

Phân lập và tuyển chọn nấm mốc có khả năng phân giải pectin từ vỏ cam sành (*Citrus sinensis*)

Huỳnh Xuân Phong*, Dương Thị Ngọc Lan, Lưu Minh Châu, Bùi Hoàng Đăng Long,
Nguyễn Ngọc Thanh, Hà Thanh Toàn

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2 đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/10/2022; ngày chuyển phân biện 12/10/2022; ngày nhận phân biện 18/11/2022; ngày chấp nhận đăng 23/11/2022

Tóm tắt:

Nấm mốc là loài có khả năng sinh enzyme pectinase với hoạt tính cao và được sử dụng nhiều nhất hiện nay. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng nấm mốc có khả năng phân giải pectin từ vỏ cam sành (*Citrus sinensis*). Phân lập nấm mốc trên các môi trường potato dextrose agar (PDA), czapek dox agar (CZ) và malt extract agar (MEA). Kết quả cho thấy, 6 dòng nấm mốc được phân lập thuộc bốn chi bao gồm *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* và *Rhizopus*. Kiểm tra khả năng phân giải pectin trên môi trường pectin agar cho thấy, tất cả các dòng nấm mốc đều có khả năng phân giải pectin với vòng phân giải nằm trong khoảng 10,33-29,33 mm. Trong đó, dòng XX2 có khả năng sinh enzyme pectinase cao nhất khi lên men, dựa trên nguồn cơ chất vỏ cam, nên được chọn để định danh. Kết quả giải trình tự cho thấy, dòng XX2 thuộc chi *Asperillus* với độ tương đồng ở mức 91,04-91,88% so với loài *A. tamarii*, *A. flavus* và *A. oryzae*.

Từ khóa: *Aspergillus*, nấm mốc, pectinase, vỏ cam.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8

Isolation and selection strains for degradation of pectin from orange peels (*Citrus sinensis*)

Xuan Phong Huynh*, Thi Ngoc Lan Duong, Minh Chau Luu, Hoang Dang Long Bui,
Ngoc Thanh Nguyen, Thanh Toan Ha

Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 10 October 2022; revised 18 November 2022; accepted 23 November 2022

Abstract:

Mould is the species, which has capable of producing the enzyme pectinase with high activity and is most commonly used today. This study was carried out to isolate and select mould strains that have potential use in degradation of pectin from orange peels (*Citrus sinensis*). Isolation of mould on potato dextrose agar (PDA), czapek dox agar (CZ), and malt extract agar (MEA) media, the results showed that 6 mould strains were isolated belonging to 4 genera, including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, and *Rhizopus*. Testing the ability to degrade pectin on pectin agar medium showed that all mould strains were able to degrade pectin with the zone of clearance in the range of 10.33-29.33 mm. In which, XX2 strain has the highest ability to produce pectinase enzyme when fermenting based on orange peel substrate should be selected for identification and the result revealed that the XX2 strain could be identified as genus *Aspergillus* and primarily presumed as *A. tamarii*, *A. flavus*, and *A. oryzae* with the identical percentage of 91.04-91.88%.

Keywords: *Aspergillus*, mould, orange peels, pectinase.

Classification numbers: 1.6, 2.8

*Tác giả liên hệ: Email: hxphong@ctu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Cây có múi là một nhóm cây ăn quả quan trọng và chiếm tỷ trọng lớn trong nền nông nghiệp thế giới, đứng đầu là cam, chanh, quýt và bưởi. Tại Việt Nam, nhóm cây ăn quả này, đặc biệt là cam được trồng phổ biến và trở thành nguồn cung chủ yếu trong công nghiệp chế biến nước quả. Do đó, một lượng lớn phụ phẩm được tạo ra ở dạng vỏ, cùi, hạt... gây ra những lo ngại về ô nhiễm môi trường. Tuy nhiên, theo B. Rivas và cs (2008) [1], vỏ cam vẫn còn chứa các chất dinh dưỡng như đường (16,9%), pectin (42,5%), tro (3,50%), chất béo (1,95%) và protein (6,50%). Chính vì vậy, nhiều nghiên cứu đã đề xuất xử lý nguồn chất thải tiềm năng này như sản xuất ethanol, acid citric, tinh dầu và ly trích các hợp chất có hoạt tính sinh học [2]. Ngoài ra, với một lượng pectin đáng kể, vỏ cam cũng được sử dụng làm chất nền để sản xuất enzyme pectinase từ các nhóm vi sinh vật.

Enzyme pectinase là một enzyme được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là trong công nghiệp thực phẩm như chiết xuất nước trái cây, lên men cà phê và trà, cải thiện màu sắc và độ trong của rượu vang hay trong các ngành công nghiệp dược phẩm, dệt, giấy và xử lý nước thải. Hiện nay, nhu cầu sử dụng enzyme pectinase đang tăng lên trên toàn cầu. Để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng đối với enzyme này, quá trình sản xuất đã được thực hiện thông qua việc lên men nhờ vào các vi sinh vật như nấm mốc, nấm men hay vi khuẩn. Trong đó, nấm mốc loài có khả năng sản xuất enzyme cao, do chúng là những vi sinh vật hoại sinh và phát triển nhờ việc lấy chất dinh dưỡng từ môi trường nên có thể tạo ra một số lượng lớn các enzyme ngoại bào cần thiết cho quá trình chuyển hóa từ các hợp chất hữu cơ. Các enzyme được sản xuất bởi nấm mốc thường dễ dàng thu nhận và tinh chế nên nấm mốc trở thành nguồn cung cấp các enzyme ổn định và rẻ tiền trong công nghiệp [3]. Hiện nay, enzyme từ nấm chiếm hơn 50% tổng số enzyme có mặt trên thị trường và được sản xuất bởi các nấm mốc chính như *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* và *Rhizopus* [4]. Hơn nữa, do có khả năng phân giải pectin cao nên nấm mốc cũng là loài vi sinh vật chính yếu làm hư hỏng vỏ cam sành trong quá trình bảo quản. Mặc dù nhiều nghiên cứu đã phân lập các vi sinh vật mới có nguồn gốc và địa lý khác nhau với các đặc điểm chuyển hóa mong muốn, song tùy thuộc vào đặc điểm của từng loại nguyên liệu khác nhau, sẽ có các dòng nấm mốc thích hợp với từng loại nguyên liệu. Vì vậy, trong nghiên cứu này, với mục tiêu phân lập và tuyển chọn các dòng nấm mốc từ vỏ cam sành có khả năng sinh enzyme pectinase cao để định hướng ứng dụng trong quá trình sản xuất pectinase dựa trên chính nguồn cơ chất vỏ cam. Từ đó, góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường và đáp ứng nhu cầu sử dụng enzyme pectinase hiện nay.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên, vật liệu và hóa chất

Vỏ cam sành được thu gom tại các chợ, các quầy nước ép trái cây ở địa bàn TP Cần Thơ. Hóa chất bao gồm KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , pectin, agar và các môi trường nuôi cấy nấm mốc như potato dextrose agar (PDA), czapek-dox agar (CZ), malt extract agar (MEA) được mua từ các sản phẩm thương mại của Merck (Đức) và HiMedia Laboratories (Ấn Độ).

2.2. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm mốc hiện diện trên vỏ cam sành

Vỏ cam sành được rửa với nước, để ráo và được cắt nhỏ khoảng 1-2 mm. Mẫu vỏ quả cam đã cắt nhỏ được đặt trên bề mặt môi trường PDA trong đĩa petri. Mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng 3-4 ngày. Sự phát triển của nấm mốc được quan sát và ghi nhận dựa vào hình dạng khuẩn lạc. Nấm mốc được cấy truyền nhiều lần trên môi trường PDA cho đến khi được các dòng nấm mốc thuần. Nấm mốc được định loại hình thái bằng cách cấy chuyển các dòng khuẩn lạc thuần đã phân lập được sang đĩa petri chứa môi trường CZ và MEA. Mỗi dòng nấm được cấy sang đĩa petri và cấy 3 điểm cách đều nhau trên mặt môi trường. Mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Đặc điểm đại thể (hình dạng, kích thước, màu sắc bề mặt) bằng mắt thường và vi thể (khuẩn ty, bề mặt cuống bào tử, hình dạng bào tử) của nấm được quan sát bằng kính hiển vi quang học (Leica, DM3000). Các dòng nấm mốc phân lập được xác định theo khóa phân loại của M.J. Carlile và cs (2001) [5].

2.3. Khảo sát khả năng phân giải pectin của các dòng nấm mốc đã phân lập

Các dòng nấm mốc khảo sát được nuôi cấy trong ống thạch nghiêng PDA, ở nhiệt độ phòng trong, khoảng 3-4 ngày. Nước cất vô trùng (5 ml) được cho vào ống nghiệm để thu dịch bào tử (10^7 bào tử/ml). Các giếng thạch với đường kính 3 mm được tạo trên môi trường pectin - agar (0,5-2%) trong đĩa petri. Dịch bào tử nấm mốc (100 μl) được cho vào mỗi giếng và ủ trong 2 ngày. Tiếp theo, dung dịch Lugol được trải đều trên bề mặt thạch để ghi nhận khả năng phân giải pectin dựa vào đường kính vòng phân giải [6].

2.4. Tuyển chọn dòng nấm mốc sinh enzyme pectinase cao trên nguồn cơ chất vỏ cam

Vỏ cam sau khi thu gom được loại bỏ phần vỏ xanh, thu phần vỏ trắng bên trong, rửa sạch bằng nước ấm 60°C , để ráo rồi cắt nhỏ và sấy ở 55°C đến độ ẩm khoảng 10%. Mẫu được nghiền thành bột và sàng qua rây để thu được

vỏ cam đồng nhất về kích thước. Các dòng nấm mốc được tuyển chọn từ thí nghiệm trên được nuôi trong ống thạch nghiêng PDA ở nhiệt độ phòng trong 3-4 ngày. Nước cất vô trùng (5 ml) được cho vào ống nghiệm để thu dịch bào tử (10^7 bào tử/ml) và chuyển sang bình tam giác chứa sẵn môi trường bao gồm 0,5% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 0,0005% FeSO_4 (pH 5,0) được bổ sung 2% bột vỏ cam. Các dòng nấm mốc được ủ lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong thời gian 4 ngày ở nhiệt độ phòng. Mẫu nuôi cấy được ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 10 phút để thu enzyme ngoại bào. Các giếng thạch với đường kính 3 mm trên môi trường pectin - agar (0,5-2%) trong đĩa petri. Dịch enzyme ngoại bào (100 μl) được cho vào giếng, đập nắp đĩa petri, giữ trong tủ lạnh ở 4°C trong 8 giờ, sau đó nuôi ở 2 ngày ở 30°C. Dung dịch Lugol được trải trên bề mặt thạch để xác định khả năng phân giải pectin dựa vào đường kính vòng phân giải [6].

2.5. Định danh dòng nấm mốc có khả năng sinh enzyme pectinase cao

Dòng nấm mốc tuyển chọn được ly trích DNA như sau: khuẩn lạc nấm mốc sau khi nuôi cấy 48 giờ trên môi trường PDA được chuyển vào ống tube 2,2 ml cùng viên bi sắt để phá mẫu bằng máy lắc trong 1 phút. Một ml lysis buffer (mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 100 μg proteinase K) được cho vào tube và lắc trong 1 phút. Tiếp theo, mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch trong (khoảng 500 μl) được hút chuyển vào tube mới và bổ sung một lượng tương đương ethanol 95%, lắc đều. Sau khi ủ ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 phút, mẫu được ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút và loại bỏ phần dịch trong. Phần kết tủa được rửa bằng 500 μl ethanol 70% (2 lần) và để khô ở nhiệt độ phòng. Mẫu kết tủa được tái huyền bằng cách hòa tan DNA trong 100 μl TE 0,1X đã ổn định pH rồi trữ -20°C. Trình tự vùng ITS được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR dựa trên cặp mồi ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') và ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') [7]. Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích của phản ứng là 25 μl trong đó 9 μl Mytaq mix 2X, 1 μl mồi ITS1, 1 μl mồi ITS4, 3 μl DNA khuôn và 11,0 μl dH_2O . Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình: (95°C trong 3 phút) x 1 chu kỳ, (95°C trong 1 phút, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút) x 35 chu kỳ, (72°C trong 7 phút) x 1 chu kỳ, dừng phản ứng ở nhiệt độ phòng. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose, DNA được quan sát và chụp hình gel bằng máy Bio-Rad và giải trình tự vùng ITS1/ITS4 trên máy ABI 3130. Cuối cùng,

kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự nấm mốc trên ngân hàng dữ liệu của ngân hàng gen NCBI bằng công cụ Nucleotide BLAST.

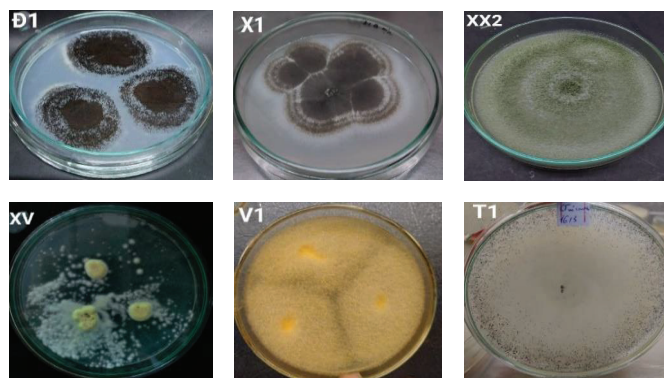
2.6. Phân tích và xử lý số liệu

Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm mốc hiện diện trên vỏ cam sành

Theo dõi sự phát triển của nấm mốc trên môi trường PDA trong khoảng 3-4 ngày cho thấy, sự phát triển của nấm mốc với màu sắc ban đầu là trắng, sau đó chuyển dần thành màu xanh, vàng, đen, xám. Chọn những khuẩn lạc rời có đặc điểm giống với khuẩn lạc nấm mốc, cấy chuyển nhiều lần trên môi trường PDA để loại bỏ tạp nhiễm. Kết quả thu được 6 dòng nấm mốc thuần bao gồm Đ1, X1, XX2, XV, V1 và T1 (hình 1).



Hình 1. Các dạng khuẩn lạc phân lập được.

Các dòng nấm này được cấy lần lượt vào các đĩa petri có chứa môi trường MEA và CZ để xác định hình thái. Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong vòng 7 ngày để quan sát và ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc của các dòng nấm mốc trên hai môi trường. Kết quả cho thấy, khuẩn lạc trên môi trường MEA có dạng gần tròn đến tròn, khuẩn ty mọc dày, có rãnh cao thấp khác nhau. Trong khi đó, các khuẩn lạc trên môi trường CZ đều có dạng gần tròn đến tròn, bề mặt có nhiều chấm, thưa. Khuẩn lạc có các màu như vàng, trắng, xám, mặt dưới có màu vàng đôi khi trắng. Đường kính khuẩn lạc của các dòng nấm mốc trong khoảng 22,0-39,3 mm trên môi trường MEA (trừ dòng khuẩn lạc T1 mọc khá nhanh) và từ 15,3 đến 33,6 mm trên môi trường CZ. Có thể thấy, tùy theo từng loại môi trường mà các dòng nấm có đường kính khuẩn lạc cũng như biểu hiện màu sắc khác nhau.

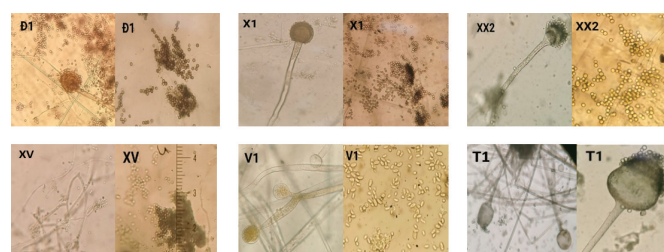
Kết hợp quan sát các đặc điểm vi thể dưới kính hiển vi cho thấy các dòng Đ1, X1 và XX2 dù có hình dạng màu sắc khuẩn lạc khác nhau nhưng tất cả các dòng nấm trên đều có bào tử đỉnh hình cầu với kích thước 3-6 μm , kết thành từng chuỗi, cuống bào tử trong suốt, bong đỉnh giả dạng hình cầu giống với kết luận của R. Thilagam và cs (2016) [8] khi mô tả về dòng nấm thuộc chi *Aspergillus*. Quan sát dòng nấm XV có đặc điểm hình thái tương tự như chi *Penicillium* với khuẩn lạc có màu vàng, xanh lục bào tử kết chuỗi dài dính vào nhau ở cuống thể bình, sợi nấm có vách ngăn và phân nhánh, bào tử có dạng hình cầu kích thước 2,5-3,0 μm , tương tự như mô tả của S. Ülhan và cs (2005) [9] về đặc điểm hình thái của chi *Penicillium* được phân lập từ đất nông nghiệp ở Eskisehir (Thổ Nhĩ Kỳ). Dòng nấm V1 sau 24 giờ đã thấy xuất hiện khuẩn ty màu vàng, nấm có lớp màng nhầy bám vào bề mặt môi trường, quan sát dưới kính hiển vi bào tử có hình elip kích thước 2,5x6,0 μm , cuống bọc bào tử phân nhánh, từ đó cho thấy dòng nấm V1 thuộc chi *Mucor* [10]. Riêng dòng nấm T1 có hệ khuẩn ty phát triển rất nhanh, chỉ sau hai ngày nuôi cấy tơ nấm tràn khắp môi trường, khuẩn lạc có màu trắng bông và nâu đen. Sợi nấm màu nâu, có vách ngăn, phân nhánh, bào tử có hình cầu đường kính 4,6-6,6 μm , túi (bong) bào tử có hình cầu hoặc hình bầu dục có đường kính 60-65 μm khi được quan sát dưới kính hiển vi. Những đặc điểm này cho thấy, đây là chi *Rhizopus* [11]. Các đặc điểm này của các chủng nấm mốc phân lập được mô tả chi tiết ở các bảng 1, 2 và hình 2.

Bảng 1. Đặc điểm đại thể và vi thể của nấm mốc đã phân lập trên môi trường malt extract agar sau 7 ngày.

Ký hiệu	Đặc điểm đại thể		Đặc điểm vi thể			
	Hình dạng	Màu sắc	Đường kính trung bình (mm)	Khuẩn ty	Bề mặt cuống bào tử	Hình dạng bào tử
Đ1	Gần tròn, chấm hạt, mịn dày, có rãnh thấp	Màu đen, trắng	38,3 $\pm$ 2,8	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình cầu
X1	Gần tròn, hạt nấm mịn, rìa có màu trắng	Màu xám nhạt, trắng	36,0 $\pm$ 1,7	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình cầu
XX2	Gần tròn đến tròn, tơ nấm mịn, mọc thấp, tâm khuẩn lạc bông lên	Màu xanh	30,6 $\pm$ 2,8	Phân nhánh, có vách ngăn	Gồ ghề	Hình cầu
XV	Tròn tơ nấm mịn màu vàng, mọc cao, tâm bị lõm	Màu xanh, vàng	22,0 $\pm$ 2,6	Phân nhánh, có vách ngăn	Gồ ghề	Hình cầu
V1	Gần tròn đến tròn tơ nấm dài, dễ thấm nước, tâm khuẩn lạc bị lõm.	Màu vàng nhạt	39,3 $\pm$ 1,2	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình elip
T1	Tơ nấm mọc dày, phát triển rất nhanh, bao trùm khắp bề mặt đĩa, đầu là những chấm màu đen	Màu trắng, đen	90,0 $\pm$ 0,0	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình cầu

Bảng 2. Đặc điểm đại thể và vi thể của nấm mốc đã phân lập trên môi trường czapek-dox agar sau 7 ngày.

Ký hiệu	Đặc điểm đại thể		Đặc điểm vi thể			
	Hình dạng	Màu sắc	Đường kính trung bình (mm)	Khuẩn ty	Bề mặt cuống bào tử	Hình dạng bào tử
Đ1	Hình tia tỏa tròn, hạt đen càng thưa khi về tâm	Màu đen, màu trắng đục	20,3 $\pm$ 0,6	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình cầu
X1	Gần tròn, tơ nấm mịn thấp màu trắng nâu	Màu nâu nhạt, màu trắng	24,0 $\pm$ 1,5	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình cầu
XX2	Tròn, hạt mịn, bề mặt xốp, ở giữa gồ lên	Màu xanh	19,3 $\pm$ 1,2	Phân nhánh, có vách ngăn	Gồ ghề	Hình cầu
XV	Tròn đến gần tròn, bám sát bề mặt môi trường	Màu xanh vàng	15,3 $\pm$ 1,5	Phân nhánh, có vách ngăn	Gồ ghề	Hình cầu
V1	Tròn đến gần tròn, tơ nấm nhiều nhưng ngắn, dễ thấm nước, thấp dần về tâm	Màu vàng	33,6 $\pm$ 1,5	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình elip
T1	Tơ nấm màu trắng, mọc thưa, trải đều khắp môi trường, không bám chặt	Màu trắng	25,0 $\pm$ 0,0	Phân nhánh, có vách ngăn	Nhẵn	Hình cầu



Hình 2. Cuống bào tử và bào tử của các dòng nấm phân lập.

Nhìn chung, nấm sợi được phân lập từ vỏ cam sành khá đa dạng về chủng loại. Trong 6 dòng được phân lập thì có 3 dòng được xác định là thuộc chi *Aspergillus*, 1 dòng thuộc chi *Penicillium*, 1 dòng thuộc chi *Mucor* và 1 dòng thuộc chi *Rhizopus*.

3.2. Khảo sát khả năng phân giải pectin của các dòng nấm mốc đã phân lập

Việc khảo sát khả năng phân giải pectin của các dòng nấm mốc sau khi phân lập là bước đầu tiên cho việc tuyển chọn dòng nấm mốc thích hợp sinh enzyme pectinase cao thủy phân pectin vỏ cam sành. Thí nghiệm được tiến hành và đánh giá thông qua đường kính của vòng phân giải pectin. Dựa trên các số liệu ghi nhận ở bảng 3, có thể thấy, tất cả các dòng nấm mốc đã phân lập có đều có khả năng phân giải pectin, với kích thước vòng phân giải nằm trong khoảng 10,33-29,33 mm. Trong đó, dòng XX2 có đường kính vòng

phân giải cao nhất (29,33 mm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại (bao gồm dòng đối chứng), ở mức ý nghĩa 5%. Các dòng V1 và Đ1 có khả năng phân giải pectin ở mức trung bình (15-20 mm) với đường kính phân giải lần lượt là 18,33 mm và 19,00 mm. Ba dòng còn lại được xếp vào nhóm có khả năng phân giải pectin ở mức thấp (<15 mm), trong đó dòng XV thuộc chi *Penicillium* có kích thước vòng phân giải thấp nhất với 10,33 mm.

Bảng 3. Khả năng phân giải pectin của các dòng nấm phân lập.

Dòng nấm mốc phân lập	Đường kính vòng phân giải pectin ¹ (mm)	Khả năng phân giải ²
Đ1	19,00 ^c	++
X1	14,67 ^d	+
XX2	29,33 ^a	+++
XV	10,33 ^e	+
V1	18,33 ^c	++
T1	13,00 ^d	+
ĐC+	24,33 ^b	+++

*Ghi chú: ¹: Các giá trị trung bình (3 lần lặp lại) trong cùng một cột theo sau có mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ tin cậy 95%, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.
²: Mức độ phân giải pectin: (+): <15 mm; (++) : 15-20 mm; (+++): >20 mm.

Nhìn chung, kết quả cho thấy các dòng nấm có khả năng phân giải pectin tốt nằm trong nhóm phân loại của chi *Aspergillus*. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy, chi *Aspergillus* nói chung hay *A. niger* nói riêng đóng vai trò chính trong quá trình sản xuất pectinase, vì sự phát triển lâu đời của chủng này trong các ngành công nghiệp lên men và được xem là một sinh vật an toàn [12]. Bên cạnh đó, W. Gong và cs (2015) [13] cũng báo cáo, hàm lượng pectinase sinh ra từ *Aspergillus* (40,66%) cao hơn so với *Penicillium* (27,91%) và *Trichoderma* (2,86%).

Thông thường, các chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng và hệ khuẩn ty phát triển trên môi trường với nguồn carbon duy nhất là pectin, nên điều này chỉ xác định sơ bộ các dòng nấm mốc có hoạt tính pectinase, mà chưa đánh giá chính xác khả năng sinh pectinase của chúng. Từ đó, chọn được 3 dòng nấm mốc gồm Đ1, XX2 và V1 để khảo sát khả năng sinh enzyme pectinase cao trên nguồn cơ chất vỏ cam sành.

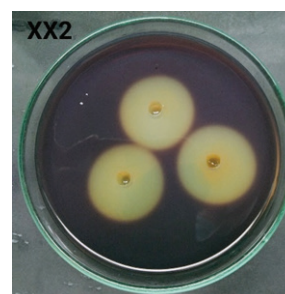
3.3. Tuyển chọn dòng nấm mốc có khả năng phân giải pectin từ nguồn cơ chất vỏ cam

Khả năng phân giải pectin từ vỏ cam sành được xác định dựa trên đường kính vòng phân giải pectin, kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Khả năng tổng hợp enzyme pectinase phân giải pectin vỏ cam.

Dòng nấm mốc phân lập	Đường kính vòng phân giải pectin ¹ (mm)	Khả năng phân giải ²
Đ1	18,33 ^b	++
XX2	31,00 ^a	+++
V1	10,33 ^c	+

*Ghi chú: ¹: Các giá trị trung bình (3 lần lặp lại) trong cùng một cột theo sau có mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ tin cậy 95%, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.
²: Mức độ phân giải pectin: (+): <15 mm; (++) : 15-20 mm; (+++): >20 mm.



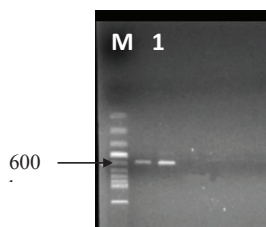
Hình 3. Vòng phân giải pectin của dòng nấm mốc XX2.

Từ kết quả thống kê ở bảng 4, có thể thấy, dòng nấm XX2 thể hiện khả năng sinh enzyme pectinase cao nhất, với đường kính vòng phân giải đạt 31,00 mm (hình 3). Hai dòng nấm Đ1 và V1 có khả năng phân giải pectin ở mức thấp hơn, với đường kính vòng phân giải lần lượt là 18,33 và 10,33 mm. Điều này cho thấy, kết quả của nghiên cứu này có sự tương đồng với kết quả công bố của T.T.D. Phan và cs (2018) [14] đã phân lập được các dòng nấm mốc từ vỏ củ quả giàu pectin. Kết quả ghi nhận chỉ có khoảng 8,9% dòng nấm mốc có đường kính vòng phân giải pectin lớn hơn 15 mm, với kích thước dao động từ 19 đến 29,3 mm. Bên cạnh đó, kết quả thu được từ nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của P.L. Reddy và cs (2012) [15] khi chỉ chọn được 1 dòng *A. flavus* trong 44 dòng phân lập, có khả năng phân giải pectin tối đa là 15,00 mm. Nhìn chung, dòng nấm XX2 được chọn để định danh do có khả năng sinh enzyme pectinase cao nhất, khi nuôi cấy trong môi trường chứa nguồn pectin vỏ cam.

3.4. Định danh dòng nấm mốc có khả năng sinh phân giải pectin cao

Sau khi khảo sát trên môi trường pectin - agar cũng như tuyển chọn thông qua việc lên men dựa trên nguồn vỏ cam là nguồn carbon duy nhất, dòng nấm XX2 được chọn để định danh thông qua các bước trích ly DNA, phản ứng PCR và giải trình tự. Kết quả phản ứng PCR cho sản phẩm có chất lượng tốt, với một băng rõ duy nhất trong mỗi dòng nằm trên gel điện di, ở vị trí 600 bp (hình 4). Điều này phù

hợp với các nghiên cứu trước, khi sử dụng cặp mồi ITS1 và ITS4 để khuếch đại gen ITS1, 5,8S, ITS2 trên các dòng nấm là khoảng 500-600 bp [7].



Hình 4. Kết quả điện di kiểm tra DNA nấm mốc (M: thang chuẩn; 1: dòng XX2).

Giải trình tự gen vùng ITS (internal transcribed spacer) trong phạm vi ITS1, 5.8S và ITS2 cho kết quả vùng ITS của dòng nấm mốc XX2, với tổng số nucleotide là 660. Trình tự của vùng này được phân tích và so sánh trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLASTN. Kết quả so sánh được thể hiện trong hình 5.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Aspergillus fumigatus strain M24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1 - Aspergillus fumigatus	896	1482	97%	0.0	91.88%	889	1819577	
✓	Aspergillus flavus isolate GHP/ISR/AAH2019 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal - Aspergillus flavus	889	1110	97%	0.0	91.65%	734	MG281652	
✓	Aspergillus flavus isolate Asp-7862 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene - Aspergillus flavus	880	1019	98%	0.0	91.78%	693	MF152937	
✓	Aspergillus sp. SV109-11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S rbs. - Aspergillus sp. S	874	1014	97%	0.0	91.38%	743	FJ584485.1	
✓	Aspergillus flavus isolate 2101954 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp. - Aspergillus flavus	870	1014	97%	0.0	91.93%	627	MG153531	
✓	Aspergillus flavus isolate Asp-6095 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s. - Aspergillus flavus	854	993	98%	0.0	91.05%	650	MF152945	
✓	Aspergillus flavus strain Beica_43 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp. - Aspergillus flavus	852	1175	97%	0.0	91.05%	849	KY234269	
✓	Aspergillus flavus strain Beica_79 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp. - Aspergillus flavus	845	1151	97%	0.0	90.77%	859	KY234273	
✓	Aspergillus oryzae strain SV109-02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1 - Aspergillus oryzae	845	984	97%	0.0	91.04%	646	FJ584483.1	
✓	Aspergillus flavus strain Beica_5 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and - Aspergillus flavus	839	1137	97%	0.0	90.62%	816	KY234263	

Hình 5. Tỷ lệ tương đồng của dòng nấm mốc XX2 so với các dòng nấm mốc trên NCBI.

Dựa vào hình 5 có thể thấy, trình tự ITS của dòng XX2 có độ tương đồng với các loài thuộc chi *Asperillus*, bao gồm *A. tamarii* (ON819577.1), *A. flavus* (MK281652) và *A. oryzae* (FJ654483) lần lượt là 91,88, 91,85 và 91,04%. Như vậy, với kết quả này có thể xác định dòng XX2 thuộc chi *Asperillus*. Các enzyme pectinase được thu nhận chủ yếu từ loài nấm sợi như *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*, *Trichoderma viridiae*, *T. virens*, *Penicillium griseoroseum* và *Phanerochaete chrysosporium* đã được nghiên cứu trước đây. Trong đó, *A. niger* có khả năng sinh nhiều enzyme pectinase khi nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Chế phẩm enzyme từ vi sinh vật này đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ chấp nhận. Trong số các loài có độ tương đồng với dòng XX2, *A. tamarii* là loài ít phổ biến hơn. Tuy nhiên, nghiên cứu sản xuất pectinase và tối ưu hóa điều kiện lên men từ loài này đã được thực hiện trên cơ chất vỏ xoài [16]. Hơn nữa, M. Shanmugavel và cs (2018) [17] còn nghiên cứu sử dụng *A. tamarii* trong quá trình lên men rắn các phụ phẩm nông nghiệp để sản xuất

pectinase và ứng dụng có hiệu quả trong việc chiết xuất sắc tố sinh học hay tạo các chế phẩm phân hủy sinh học. Do đó, *A. tamarii* có thể xem là loài hữu ích cho các ứng dụng công nghiệp, đặc biệt là trong ngành công nghiệp thực phẩm bởi độ an toàn của nó.

Một loài khác phổ biến, an toàn và tương đồng với dòng XX2 là *A. oryzae*. Chúng cũng được ghi nhận là có khả năng sản xuất pectinase với hiệu suất cao, đã được nghiên cứu các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men vỏ của các loài cây có múi [18]. Ngoài ra, kết quả giải trình tự cho thấy, dòng XX2 cũng có thể là *A. flavus*. Một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy, sự có mặt của *A. flavus* với khả năng sinh enzyme pectinase. Cụ thể là trong nghiên cứu của J.H. Doughari và cs (2019) [19] đã chọn được dòng *A. flavus* có hoạt tính polygalacturonase cao trong các dòng phân lập và tối ưu việc sản xuất trên vỏ cam. Tuy nhiên, cần cân nhắc việc sử dụng *A. flavus* trong sản xuất pectinase để ứng dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm bởi đặc tính sinh độc tố aflatoxin của nó.

Nhìn chung, dòng *Asperillus* sp. XX2 có tiềm năng để sản xuất enzyme pectinase nhưng cần tiến hành xác định tên khoa học một cách chính xác hơn, cũng như tiếp tục các thử nghiệm và chứng minh về độ an toàn của chủng nấm này trên động/thực vật trước khi sử dụng trong ngành thực phẩm phục vụ con người.

4. Kết luận

Phân lập các dòng nấm mốc trên vỏ cam sành cho thấy sự đa dạng của các loài nấm mốc, với sự hiện diện của 6 dòng nấm mốc thuộc 4 chi bao gồm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* và *Rhizopus*. Tất cả các dòng nấm mốc được phân lập đều có khả năng phân giải pectin. Trong đó, dòng XX2 có khả năng sinh enzyme pectinase cao nhất, thông qua khả năng phân giải pectin từ nguồn cơ chất vỏ cam sành, với đường kính vòng phân giải pectin đạt 31,00 mm. Giải trình tự và so sánh trên NCBI cho thấy, dòng XX2 thuộc chi *Asperillus*, trong đó cho thấy độ tương đồng cao với loài *A. tamarii*, *A. flavus* hay *A. oryzae*. Do đó, với mục đích ứng dụng dòng nấm mốc *Asperillus* sp. XX2 để sản xuất pectinase dùng cho thực phẩm cần phải có những nghiên cứu sâu hơn, để định danh chính xác tên loài và đánh giá độ an toàn của chủng nấm này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí thực hiện thông qua đề tài nghiên cứu khoa học, theo hợp đồng thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ số 10/HĐ-SKHCN ngày 18/10/2021 giữa Sở Khoa học và Công nghệ TP Cần Thơ và Trường Đại học Cần Thơ. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Rivas, A. Torrado, P. Torre, et al. (2008), "Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(7), pp.2380-2387, DOI: 10.1021/jf073388r.
- [2] L. Xiao, F. Ye, Y. Zhou, et al. (2021), "Utilization of pomelo peels to manufacture value-added products: A review", *Food Chemistry*, **351**, DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129247
- [3] K.C. Sudeep, J. Upadhyaya, D.J. Joshi, et al. (2020), "Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains", *Fermentation*, **6**, DOI: 10.3390/fermentation6020059.
- [4] N. Kango, U.K. Jana, R. Choukade (2019), "Fungal enzymes: Sources and biotechnological applications", *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, Springer, pp.515-538, DOI: 10.1007/978-981-13-9349-5_21.
- [5] M.J. Carlile, S.C. Watkinson, G.W. Gooday (2001), *The Fungi*, 2nd Edition Academic Press, 603pp.
- [6] Y. Khairnar, K. Krishna, A. Boraste, et al. (2009), "Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*", *International Journal of Microbiology Research*, **1**(2), pp.13-17, DOI: 10.9735/0975-5276.1.2.13-17.
- [7] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, et al. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, pp.315-322, DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- [8] R. Thilagam, N. Hemalatha, E. Poongothai, et al. (2016), "Identification of *Aspergillus* species isolated from corn and peanuts in storage godowns", *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **7**(4), pp.600-606, DOI: 10.22376/ijpbs.2016.7.4.b600-606.
- [9] S. Ülhan, R. Demürel, A. Asan, et al. (2005), "Colonial and morphological characteristics of some microfungi species isolated from agricultural soils in Eskişehir province (Turkey)", *Turkey Journal of Botany*, **30**(2), pp.95-104.
- [10] T.T.T. Nguyen, Y.J. Jeon, H.Y. Mun, et al. (2019), "Isolation and characterization of four unrecorded *Mucor* species in Korea", *Mycobiology*, **48**(1), pp.29-36, DOI: 10.1080/12298093.2019.1703373.
- [11] A.T. Hartanti, G. Rahayu, I. Hidayat (2015), "Rhizopus species from fresh tempeh collected from several regions in Indonesia", *HAYATI Journal of Biosciences*, **22**(3), pp.136-142, DOI: 10.1016/j.hjb.2015.10.004.
- [12] S.M. Gummadi, T. Panda (2003), "Purification and biochemical properties of microbial pectinases: Review", *Process Biochemistry*, **38**(7), pp.987-996, DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00203-0.
- [13] W. Gong, H. Zhang, S. Liu, et al. (2015), "Comparative secretome analysis of *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, and *Penicillium oxalicum* during solid-state fermentation", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **177**(6), pp.1252-1271, DOI: 10.1007/s12010-015-1811-z.
- [14] T.T.D. Phan, T.N.L. Pham, T.B.C. Ngo, et al. (2018), "Isolation and screening of mould strains for cloning and expressing pectinase gene", *Hue University Journal of Science: Natural Science*, **27**(1C), pp.95-106, DOI: 10.26459/hueuni-jns.v127i1C.4885 (in Vietnamese).
- [15] P.L. Reddy, A. Sreeramulu (2012), "Isolation, identification and screening of Pectinolytic fungi from different soil samples of Chittoor district", *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, **1**(3), pp.186-193.
- [16] T. Amande, B.A. Tayo, U.N. Nnaji, et al. (2013), "Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamarii*", *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **3**(1), pp. 59-62.
- [17] M. Shanmugavel, S. Vasantharaj, A. Yazhmozhi, et al. (2018), "A study on pectinases from *Aspergillus tamarii*: Toward greener approach for cotton bioscouring and phytopigments processing", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **15**, pp.295-303, DOI: 10.1016/j.bcab.2018.06.013.
- [18] R. Ketipally, M.R. Ram (2018), "Optimization of pectinase production by *Aspergillus oryzae* RR 103", *Current Agriculture Research Journal*, **6**(1), pp.37-44, DOI: 10.12944/CARJ.6.1.05.
- [19] J.H. Doughari, G.C. Onyebarachi (2019), "Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus flavus* grown on orange peel", *Applied Microbiology Open Access*, **4**(3), pp.1-7, DOI: 10.4172/2471-9315.1000155.