



PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC MỘT SỐ CHỦNG NẤM MỐC PHỤC VỤ CHO NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN PECTINASE

Phan Thị Thanh Diễm^{1*}, Phạm Thị Ngọc Lan², Ngô Thị Bảo Châu², Trần Quốc Dung³

¹Trường Đại học Quảng Nam, 102, Hùng Vương, Tam Kỳ, Quảng Nam, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77, Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

³Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 32 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Pectinase là enzyme xúc tác sự thủy phân pectin, được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến thực phẩm để làm mềm vách tế bào, tăng quá trình ly trích các loại nước ép trái cây; hỗ trợ quá trình lọc và làm trong các loại nước ép trái cây, rượu vang. Từ một số loại vỏ củ, quả giàu pectin chúng tôi đã phân lập và sàng lọc được 113 chủng nấm mốc có hoạt tính pectinase cao được kí hiệu M1-M113. Số lượng nấm mốc có khả năng phân giải pectin dao động từ $6,3 \times 10^3$ đến $35,1 \times 10^3$ CFU/g. Đã tuyển chọn được 2 chủng nấm mốc M45 và M68 có hoạt tính pectinase mạnh với hoạt độ chung lần lượt là 110,2 U/mL và 98,5 U/mL. Bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS, chủng M45 được định danh là *Aspergillus oryzae* và chủng M68 là *Aspergillus flavus*. Các trình tự ITS của hai chủng *A. oryzae* 45 và *A. flavus* M68 đã được đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là MH746006 và MH746007.

Từ khóa: *Aspergillus*, ITS, pectinase, phân lập, sàng lọc

1 Mở đầu

Pectinase là một nhóm enzyme thủy phân cơ chất pectin, với sản phẩm tạo thành là galacturonic acid, galactose, methanol... [6]. Đây là nhóm enzyme được ứng dụng rộng rãi sau amylase và protease. Pectinase được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến thực phẩm, lên men cotton, tách rời các sợi thực vật, xử lý nước thải, lọc dầu thực vật, lên men trà và cà phê, tẩy trắng giấy... Trong lĩnh vực chế biến trái cây, pectinase được sử dụng nhằm mục đích gia tăng hiệu suất thu hồi dịch quả, cải thiện chất lượng và có tác dụng làm trong dịch quả. Một đặc điểm nổi bật của pectinase là các enzyme này được dùng không giới hạn trong thực phẩm vì không ảnh hưởng đến sức khỏe con người [1]. Mặc dù pectinase có mặt nhiều ở thực vật và vi sinh vật, nhưng trong sản xuất công nghiệp người ta thường dùng các loại nấm mốc như *Aspergillus* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma* sp., *Neurospora crassa*... Trong số các loài nấm mốc thì chi *Aspergillus* luôn là lựa chọn hàng đầu. Với khả năng phát triển nhanh trên nhiều loại cơ chất khác nhau, đặc biệt là trên các phế liệu nông nghiệp giàu pectin, nấm mốc *Aspergillus* luôn thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà

*Liên hệ: dphan2010@gmail.com

ngiên cứu [3]. Ở Việt Nam có nhiều công trình nghiên cứu liên quan đến pectinase. Huỳnh Ngọc Oanh và Trần Ngọc Hùng (2008) nghiên cứu tinh chế enzyme pectinase bằng phương pháp lọc gel và lọc màng [7]. Trần Thị Thanh Thuần và Nguyễn Đức Lượng (2009) sử dụng chế phẩm chứa pectinase để xử lý nhanh vỏ cà phê trong quá trình ủ hoai [8]. Trần Quốc Dung và cs. (2015) đã tuyển chọn được 50 dòng nấm mốc *Aspergillus* có hoạt tính pectinase từ các loại vỏ quả giàu pectin [1]...

Mặt khác, hàng năm ngành công nghệ chế biến thực phẩm thải ra một lượng lớn các loại phế phụ liệu giàu pectin như cùi, vỏ các loại củ quả, lợi dụng nguồn phế liệu này để ứng dụng trong việc sản xuất pectinase ở quy mô công nghiệp đồng thời giảm thiểu lượng xác bã thực vật thải ra gây ô nhiễm môi trường. Bài báo này trình bày một số kết quả ban đầu về phân lập và sàng lọc một số chủng nấm mốc *Aspergillus* có khả năng sinh tổng hợp pectinase từ các loại vỏ, củ quả giàu pectin.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

Một số mẫu vỏ củ, quả giàu pectin như: cam, chanh, bưởi, quýt, chuối, xoài, táo, khoai tây, cà rốt được thu gom tại các chợ, các quầy nước ép trái cây ở thành phố Huế. Sử dụng môi trường Czapek – pectin (g/L) để phân lập các chủng nấm mốc, thành phần môi trường như sau: K_2HPO_4 0,2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g; $NaNO_3$ 2,0 g; KCl 0,5 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g (Xilong Chemical, Trung Quốc); pectin 5,0 g (HIMEDIA, Đức); agar 20 g (Hải Long, Việt Nam); pH 6,5. Dùng pectin 5,0 g (HIMEDIA, Đức); agar 20 g (Hải Long, Việt Nam); pH 6,5 làm môi trường tuyển chọn các chủng nấm mốc *Aspergillus*.

2.2 Phương pháp

Phân lập các chủng nấm mốc trên môi trường có bổ sung pectin

Các chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa pectin được phân lập dựa theo phương pháp Koch [4]. Các loại vỏ quả, củ để lên mốc tự nhiên. Lấy 10g mẫu (phần bị hỏng do nấm mốc) cắt thành mảnh 1–1,5 mm, sau đó nghiền nhỏ, cho vào ống nghiệm chứa 90 mL nước vô trùng được độ pha loãng 10^1 . Lắc ống nghiệm chứa mẫu trên máy vortex để dịch tan đều. Hút 1 mL dịch từ ống nghiệm này đưa sang ống nghiệm khác cũng chứa 9 mL nước vô trùng lắc đều được độ pha loãng 10^2 . Tiếp tục pha loãng cho đến độ pha loãng cần thiết. Sau đó hút 100 μ L ở các độ pha loãng đã chọn nhỏ vào mỗi đĩa petri chứa môi trường Czapek có bổ sung 15 % pectin đã được khử trùng. Dùng que gạt thủy tinh vô trùng trải đều giọt dịch lên mặt thạch. Bao gói, ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30 °C trong thời gian 3–4 ngày. Số lượng tế bào nấm mốc được xác định bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [4].

Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp cấy chấm điểm

Tiến hành cấy trực tiếp bào tử nấm mốc từ ống giống thuần khiết vào đĩa môi trường Czapeck thạch chỉ bổ sung nguồn carbon duy nhất là pectin, mỗi đĩa cấy 1 chấm. Đặt các đĩa đã cấy vào tủ ẩm ở nhiệt độ 30 °C. Sau 4 ngày nhuộm mẫu bằng thuốc thử Lugol, đổ thuốc nhuộm Lugol lên bề mặt môi trường thạch đĩa. Nhuộm màu 1–2 phút rồi loại bỏ phần thuốc nhuộm còn lại trong đĩa thạch. Khả năng phân giải pectin được xác định dựa vào hiệu số của đường kính vòng phân giải pectin với đường kính khuẩn lạc của nấm mốc [4].

Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch

Nuôi cấy lác các chủng nấm mốc trong môi trường dịch thể Czapek – pectin (với lượng bào tử cấy vào mỗi bình thí nghiệm là 5 mL/50 mL môi trường), tốc độ lắc 120 rpm ở nhiệt độ 30 °C trong 4 ngày. Sau đó tiến hành lọc dịch nuôi cấy bằng máy hút chân không thu enzyme ngoại bào. Phần sinh khối nấm mốc được sấy khô tuyệt đối để đánh giá khả năng sinh trưởng phát triển. Phần dịch enzyme được sử dụng để xác định hoạt tính pectinase.

Chuẩn bị môi trường thạch – cơ chất: thạch (2 %) và pectin (0,3 %) được phân phối vào các bình tam giác, khử trùng ở nhiệt độ 121 °C trong 20 phút, đổ thạch đĩa với mỗi đĩa 80 mL môi trường. Đục lỗ và nhỏ dịch enzyme: dùng khoan để tạo giếng sau khi thạch đông. Nhỏ 0,6 mL dịch enzyme ngoại bào vào giếng, đậy nắp hộp và đưa vào ủ lạnh 4 °C trong 8 giờ, rồi chuyển vào tủ ẩm 30 °C. Sau 48 giờ ủ, lấy các đĩa thạch ra nhuộm màu bằng thuốc thử lugol. Xác định hoạt tính pectinase bằng cách đo đường kính vòng thủy phân pectin [4].

Xác định hoạt độ

Hoạt độ pectinase được xác định bằng cách đo lượng đường khử được giải phóng từ hoạt động của pectinase trên cơ chất pectin bằng thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Lấy 3 mL hỗn hợp phản ứng bao gồm 0,8 ml dung dịch pectin và 0,2 mL dịch enzyme được pha loãng thích hợp trong 2 mL dung dịch sodium acetate 0,1 M; pH 5. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 40°C trong 10 phút. Sau đó thêm vào 1 mL NaOH và 1 mL DNS; dừng phản ứng bằng cách đun sôi trong 10 phút. Tính lượng đường khử giải phóng bởi sự thủy phân enzyme. Một đơn vị hoạt độ của enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol của các nhóm khử trong một phút với galacturonic acid là tiêu chuẩn trong các điều kiện thí nghiệm [10].

Quan sát đặc điểm hình thái

Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường Czapek thạch đĩa ở nhiệt độ 30 °C; sau 72 giờ lấy ra quan sát kích thước, màu sắc, hình dạng, độ dày, mép khuẩn lạc, sự tạo sắc tố của khuẩn lạc. Sử dụng phương pháp làm tiêu bản phiến kính, hình thái khuẩn ti, cuống sinh bào tử và bào tử nấm mốc được quan sát trên kính hiển vi quang học [4].

Định danh các chủng nấm mốc

Chủng nấm mốc có hoạt tính pectinase mạnh được gửi đi định danh tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa, 793/58 Trần Xuân Soạn, Phường Tân Hưng, Quận 7, Thành phố Hồ Chí Minh. Phương pháp này được tiến hành như sau: đầu tiên tách chiết DNA tổng số của nấm mốc [11]; sau đó khuếch đại trình tự vùng ITS bằng kỹ thuật PCR rồi xác định trình tự vùng ITS theo nguyên lý của phương pháp Sanger cải tiến, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm Sequencing Analysis 5.3 [11] và cuối cùng trình tự này được so sánh với các trình tự ITS trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST để phân loại chủng nấm mốc.

Xử lý số liệu

Thí nghiệm lặp lại ba lần, số liệu được xử lý bằng thống kê mô tả (Microsoft Excel 2010) và phân tích ANOVA (Duncan's test $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 20.0.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập và xác định số lượng tế bào nấm mốc có khả năng phân giải pectinase

Từ một số mẫu vỏ củ, quả giàu pectin như cam, chanh, bưởi, quýt, chuối, xoài, táo, khoai tây, cà rốt, thanh long, đã phân lập và thuần khiết được 113 chủng nấm mốc có hoạt tính pectinase (ký hiệu M1–M113). Số lượng nấm mốc có hoạt tính pectinase phân bố không đồng đều giữa các mẫu phân lập, cao nhất ở mẫu bưởi đỏ Huế MA19 ($35,1 \times 10^3$ CFU/g mẫu). Số lượng nấm mốc thấp nhất ở mẫu cam sành MA2 ($6,3 \times 10^3$ CFU/g mẫu). Số lượng chủng nấm mốc phân lập được nhiều nhất ở mẫu bưởi thanh trà Huế MA18 và mẫu bưởi đỏ Huế MA19 với 11 chủng và thấp nhất ở mẫu cam sành MA2, mẫu xoài MA14 chỉ 2 chủng nấm mốc. Nguyên nhân có thể là do các mẫu thu nhận không đồng đều về độ hư hỏng và cũng có thể do hàm lượng cơ chất pectin ở các mẫu khác nhau hay có sự tham gia của hóa chất bảo quản ở các mẫu khác nhau. Nhìn chung, các loại vỏ quả giàu pectin ở các loại cây có múi phân lập được số lượng chủng nấm mốc cao hơn so với các loại vỏ củ, quả khác. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Số lượng tế bào nấm mốc phân giải pectin trong các mẫu phân lập

Đợt phân lập	Loại mẫu (vỏ)	Ký hiệu mẫu	Số chủng nấm mốc	pH mẫu	CFU/g mẫu ($\times 10^3$)
Đợt 1 (1/6/2017)	Bưởi da xanh	MA1	M1-M5	6,7	18,1 ^g
	Cam sành	MA2	M6-M7	4,5	6,3 ^l
	Bưởi da xanh	MA3	M8-M13	6,4	20,2 ^f
Đợt 2	Quýt đường	MA4	M14-M17	4,8	14,6 ⁱ

(12/6/2017)	Chuối ba lùn	MA5	M18-M20	5,8	7,1 ^k
Đợt 3 (14/6/2017)	Bưởi đỏ	MA6	M21-M23	6,1	10,2 ^j
	Cam sành	MA7	M24-M25	5,1	6,6 ^{kl}
Đợt 4 (28/6/2017)	Bưởi da xanh	MA8	M26-M32	6,9	16,2 ^h
	Bưởi năm roi	MA9	M33-M39	5,1	17,4 ^{gh}
Đợt 5 (4/7/2017)	Cam dòng	MA10	M40-M45	4,5	22,2 ^e
	Chuối tiêu	MA11	M46-M49	5,9	20,1 ^f
Đợt 6 (8/7/2017)	Chanh	MA12	M50-M53	4,1	16,6 ^h
	Táo	MA13	M54-M59	5,2	14,1 ⁱ
	Xoài	MA14	M60-M61	4,7	10,3 ^j
Đợt 7 (11/7/2017)	Thanh long	MA15	M62-M65	5,1	18,1 ^g
	Khoai tây	MA16	M66-M74	5,8	26,1 ^c
	Cà rốt	MA17	M75-M81	6,5	24,3 ^d
Đợt 8 (2/8/2017)	Bưởi thanh trà Huế	MA18	M82-M92	6,1	30,3 ^b
	Bưởi đỏ Huế	MA19	M93-M107	6,21	35,1 ^a
	Bưởi đỏ	MA20	M108-M113	6,02	26,1 ^c

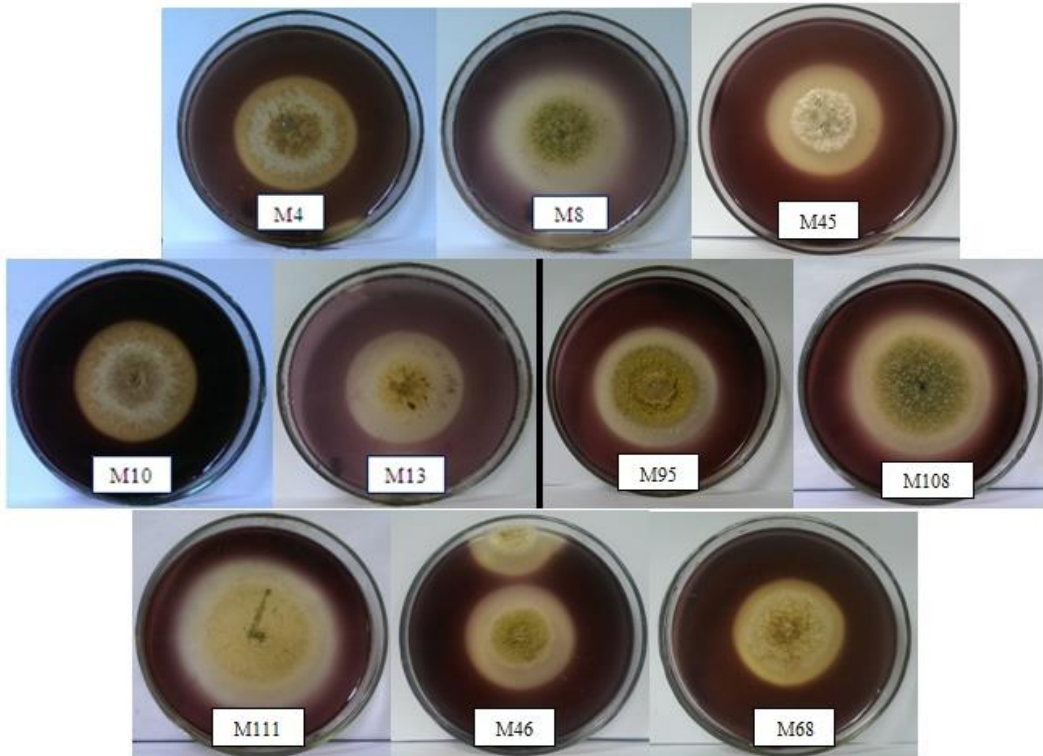
Ghi chú: CFU: Colony Forming Unit; Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

3.2 Kết quả sơ tuyển trực tiếp các chủng nấm mốc

Khả năng phân giải pectin của các chủng nấm mốc phân lập được thể hiện trên môi trường Czapek - pectin. Thông qua đường kính vòng phân giải cơ chất pectin có thể đánh giá được mức độ sinh trưởng cũng như khả năng phân giải pectin của các chủng nấm mốc. Trong cùng điều kiện nuôi cấy hoàn toàn giống nhau, các chủng nấm mốc muốn sinh trưởng và phát triển bắt buộc phải phân giải nguồn cơ chất pectin để sử dụng. Kích thước khuẩn lạc phản ánh sơ bộ khả năng phân giải pectin của các chủng nấm mốc và được phân chia ở các mức độ yếu, trung bình, mạnh và rất mạnh (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng phân giải pectin của các chủng nấm mốc trên môi trường thạch Czapek – pectin

Khả năng STPT	Đường kính vòng phân giải cơ chất pectin (mm)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Yếu	≤ 5	62	54,9
Trung bình	> 5 và ≤ 10	27	23,9
Mạnh	> 10 và ≤ 15	14	12,3
Rất mạnh	> 15	10	8,9



Hình 1. Các chủng nấm mốc sơ tuyển trực tiếp có hoạt tính pectinase mạnh

Có thể thấy tất cả các chủng nấm mốc phân lập được đều có khả năng phân giải pectin nhưng ở các mức độ khác nhau. Các chủng nấm mốc phân giải pectin yếu chiếm 54,9 %; trong khi đó các chủng nấm mốc có khả năng phân giải pectin mạnh và rất mạnh chiếm tỷ lệ thấp lần lượt là 12,3 % và 8,9 %. Từ 113 chủng nấm mốc chúng tôi tuyển chọn được 10 chủng có khả năng phân giải pectin mạnh (Hình 1). Thông thường, các chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng phát triển tạo khuẩn ti mạnh trên bề mặt thạch đĩa nên chỉ thể hiện vùng phân giải cơ chất từ tâm đến mép khuẩn lạc. Chính vì vậy, kết quả nuôi cấy trực tiếp trên môi trường Czapek với nguồn carbon là pectin chỉ xác định sơ bộ các chủng có hoạt tính pectinase mà chưa đánh giá chính xác khả năng sinh pectinase của chúng.

3.3 Sơ tuyển gián tiếp và xác định hoạt độ pectinase của các chủng tuyển chọn

Từ 10 chủng nấm mốc (M4, M8, M10, M13, M45, M46, M68, M95, M108 và M111) đã sơ tuyển trực tiếp, chúng tôi tiếp tục sơ tuyển gián tiếp và xác định hoạt tính pectinase nhằm chọn ra chủng có khả năng phân giải pectin mạnh để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Các chủng nấm mốc được nuôi cấy lắc trong môi trường Czapek dịch thể với nguồn carbon là pectin (3 g/L); lượng bào tử đưa vào ban đầu của mỗi bình nuôi cấy là đồng đều (5 mL dịch huyền phù/50 mL môi trường dịch thể). Sau 4 ngày nuôi cấy, tiến hành lọc dịch nuôi để thu nhận sinh

khối nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng phát triển. Phần dịch enzyme được sử dụng để xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Vòng phân giải pectin được phát hiện bằng thuốc nhuộm lugol và hoạt tính pectinase được xác định bằng hiệu số giữa độ lớn đường kính vòng phân giải và đường kính của lỗ thạch. Để xác định được chính xác hơn khả năng sinh tổng hợp enzyme pectinase mạnh hay yếu, chúng tôi tiến hành xác định hoạt độ dựa vào phương pháp định lượng đường khử (Bảng 3).

Kết quả cho thấy sinh khối của các chủng nấm mốc lựa chọn không cao, đạt 4,0–6,0 mg/mL. Tuy nhiên, đường kính vòng phân giải tương đối cao đạt 19,0 mm đến 29,3 mm, xấp xỉ kết quả của một số công trình nghiên cứu cùng lĩnh vực. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Thúy Hà (2011) về tổng hợp pectinase của nấm mốc phân lập từ cơ chất giàu pectin thì vòng phân giải của các chủng nấm mốc thu được dao động từ 25,1 mm đến 26,7 mm [2]. Phạm Thị Ngọc Lan và cs. (2017) đã công bố kết quả về phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng phân giải pectin: đường kính vòng phân giải của 5 chủng nấm mốc dao động từ 17,33 mm đến 30,33 mm [5]. Theo kết quả nghiên cứu của Trần Thanh Trúc (2013) với 60 dòng nấm mốc phân lập từ các loại vỏ giàu pectin ở đồng bằng sông Cửu Long, tuyển chọn bằng phương pháp đo đường kính vòng phân giải pectin khuếch tán trên thạch được 14 dòng cho hoạt tính pectinase mạnh, với đường kính vòng phân giải trung bình là 20 mm [9].

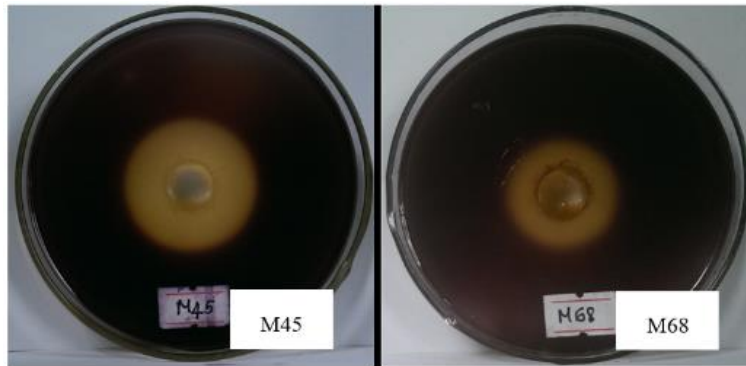
Về hoạt độ pectinase, 10 chủng có hoạt độ chung đạt 7,4 U/mL đến 98,5 U/mL. Trong đó, có 2 chủng M45 và M68 có hoạt tính pectinase mạnh với hoạt độ chung lần lượt đạt 110,17 U/mL và 98,5 U/mL. Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Trần Quốc Dung và cs. (2015) đã phân lập được 50 chủng *Aspergillus niger* từ các mẫu vỏ xoài, thanh long, cà rốt, chuối, táo đã thu được hai chủng X5 và X9 có khả năng sinh tổng hợp pectinase với hoạt độ chung là 10,4–10,70 U/mL sau 3 ngày nuôi cấy [1]. Trần Ngọc Hùng và cs. (2016) đã phân lập được 9 chủng *Aspergillus* từ các nguồn phế liệu giàu pectin, trong đó chủng *A. niger* B2 sinh tổng hợp enzyme pectinase tốt nhất trên môi trường bán rắn chứa bột củi buôi với tỷ lệ 12 %, lượng nước bổ sung vào môi trường 40 %, thời gian nuôi cấy thích hợp là 5 ngày, hoạt độ pectinase trong canh trường đạt 4,82 U/g [3]. Phạm Thị Ngọc Lan và cs. (2017) đã công bố kết quả về phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng phân giải pectin: đường kính vòng phân giải của 5 chủng nấm mốc dao động từ 17,33 mm đến 30,33 mm, hoạt độ chung đạt 4,7–12,99 U/mL, hoạt độ riêng đạt 24,5–205,50 U/mg [5].

Bảng 3. Sinh khối, đường kính vòng phân giải và hoạt độ pectinase của các chủng nấm mốc được tuyển chọn

Chủng nấm mốc	Sinh khối (mg/mL)	Đường kính vòng phân giải pectin (mm)	Hoạt độ chung (U/mL)
M4	5,6 ^b	28,7 ^b	24,8 ^d
M8	4,4 ^d	19,0 ⁱ	34,3 ^c

M10	5,4 ^b	27,8 ^e	10,9 ^e
M13	4,2 ^e	28,5 ^c	9,9 ^s
M45	6,0 ^a	29,3 ^a	110,2 ^a
M46	4,8 ^c	28,3 ^d	7,4 ⁱ
M68	5,6 ^b	24,3 ^s	98,5 ^b
M95	4,8 ^c	21,2 ^h	8,4 ^h
M108	4,0 ^f	24,3 ^s	10,4 ^f
M111	3,4 ^s	26,2 ^f	10,9 ^e

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 2. Vòng phân giải pectin của hai chủng nấm mốc M45 và M68

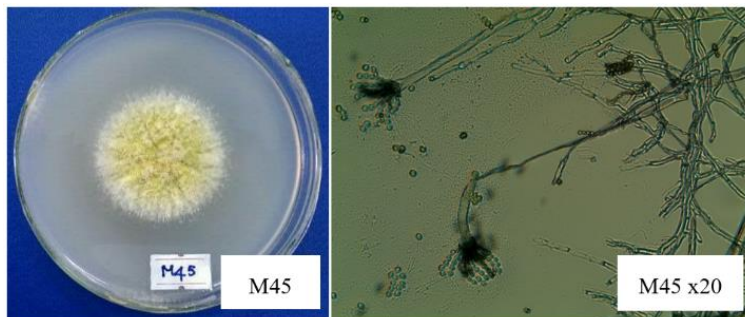
Căn cứ vào kết quả Bảng 3, chủng nấm mốc M45 và M68 (Hình 2) có hoạt tính cũng như hoạt độ pectinase cao hơn các chủng phân lập được. Từ đó, chúng tôi lựa chọn hai chủng này để nghiên cứu đặc điểm sinh học và giải trình tự vùng ITS.

3.4 Đặc điểm sinh học của các chủng nấm mốc tuyển chọn

Dựa trên đường kính vòng phân giải pectin và hoạt độ, chủng nấm mốc M45 và chủng M68 có hoạt tính pectinase mạnh nên được chọn để sử dụng cho các nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen pectinase về sau.

Chủng M45

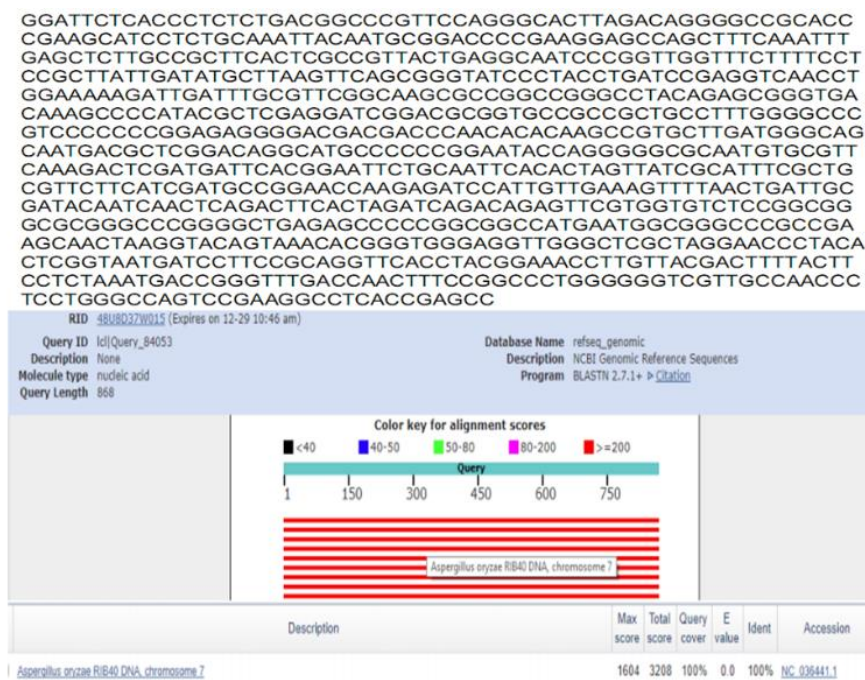
Nuôi cấy chủng nấm mốc M45 trên thạch đĩa trong tủ ấm ở 30 °C. Sau bốn ngày, chủng nấm mốc có đặc điểm: khuẩn lạc tròn, màu sắc thay đổi trong quá trình sinh trưởng và phát triển, từ trắng đến vàng. Hệ sợi nấm mọc dày, to, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường (Hình 3).



Hình 3. Đặc điểm hình thái và hiển vi của chủng nấm mốc M45

Sau khi nuôi cấy bào tử trên lam kính, sau hai ngày tiến hành quan sát sự hình thành khuẩn ty, cuống sinh bào tử, bào tử bằng kính hiển vi ở các độ phóng đại khác nhau. Chủng M45 có khuẩn ty đã phân hóa thành vách ngăn, phân nhánh; cuống sinh bào tử có dạng tia, phần phình đỉnh cuống tỏa tròn. Thể bình có dạng hình chai, xếp trực tiếp trên bề mặt bông đỉnh giá. Bào tử trần xếp thành chuỗi, có dạng hình cầu (Hình 3).

Kết quả giải trình tự vùng ITS của chủng nấm mốc M45 được trình bày ở Hình 4. Kết quả phân tích BLAST trên GenBank cho thấy trình tự ITS của chủng nấm mốc M45 tương đồng 100 % với trình tự vùng ITS của loài *Aspergillus oryzae* (Accession number NC 036441.1). Như vậy, chủng M45 là *Aspergillus oryzae*.

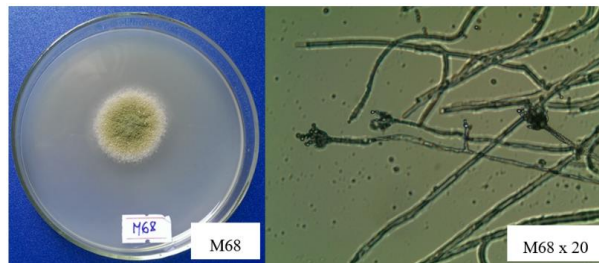


Hình 4. Kết quả giải trình tự vùng ITS và phân tích BLAST trên GenBank của chủng nấm mốc M45

Chủng M68

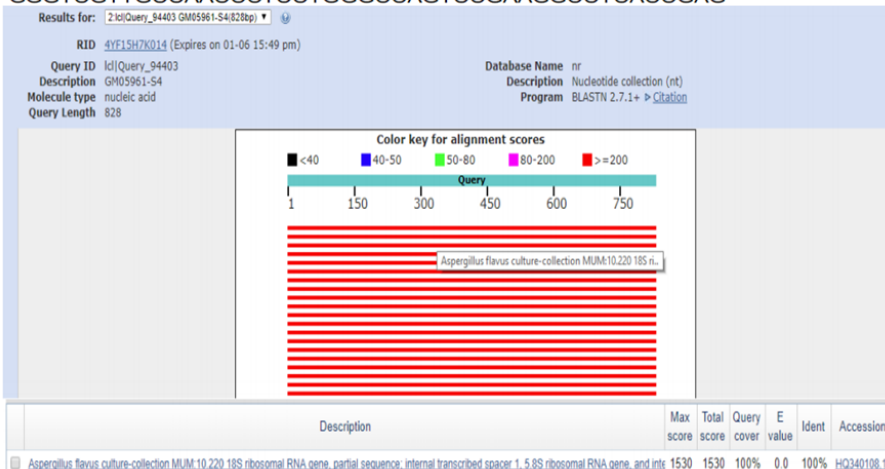
Nuôi cấy chủng nấm mốc M68 trên thạch đĩa trong tủ ấm ở 30 °C. Sau bốn ngày, chủng nấm mốc có đặc điểm: khuẩn lạc tròn, màu sắc thay đổi trong quá trình sinh trưởng và phát triển, từ trắng đến vàng. Hệ sợi nấm mọc thưa, trên bề mặt xuất hiện nhưng giọt tiết cứng và không tiết sắc tố ra môi trường (Hình 5).

Sau khi nuôi cấy bào tử trên lam kính, sau hai ngày tiến hành quan sát sự tạo thành khuẩn ty, cuống sinh bào tử, bào tử bằng kính hiển vi ở các độ phóng đại khác nhau. Chủng M68 có khuẩn ty đã phân hóa thành vách ngăn, phân nhánh. Thể bình có dạng hình chai, bào tử trần xếp thành chuỗi, có dạng hình cầu (Hình 5).



Hình 5. Đặc điểm hình thái và hiển vi của chủng nấm mốc M68

```
TTAGACAGGGGCCGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGACCCCGAAG
GAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCC
CGTTGGTTTCTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTACAGCGGGTATCCCTAC
CTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGG
GCCTACAGAGCGGGTGACAAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGC
CGCTGCCCTTTGGGGCCCGTCCCCCCCCGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAG
CCGTGCTTATGGGCGAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAATACCAG
GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTA
GTTATCGCATTTGCTGCGTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGA
AAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTC
GTGGTGTCTCCGGCCGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGCGGCCATGAA
TGCGCGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGTTGGGCT
CGCTAGGAACCTTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACACTACGGAACCT
TGTTACGACTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCGGGCCCTGGG
GGTCTTGCCAAACCTCCTGGGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAG
```



Hình 6. Kết quả giải trình tự vùng ITS và phân tích BLAST trên GenBank của chủng nấm mốc M68

Kết quả giải trình tự vùng ITS của chủng nấm mốc M68 được trình bày ở Hình 6. Kết quả phân tích BLAST trên GenBank cho thấy trình tự ITS của chủng nấm mốc M68 tương đồng 100 % với trình tự vùng ITS của loài *Aspergillus flavus* (Accession number HQ 340108.1). Như vậy, chủng M68 là *Aspergillus flavus*.

4 Kết luận

Đã phân lập được 113 chủng nấm mốc có khả năng phân giải pectin từ một số mẫu vỏ củ, quả giàu pectin. Số lượng nấm mốc phân giải pectin trong mẫu dao động từ $6,3 \times 10^3$ CFU/g mẫu đến $35,1 \times 10^3$ CFU/g mẫu. Đã tuyển chọn được 2 chủng nấm mốc có khả năng phân giải pectin mạnh là M45 và M68. Chủng M45 có đường kính vòng phân giải 29,3 mm; hoạt tính pectinase đạt 110,2 U/mL; sinh khối khô đạt 6,0 mg/mL được định danh là *Aspergillus oryzae*. Chủng M68 có đường kính vòng phân giải 24,3 mm; hoạt tính pectinase đạt 98,5 U/mL, sinh khối khô đạt 5,6 mg/mL được định danh là *Aspergillus flavus*.

Tài liệu tham khảo

1. Trần Quốc Dung, Nguyễn Thị Kim Cơ, Nguyễn Thị Suong, Nguyễn Thị Thu Chung, Phan Thị Thanh Diễm, Nguyễn Hoàng Lan Anh (2015), Phân lập và sàng lọc một số chủng *Aspergillus niger* sinh pectinase từ một số vỏ củ, quả ở thành phố Huế. *Báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 6*: trang 1073–1077.
2. Nguyễn Thị Thúy Hà (2011), Nghiên cứu khả năng tổng hợp pectinase của nấm mốc phân lập từ cơ chất giàu pectin và ứng dụng trong công nghệ thực phẩm. *Luận văn Thạc sĩ Kỹ thuật*, Chuyên ngành Công nghệ thực phẩm và đồ uống, Đại học Đà Nẵng.
3. Trần Ngọc Hùng, Nguyễn Anh Dũng, Mai Thị Ngọc Lan Thanh, Trần Thị Ngọc Như (2016), Nghiên cứu thu nhận pectinase từ *Aspergillus niger* nuôi cấy trên môi trường bán rắn chứa củi buri để nâng cao hiệu quả bóc vỏ tiêu. *Tạp chí Khoa học, Đại học Thủ Dầu 1*, 5(30): trang 82–89.
4. Phạm Thị Ngọc Lan (2012), Thực tập Vi sinh vật học. Nxb. Đại học Huế.
5. Phạm Thị Ngọc Lan, Ngô Thị Bảo Châu, Nguyễn Quỳnh Chi (2017), Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng phân giải pectin. *Báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 7*: trang 1304–1310.
6. Nguyễn Đức Lượng (2004), Công nghệ enzyme. Nxb. Đại học Quốc Gia TP.HCM (356–376; 398–399; 424–436).
7. Huỳnh Ngọc Oanh, Trần Ngọc Hùng (2008), Thu nhận enzyme pectinase từ *A. niger* – tinh sạch bằng phương pháp lọc gel và lọc màng. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 8(11): trang 46–50.
8. Trần Thị Thanh Thuần, Nguyễn Đức Lượng (2009), Nghiên cứu enzyme cellulase và pectinase từ chủng *Trichoderma viride* và *Aspergillus niger* nhằm xử lý nhanh vỏ cà phê, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 12(3): trang 50–56.
9. Trần Thanh Trúc (2013), Phân lập và tuyển chọn dòng *Aspergillus niger* sinh pectin methylesterase hoạt tính cao, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
10. Mrudula S., Anitharaj R. (2011), Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate, *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6 (2): pp. 64–71.

11. Sambrook J. and Russell D. W. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rded. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: pp. 35–68.

ISOLATION AND SCREENING OF MOULD STRAINS FOR CLONING AND EXPRESSING PECTINASE GENE

Phan Thi Thanh Diem^{1*}, Pham Thi Ngoc Lan², Ngo Thi Bao Chau², Tran Quoc Dung³

¹Quang Nam University, 102 Hung Vuong, Tam Ky, Quang Nam, Viet Nam

²College of Science, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Viet Nam

³College of Education, Hue University, 32 Le Loi, Hue, Viet Nam

Abstract. Pectinase, an enzyme that degrades pectin, is widely used in the food processing industry for wall softening and extraction of fruit juices; it supports filtering and making fruit juices and wine. From the peels of some fruits rich in pectin, we isolated and screened 113 strains of highly pectinase-active moulds and designated as M1–M113. The number of moulds capable to hydrolyse pectin in the samples ranged from $6,3 \times 10^3$ CFU/g to $35,1 \times 10^3$ CFU/g. Two strains, namely M45 and M68, were selected; they showed a strong pectinase activity of 110,2 U/mL and 98,5 U/mL, respectively. The ITS sequencing method revealed that the M45 strain was identified as *Aspergillus oryzae* and the M68 strain as *Aspergillus flavus*. The ITS sequences of strain *A. oryzae* (M45) and strain *A. flavus* (M68) were registered in GenBank with accession number MH746006 and MH746007, respectively.

Keywords: *Aspergillus*, isolation, ITS, pectinase, screening