

**PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC MỘT SỐ CHỦNG *Aspergillus niger*  
SINH PECTINASE TỪ MỘT SỐ VỎ CỦ, QUẢ  
(CHUỐI, TÁO, XOÀI, THANH LONG VÀ CÀ RỐT) Ở THÀNH PHỐ HUẾ**

**TRẦN QUỐC DUNG, NGUYỄN THỊ KIM CỐ,  
NGUYỄN THỊ SƯƠNG, NGUYỄN THỊ THU CHUNG**  
*Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế*

**PHAN THỊ THANH DIỄM, NGUYỄN HOÀNG LAN ANH**  
*Trường Đại học Quảng Nam*

Pectinase là các enzyme phân giải các cơ chất pectin, 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 nước giải khát có cồn. Các enzyme này thường làm cho việc chiết xuất, lọc và tinh lọc nước quả và nước giải khát được dễ dàng cũng như làm tăng sản lượng của chúng trong sản xuất. 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. Sự sản xuất pectinase quy mô công nghiệp được thực hiện chủ yếu từ *Aspergillus niger* (Yogesh, 2009). Vì vậy việc tìm kiếm các chủng *A. niger* có khả năng tổng hợp pectinase cao là rất có ý nghĩa. Nhiều nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn các chủng *A. niger* có khả năng tổng hợp pectinase cao (Dung, 2013; Trúc, 2011, 2010; Hương, 2006), thu nhận và tinh sạch pectinase từ *A. niger* (Oanh, 2008; Tâm, 2002), sản xuất pectinase (Mrudula, 2011; Yogesh, 2009) đã được thực hiện.

Bài báo này trình bày một số kết quả ban đầu về phân lập và sàng lọc một số chủng *A. niger* có khả năng tổng hợp pectinase từ vỏ của 5 loại củ, quả ở thành phố Huế.

## **I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Vật liệu**

Các mẫu vỏ của 5 loại củ, quả được thu thập từ một số chợ ở thành phố Huế, bao gồm: chuối, táo, xoài, thanh long và cà rốt.

Môi trường PDA: Dịch chiết khoai tây 1000 ml; agar 2%, glucose 2%; pH 5,5.

Môi trường Czapeck-pectin:  $K_2HPO_4$  0,1%;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%;  $NaNO_3$  0,3%; KCl 0,05%;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,001%; pectin 1,5%; pH 5,5.

Môi trường tuyển chọn chủng *A. niger*: Pectin 0,5%; agar 2% g; pH 5,5.

### **2. Phương pháp nghiên cứu**

*Phương pháp phân lập A. niger*: Các vỏ quả để lên mốc tự nhiên. Lấy mẫu vỏ (phần bị hỏng do nấm mốc) cắt thành mảnh 1-1,5 mm, sau đó nghiền nhỏ, cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch agar 0,1% vô trùng. Lắc ống nghiệm chứa mẫu trên máy vortex để dịch tan đều. Hút 200  $\mu$ l hỗn dịch cho vào mỗi đĩa petri chứa môi trường PDA. Nuôi cấy mẫu ở 30°C trong tủ ẩm. Sau 72 giờ, lấy mẫu ra quan sát đại thể và vi thể và định loại *A. niger* theo khóa phân loại của Diba và cs.(2007).

*Sàng lọc các chủng A. niger*: Các chủng *A. niger* được nuôi cấy trong môi trường lỏng Czapeck-pectin, ở 30°C, sau 3 ngày ly tâm loại sinh khối, thu enzyme ngoại bào. Lấy 100  $\mu$ l dịch enzyme ngoại bào cho vào lỗ đã đục trên đĩa thạch pectin. Sau đó đem ủ ở 37°C. Sau 24 giờ lấy ra nhỏ dung dịch lugol 1% lên mặt thạch. Xác định hoạt tính pectinase bằng cách đo

đường kính vòng thủy phân pectin. Khả năng sinh tổng hợp pectinase của các chủng được đánh giá thông qua độ lớn của đường kính vòng thủy phân pectin.

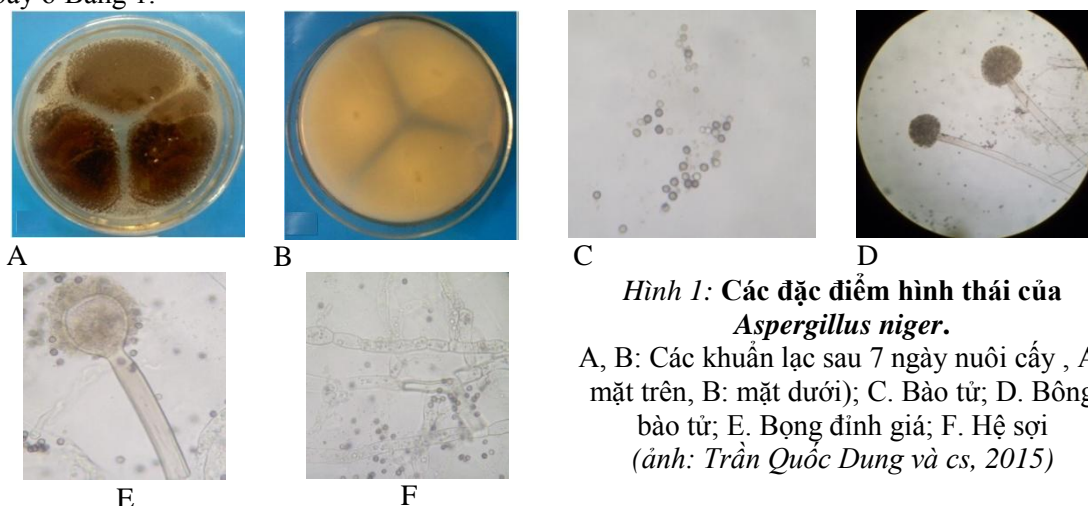
**Xác định hoạt độ pectinase:** Hoạt độ pectinase được xác định bằng cách đo lượng đường khử được giải phóng từ hoạt động của pectinase trên cơ chất pectin bằng thuốc thử 3, 5-dinitrosalicylic axit, (DNS). Lấy 3 ml hỗn hợp phản ứng bao gồm 0,8 ml dung dịch pectin và 0,2 ml dịch enzyme được pha loãng 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, làm 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  $\mu\text{mol}$  của các nhóm khử trong một phút với glucose là tiêu chuẩn trong các điều kiện thí nghiệm (Mrudula, 2011).

**Xử lý thống kê:** Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình mẫu và phân tích Duncan's test,  $p < 0,05$  bằng chương trình SAS (ver.6.12).

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Phân lập các chủng *A. niger* có khả năng sinh tổng hợp pectinase

Từ các vỏ quả chuối, táo, xoài, thanh long và cà rốt đã tiến hành phân lập các chủng *A. niger* trên môi trường Czapeck. Trong quá trình nuôi cấy ở 30°C, các khuẩn lạc được quan sát đầu tiên bằng mắt thường thấy có màu trắng và sau đó nhanh chóng chuyển thành màu nâu đậm và đen với các bào tử đỉnh và mặt dưới của đĩa Petri có màu vàng nhạt và các rãnh phóng xạ xuất hiện trên đĩa thạch (Hình 1A, 1B). Sau đó quan sát các chủng phân lập được dưới kính hiển vi thấy các sợi nấm mảnh, phân nhánh và có vách ngăn. Các bào tử hình cầu có màu nâu đen, cuống bào tử ngắn. Bọng đỉnh giá có hình cầu hoặc gần cầu, có hai hàng thể bình (Hình 1C, 1D, 1E, 1F). Các đặc điểm hình thái này hoàn toàn phù hợp với khóa định loại của Diba và cs. (2007). Như vậy 50 chủng nấm phân lập được đều là *A. niger*: 10 chủng có nguồn gốc từ vỏ chuối (được ký hiệu là CH1, CH2, CH3, CH4, CH5, CH6, CH7, CH8, CH9 và CH10); 10 chủng có nguồn gốc từ vỏ táo (được ký hiệu là T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 và T10); 10 chủng có nguồn gốc từ vỏ xoài (được ký hiệu là X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9 và X10); 10 chủng có nguồn gốc từ vỏ thanh long (được ký hiệu là TL1, TL2, TL3, TL4, TL5, TL6, TL7, TL8, TL9 và TL10) và 10 chủng có nguồn gốc từ vỏ cà rốt (được ký hiệu là CR1, CR2, CR3, CR4, CR5, CR6, CR7, CR8, CR9 và CR10). Kết quả phân lập các chủng *A. niger* được trình bày ở Bảng 1.



**Hình 1: Các đặc điểm hình thái của *Aspergillus niger*.**

A, B: Các khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy, A: mặt trên, B: mặt dưới); C. Bào tử; D. Bông bào tử; E. Bọng đỉnh giá; F. Hệ sợi (ảnh: Trần Quốc Dung và cs, 2015)

Bảng 1

**Nguồn gốc và đặc điểm của các chủng *A. niger* phân lập từ một số vỏ quả**

STT	Nguồn phân lập	Số mẫu phân lập	Số chủng <i>A. niger</i> phân lập được	Đặc điểm của chủng	
				Thời gian xuất hiện bào tử/ngày	Màu của khuẩn lạc
1	Vỏ chuối	10	10	2	Đen
2	Vỏ táo	10	10	1	Đen và nâu đen
3	Vỏ xoài	10	10	2	Đen
4	Vỏ thanh long	10	10	2	Đen
5	Vỏ cà rốt	10	10	2	Đen

**2. Sàng lọc các chủng *A. niger* có khả năng sinh pectinase**

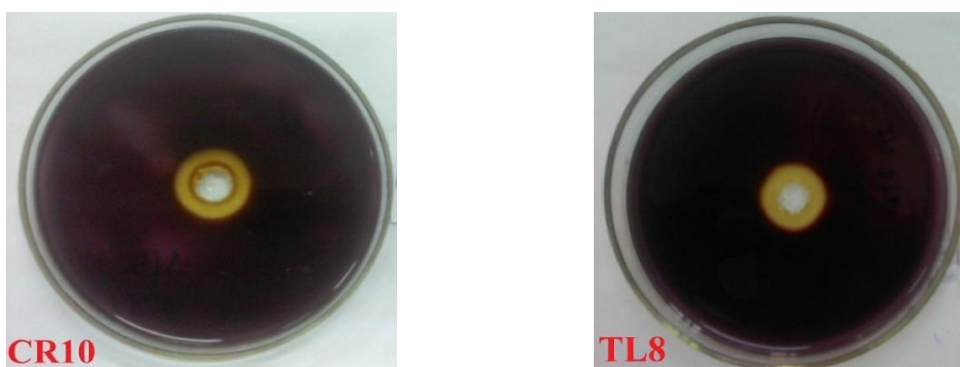
Khả năng sinh pectinase của các chủng *A. niger* sau khi phân lập được đánh giá gián tiếp qua đường kính vòng thủy phân pectin. Kết quả xác định đường kính vòng thủy phân pectin của 50 chủng *A. niger* được trình bày ở Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2

**Đường kính vòng thủy phân pectin của 50 chủng *A. niger* phân lập**

STT	Nguồn phân lập	Số mẫu phân lập	Đường kính vòng thủy phân pectin (cm)	
			Trung bình	Khoảng biến thiên
1	Vỏ chuối	10	1,64±0,06	1,2-1,9
2	Vỏ táo	10	1,88±0,04	1,7-2,1
3	Vỏ xoài	10	<b>I</b> 1,65±0,08	1,4-2,2
4	Vỏ thanh long	10	<b>II</b> 1,89±0,06	1,5-2,1
5	Vỏ cà rốt	10	<b>III</b> 1,99±0,08	1,3-2,2

Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy đường kính vòng thủy phân pectin trung bình của các chủng *A. niger* có nguồn gốc từ vỏ cà rốt là lớn nhất ( $1,99 \pm 0,08$ ), biến thiên trong khoảng từ 1,3-2,2 cm. Đường kính vòng thủy phân pectin lớn nhất của các chủng *A. niger* là 2,2 cm. Trong đó, 15 chủng có đường kính vòng thủy phân pectin lớn hơn 2,0 cm ( $2,08 \pm 0,05$ ); 31 chủng có đường kính vòng thủy phân pectin là 1,5-2,0 cm ( $1,74 \pm 0,13$ ) và 4 chủng có đường kính vòng thủy phân pectin nhỏ hơn 1,5 cm ( $1,32 \pm 0,07$ ). Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Tran Thanh Truc và cs. (2011).



Hình 2: Đường kính vòng thủy phân của hai chủng *A. niger* CR10 và TL8 (ảnh: Trần Quốc Dung và cs, 2015)

### 3. Hoạt độ pectinase của các chủng *A. niger* phân lập được

Kết quả phân tích hoạt độ pectinase của 50 chủng *A. niger* phân lập được trình bày ở Bảng 3 cho thấy: 2 chủng từ vỏ quả xoài có hoạt độ pectinase cao nhất đạt từ 10,544-10,700 U/ml. Tiếp đến là chủng phân lập từ vỏ quả chuối có hoạt độ pectinase 8,806 U/ml và chủng phân lập từ vỏ quả xoài có hoạt độ pectinase 8,802 U/ml. Chủng phân lập từ vỏ quả táo có hoạt độ pectinase thấp nhất chỉ đạt 0,407 U/ml.

Bảng 3

Hoạt độ pectinase của các chủng *A. niger* phân lập được

STT	Chủng	Hoạt độ, U/ml)	STT	Chủng	Hoạt độ, U/ml)	STT	Chủng	Hoạt độ, U/ml)
1	CH1	3.897 <sup>de</sup>	17	T7	2.583 <sup>e</sup>	35	TL5	2.029 <sup>c</sup>
2	CH2	7.685 <sup>b</sup>	18	T8	5.714 <sup>b</sup>	36	TL6	0.609 <sup>f</sup>
3	CH3	5.567 <sup>c</sup>	19	T9	5.646 <sup>b</sup>	37	TL7	1.112 <sup>de</sup>
4	CH4	8.806 <sup>a</sup>	20	T10	4.063 <sup>c</sup>	38	TL8	2.000 <sup>c</sup>
5	CH5	4.176 <sup>ed</sup>	21	X1	8.850 <sup>b</sup>	39	TL9	0.770 <sup>ef</sup>
6	CH6	4.693 <sup>cd</sup>	22	X2	6.693 <sup>d</sup>	40	TL10	2,176 <sup>c</sup>
7	CH7	3.228 <sup>e</sup>	23	X3	6.130 <sup>e</sup>	41	CR1	0.908 <sup>f</sup>
8	CH8	5.601 <sup>c</sup>	24	X4	4.527 <sup>f</sup>	42	CR2	2.563 <sup>d</sup>
9	CH9	3.890 <sup>ed</sup>	25	X5	10.544 <sup>a</sup>	43	CR3	3.040 <sup>c</sup>
10	CH10	4.470 <sup>d</sup>	28	X8	1.550 <sup>g</sup>	44	CR4	2.549 <sup>d</sup>
11	T1	4.676 <sup>a</sup>	27	X7	8.802 <sup>b</sup>	45	CR5	1.639 <sup>e</sup>
12	T2	1.656 <sup>f</sup>	29	X9	10.700 <sup>a</sup>	46	CR6	1.245 <sup>ef</sup>
13	T3	3.488 <sup>d</sup>	30	X10	6.407 <sup>de</sup>	47	CR7	5.155 <sup>b</sup>
14	T4	1.307 <sup>g</sup>	31	TL1	6.818 <sup>a</sup>	48	CR8	2.985 <sup>cd</sup>
15	T5	0.583 <sup>h</sup>	32	TL2	1.307 <sup>d</sup>	49	CR9	6.982 <sup>a</sup>
16	T6	0.470 <sup>h</sup>	33	TL3	1.452 <sup>d</sup>	50	CR10	5.309 <sup>b</sup>
17	T7	2.583 <sup>c</sup>	34	TL4	2.660 <sup>b</sup>			

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

### III. KẾT LUẬN

Từ 50 chủng *A. niger* phân lập được từ vỏ quả chuối, táo, xoài, thanh long và cà rốt đã sàng lọc được hai chủng có khả năng sinh tổng hợp pectinase trên 10 U/ml sau 3 ngày nuôi cấy là X5 và X9.

*Lời cảm ơn:* Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Đại học Huế qua đề tài mã số DHH2014-03-54.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Kim Dung, Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Trà My, Lê Thị Huyền, Nguyễn Thị Xuân Sâm, 2013. Phân lập, tuyển chọn các chủng *Aspergillus niger* sinh endo polygalacturonase cao cho mục tiêu sản xuất pectic oligosaccharide (POS), Báo cáo khoa học Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013, Nxb. KHTN & CN, Hà Nội, trang 313-317.

2. **Lê Thị Thanh Hương, Nguyễn Thuỳ Châu**, 2005. Phân lập tuyển chọn một số chủng nấm *Aspergillus niger* sinh enzyme pectinaza cao từ một số phế phụ phẩm nông sản, TC Nông nghiệp và phát triển nông thôn, 15: 37-38.
3. **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): 46-50.
4. **Nguyễn Quang Tâm, Lê Thị Hồng Nga, Đồng Thị Thanh Thu, Nguyễn Thị Tuyết Thanh**, 2002. Tinh sạch và cố định enzyme pectinase thu nhận từ một số chủng nấm mốc, Báo cáo Hội nghị Khoa học Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Thành phố Hồ Chí Minh: 187-193.
5. **Diba K., Kordbacheh P., Mirhendi S.H., Rezaie S., Mahmoudi**, 2007. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics, Pak J Med Sci, 23(6): 867-872.
6. **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): 64-71.
7. **Tran Thanh Truc, Le Vuong Hai Nguyet, Nguyen Van Muoi**, 2011. Journal of Food Science and Technology, 49 (1A): 453-458.
8. **Tran Thanh Truc, Duong Do Thanh Lan, Nguyen Thi Kieu Linh, Nguyen Van Thanh, Nguyen Van Muoi**, 2010. Isolation and screening *Aspergillus niger* strains producing pectin methyl esterase from some kinds of orange and pomelo in Mekong river delta, Vietnam, Food Innovation Asia Conference on Ligneous Food Research and Development to Global Market, June 17-18, 2010, BITEC, Bangkok, Thailand: 453-458.
9. **Yogesh, K., K. K. Vamsi, B. Amol, G. Nikhil, T. Soham, P. Prasad, G. Girish, G. Mayank, J. Amol, M. Adarsh, B. Joshi, D. Mishra**, 2009. International Journal of Microbiology Research, 1 (2): 13-17.

**ISOLATION AND SCREENING OF *Aspergillus niger* STRAINS FOR BIOSYNTHESIS OF PECTIANSE FROM PEELS OF SOME FRUITS , BANANA, APPLE, MANGO, DRAGON AND CARROT) IN HUE CITY**

**TRAN QUOC DUNG, NGUYEN THI KIM CO, NGUYEN THI SUONG  
NGUYEN THI THU CHUNG, PHAN THI THANH DIEM, NGUYEN HOANG LAN ANH**

**SUMMARY**

Pectinase originated from *Aspergillus niger* strains are important in the food and other processing industries. This investigation is for isolation and screening of *Aspergillus niger* strains for biosynthesis of pectianse production from peels of some fruits such as banana, apple, mango, dragon and carrot in Hue city. A preliminary result was isolated and selected 50 strains of *A. niger*. Among these 2 strains, viz X5 and X9 are able to produce highest pectinase with 10 U/ml.