PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MỐC CÓ KHẢ NĂNG SINH PROTEASE CÓ HOẠT ĐỘ CAO TỪ HẠT SEN

Phan Thị Hồng Liên*, Nguyễn Minh Hưng,

Trần Ngọc Đào, Nguyễn Hoàng Lan

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: *lienpth@fst.edu.vn*

Ngày nhận bài: 16/8/2023; Ngày chấp nhận đăng: 22/11/2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và định danh sơ bộ một số loài nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* có trên hạt sen ở chợ Tháp Mười, Đồng Tháp để từ đó chọn ra chủng có khả năng sinh tổng hợp protease có hoạt độ cao để ứng dụng vào quá trình sản xuất nước chấm từ hạt sen. Kết quả cho thấy hạt sen có tần suất phân lập nấm cao. Từ các mẫu hạt sen được thu mua tại chợ, đã phân lập được 4 chủng nấm mốc với kí hiệu MS1 - MS4. Các chủng nấm phân lập được định danh bằng hình thái và định danh đến mức độ loài bằng phương pháp giải trình tự gen vùng ITS. Chủng MS1 - MS3 được định danh là *Aspergillus flavus* với độ tương đồng 99,89-100% và chủng MS4 được định danh là *Aspergillus tamarii* với độ tương đồng 100%. Kết quả khảo sát hoạt độ enzyme protease theo thời gian nuôi cấy cho thấy chủng *Aspergillus tamarii* cho hoạt độ cao nhất ở 72 giờ nuôi cấy, đạt 1153,67 UI/g.

Từ khóa: Hạt sen, phân lập, *Aspergillus tamarri,* hoạt độ protease.

1. MỞ ĐẦU

Protease là nhóm enzyme xúc tác cho phản ứng thủy phân liên kết peptide (-CO-NH-) của chuỗi polypeptide, là enzyme đa chức năng và cực kỳ quan trọng trong ngành dược phẩm, y tế, công nghệ sinh học và thực phẩm, chiếm gần 60% toàn bộ thị trường enzyme [1, 2]. Chúng có thể được sản xuất từ thực vật, động vật và vi sinh vật. Trong số các nguồn này, vi sinh vật cho thấy tiềm năng lớn trong việc sản xuất protease do tính đa dạng sinh hóa và tính nhạy cảm của chúng. Người ta ước tính rằng protease được sản xuất bởi vi sinh vật chiếm khoảng 40% tổng doanh số enzyme được bán trên toàn thế giới [3].

Aspergillus sp. là chi nấm sợi phân bố rất rộng rãi trên nhiều sản phẩm nông nghiệp như các loại hạt, củ, quả, được biết đến với khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme, trong đó có protease. Việt Nam có điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm nên rất thuận lợi cho các loài nấm mốc phát triển trong đó có *Aspergillus* sp. Vì vậy việc tuyển chọn được dòng nấm mốc *Aspergillus* có trên các loại hạt phù hợp giúp thúc đẩy sự tổng hợp enzyme protease đóng vai trò rất quan trọng, là cơ sở bước đầu cho việc nghiên cứu ứng dụng các chủng *Aspergillus* có khả năng sinh tổng hợp protease cao và an toàn để làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hạt sen được thu hoạch từ cây hoa sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn) là một trong những loại hạt quen thuộc của người dân Việt Nam, có giá trị dinh dưỡng cao, đem lại những giá trị về kinh tế ở nước ta. Đặc biệt, ở Đồng Tháp là một trong những vùng thích hợp để trồng hạt sen. Trong những năm gần đây, diện tích và sản lượng cây sen của tỉnh Đồng Tháp không ngừng tăng cao. Ở Đồng Tháp, sen không những trở thành một biểu tưởng gắn liền với con người và quê hương nơi đây mà còn mang lại nhiều lợi ích đảm bảo cho sự phát triển cho người dân nơi này, là tiềm năng cho việc phát triển sản xuất và đa dạng hóa các sản phẩm thực phẩm tại địa phương. Vì vậy nghiên cứu phân lập, định danh và tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng sinh protease có hoạt độ cao thuộc *Aspergillus* sp. đã được thực hiện. Đây là nghiên cứu ban đầu để ứng dụng enzyme từ các loài nấm mốc thuộc *Aspergillus* sp. vào lĩnh vực công nghệ thực phẩm nói chung và sản xuất nước chấm từ hạt sen nói riêng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Hạt sen tươi dùng trong nghiên cứu được mua tại chợ Tháp Mười, thị trấn Mỹ An, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập nấm mốc từ hạt sen

Các mẫu hạt sen sau khi mua về, được khử trùng bề mặt trong dung dịch NaClO (Natri hypochlorite) 0,35% trong thời gian 2 phút, sau đó được tráng rửa bằng nước cất vô trùng, làm khô trên giấy vô trùng [4, 5]. Dùng kẹp gắp vi sinh đã khử trùng gắp một nửa hạt sen còn nguyên vào đĩa petri chứa sẵn môi trường PDA đã chuẩn bị trước. Đặt đều các hạt trong đĩa, ấn nhẹ hạt để hạt không di chuyển trên bề mặt thạch. Tiến hành bao gói, ủ nhiệt độ 30 ^oC trong 3 - 5 ngày. Sau khi ủ, tiến hành tách những khuẩn lạc nấm mốc nghi ngờ thuộc chi *Aspergillus* bằng cách dùng que cấy vô trùng lấy một ít bào tử hoặc một búi nhỏ của hệ sợi nấm đặt lên đĩa thạch PDA. Thao tác cấy truyền được thực hiện nhiều lần cho đến khi nấm mốc hoàn toàn thuần, không có lẫn sợi nấm lạ.

2.2.2. Định danh các chủng nấm mốc đã phân lập dựa trên đặc điểm hình thái

Cấy chuyền các dòng nấm đã phân lập sang đĩa petri, ủ ở nhiệt độ 30 °C. Quan sát và ghi nhận tất cả 3 đĩa petri của một dòng nấm và xác định các đặc điểm sau ở khuẩn lạc sau thời gian nuôi cấy 7 ngày bao gồm hình dáng; kích thước (đường kính khuẩn lạc); dạng mặt của khuẩn lạc (dạng hạt, dạng sợi, lồi lõm, có khía hay không); dạng mép khuẩn lạc (mỏng, phẳng, dày, nhăn nhúm); màu sắc của mặt trên khuẩn lạc; màu sắc của mặt dưới khuẩn lạc; chất tiết ra môi trường (nếu có) và màu của môi trường xung quanh khuẩn lạc (nếu có). Tiến hành làm tiêu bản nấm mốc, quan sát dưới kính hiển vi để định loại vi thể theo đặc điểm bào tử đính sợi nấm (có hay không vách ngăn, màu sắc, nhẵn hoặc có gai), hình dạng và màu sắc của bào tử, thể bình (mấy tầng, dạng gì), bọng (hình cầu hay gần cầu). Dựa vào khóa phân loại của tác giả Đặng Vũ Hồng Miên để định danh [6].

2.2.3. Định danh các chủng nấm mốc đã phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử

Các chủng nấm mốc đã định danh dựa trên đặc điểm hình thái được 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.

Đầu tiên tách chiết DNA tổng số của nấm mốc [7]. Sau đó khuếch đại trình tự vùng ITS1-5,8-ITS2 của các chủng nấm mốc bằng kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction) với các cặp mồi được sử dụng là ITS1: 5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´và ITS4: 5´- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´[8]. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự tự động. Phân tích kết quả và cuối cùng trình tự này được so sánh với các trình tự tương ứng trên dữ liệu ngân hàng gene NCBI bằng công cụ BLAST để định danh chủng nấm mốc [9].

2.2.4. Xác định hoạt độ protease của các chủng nấm mốc tuyển chọn

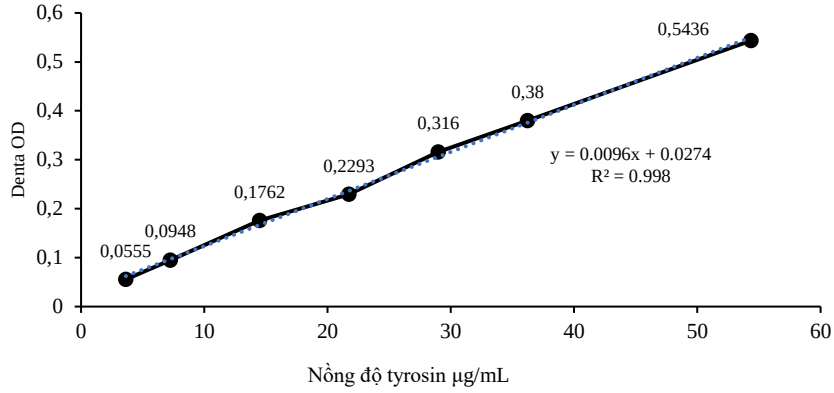
Hoạt độ enzyme được xác định dựa trên khả năng thuỷ phân casein bởi enzyme có trong mẫu nghiên cứu. Hoạt độ protease được xác định dựa theo phương pháp Anson cải tiến với cơ chất là casein.

Nguyên liệu hạt sen được rửa sạch, sau đó được nghiền nhỏ và hấp chín. 25 g nguyên liệu được cho vào bình tam giác 250 mL, trải đều với chiều dày khoảng 2 cm với độ ẩm ban đầu 50% và bổ sung mốc giống với mật độ bào tử 10^6 CFU/mL. Hỗn hợp được lên mốc ở nhiệt độ 30 ^oC. Tiến hành thu mẫu và xác định hoạt độ enzyme protease theo các mốc thời gian 24, 48, 72, 96 và 120 giờ bằng phương pháp Anson cải tiến [10].

Cân 1 g mẫu, nghiền mịn và thêm vào 50 mL nước cất. Lắc hỗn hợp để trích ly enzyme (tốc độ 180 vòng/phút, trích ly trong 30 phút). Lọc hỗn hợp để thu dịch trích ly, bảo quản ở 4^oC để phân tích. Chuẩn bị phản ứng thuỷ phân bằng cách lấy 1 mL dung dịch enzyme, bổ sung vào 2 mL dung dịch casein 2%, ủ ở nhiệt độ 30^oC trong 10 phút để phản ứng thuỷ phân xảy ra. Phản ứng kết thúc bằng cách bổ sung 5 mL dung dịch tricloacetic acid (TCA) 5%, lắc đều, để ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút, lọc kết tủa, thu dịch. Dung dịch thu được dùng để làm phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin 0,2 N có mặt Na_2CO_3 6%. Cho 1 mL dịch lọc enzyme và 4 mL Na_2CO_3 6% lắc đều. Sau đó, cho thêm 1 mL

thuốc thử Folin 0,2 N lắc đều, giữ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 750 nm để xác định hoạt độ protease [10].

Đơn vị hoạt độ protease là lượng enzyme chuyển hoá được một lượng caseinat natri thành dạng không bị kết tủa bởi acid tricloacetic tương đương với tyrosine 1mM ở 30 ^{o}C trong thời gian 1 phút [10].



Hình 1. Phương trình đường chuẩn tyrosin

Hoạt độ protease được tính dựa vào đường chuẩn tyrosin y = 0,0096x + 0,0274 với R^2 = 0,998, trong đó y là mật độ quang của dịch enzyme thuỷ phân đo ở bước sóng 750 nm; x là nồng độ tyrosin (mmol/mL). Tính hoạt độ protease của 1 mg mẫu theo công thức:

$$\text{Hoạt độ protease (UI/ g)} = \frac{\mu g\ \text{tyrosin} \times 8 \times 50}{t \times m}$$

Trong đó: µg tyrosin được tính ra từ đường chuẩn; 8: tổng thể tích toàn bộ hỗn hợp phản ứng; 50: độ pha loãng mẫu; t: thời gian để enzyme tác dụng với cơ chất (10 phút); m: khối lượng mẫu nghiên cứu đem đi xác định hoạt độ (m = 1 g).

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình ± SD. Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Minitab 19, phương pháp phân tích phương sai ANOVA. Biểu đồ được vẽ bằng phầm mềm Microsoft excel 2016.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm mốc từ hạt sen

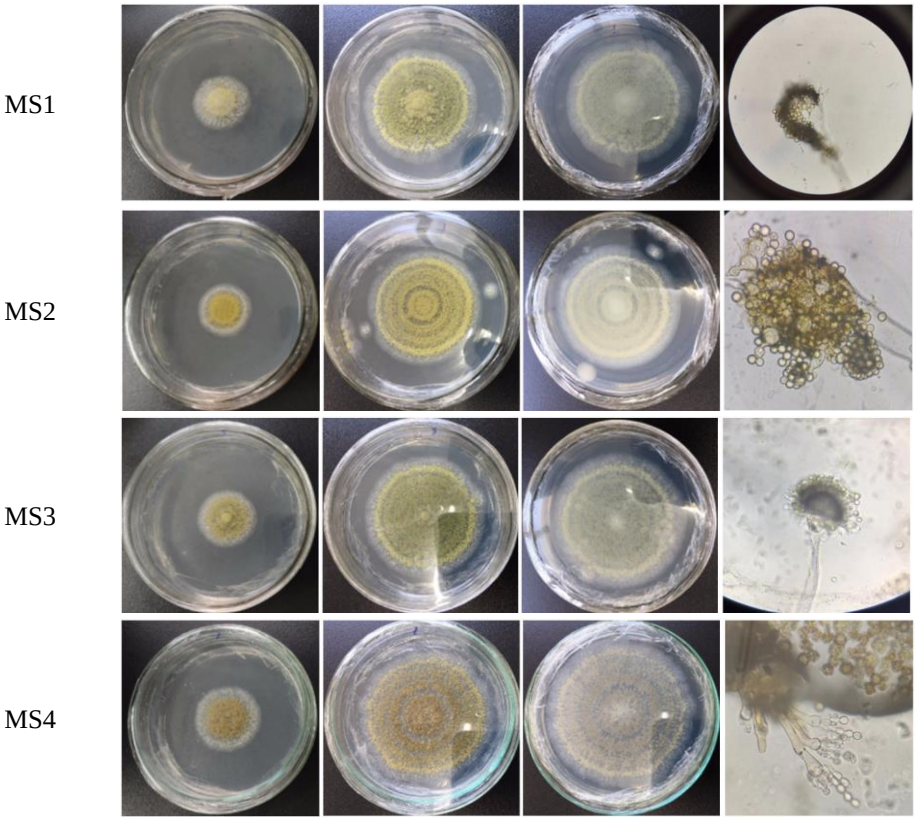
Sau quá trình phân lập nấm mốc từ hạt sen trên môi trường PDA, kết quả thu được 4 đĩa nấm mốc thuần chủng ký hiệu lần lượt là MS1; MS2; MS3 và MS4 với các đặc điểm phù hợp với chi *Aspergillus* (Hình 2).

3.2. Định danh các chủng nấm mốc đã phân lập dựa trên đặc điểm hình thái

Kết quả định danh dựa trên các đặc điểm hình thái được trình bày trong Bảng 1.

Trong 4 chủng nấm phân lập được, chủng MS4 có các đặc điểm khác biệt rõ rệt nhất so với các chủng còn lại. Từ các đặc điểm đã quan sát trên và dựa vào khóa phân loại của Đặng Vũ Hồng Miên [6] và các đặc điểm của *Aspergillus tamarii* do Ngô Thị Bảo Châu và cộng sự phân lập được như khuẩn lạc dạng tròn; hệ sợi nấm dạng bông; tơi; cấu trúc không chặt; có màu cỏ úa; trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường [11] thì có thể nghi ngờ MS4 là *Aspergillus tamarii.*

Về mặt hình thái các chủng nấm có thể thay đổi theo điều kiện môi trường sinh trưởng, đặc biệt các loài thuộc chi *Aspergillus* thường có đặc điểm hình thái dưới kính hiển vi là khó phân biệt với nhau. Trong đó, nấm sợi *Aspergillus oryzae* gần như giống hệt với *Aspergillus flavus* sinh độc tố aflatoxin về hình thái nên khó có thể phân biệt được 2 loài này [12]. Vì lý do như vậy cần phải tiến hành định danh bằng phương pháp sinh học phân tử để biết chính xác tên của 4 chủng nấm mốc này.



Hình 2. Hình ảnh của các chủng nấm mốc được phân lập trên hạt sen
a) Mặt trước khuẩn lạc sau 3 ngày; b) Mặt trước khuẩn lạc sau 7 ngày; c) Mặt sau khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA; d) Khuẩn ty và bào tử dưới kính hiển vi vật kính 40x

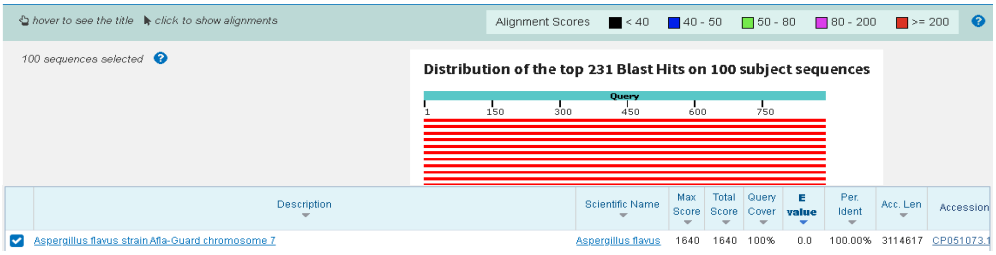
Bảng 1. Đặc điểm đại thể và vi thể của các chủng phân lập

Kí hiệu	Đặc điểm đại thể và vi thể	Nhận xét
MS1	Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, hình thành cái vòng tròn đồng tâm, ngoài là lớp tơ trắng, tâm nhô cao, sợi nấm dày đặc trong đường kính khoảng 2 cm. Mặt trái khuẩn lạc không màu. Khuẩn ty phân nhánh có vách ngăn, cọng mang túi bào tử thể bình thứ cấp với bào tử đính. Bào tử hình gần cầu, bề mặt có gai xù xì, màu xanh.	Thuộc *Aspergillus* sp. Với nhiều đặc điểm tương tự *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus flavus*
MS2	Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, hệ sợi nấm mịn màu vàng. Mặt trái khuẩn lạc không màu, không tiết sắc tố ra môi trường. Cuống bào tử có gai li ti. Thể bình có dạng hình chai, xếp trực tiếp trên bề mặt bọng đỉnh giá. Bào tử trần xếp thành chùm, có dạng hình cầu.	Thuộc *Aspergillus* sp. Với nhiều đặc điểm tương tự *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus flavus*
MS3	Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, hình thành cái vòng tròn đồng tâm, viên khuẩn lạc xuất hiện lớp tơ trắng mỏng, tâm nhô cao. Mặt trái khuẩn lạc không màu. Bề mặt cuống có gai. Thể bình có dạng hình chai. Bào tử hình cầu, bề mặt nhẵn, màu xanh.	Thuộc *Aspergillus* sp. Với nhiều đặc điểm tương tự *Aspergillus oryzae* hoặc *Aspergillus flavus*
MS4	Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, hệ sợi nấm dạng bông, có màu cỏ úa (vàng nâu), trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố ra môi trường. Khuẩn ty đã phân hóa thành vách ngăn, phân nhánh, thể bình thứ cấp, bào tử có hình cầu, đính dạng chuỗi, có gai mụn cơm.	Thuộc *Aspergillus* sp. với nhiều đặc điểm tương tự *Aspergillus tamarii*

3.3. Định danh các chủng nấm mốc đã phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử

Kết quả giải trình tự gen vùng ITS chủng nấm mốc MS1 và tra cứu trên BLAST search tương đồng 100% với trình tự gen vùng ITS loài *Aspergillus flavus*, mã số truy cập CP051073.1. Chủng nấm mốc MS1 được xếp vào chi *Aspergillus*, loài *Aspergillus flavus* (Hình 3).

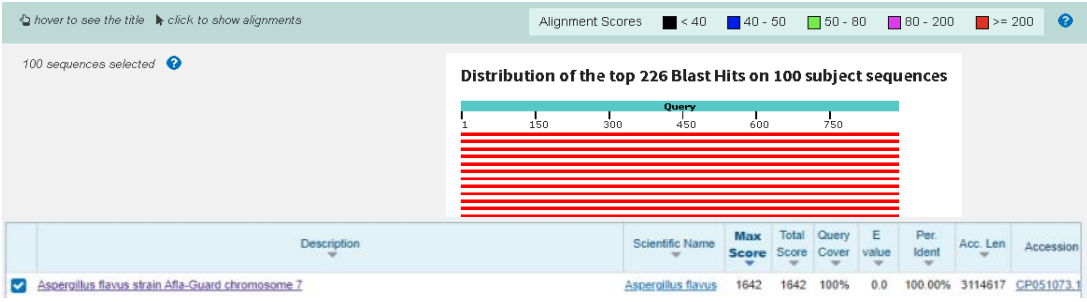
CGGACACCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACAGGGGCCGCACCCGAAGCATCCTCTG
CAAATTACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGT
TTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAGATTGATTTGCGTTCGG
CAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCG
TCCCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAAT
ACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTG
GTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAA
CACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTT
ACTTCCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCCGGCCCTGGGGGGTCGTTGCCAACCCTCCTGGGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAG



Hình 3. Kết quả giải trình tự vùng ITS và phân tích BLAST trên GenBank của chủng MS1

Kết quả giải trình tự gen vùng ITS chủng nấm mốc MS2 và tra cứu trên BLAST search tương đồng 100% với trình tự gen vùng ITS loài *Aspergillus flavus*, mã số truy cập CP051073.1. Chủng nấm mốc MS2 được xếp vào chi *Aspergillus*, loài *Aspergillus flavus* (Hình 4).

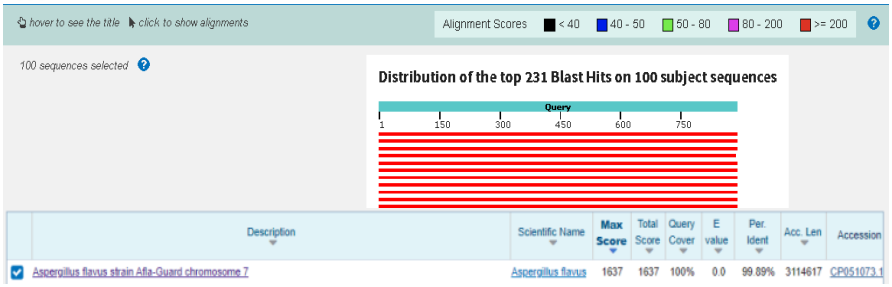
GCGGACACCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACAGGGGCCGCACCCGAAGCATCCTCT
GCAAATTACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGG
TTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAGATTGATTTGCGTTCGG
CAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCG
TCCCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAAT
ACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTG
GTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAA
CACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTT
ACTTCCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCCGGCCCTGGGGGGTCGTTGCCAACCCTCCTGGGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAG
CCA



Hình 4. Kết quả giải trình tự vùng ITS và phân tích BLAST trên GenBank của chủng MS2

Kết quả giải trình tự gen vùng ITS chủng nấm mốc MS3 và tra cứu trên BLAST search tương đồng 99,89% với trình tự gen vùng ITS loài *Aspergillus flavus*, mã số truy cập CP051073.1. Chủng nấm mốc MS3 được xếp vào chi *Aspergillus*, loài *Aspergillus flavus* (Hình 5).

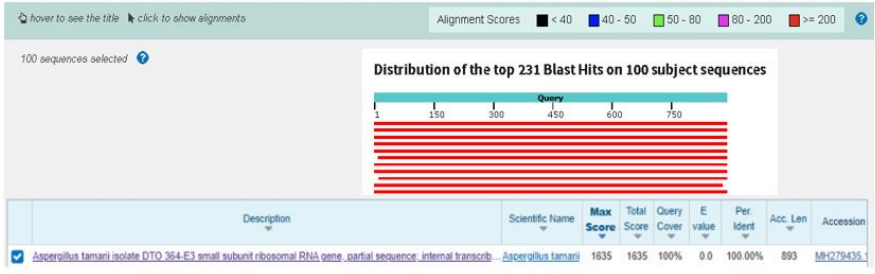
CCCATCCCAGACGGGATTCTCACCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACAGGGGCCGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATTA
CAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTC
CTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGC
CGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCC
CGGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAATACCAGG
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCC
GGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCT
CCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGG
TGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCT
CTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCCGGCCCTGGGGGGTCGTTGCCAACCCTCCTGGGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAGCCATCAA
TCGG



Hình 5. Kết quả giải trình tự vùng ITS và phân tích BLAST trên GenBank của chủng MS3

Kết quả giải trình tự gen vùng ITS chủng nấm mốc MS4 và tra cứu trên BLAST search tương đồng 100% với trình tự gen vùng ITS loài *Aspergillus tamarii*, mã số truy cập MH279435.1. Chủng nấm mốc MS4 được xếp vào chi *Aspergillus*, loài *Aspergillus tamarii* (Hình 6).

CCCCATCCCAGACGGGATTCTCACCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACAGGGGCCGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATT
ACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTT
CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAGAATGGTTGTTTTGCGTTCGGCAA
GCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCC
CCCCCGAAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAATACC
AGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT
GCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTG
TCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCTGATGCCCCCCGGCGGCCTTAAAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTTACAGTAAACAC
GGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACT
TCCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCCGGCCCTGGGGGGTCGTTGCCAACCCTCCTGGGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAGCC

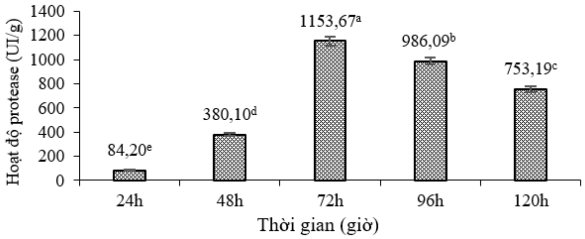


Hình 6. Kết quả giải trình tự vùng ITS và phân tích BLAST trên GenBank của chủng MS4
(Các chữ cái a, b, c… chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với p < 0,05)

3.4. Xác định hoạt độ protease của các chủng nấm mốc tuyển chọn

Trong hai loài phân lập được thì *Aspergillus flavus* được biết đến với khả năng có thể sinh độc tố nấm mốc như aflatoxin B1, B2, G1, G2 và cyclopiazonic acid [11, 12] nên không thể tuyển chọn để xác định hoạt độ protease. Về *Aspergillus tamarii*, đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng chủng nấm mốc này không sinh bất kỳ độc tố aflatoxin nào, được xác định bằng các kỹ thuật sắc ký, xét nghiệm CMA và amoni [13, 14]. Vì lý do như vậy, chủng *Aspergillus tamarii* được chọn để xác định hoạt độ protease.

Kết quả đo hoạt độ protease của *Aspergillus tamarii* được thể hiện ở Hình 7.



Hình 7. Ảnh hưởng của thời gian đến hoạt độ enzyme protease
(Các chữ cái a, b, c… chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với p < 0,05)

Kết quả cho thấy thời gian ảnh hưởng có ý nghĩa (p<0,05) đến hoạt độ enzyme trong suốt quá trình lên mốc. Hoạt độ enzyme protease tăng liên tục trong thời gian từ 24 giờ đến 72 giờ và đạt giá trị cực đại ở 72 giờ nuôi cấy với hoạt độ là 1153,67 UI/g. Sau đó, giá trị giảm dần sau 96 giờ nuôi cấy.

Trong suốt quá trình phát triển (0-120 giờ), nấm mốc có sự biến đổi rõ rệt về màu sắc sinh khối từ màu vàng sậm chuyển sang nâu sậm, sợi nấm dài hơn. Điều này cho thấy mốc đã già đi và yếu dần. Sự suy giảm về sinh khối nấm mốc sẽ dẫn đến sự giảm dần của hoạt độ protease còn có thể là do càng về thời gian sau của quá trình nuôi cấy, hàm lượng chất dinh dưỡng trong môi trường giảm và sự gia tăng của các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh làm thay đổi điều kiện lên mốc [17]. Kết quả tương tự được thể hiện trong nghiên cứu của Silva và cộng sự, nhóm tác giả đã nuôi cấy *Aspergillus tamarii* trong môi trường cám lúa mì và thu được hoạt độ protease cao nhất sau 72 giờ nuôi cấy với hoạt độ là 404,67 U/mL [15].

Chủng nấm mốc *Aspergillus tamarii* hiện đã được chứng minh là được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm và lên men [18]. Nhưng tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu về chủng nấm mốc này, do đó kết quả nghiên cứu bước đầu cung cấp một số thông tin cơ bản để từ đó hỗ trợ các nghiên cứu tiếp theo để có thể ứng dụng chủng nấm mốc vào sản xuất nước chấm lên men từ hạt sen.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu hạt sen được thu mua từ chợ Tháp Mười, Đồng Tháp, phân lập được 4 chủng, trong đó 3 chủng *Aspergillus flavus* và 1 chủng *Aspergillus tamarii*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng nấm mốc *Aspergillus tamarii* có khả năng sinh tổng hợp enzyme protease cao nhất ở 72 giờ nuôi cấy với hoạt độ là 1153,67 UI/g, từ đó có thể tiếp tục nghiên cứu sâu hơn để có thể ứng dụng vào thực tiễn sản xuất nước chấm lên men từ hạt sen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jinka, R., Ramakrishna, V., Rao, S. K. and Rao, R. P. - Purification and characterization of cysteine protease from germinating cotyledons of horse gram. BMC Biochem **10** (1) (2009) 28. https://doi.org/10.1186/1471-2091-10-28
2. Ramakrishna, V., Rajasekhar, S. and Reddy, L. S. - Identification and purification of metalloprotease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) Seeds. Applied Biochemistry Biotechnology **160** (1) (2010) 63–71. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8523-1
3. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. - Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews **62** (3) (1998) 597–635. https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998
4. Bell, C., Neaves, P. and Williams, A. P. - Food microbiology and laboratory practice, Blackwell Science (2005).
5. Andrews, S. and Pitt, J. I. - Selective medium for isolation of Fusarium species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. Applied and Environmental Microbiology **51** (1986) 1235–1238. https://doi.org/10.1128/aem.51.6.1235-1238.1986
6. Miên, Đ. V. H. - Hệ nấm mốc ở Việt Nam-phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật (2015).
7. Green, M. R. and Sambrook, J. - Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).
8. Linh, Đ. T. M., Mai, N. T. Q., Thùy, P. T. P., Mai, H. T. and Ngân, P. T. K. - Tuyển chọn nấm

mốc sinh enzyme chitosanase phân lập từ đất một số vùng thuộc Nam Bộ. Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm **19** (1) (2019) 38-49.

9. Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. - Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews **64** (4) (2000) 655–671. https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.655-671.2000
10. Lượng, N. Đ., Huyền, P. T. and Tuyết, N. A. - Thí nghiệm công nghệ sinh học Tập 2, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (2011).
11. Châu, N. T. B., Tuấn, N. Đ. and Diễm, P. T. T. - Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có hoạt tính pectinase mạnh. Tạp chí Khoa học và Công nghệ **15** (2) (2020) 79-80.
12. Machida, M., Yamada, O., and Gomi, K. - Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the history of koji mold and exploration of its future. DNA Research **15** (4) (2008) 173-183. https://doi.org/10.1093/dnares/dsn020
13. Georgianna, D. R., Fedorova, N. D., Burroughs, J. L., Dolezal, A. L., Bok, J. W., Horowitz-Brown, S., Woloshuk, C. P., Yu, J., Keller, N. P. and Payne, G. A. - Beyond aflatoxin: Four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. Molecular Plant Pathology **11** (2) (2010) 213-226. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00594.x
14. Gonçalez, E., Silva, J. L. D., Reis, T. A. D., Nakai, V. K., Felicio, J. D. and Corrêa, B. - Production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* strains isolate from peanuts. Arquivos do Instituto Biológico **80** (3) (2013) 312–317.
15. Silva, O. S. da, Oliveira, R. L. de, Souza-Motta, C. M., Porto, A. L. F. and Porto, T. S. - Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. Advances in Enzyme Research **4** (2016) 125-143.http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.44012
16. Yazdani, D., Abidin, Z. and Tan, Y. - Evaluation of the detection techniques of toxigenic aspergillus isolates. African Journal of Biotechnology **9** (45) (2010) 7654-7659.
17. Wang, R., Chau Sing Law, R. and Webb, C. - Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. Process Biochemistry **40** (1) (2005) 217-227. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.12.008
18. Varga, J., Frisvad, J. C. and Samson, R. A. - Two new aflatoxin producing species, and an overview of Aspergillus section Flavi. Studies in Mycology **69** (1) (2011) 57-80. https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.05

ABSTRACT

ISOLATION, IDENTIFICATION AND SELECTION OF MOLD STRAINS WITH HIGH PROTEASE ACTIVITY FROM LOTUS SEEDS

Phan Thi Hong Lien*, Nguyen Minh Hung,
Tran Ngoc Dao, Nguyen Hoang Lan
Ho Chi Minh City University of Industry and Trade
*Email: *lienpth@fst.edu.vn*

The study was carried out with the aim of isolating and preliminary identifying some *Aspergillus* species found on lotus seeds in Thap Muoi market, Dong Thap province to select strains with high protease biosynthesis ability to apply in the process soy sauce production. The results showed that lotus seeds have a high frequency of fungal isolation. From samples of lotus seeds collected at market stalls, four mold strains with symbols MS1 - MS4 were isolated. Isolated fungal strains were identified by morphology and identified to the species level by ITS region gene sequencing. The MS1 - MS3 strain was identified as *Aspergillus flavus* with 99,89 - 100% similarity and the MS4 strain was identified as *Aspergillus tamarii* with 100% similarity. The results of surveying protease enzyme activity according to culture time showed that the *Aspergillus tamarii* strain had the highest activity at 72 hours of culture, reaching 1153,67 UI/g.

Keywords: Lotus seeds, isolation, *Aspergillus tamarri*, protease activity.