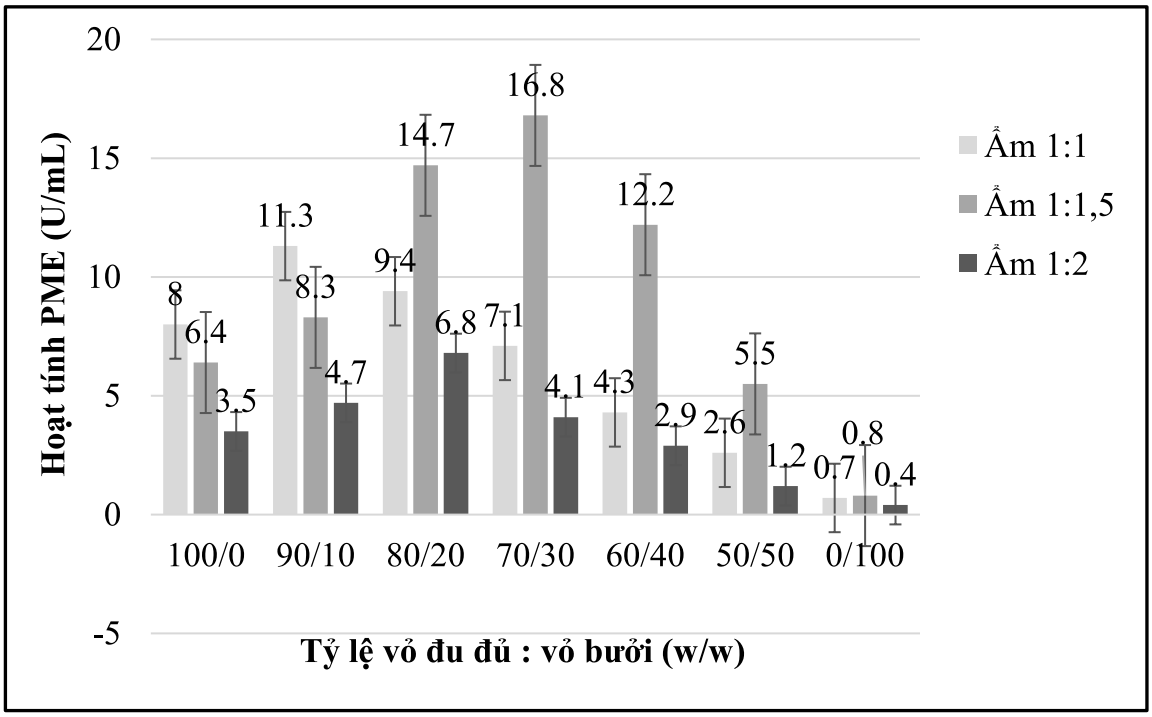
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn cơ chất vỏ đu đủ và vỏ bưởi và tỉ lệ pha loãng cơ chất đến khả năng sinh PME từ *A. niger*

Trong quá trình trích ly PME trên cơ chất vỏ bưởi (tỷ lệ 0/100) không có sự sinh tổng hợp PME rõ rệt trên môi trường ở tỉ lệ pha loãng cơ chất và nước là 1:2. Khi mức độ pha loãng gia tăng, hoạt tính của PME có xu hướng giảm thấp. Ở trường hợp sử dụng cơ chất lên men là vỏ bưởi, hoạt tính của PME rất thấp (hoạt tính PME cao nhất là 0,8 U/mL ở tỉ lệ pha loãng 1:1,5 và giảm ở mức độ pha loãng cao hơn). Điều này có thể được lý giải là do sự khác nhau về thành phần cơ chất và lượng ẩm của môi trường lên men. Do đó, hàm lượng ẩm và thành phần cơ chất có ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của vi sinh vật và sản xuất enzyme trong phương pháp nuôi cấy bề mặt trên môi trường rắn (SSF).

Ở mức độ pha loãng thấp hơn (1:1) làm hạn chế khả năng sinh enzyme của nấm mốc. Kết quả này được giải thích là do sự kìm hãm khả năng phát triển, độ xốp của cơ chất thấp và sự cạnh tranh nước của vi sinh vật ở các nghiệm thức có hàm lượng ẩm thấp. Độ ẩm môi trường nuôi cấy thấp, nước không đủ cung cấp cho các phản ứng sinh lý, sinh hóa bên trong nấm mốc, gây cản trở sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc *A. niger* (Nguyễn Đức Lượng, 2004) [2], chính vì thế hoạt tính PME thu được thấp hơn hẳn các mẫu có mức độ pha loãng môi trường cao hơn. Tuy nhiên, khi độ ẩm môi trường tăng ở mức pha loãng 1:2 thì hoạt tính của PME thu được bắt đầu giảm vì môi trường có độ ẩm khá cao làm giảm độ thoáng khí dẫn đến nấm mốc chậm phát triển.

Việc sử dụng cơ chất lên men gồm hỗn hợp vỏ đu đủ và vỏ bưởi, một phần giúp điều chỉnh độ ẩm của môi trường, ảnh hưởng đến hàm lượng chất dinh dưỡng hòa tan mà còn giúp gia tăng mức độ thoáng khí của môi trường do sự hiện diện của vỏ bưởi. Thêm vào đó, hoạt tính PME ở các nghiệm thức sử dụng kết hợp hai loại cơ chất trên cao hơn so với hai mẫu đối chứng. Cụ thể theo Hình 1, trong trường hợp pha loãng 1:1,5 với mức tỷ lệ cơ chất là (70/30) *A. niger* cho ra hoạt tính enzyme cao nhất 16,8 U/mL và đó cũng là điều kiện tối thích cho khả năng sinh tổng hợp PME từ *A. niger*.



Hình 1. Biểu đồ thể hiện khả năng sinh tổng hợp PME từ hỗn hợp vỏ đu đủ và vỏ bưởi ở các mức độ pha loãng khác nhau

3.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của việc điều chỉnh pH đến khả năng trích ly PME từ *A. niger*

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính PME

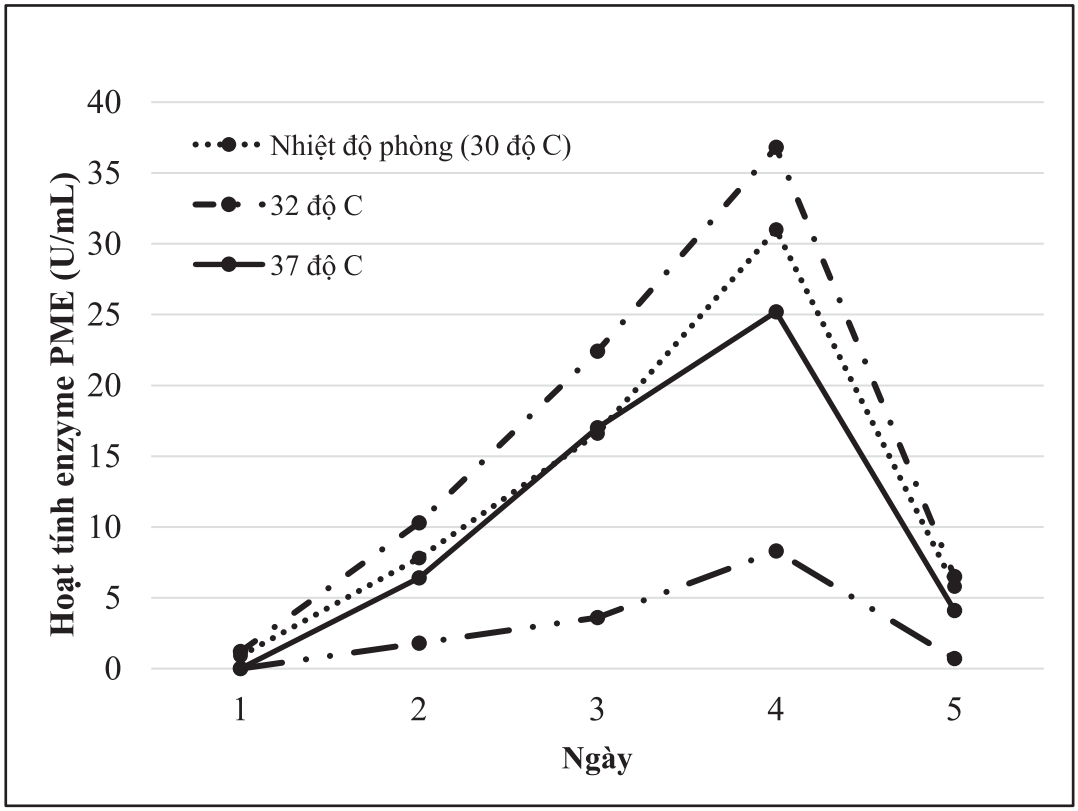
pH	Hoạt tính PME (U/mL)	Hoạt tính tổng (Kat)
3.0	4,1[d]	68,347[d]
3.5	4,3[d]	71,681[d]
4.0	18,7[a]	331,729[a]
4.5	18,0[b]	300,060[b]
5.0	15,4[c]	256,718[c]
5.5	15,4[c]	256,718[c]
Nước cất (6.7 - 6.8)	15,1[c]	251,717[c]

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê qua kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%

Ở pH thấp 3,0 hoạt tính enzyme có tính thấp nhất, nguyên do là do khi ở pH thấp độ acid trong môi trường tăng mạnh gây ức chế khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm mốc khi chúng còn quá yếu ớt khả năng thích nghi với môi trường chưa cao nhưng phải phát triển trong một môi trường khá khắc nghiệt. Các khoảng pH từ 4,5 đến 6,8 của nước cất, hoạt tính enzyme thu được tương đối cao, tuy nhiên lại có xu hướng giảm dần khi pH tăng. Có thể lý giải điều này là do, pH tối ưu cho nấm mốc phát triển nằm trong khoảng 4,0 đến 4,5 cùng với enzyme PME có tính acid yếu nên khi pH môi trường tăng cao sẽ ảnh hưởng xấu đến khả năng sinh và trích ly enzyme từ môi trường lên men.

Kết quả Bảng 2 cho thấy, việc điều chỉnh pH ban đầu của môi trường lên men (thông qua việc sử dụng dung dịch đệm ở pH tương ứng làm dung môi pha loãng) giá trị pH = 4,0 là thông số tối ưu cho hiệu quả thu nhận PME từ *A. niger* cao nhất.

3.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian ủ đến khả năng sinh tổng hợp PME từ *A. niger*



Hình 2. Biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến hoạt tính PME

Kết quả trong Hình 2 cho thấy, hoạt tính enzyme thu được có mối liên quan chặt chẽ đến sự sinh trưởng và phát triển của tế bào nấm mốc. Điều này có thể được giải thích do trong 24 giờ sau khi cấy, bào tử nấm mốc *A. niger* dần thích nghi với điều kiện môi trường, do vậy chúng chưa gia tăng sinh khối đáng kể. Vì thế, việc thu nhận enzyme ở thời điểm này là quá sớm khiến cho enzyme chưa được sinh tổng hợp nhiều dẫn đến enzyme thu được có hoạt tính khá thấp. Ở nhiệt độ khảo sát 37 và 42^{o}C, hoạt tính enzyme thu được là 0 U/mL sau 24 giờ nuôi cấy. Sau 24 giờ tiếp theo, nấm mốc bắt đầu gia tăng mật số, nên hoạt tính của enzyme lúc này bắt đầu tăng.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, thời gian để nấm mốc phát triển tối ưu, khả năng sinh tổng hợp enzyme có hoạt tính cao nhất là 96 giờ sau khi cấy. Điều này có thể được giải thích là do trong khoảng thời gian này nấm mốc đã hoàn toàn thích nghi được với điều kiện môi trường và quá trình sinh khối tăng rất nhanh. Bên cạnh đó, việc gia tăng mật số của tế bào nấm mốc góp phần tổng hợp enzyme được tăng mạnh. Do đó, thời điểm tốt nhất để thu chế phẩm enzyme tương ứng với điều kiện rắn là 96 giờ. Sau thời gian phát triển tối ưu, hoạt tính của enzyme *A. niger* PME thu được bắt đầu giảm. Điều này là do sau giai đoạn tăng trưởng nấm mốc sẽ chết đi, trong khi đó số bào tử mới được hình thành trong điều kiện cơ chất đã nghèo nàn dinh dưỡng nên không thể tăng trưởng tiếp tục được nữa. Do vậy, quá trình sinh tổng hợp enzyme hầu như ngừng lại nên hoạt tính enzyme thu được thấp nên nếu tiếp tục kéo dài thời gian nuôi cấy thì hoạt tính PME sẽ càng giảm xuống.

Tóm lại, điều kiện ủ nấm mốc thích hợp nhất nhằm thu được enzyme PME có hoạt tính cao từ *A.niger* là ở nhiệt độ 32^{o}C trong thời gian 96 giờ khi được nuôi cấy trên bề mặt môi trường ở trạng thái rắn (SSF).

4. KẾT LUẬN

Enzyme PME thu được sau quá trình nuôi cấy là chế phẩm ở dạng thô. Trong quá trình nuôi cấy nấm *Aspergillus niger* để thu nhận enzyme, nếu điều kiện nuôi cấy không đảm bảo thích hợp cho sự phát triển của nấm sẽ làm giảm khả năng tổng hợp enzyme PME có hoạt tính cao. Ở tỉ lệ vỏ đu đủ và vỏ bưởi là 70/30, hoạt tính PME thu được là 16,8 U/mL đã được ghi nhận khi lên men cơ chất ở môi trường rắn với tỉ lệ pha loãng cơ chất với nước là 1:1,5. Trong suốt quá trình lên men, điều kiện pH, nhiệt độ và thời gian ủ đều có ảnh hưởng rất đáng kể đến hiệu suất thu hồi enzyme PME. Qua đó, pH thích hợp cho quá trình lên men sinh PME là 4,0 và nhiệt độ lên men tối ưu là 32 ±1^{o}C. Đồng thời qua đó, có sự tương quan giữa điều kiện môi trường lên men nhiệt độ và thời gian ủ đến khả năng sinh enzyme PME từ nấm *Aspergillus niger*. Quá trình lên men xảy ra chậm hơn ở nhiệt độ quá cao. Trong điều kiện lên men rắn (SSF), thời gian ủ thích hợp cho hiệu quả sinh enzyme PME cao nhất (36,8 U/mL) là 4 ngày tương ứng với nhiệt độ ủ 32 ±1^{o}C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Đặng Thị Thu, Lê Ngọc Tú, Tô Kim Anh, Phạm Thu Thủy và Nguyễn Xuân Sâm (2012). *Công nghệ enzyme*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, Việt Nam.

[2] Nguyễn Đức Lượng (2004). *Công nghệ enzyme*. Nhà xuất bản Đại học quốc gia TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.

[3] Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez, M., Serrano, L., & Viniegra, G. G. (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. *J. Food Sci. Technol*, 31, No.1, pp. 22-26

[4] Duvetter, T. (2007). *Understanding the role of fungal pectin methylesterase in fruit texture engineering*. Docteraasproefschrift Nr. 729 an de Faculteit Bioingenieurswetenschappen van de KU. Leuven.

[5] Joshi, V.K., Parmar, M., & Rana, S. (2006), Pectin Esterase Production from Apple Pomance in Solid - State and Submerged Fermentation, *Food Technology Biotechnology*, 44 (2), pp. 53-256.

[6] Martin, N. , De Souza, S.R., Da Silva, R., & Gomes, R. (2004). Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct, braz. *Arch. Biol. Technol.*, 47, pp. 813-819.

[7] Mukesh Kumar Patidar (2016). Papaya peel valorization for production of acidic pectin methylesterase by Aspergillus tubingensis and its application for fruit juice clarification, *Biocatalysis and Agricultural iotechnology*, pp. 58-67.

[8] Pilnik, W., & Voragen, A.G.J. (1993), Pectic enzymes in Fruit and Vegetable Juice Manufacture. *Enzymes in Food Processing.* Academic Press Limited, London, Third Edition, pp. 363-392.

[9] Polizeli, M. L. T., Jorge, J.A., & Terenzi, H.F. (1991). Pectinase production by Neurospora crassa: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity, *J. Gen. Microbiol.*, 137, pp. 1815-1823.

[10] Silva, D., Tokuioshi, K., Martins, E.S, Da Silva, R., & Gomes, E. (2005). Production of pectinase by solid-state fermentation with Penicillium viridicatum RFC 3, *Process Biochemistry*. 40, pp. 2885-2889.

[11] Taylor, M., & Richardson, T. (1979). Applications of microbial enzymes in food system and in biotechnology, Adv. Appl. Microbiol.

[12] Torres, E.F., Aguilar C., Esquivel J.C.C., & Gonzales, G.V. (2005). Pectinase. In: Enzyme Technology, Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, (Eds), *Asiatech Publishers Inc.*, New Delhi, India, pp. 273-296.