

Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn sinh pectinase từ đất trồng và vỏ quả cà phê, ứng dụng trong lên men sản xuất cà phê

Nguyễn Thị Thu Huyền¹, Trịnh Thị Thu Thủy², Lê Thị Ngọc Thúy¹, Đặng Thảo Yến Linh³, Nguyễn Thị Thanh Thủy^{1*}

¹Khoa Công nghệ Thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Công nghệ Vật liệu, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6 Thanh Xuân Bắc, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/4/2023; ngày chuyển phản biện 28/4/2023; ngày nhận phản biện 20/5/2023; ngày chấp nhận đăng 25/5/2023

Tóm tắt:

Pectinase là nhóm enzyme thủy phân pectin, một loại polysaccharide có ở thành tế bào thực vật, tạo ra hợp chất phân tử thấp như galacturonic, galactose, arabinose, methanol... Pectinase được phép sử dụng trong thực phẩm do không ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp pectinase và xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ pectinase của các chủng vi khuẩn, làm cơ sở cho nghiên cứu ứng dụng loại bỏ pectin trên lớp vỏ nhầy trong quá trình lên men sản xuất cà phê. 32 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ các mẫu đất trồng cà phê và vỏ cà phê khô thu thập tại Tây Nguyên và Quảng Trị, trong đó 4 chủng có hoạt độ pectinase cao nhất là DA2.7; DA3.1; DA4.1 và VC1.1. Các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được định danh dựa trên trình tự gen mã hóa 16S rRNA, cụ thể: chủng DA2.7, DA3.1 tương đồng với *Calidifontibacillus erzurumensis*; chủng DA4.1 tương đồng với *Bacillus stercoris*; chủng VC1.1 tương đồng với *Bacillus subtilis*. Điều kiện lên men thích hợp cho chủng VC1.1 sinh pectinase là môi trường pH 5,0 ở 50°C trong 48 giờ. Pectinase thô được ứng dụng trong lên men cà phê thu được sản phẩm có hàm lượng chất khô hòa tan đạt 6,10°Brix và caffein đạt 0,6/100 mg.

Từ khóa: *Bacillus*, lên men cà phê, pectinase, phân lập vi khuẩn.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8, 2.10

Isolation and selection of pectinase-synthesising bacteria from soil and coffee husk for application in coffee fermentation

Thi Thu Huyen Nguyen¹, Thi Thu Thuy Trinh², Thi Ngoc Thuy Le¹, Thao Yen Linh Dang³, Thi Thanh Thuy Nguyen^{1*}

¹Faculty of Food Science and Technology, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quỳ Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quỳ Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

³Center for Advanced Materials Technology, National Center for Technological Progress, C6 Thanh Xuan Bac, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 25 April 2023; revised 20 May 2023; accepted 25 May 2023

Abstract:

Pectinase is a group of enzymes that hydrolyse pectin, a polysaccharide found in plant cell walls, into low molecular compounds such as galacturonic acid, galactose, arabinose, methanol, etc. Pectinase can be used in foods as it does not affect human health. This study was conducted to isolate and select bacterial strains capable of pectinase biosynthesis and determine the factors affecting pectinase activity of bacterial strains as a basis for applied research to remove pectin during fermentation to produce coffee. 32 bacterial strains were isolated from samples of coffee soil and dried coffee pods collected in the Tay Nguyen and Quang Tri, of which the 4 strains with the highest pectinase activity were DA2.7; DA3.1; DA4.1 and VC1.1. Selected bacterial strains were identified to species based on 16S rRNA gene sequences, specifically: strains DA2.7, DA3.1 are homologous to species *Calidifontibacillus erzurumensis*; strain DA4.1 is homologous to the species *Bacillus stercoris*; strain VC1.1 is homologous to the species *Bacillus subtilis*. The suitable fermentation conditions for pectinase-producing strain VC1.1 is pH 5.0 at 50°C for 48 hours. Pectinase is applied in coffee fermentation to obtain a product with a soluble solids content of 6.10°Brix and caffeine of 0.6 mg/100 mg.

Keywords: *Bacillus*, bacteria isolation, coffee fermentation, pectinase.

Classification numbers: 1.6, 2.8, 2.10

*Tác giả liên hệ: Email: ntthuy@vnua.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là nước xuất khẩu cà phê đứng thứ hai trên thế giới, chỉ sau Brazil. Năm 2021, diện tích trồng cà phê của Việt Nam khoảng 710,59 nghìn ha, sản lượng đạt 1,816 triệu tấn/năm [1]. Phần vỏ chứa thịt quả chiếm 40-45% trọng lượng quả cà phê, hàng năm lượng vỏ bỏ đi khoảng 726.400 tấn [2]. Vỏ quả cà phê chứa nhiều đường, protein, xơ, polyphenol, pectin nên việc tận dụng để hình thành những sản phẩm mới như đồ uống sẽ giúp đa dạng hóa sản phẩm và giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Trong vỏ cà phê, pectin chiếm tới 17-20% với hàm lượng cao nhất ở phần giữa và vách tế bào sơ cấp. Pectin có vai trò làm chậm hoạt động của enzyme phân giải tinh bột và đường, làm giảm sự dung nạp glucose, hạn chế tăng cân và tiểu đường; được sử dụng trong quá trình tạo gel, làm đông các sản phẩm mứt [3]. Bên cạnh những điểm có lợi, pectin cũng gây hạn chế trong quá trình thu nhận, lên men để sản xuất đồ uống từ cà phê do tính chất keo. Muốn giải quyết được vấn đề này, enzyme pectinase thường được sử dụng với các điều kiện nhiệt độ, pH phù hợp cho từng loại nguyên liệu.

Pectinase hiện đang được ứng dụng rộng rãi, đa dạng trong rất nhiều quy trình công nghiệp, điển hình như dệt may, chế biến sợi thực vật, sản xuất cà phê, chiết xuất dầu, xử lý nước thải, chế biến rau củ quả [4, 5]... Điểm nổi bật là pectinase được dùng không giới hạn trong thực phẩm do không ảnh hưởng sức khỏe con người [6].

Cà phê là thức uống được tiêu thụ nhiều thứ hai trên thế giới sau trà. Vì vậy, lợi ích sức khỏe và lợi ích kinh tế của cà phê cần được quan tâm nghiên cứu để nâng cao chất lượng và đa dạng sản phẩm. Pectinase được sử dụng để loại bỏ pectin khỏi hạt cà phê, do lớp vỏ chứa pectin sẽ khiến cà phê khi pha bị sệt, chất lượng cảm quan không được đảm bảo. Cà phê được lên men với các vi khuẩn phân giải pectin để loại bỏ lớp chất nhầy, từ đó đặc tính lên men được cải thiện [7].

Vi sinh vật được xem là nguồn nguyên liệu hiệu quả để sản xuất pectinase do thời gian sinh trưởng ngắn, hệ enzyme phong phú, dinh dưỡng nuôi vi sinh vật rẻ tiền, dễ kiếm [8]. Nhiều nghiên cứu về pectinase có nguồn gốc từ vi sinh vật đã được công bố nhưng chủ yếu từ nấm mốc, còn pectinase từ vi khuẩn vẫn hạn chế [9]. Mục đích nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải pectin cao từ đất trồng cà phê và vỏ cà phê tại Tây Nguyên và Quảng Trị, thuộc nhóm an toàn có thể áp dụng trực tiếp xử lý vỏ nhầy trong quy trình sản xuất cà phê.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Bốn mẫu đất vườn trồng cà phê hữu cơ tại các vườn thuộc xã Ea Kao, Buôn Mê Thuột (ĐA1, ĐA2, ĐA3, ĐA4) và 1 mẫu vỏ quả cà phê arabica (VC1) thu thập tại Quảng Trị được sử dụng để phân lập vi khuẩn.

Hạt cà phê arabica được cung cấp từ Quảng Trị. Cà phê được thu hoạch từ tháng 9 đến tháng 11, sau đó được tách vỏ bằng phương thức tách khô. Yêu cầu không lẫn tạp chất, không bị ẩm mốc, không có mùi lạ.

2.2. Phương pháp phân lập

Vi khuẩn được phân lập trên môi trường xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí (PCA) cải tiến có bổ sung cơ chất pectin (pepton 5 g/l, cao nấm men 2,5 g/l, pectin 3 g/l, agar 16 g/l, pH 7,0). Chủng sau khi làm thuần được bảo quản trong ống thạch nghiêng [10].

2.3. Phương pháp xác định hoạt tính pectinase

Xác định khả năng sinh pectinase của các chủng vi khuẩn bằng cách nuôi cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng (NA) cải tiến có bổ sung 5 g/l pectin (pepton 2 g/l, cao nấm men 2 g/l, cao thịt 1 g/l, NaCl 3 g/l, pectin 5 g/l, agar 16 g/l). Chủng vi khuẩn được cấy vạch trên môi trường thạch NA và tiến hành ủ ở 37°C trong 24 giờ. Khả năng sinh tổng hợp pectinase được đánh giá dựa vào kích thước vạch phân giải pectin (bao gồm cả vạch cấy) sau khi nhuộm bằng lugol [11].

Xác định hoạt độ pectinase từ các chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng cách nuôi cấy chủng vi khuẩn trong môi trường NB cải tiến (pepton 2 g/l, cao nấm men 2 g/l, cao thịt 1 g/l, NaCl 3 g/l, pectin 5 g/l) [12]. Một đơn vị hoạt độ pectinase là lượng enzyme cần thiết để xúc tác chuyển hóa pectin tạo thành 1 μ mol galacturonic acid trong thời gian 1 phút, ở những điều kiện hoạt động thích hợp của enzyme [13].

Hoạt độ pectinase xác định bằng công thức:

$$H = \frac{X.f.1000}{600.t} \text{ (U/ml)}$$

trong đó, X: hàm lượng đường khử sau thủy phân (mg/ml); f: hệ số pha loãng; 1000: hệ số quy đổi; 600: khối lượng phân tử pectin; t: thời gian thủy phân (5 phút).

2.4. Định danh các chủng vi khuẩn dựa trên trình tự gen mã hóa 16S rRNA

Định danh tiến hành theo phương pháp của J. Marc và cs (2003) [14] và P. Filipe và cs (2008) [15]. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được tiến hành tách DNA tổng số. DNA tổng số của mỗi chủng vi khuẩn được sử dụng phản ứng PCR

với mỗi xuôi 27F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' và mỗi ngược 1492R: 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' [16]. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được kiểm tra trên gel agarose 1%, sau đó được giải trình tự tại Hãng First-Base, Malaysia. Kết quả giải trình tự được so sánh trình tự tương đồng bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen NCBI.

2.5. Phương pháp xác định điều kiện lên men thu pectinase có hoạt độ cao

Chủng vi khuẩn được lên men trong môi trường chứa ri đường (dịch ri đường 20 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l, pectin 2 g/l) để thu pectinase. Các yếu tố về pH, nhiệt độ và thời gian lên men sẽ được khảo sát tại các khoảng: pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0; nhiệt độ: 37, 45, 50, 55 và 60°C và thời gian: 12, 24, 36, 48 và 60 giờ. Sau khi ủ xong toàn bộ dịch nuôi vi khuẩn được đem ly tâm 10.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Enzyme thô được thu nhận bằng cách lọc dịch nổi phía trên bằng màng lọc tiệt trùng có kích thước lỗ 0,2 μm để loại bỏ tất cả vi sinh vật còn sót lại trong môi trường. Phần nổi phía trên được thu thập như một nguồn enzyme thô [17]. Dịch enzyme thô được tiến hành xác định hoạt độ pectinase.

2.6. Phương pháp lên men hạt cà phê bằng enzyme pectinase thô

Hạt cà phê được xử lý bằng pectinase thô ở tỷ lệ 8% (xác định thông qua các thí nghiệm khảo sát). Đối chứng là mẫu không xử lý enzyme (đối chứng âm) và mẫu xử lý bằng pectinase thương mại Viscozyme L (đối chứng dương). Tất cả mẫu đối chứng và mẫu thử được ủ ở 35°C trong 32 giờ. Các mẫu sau lên men được tiến hành xác định hàm lượng tổng chất rắn hòa tan và caffeine.

Sau khi xử lý, hạt cà phê đã rửa sạch được sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi đạt độ ẩm ban đầu (7,7%). Sau đó, hạt cà phê khô được rang ở nhiệt độ 240°C trong 15 phút và nghiền thành bột. 10 gram bột cà phê được cho vào cốc và thêm 70 ml nước đun sôi. Hỗn hợp được lắc với tốc độ 175 vòng/phút trong 10 phút. Sau khi các mẫu nguội đi, chúng được lọc bằng giấy lọc để lấy phần nổi phía trên. Cuối cùng, hàm lượng chất rắn hòa tan của dung dịch chiết được đo bằng khúc xạ kế.

Sau đó, cà phê bột của 3 mẫu (không xử lý men, lên men bằng pectinase thô và lên men bằng Viscozyme L) được xác định hàm lượng cafein theo TCVN 9723: 2013.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được phân tích ANOVA trên phần mềm Microsoft Excel để so sánh sự khác biệt trung bình giữa các lần lặp lại trong cùng thí nghiệm $p < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập, sàng lọc và định danh các chủng vi khuẩn sinh pectinase

Từ các mẫu đất trồng cà phê và vỏ cà phê thu thập tại Tây Nguyên và Quảng Trị, nghiên cứu đã phân lập được 32 chủng vi khuẩn, trong đó 26 chủng có khả năng sinh pectinase (bảng 1). Dựa trên kích thước vùng phân giải, nghiên cứu này đã lựa chọn được 9 chủng có vòng phân giải rộng nhất (kích thước lớn hơn 10 mm) là ĐA2.6, ĐA2.7, ĐA3.1, ĐA3.5, ĐA3.6, ĐA3.7, ĐA4.1, ĐA4.3, VC1.1.

Bảng 1. Khả năng sinh pectinase của các chủng vi khuẩn phân lập.

TT	Mẫu	Ký hiệu mẫu	Kích thước vùng phân giải (mm)	Hoạt độ (U/ml)
1		ĐA1.1	3,50±0,50	-
2		ĐA1.4	8,23±0,25	-
3	Đất trồng	ĐA1.5	1,27±0,21	-
4	Cà phê hữu cơ vườn 1	ĐA1.6	0	-
5		ĐA1.7	0	-
6		ĐA1.8	6,23±0,25	-
7		ĐA1.9	5,50±0,50	-
8		ĐA2.1	4,17±0,29	-
9		ĐA2.2	6,27±0,31	-
10	Đất trồng	ĐA2.3	7,17±0,29	-
11	Cà phê hữu cơ vườn 2	ĐA2.4	5,30±0,27	-
12		ĐA2.5	7,40±0,36	-
13		ĐA2.6	10,57±0,40	2,337±0,002
14		ĐA2.7	12,00±0,50	2,776±0,003
15		ĐA3.1	11,33±0,29	2,714±0,005
16	Đất trồng	ĐA3.2	6,67±1,53	-
17	Cà phê hữu cơ vườn 3	ĐA3.5	10,40±0,20	2,220±0,005
18		ĐA3.6	10,36±0,15	2,048±0,005
19		ĐA3.7	10,43±0,15	1,973±0,004
20		ĐA4.1	11,00±0,2	2,684±0,003
21		ĐA4.2	0	-
22		ĐA4.3	10,50±0,50	2,122±0,005
23	Đất trồng	ĐA4.4	6,33±1,53	-
24	Cà phê hữu cơ vườn 4	ĐA4.5	2,23±0,25	-
25		ĐA4.6	3,67±0,76	-
26		ĐA4.7	6,00±0,50	-
27		ĐA4.8	6,23±0,25	-
28		ĐA4.9	0	-
29		ĐA4.10	0	-
30	Vỏ cà phê khô	VC1.1	11,50±0,50	2,683±0,005
31		VC1.4	5,43±0,40	-
32		VC1.5	0	-

Đồng thời, nghiên cứu này đã xác định hoạt độ pectinase của dịch nuôi 9 chủng vi khuẩn trên, kết quả cho thấy, 4 chủng có hoạt độ pectinase cao nhất là ĐA2.7, ĐA3.1, ĐA4.1, VC1.1. So sánh với các công bố về pectinase của một số tác giả thì hoạt độ của 4 chủng trên còn tương đối thấp. Nghiên cứu của G. Tripathi và cs (2014) [18] thu được chủng *Bacillus subtilis* phân lập từ đất có hoạt độ 4,5 U/mg. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này hoạt độ pectinase mới xác định bước đầu để tuyển chọn sơ bộ các chủng có hoạt độ cao hơn, chưa tối ưu thành phần môi trường và điều kiện nuôi để nâng cao khả năng tổng hợp pectinase.

Để có thể ứng dụng các chủng vi khuẩn trên vào sản xuất thực tế, cả 4 chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được định danh dựa trên trình tự gen mã hóa 16S rRNA, sau khi phân tích được so sánh với các trình tự gen tương đồng trên GenBank bằng chương trình BLAST SEARCH (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Kết quả được thể hiện trên bảng 2.

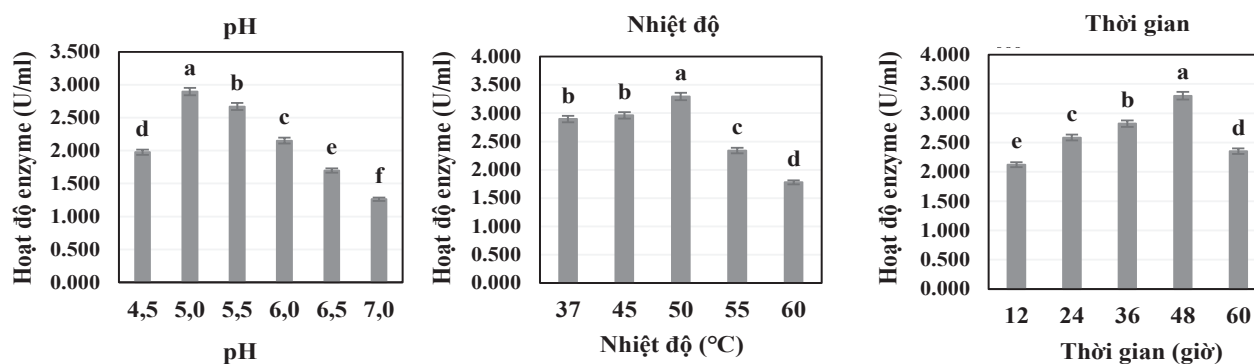
Bảng 2. Kết quả so sánh mức độ tương đồng của trình tự 16S rRNA của các chủng vi khuẩn với dữ liệu trên GenBank.

TT	Chủng vi khuẩn tuyển chọn	Tên chủng vi khuẩn trong cơ sở dữ liệu GenBank	Mã số GenBank	Mức độ tương đồng (%)
1	ĐA 2.7	<i>Calidifontibacillus erzurumensis</i> , strain P2	NR180225.1	99,93
		<i>Bacillus velezensis</i> , strain CBMB205	NR116240.1	99,85
2	ĐA 3.1	<i>Calidifontibacillus erzurumensis</i> , strain P2	NR180225.1	100
		<i>Bacillus velezensis</i> , strain CBMB205	NR116240.1	99,93
3	ĐA 4.1	<i>Bacillus stercoris</i> , strain GB21	MT214144.1	99,93
		<i>Bacillus subtilis</i> , strain IAM 12118	NR112116.2	99,86
4	VC1.1	<i>Bacillus subtilis</i> , strain HY2-62	CP110365.1	100
		<i>Bacillus cabrialesii</i> , strain TE3	NR180419.1	99,93

Sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự, phân tích, so sánh với dữ liệu trên GenBank cho thấy, chủng ĐA 2.7 có độ tương đồng 99,93% với *Calidifontibacillus erzurumensis*; ĐA3.1 có độ tương đồng 100% với *Calidifontibacillus erzurumensis*; chủng ĐA4.1 độ tương đồng 99,93% với *Bacillus stercoris* và chủng VC1.1 có độ tương đồng 100% với *Bacillus subtilis*. Trong số các chủng đã định tên, nhận thấy rằng *B. subtilis* là chủng đã được công nhận là an toàn (GRAS), được báo cáo là tạo ra bacteriocin như subtilisin để ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh liên quan đến vật nuôi, bao gồm cả *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens* và *Escherichia coli* [19-21]. *B. subtilis* là lợi khuẩn chịu được điều kiện môi trường khắc nghiệt, có khả năng sinh enzyme tốt nhất và được sản xuất thành chế phẩm trên quy mô công nghiệp, ứng dụng rộng rãi trong y học, nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm. Vi khuẩn này được đánh giá an toàn và hiệu quả nhất để sử dụng trong ngành công nghệ sinh học sản xuất các amino acid quan trọng như: lysine, valine, tyrosine, threonine, aspartic... Trong y học, *B. subtilis* có đặc tính probiotic đã trở thành cái tên quen thuộc để tăng cường hệ tiêu hóa cho cả người và động vật, điều trị các chứng viêm ruột, đại tràng, chống tiêu chảy do lạm dụng kháng sinh hoặc loạn khuẩn đường ruột [22]. Đối với 3 chủng vi khuẩn còn lại được xác định thuộc loài *Calidifontibacillus erzurumensis* và *Bacillus stercoris*, đây là các loài vi khuẩn chưa có các ghi nhận về tính an toàn khi sử dụng cho người, do đó cần có thêm nhiều nghiên cứu trước khi ứng dụng. Do vậy, chủng VC1.1 tạm thời gọi là *B.subtilis* VC1.1 được lựa chọn để sử dụng cho nghiên cứu lên men cả phê.

3.2. Điều kiện lên men thích hợp cho chủng *B. subtilis* VC1.1 để thu pectinase

pH, nhiệt độ và thời gian là các yếu tố ảnh hưởng tới hoạt độ pectinase của chủng *B. subtilis* VC1.1 (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và thời gian đến quá trình lên men sản xuất pectinase của chủng vi khuẩn *B. subtilis* VC1.1

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng *B. subtilis* VC1.1 có hoạt độ enzyme pectinase tăng khi môi trường nuôi cấy có pH từ 4,5 đến 5,0 và đạt cao nhất tại môi trường có pH là 5,0. Nghiên cứu của J. Prajapati và cs (2021) [23] cũng cho thấy, chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* BK-3 sinh enzyme pectinase có hoạt độ cao nhất ở pH 5,0 và nhiệt độ 50°C.

Chủng *B. subtilis* VC1.1 có hoạt độ pectinase tăng trong khoảng nhiệt độ 37-50°C; giá trị hoạt độ enzyme đạt cao nhất tại nhiệt độ 50°C. Các nghiên cứu khác cho thấy, nhiệt độ tối ưu của *B. subtilis* BK-3 là 50°C [23], hay *B. cereus* phân lập từ phế phụ phẩm nông nghiệp sinh tổng hợp enzyme pectinase tối ưu ở 50°C [24].

Nghiên cứu này cũng đã xác định được thời gian nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp pectinase của chủng *B. subtilis* VC1.1 là 48 giờ. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy, thời gian nuôi cấy thích hợp cho sinh pectinase của chủng *B. stearothermophilus* và *B. cereus* phân lập từ nguồn phế phụ phẩm nông nghiệp là 36 giờ [24].

Như vậy, điều kiện thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp pectinase của chủng vi khuẩn *B. subtilis* VC1.1 là ở pH 5,0, nhiệt độ 50°C và thời gian nuôi cấy 48 giờ.

3.3. Ứng dụng enzyme pectinase trong lên men cà phê

Sử dụng pectinase thô sản xuất bởi chủng *B. subtilis* VC1.1 lên men hạt cà phê. Kết quả đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng cà phê sau lên men trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Chất lượng của cà phê ở các điều kiện lên men khác nhau.

Loại enzyme	Hàm lượng chất khô hòa tan (°Brix)	Caffein (mg/100 mg)
Không dùng enzyme (ĐC-)	3,97±0,2 ^c	0,35±0,06 ^c
Pectinase thô	6,10±0,1 ^b	0,60±0,05 ^b
Viscozyme L (ĐC +)	7,53±0,1 ^a	0,84±0,08 ^a

Ghi chú: các chữ mũ khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau là có ý nghĩa ở mức $\alpha=0,05$.

Kết quả cho thấy, hạt cà phê được lên men bằng enzyme (thô, thương mại) đều có hàm lượng chất khô hòa tan và hàm lượng caffein cao hơn so với cà phê không được lên men bằng enzyme. Kết quả này là do pectinase giúp phân giải pectin của hạt cà phê giải phóng chất rắn hòa tan và caffein, khiến hàm lượng hai chất này ở cà phê xử lý enzyme cao hơn so với cà phê không được xử lý. Viscozyme L cho hiệu quả xử lý hạt cà phê tốt hơn, bởi đây là một enzyme thương mại, trong thành phần không chỉ có pectinase mà còn có thêm cellulase, do vậy khi sử dụng enzyme này để lên men thì cả pectin và cellulose ở thành tế bào của hạt cà phê đều

bị phân giải, khiến hàm lượng chất khô hòa tan tổng số và caffein đều được giải phóng ra nhiều hơn. Tuy nhiên có thể thấy rằng, hiệu quả xử lý hạt cà phê của enzyme thô sản xuất với vi khuẩn *B. subtilis* VC1.1 trong nghiên cứu không thấp hơn quá nhiều so với enzyme thương mại, điều này cho thấy triển vọng ứng dụng của chủng vi khuẩn này trong quá trình lên men sản xuất cà phê, khi các yếu tố về điều kiện lên men được tối ưu và kiểm soát chặt chẽ hơn nữa.

4. Kết luận

Từ 5 mẫu đất và vỏ cà phê khô thu thập tại Tây Nguyên và Quảng Trị, nghiên cứu đã phân lập được 32 chủng vi khuẩn, trong đó đã tuyển chọn được 4 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp pectinase cao. Các chủng sau đó đã được định danh dựa trên trình tự gen 16S rRNA, cho thấy chủng ĐA 2.7 và ĐA3.1 thuộc loài *Calidifontibacillus erzurumensis*; chủng ĐA4.1 thuộc loài *Bacillus stercoris* và chủng VC1.1 thuộc loài *Bacillus subtilis*. Sàng lọc được 1 chủng là *B. subtilis* VC1.1, có khả năng ứng dụng trong lên men sản xuất cà phê. Điều kiện lên men thích hợp cho quá trình sản xuất pectinase của chủng *B. subtilis* VC1.1 đã được xác định, hoạt độ enzyme pectinase cao nhất là 3,297 U/ml khi lên men chìm bằng ri đường ở pH 5,0, nhiệt độ 50°C và thời gian nuôi cấy 48 giờ. Pectinase thô sau đó được thử nghiệm ứng dụng trong lên men cà phê, sau lên men cà phê có hàm lượng chất khô hòa tan đạt 6,10°Brix và caffein đạt 0,6 mg/100 mg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.T.T. Hien (2021), “Boosting Vietnam’s coffee exports to the EU under the EVFTA”, *Vietnam Trade and Industry Review*, **6**, pp.111-116 (in Vietnamese).
- [2] B.A. Vo, N.D. Luong (2010), “Study on receiving crude pectin from coffee pulp”, *Science & Technology Development*, **13**(2), pp.50-56 (in Vietnamese).
- [3] T.N. Hung (2019), “Using the viscous layer of coffee fruit to culture microorganism so as to receive enzyme pectinase for increasing transparency of wine”, *Thu Dau Mot University Journal of Science*, **1**(44), pp.34-43, DOI: 10.37550/tdmu.VJS/2020.01.011 (in Vietnamese).
- [4] S. Rebello, M. Anju, E.M. Aneesh, et al. (2017), “Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: An overview”, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **16**, pp.381-394, DOI: 10.1007/s11157-017-9437-y
- [5] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, et al. (2016), “Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century”, *Biotech*, **6**(2), DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8.

- [6] T.Q. Dung, N.T.K. Co, N.T. Suong, et al. (2015), *Isolation and Screening of Aspergillus Niger Strains for Biosynthesis of Pectinase from Feels of Some Fruits: Banana, Apple, Mango, Dragon, and Carrot in Hue City*, The 6th National Scientific Conference on Ecology and Biological Resources, pp.1073-1077 (in Vietnamese).
- [7] N. Sharma, M. Rathore, M. Sharma, (2012), “Microbial pectinase: Sources, characterization and applications”, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **12**(1), pp.45-60, DOI: 10.1007/s11157-012-9276-9.
- [8] N.D. Luong, C. Cuong, N.A. Tuyet, et al. (2004), *Enzyme Technology*, Vietnam National University - Ho Chi Minh City Publishing House, 533pp (in Vietnamese).
- [9] P.T.N. Lan, N.T.B. Chau, N.T.M. Thu (2020), “Isolation and selection of pectinolytic bacterial strains from fruit peels”, *Hue University Journal of Science*, **17**(2), pp.83-90 (in Vietnamese).
- [10] N.X. Thanh, N. Duong, H. Hai (2007), *Soil Biology Textbook*, Education Publishing House, 269pp (in Vietnamese).
- [11] P.T.N. Lan, H.N. Thanh (2012), “Research on starch-degrading mold strains isolated from shrimp culture ponds at Sam - Chuon lagoon, Thua Thien Hue province”, *Hue University Journal of Science*, **73**(4), pp.147-156 (in Vietnamese).
- [12] G.L. Miller (1969), “Use of dinitrosilicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical 11-Chemistry*, **31**(3), pp.426-428, DOI: 10.1021/ac60147a030.
- [13] D.R. Motwani, V.C. Meshram, V.S. Jambhulkar (2013), “Partial characterization of pectinase produced by *Aspergillus niger* grown on wheat bran”, *International Journal of Scientific & Engineering Research*, **4**(12), pp.345-365.
- [14] J. Marc, C. Lemaire, V.V. Bagnis, et al. (2003), “Direct sequencing method for species identification of canned sardine and sardine-type products”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(25), pp.7326-7332, DOI: 10.1021/jf034652t.
- [15] P. Filipe, C. Lemaire, V.V. Bagnis, et al. (2008), “Identification of species with DNA-based technology: Current progress and challenges”, *Recent Patents on DNA and Gene Sequences*, **2**(3), pp.187-200, DOI: 10.2174/187221508786241738.
- [16] D.J. Lane (1991), *16S/23S rRNA Sequencing, Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, pp.115-175.
- [17] N.Q. Duy, N.T.X. Quynh, T.T.T. Huong, et al. (2017), “Pectinase production by *Bacillus subtilis* on different fermentation modes and its application on coffee treatment”, *International Journal of Modern Engineering Research*, **7**(9), pp.50-55.
- [18] G. Tripathi, J. Zoya, Sushma, et al. (2014), “Pectinase production and purification from *Bacillus subtilis* isolated from soil”, *Advances in Applied Science Research*, **5**(1), pp.103-105.
- [19] R.M.L. Ragione, G. Casula, S.M. Cutting, et al. (2001), “*Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry”, *Vet Microbiol.*, **79**(2), pp.133-142, DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00350-3.
- [20] R.M.L. Ragione, M. J. Woodward (2003), “Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype enteritidis and clostridium perfringens in young chickens”, *Vet Microbiol.*, **94**(3), pp.245-256, DOI: 10.1016/S0378-1135(03)00077-4.
- [21] I.S. Khatri, T.N. Ramya, S. Subramanian (2016), “Complete genomes of *Bacillus coagulans* S-lac and *Bacillus subtilis* TO-A JPC, two phylogenetically distinct probiotics”, *PLOS ONE*, **11**(6), DOI: 10.1371/journal.pone.0156745.
- [22] G.Y. Yu, J.B. Sinclair, G.L. Hartman (2009), “Production of iturin a by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*”, *Soil Biology and Biochemistry*, **34**(7), pp.955-963, DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00027-5.
- [23] J. Prajapati, P. Dudhagara, K. Patel (2021), “Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **35**, DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102063.
- [24] N. Torimiro, R.E. Okonji (2013), “A comparative study of pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species”, *African Journal of Biotechnology*, **12**(46), pp.6498-6503, DOI: 10.5897/AJB2013.12421.