

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH LOÀI NẤM *ASPERGILLUS ORYZAE* SỬ DỤNG TRONG SẢN XUẤT SỮA GẠO LÊN MEN

Mai Thành Luân¹, Nguyễn Thị Mai¹, Nguyễn Thị Mai Anh², Phạm Phương Anh²

TÓM TẮT

Nấm mốc *Aspergillus oryzae* được sử dụng khá phổ biến trong ngành công nghiệp lên men thực phẩm và đồ uống do giá trị sức khỏe và mức độ an toàn của nó mang lại. Việc phân lập và định danh loài nấm này đóng vai trò quan trọng giúp chủ động sản xuất nguồn men phục vụ cho quy trình sản xuất các sản phẩm lên men. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về đặc điểm hình thái và giải trình tự đoạn rDNA (vùng gen ITS) đã khẳng định loài nấm phân lập được là nấm *Aspergillus oryzae*.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae*, lên men thực phẩm, định danh loài nấm.

DOI: <https://doi.org/10.70117/hdujs.71.2024.702>

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm mốc *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) là một trong những loài nấm phổ biến nhất được sử dụng trong lĩnh vực công nghệ sinh học ở nhiều quốc gia trên thế giới. Trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm, loài nấm này thường được sử dụng để lên men thực phẩm. Enzyme amylase và protease trong nấm mốc *A. oryzae* giúp phân giải protein và các loại tinh bột khác nhau thành axit amin và đường được phân tán vào trong môi trường nuôi cấy [5][8]. Nấm mốc *Aspergillus oryzae* được các tổ chức như Food Standards Australia New Zealand (2016) và tổ chức US Food and Drug Administration (2018) đánh giá an toàn với sức khỏe con người. Tại Nhật Bản, nấm mốc *Aspergillus oryzae* hay còn gọi là nấm Koji được sử dụng khá phổ biến để lên men các sản phẩm ngũ cốc tạo ra các sản phẩm truyền thống như rượu sake, shochu, mirin (rượu ngọt), giấm gạo, tương miso, muối Koji... Sữa gạo lên men (Koji amazake) là một loại thức uống lên men từ loài nấm mốc *Aspergillus oryzae* này. Có hai loại đồ uống được gọi là amazake, một loại là sữa gạo lên men được làm từ Koji (Koji amazake) và loại khác được làm từ một sản phẩm phụ của rượu sake (Sakekasu amazake). Sữa gạo lên men (koji amazake) là thức uống không chứa cồn, màu trắng sữa, có vị ngọt và là thức uống truyền thống lâu đời của người Nhật Bản. Sữa gạo lên men được chiết xuất từ gạo trắng lên men với loài nấm mốc *Aspergillus oryzae* ở nhiệt độ 50°C - 60°C trong 6 - 8 tiếng. Enzyme amylase tiết ra bởi nấm mốc *A. oryzae* có chức năng phá vỡ tinh bột thành đường glucose tạo nên vị ngọt mát của sữa gạo lên men.

Nấm mốc *A. oryzae* có khả năng sinh trưởng được trên nhiều loại môi trường dinh dưỡng khác nhau bao gồm: môi trường khoai tây đường agar (PDA) cho sinh trưởng nhanh

¹ Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức; Email: maithanhluan@hdu.edu.vn

² Sinh viên lớp K24 Đại học Nông học, Trường Đại học Hồng Đức

tạo sinh khối tốt; môi trường Czapek's agar cho đường kính tản nấm đạt 7 - 8 cm trong 7 ngày ở nhiệt độ 25°C. Nhìn chung, nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng phát triển của nấm mốc *A. oryzae* từ 32°C - 36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) và không thể sinh trưởng ở nhiệt độ cao hơn 44°C. Mức pH tối ưu cho sự phát triển của nấm mốc từ 5,0 - 6,0, tuy nhiên bào tử có thể nảy mầm được ở điều kiện phổ pH khá rộng từ 2,0 - 8,0 [6]. Dưới kính hiển vi quang học, nấm mốc *A. oryzae* được nhận biết với bào đài sinh bào tử (vesicle) hình tròn được nối dài bởi chuỗi bào tử dính kết với nhau. Cành bào tử phân sinh *A. oryzae* dài, mọc lên từ môi trường nuôi cấy, vỏ ngoài thô ráp, đầu cuối của cành bào tử phân sinh lớn, tỏa ra nhiều hướng với nhiều bào tử phân sinh hình tròn. Nấm mốc *Aspergillus oryzae* thuộc lớp *Eurotiomycetes*; bộ *Eurotiales*; họ *Trichocomaceae*. Nấm được phân lập từ đất trồng, trên các cây trồng khác nhau như lúa, đậu, hoa hướng dương, đậu tương, và lúa mì [3].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và làm thuần nấm *Aspergillus* sp. từ nguồn men thương mại tại Nhật Bản, sau đó thực hiện định danh thông qua hình thái và kỹ thuật phân tử để xác định loài nấm phân lập được là nấm *A. oryzae*. Việc xác định loài nấm có ý nghĩa quan trọng trong việc chủ động tạo nguồn men vi sinh vật phục vụ cho sản xuất các sản phẩm lên men.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nấm mốc *Aspergillus* sp. được phân lập từ sản phẩm men vi sinh Tane Koji (Công ty Bio'c, Nhật Bản).

Môi trường PDA dùng để phân lập và nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus* sp. gồm: khoai tây (250g), đường glucose (20g), agar (20g), nước cất (1 lít).

Các dụng cụ thiết bị được sử dụng trong nuôi cấy, quan sát hình thái của nấm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và làm thuần nấm mốc *Aspergillus* sp.

Men vi sinh Koji (Nhật Bản) 0.1g được hòa vào 10 ml nước cất khử trùng, lắc đều cho men tan hết. Sử dụng phương pháp trang vi sinh vật trên môi trường PDA để phân lập nấm mốc *Aspergillus* sp.. Đĩa môi trường cấy nấm mốc được nuôi cấy trong điều kiện 32°C - 35°C trong 5 - 7 ngày. Cho đến khi, các tản nấm và bào tử được xác định hình thái giống nấm *Aspergillus* sp. thì bắt đầu cấy chuyển và làm thuần trên môi trường PDA. Nấm mốc *Aspergillus* sp. sau khi làm thuần được bảo quản trong điều kiện 5°C phục vụ cho các thí nghiệm.

2.2.2. Phương pháp định danh loài nấm *Aspergillus* sp.

Phương pháp định danh loài nấm Aspergillus sp. bằng hình thái

Sử dụng phương pháp phân loại định danh nấm mốc *Aspergillus* sp. bằng kiểu hình (màu sắc, hình dạng, kích thước tản nấm trên môi trường nuôi cấy, cành bào tử phân sinh, bào tử phân sinh...), đối chiếu với các kết quả nghiên cứu nấm mốc *Aspergillus* sp. trong và ngoài nước.

Phương pháp phân loại định danh loài nấm *Aspergillus* sp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Sau khi xác định được các chủng nấm dựa trên đặc điểm hình thái, các chủng này tiếp tục được gửi đến đơn vị cung cấp dịch vụ để định danh ở mức độ phân tử dựa vào trình tự gene rDNA. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng công cụ online NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

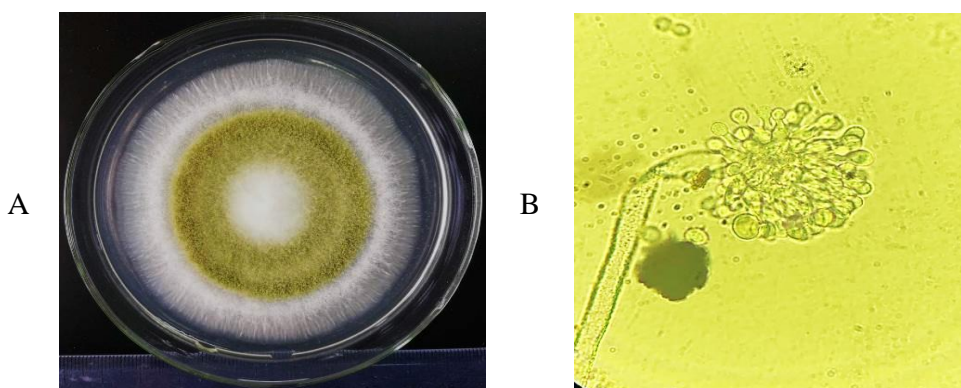
Nấm sau khi định danh bằng sinh học phân tử được bảo quản trên môi trường PDA trong điều kiện 5°C cho các thí nghiệm và bảo quản dưới dạng giấy bột bào tử trong điều kiện -8°C để sử dụng lâu dài.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm hình thái nấm mốc *Aspergillus* sp. phân lập được

Nấm *Aspergillus* sp. phân lập được trên môi trường PDA (hình 1A, B) có tản nấm màu trắng xốp, tốc độ sinh trưởng nhanh, sau 4 - 5 ngày phủ kín đĩa nuôi cấy petri đường kính 90 mm. Sợi nấm màu trắng, đa bào, mọc đan xen như mạng lưới, phát triển nhanh. Tản nấm có tâm lõi, rìa mép tản nấm thấp, bên ngoài rìa mép là lớp nấm trắng mịn bao phủ. Ở giữa tâm hướng về phía mép đĩa là bào tử màu xanh vàng đậm trên môi trường nuôi cấy PDA, ở dưới mặt đĩa cấy môi trường PDA không có màu (không sinh sắc tố trên môi trường nuôi cấy).

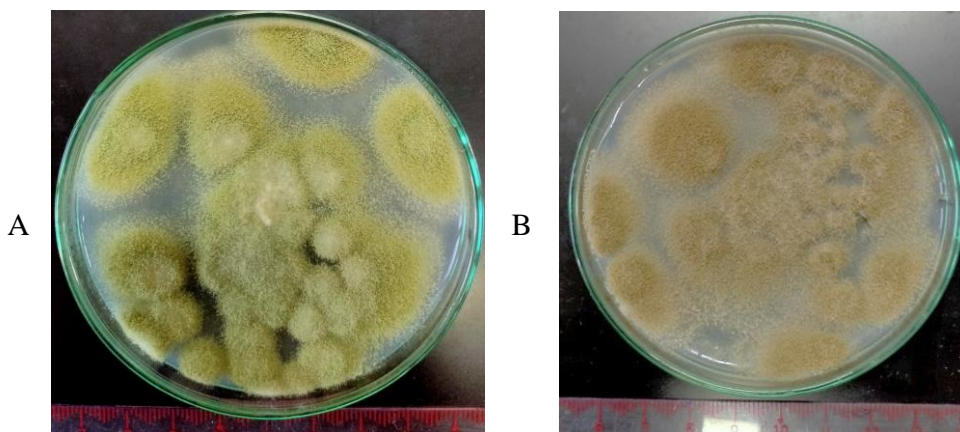
Bào tử xuất hiện từng vòng đồng tâm trên đĩa nấm, phát triển từ trong ra ngoài. Bào tử có màu vàng xanh, hình thành nhiều trên bề mặt tản nấm (hình 1A, 2A) ở giai đoạn đầu (4 - 7 ngày sau cấy) và dần chuyển thành màu vàng nâu nhạt sau 20 ngày cấy (hình 2B).



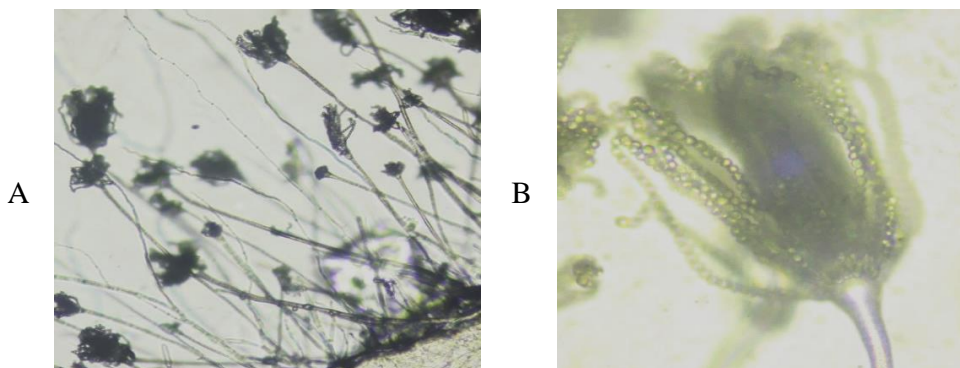
Hình 1. Đặc điểm hình thái nấm *Aspergillus* sp. phân lập được. Hình thái tản nấm *Aspergillus* sp. trên môi trường PDA sau 4 ngày cấy ở nhiệt độ 32°C (A). Cành bào tử và bào tử phân sinh nấm mốc *Aspergillus* sp. trên môi trường PDA dưới kính hiển vi quang học (B)

Cành sinh bào tử (bào đài) (conidiophores) không màu, bề mặt có gai mịn, có chiều dài phổ biến trên 2 mm, đường kính 20 - 25 μm (hình 3A), đây là đặc điểm quan trọng giúp phân biệt bằng quan sát hình thái của nấm *Aspergillus oryzae* với nấm *Aspergillus flavus* [1]. Bào tử (conidia) mang đặc trưng của nấm *Aspergillus* sp., có hình cầu, kích thước 5 - 7 μm , màu nâu sáng, không có gai, đơn bào, mọc trên các thể bình xung quanh bong vesicle (hình 1B, 3B). Bong vesicle có hình cầu, có đường kính từ 15,8 - 19,2 μm , là nơi gắn các

thể bình (sterigma) tỏa tia khi non và xé rách thành những dây tua với chuỗi bào tử hình cầu rất dài khi già. Thể bình có một tầng chủ yếu có hình chai, có kích thước (8 -12) x (4,5 - 5) μm (hình 3). Như vậy, những đặc điểm về kiểu hình của nấm phân lập được tương đồng với kiểu hình của loài nấm *Aspergillus oryzae* [1][7].



Hình 2. Đặc điểm tản nấm *Aspergillus* sp. trên môi trường PDA sau 6 ngày (A) và 21 ngày cấy (B)



Hình 3. Bộ phận sinh bào tử của nấm *Aspergillus* sp. Đỉnh bào dài mọc từ tế bào chân (conidiophores) môi trường nuôi cấy PDA (A). Chuỗi bào tử nấm *Aspergillus* sp. quan sát dưới kính hiển vi quang học (40X) (B)

3.2. Kết quả định danh loài nấm *Aspergillus* sp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử

A Kết quả giải trình tự (chiều 5'-3') gen 16S rRNA của loài nấm phân lập, (554 bp)

```

ACATGATCCGAGGTCACCTGGAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGC
CGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGG
TGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAA
CACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCC
GGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTC
TGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCATCGATGCCGGAACC
AAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACT
TCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGCCCGGGGCT
GAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACA
GTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGG
TAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

```

B. Kết quả Blast Nucleotide trên ngân hàng gen NCBI**Aspergillus oryzae NRRL 447 ITS region; from TYPE material**Sequence ID: [NR_135395.1](#) Length: 616 Number of Matches: 1Range 1: 1 to 536 [GenBank](#) [Graphics](#)▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
972 bits(526)	0.0	533/536(99%)	2/536(0%)	Plus/Minus
Query 12	TACATGATCCGAGGTCA - CCTGG - AAAAGATTGATTTGCGTTCCGGCAAGCGCCGGCCGGG	69		
Sbjct 536	TACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCCGGCAAGCGCCGGCCGGG	477		
Query 70	CCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGC	129		
Sbjct 476	CCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGC	417		
Query 130	CTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGAT	189		
Sbjct 416	CTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGAT	357		
Query 190	GGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGT	249		
Sbjct 356	GGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGT	297		
Query 250	TCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTTCGCTGCG	309		
Sbjct 296	TCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTTCGCTGCG	237		
Query 310	TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCGATAC	369		
Sbjct 236	TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCGATAC	177		
Query 370	AATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCC	429		
Sbjct 176	AATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCC	117		
Query 430	CGGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAG	489		
Sbjct 116	CGGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAG	57		
Query 490	TAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCTTACACTCGGTAATGATCCTT	545		
Sbjct 56	TAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCTTACACTCGGTAATGATCCTT	1		

Hình 4. Định danh nấm phân lập bằng phương pháp giải trình tự gen. (A) Trình tự gen thuộc phân vùng ITS của loài nấm *Aspergillus* sp. phân lập; (B) Trình tự gen thuộc phân vùng ITS được đối chiếu so sánh với ngân hàng gen ITS của NCBI sử dụng công cụ BLAST Nucleotide

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS4 [2] [4] đã khuếch đại được đoạn DNA có kích thước khoảng 554 bp của nấm *Aspergillus* sp. (hình 4A). Gen mã hóa được giải trình tự và so sánh với dữ liệu trình tự phân vùng gen ITS trên ngân hàng gen NCBI sử dụng công cụ BLAST nucleotide (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Kết quả blast trên ngân hàng NCBI cho thấy, loài nấm phân lập được thuộc loài nấm *Aspergillus oryzae* với mức tương đồng đạt 99,44%.

4. KẾT LUẬN

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái và kết quả định danh loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử đều khẳng định loài nấm phân lập được tương đồng với loài nấm *Aspergillus oryzae*. Kết quả này phù hợp với nguồn gốc loài nấm *Aspergillus* sp. được công bố trong men vi sinh Tane Koji (Công ty Bio'c, Nhật Bản) sử dụng trong phân lập, làm thuần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Charles Thom, Margaret B. Church (1921), *Aspergillus flavus*, *A. oryzae* and associated species. American Journal of Botany, Feb., 8(2):103-126.

- [2] Daniel K. Manter and Jorge M. Vivanco (2007), *Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis*, Journal of Microbiological Methods, (71):7-14, Doi:10.1016/j.mimet.2007.06.016.
- [3] Elkhateeb, W.A., (2005), *Some mycological, phytopathological and physiological studies on mycobiota of selected newly reclaimed soils in Assiut Governorate, Egypt* (M. Sc. Thesis, Faculty of Science, Assuit University, Egypt).
- [4] Hinrikson H.P, Hurst S.F, Morrison C.J (2005), *Molecular methods for the identification of Aspergillus species*. Medical Mycology Supplement 1, (43):129-137.
- [5] Machida M (2002), *Progress of Aspergillus oryzae genomics*, Adv Appl Microbiol (51):81-106.
- [6] Moubasher AH (1993), *Soil fungi in Qatar and other Arab countries*, The Scientific And Applied Research Centre University of Qatar, Doha.
- [7] Yoshio Otani (1939), *Some relations between morphology and physiology of Aspergillus oryzae*, The zymomycological Institute, the imperial college of agriculture, Tottori, Japan, 15(3):33-36.
- [8] Watarai N, Yamamoto N, Sawada K, Yamada T (2019), *Evolution of Aspergillus oryzae before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis*, DNA Res, 26(6):465-472.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE FUNGUS *ASPERGILLUS ORYZAE* USED IN FERMENTED RICE MILK PRODUCTION

Mai Thanh Luan, Nguyen Thi Mai, Nguyen Thi Mai Anh, Pham Phuong Anh

ABSTRACT

Aspergillus oryzae is a fungus widely used in food industry for manufacturing fermented foods due to health beneficial properties and safety. Isolation and identification of *A. oryzae* plays an important role in making microbial inoculants for fermentation processes. The characterization of the isolated fungus was carried out through morphological observations and the amplification and sequencing of DNA fragments (ITS regions), achieving the identification of *Aspergillus oryzae*.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, fermentation food, fungus identification.

* Ngày nộp bài: 29/6/2024; Ngày gửi phản biện: 6/7/2024; Ngày duyệt đăng: 4/10/2024