

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA CAO DỊCH CHIẾT CỦ GỪNG (*Zingiber officinale* L.) ĐẾN NẤM MỐC *Aspergillus* sp. PHÂN LẬP TỪ BÁNH MOCHI KHOAI LANG TÍM

Nguyễn Trung Trục^{1*}, Đặng Phi Yến¹, Quách Văn Cao Thi¹

¹Khoa Sinh hóa - Thực phẩm, Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

*Email: trucnt@vlute.edu.vn

TÓM TẮT

Mochi khoai lang tím là sản phẩm kết hợp giữa bánh gạo nếp và khoai lang tím có giá trị dinh dưỡng và hàm lượng ẩm cao. Tuy nhiên, đặc điểm của sản phẩm là có hàm lượng ẩm lớn và cấu trúc mềm dẻo, đây chính là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các vi sinh vật gây hư hỏng, đặc biệt là nấm mốc. Do đó, việc tìm kiếm các giải pháp bảo quản an toàn và hiệu quả từ nguồn gốc tự nhiên đang là hướng đi được quan tâm. Nghiên cứu này nhằm bước đầu thử nghiệm khả năng ức chế của cao chiết gừng đối với nấm mốc phân lập từ bánh mochi khoai lang tím. Kết quả, đã phân lập và giải trình tự cho thấy, dòng nấm mốc gây hư hỏng cho sản phẩm ở điều kiện nhiệt độ môi trường tương đồng 97,26% với loài *Aspergillus niger* chủng WM 10.75 (OR195800.1) trên ngân hàng gen. Sau 168 giờ nuôi cấy, hoạt tính ức chế sợi nấm của cao chiết củ gừng đối với chủng nấm trong nghiên cứu là 1.000 µg/mL. Đồng thời, sau 48 giờ nuôi cấy, hoạt tính ức chế bào tử được xác định là 4 mg/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết củ gừng có tiềm năng ứng dụng cao trong việc ức chế sự phát triển của nấm mốc *A. niger* trong điều kiện *in vitro*.

Từ khoá: *Aspergillus niger*, cao chiết củ gừng, hoạt tính kháng nấm, mochi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mochi là sản phẩm bánh gạo nếp được tiêu dùng nhiều ở các quốc gia và vùng lãnh thổ như: Đài Loan, Trung Quốc và Nhật Bản [1]. Đây là sản phẩm bánh ngọt, mềm và có tính chất đàn hồi với độ dính nhẹ do độ ẩm cao và hàm lượng gạo nếp cao [1]. Khoai lang tím (KLT) được bổ sung vào trong thành phần bánh mochi giúp tăng giá trị dinh dưỡng, màu sắc và hương vị sản phẩm. Với hàm lượng dinh dưỡng cao, độ ẩm khoảng 62,2% và pH gần như trung tính [2], mochi KLT có thể được xem là môi trường tốt cho sự phát triển của vi sinh vật. Phương pháp điển hình để chế biến bánh mochi thường là hấp hỗn hợp nguyên liệu, nếu bảo quản ở điều kiện nhiệt độ lạnh dẫn đến thành phần tinh bột bị thoái hóa [3], tốc độ thoái hóa đạt mức tối đa ở khoảng 5°C [4]. Do đó, bánh mochi thường không được bảo quản trong điều kiện lạnh [5]. Tuy nhiên, việc bảo quản bánh mochi ở nhiệt độ phòng thường dẫn đến sự phát triển nhanh

chóng của các chủng vi sinh vật, bao gồm cả các chủng nấm mốc [6, 7].

Gừng (*Zingiber officinale* L.) là một trong những loại cây thảo được phổ biến nhất thuộc họ Zingiberaceae [8] và được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chứng nhận là an toàn cho mục đích sử dụng (GRAS) [9]. Trong thành phần dịch chiết của củ gừng đã được báo cáo có chứa các thành phần có hoạt tính sinh học bao gồm: Monoterpenoid, sesquiterpenoid, hợp chất phenolic và các dẫn xuất như: Aldehyde, ketone, rượu, este, có phổ kháng khuẩn rộng, chống lại sự phát triển của vi sinh vật [10]. Một số nghiên cứu chứng minh cao dịch chiết từ củ gừng thể hiện khả năng kháng mạnh đối với các chủng nấm mốc như: *Penicillium digitatum* [11], *Aspergillus niger* [12], *A. flavus* [13] và *Rhizopus stolonifer* [14].

Tuy nhiên, ứng dụng của gừng trong việc ngăn cản sự phát triển của nấm mốc trong sản

phẩm bánh, đặc biệt là bánh mochi chưa được nghiên cứu. Do đó, nghiên cứu ứng dụng khả năng kháng nấm của cao dịch chiết gừng trên bánh mochi KLT được thực hiện. Nghiên cứu giúp cung cấp một cái nhìn tổng quan về tiềm năng ứng dụng cao dịch chiết củ gừng như một chất kháng vi sinh vật trong các sản phẩm thực phẩm, giúp gia tăng giá trị cảm quan và kéo dài thời gian bảo quản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp phân lập nấm mốc trên bánh mochi KLT

Quy trình chế biến bánh mochi KLT được thực hiện theo Ren và cs (2020) [15] với một số điều chỉnh. KLT sau khi được hấp chín và nghiền mịn, tiến hành phối trộn với tinh bột gạo nếp với tỷ lệ 35% (w/w) so với KLT, điều chỉnh hàm lượng ẩm đến 55% (w/w) và bổ sung đường với tỷ lệ 42%. Nguyên liệu sau khi phối trộn được hấp ở 100°C với thời gian 30 phút. Sau khi chín tiến hành định hình sản phẩm và bảo quản ở 25°C (Hình 1).



Hình 1. Bánh mochi KLT thành phẩm

Phương pháp phân lập nấm mốc: Bánh mochi thành phẩm bảo quản ở 25°C cho đến khi hư hỏng (bắt đầu xuất hiện những vết do nấm mốc phát triển). Nấm mốc được phân lập dựa theo quy trình của Araújo và cs (2001) [16], có chỉnh sửa và bổ sung: Dùng dao cắt những mẫu bánh có kích thước 5 × 5 mm chứa nấm mốc đặt lên trung tâm đĩa petri đã chuẩn bị sẵn môi trường Potato Dextrose Agar (PDA, Himedia, Ấn Độ). Khuẩn ty nấm được nuôi cấy trong bóng tối trên môi trường PDA, nhiệt độ 30 ± 2°C. Sau khi phân lập, các mẫu nấm được quan sát bằng mắt thường và kính hiển vi về hình dạng tản nấm, hình dạng khuẩn ty, màu sắc khuẩn ty, màu sắc bào tử, hình dạng bào tử để tiến hành nhận diện sơ bộ. Sau đó tiến hành cấy tách riêng và làm thuần chủng nấm.

2.2. Phương pháp định danh nấm mốc bằng kỹ thuật PCR

Phương pháp tách chiết ADN tổng số: Đĩa nấm thuần được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 30 ± 2°C. Sau đó, tiến hành trích ADN theo phương pháp của White và cs (1990) [17]. Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp primer ITS1 và ITS4, trình tự của ITS1 (mũi xuôi): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 (mũi ngược): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' [17]. Sản phẩm PCR sẽ được gửi giải trình tự ở Công ty Macrogen (Hàn Quốc), kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA đem so sánh với các trình tự trong ngân hàng dữ liệu gen của National Center for Biotechnology Information (NCBI) bằng công cụ BLASTn.

2.3. Phương pháp trích ly cao chiết củ gừng

Gừng (*Zingiber officinale* L.) sử dụng trong các thí nghiệm được thu mẫu tại phường Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long (nay là xã Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long). Gừng được thu hoạch khi cây bắt đầu vàng lá, héo rụng. Nguyên liệu tươi sau khi thu hái được loại bỏ những củ bị hư hại do côn trùng hoặc sinh vật gây hại, bị thối rữa và dập nát.

Phương pháp điều chế cao chiết ethanol được thực hiện theo Basri và Fan (2005) [18] với một số điều chỉnh. Gừng tươi sau khi thu hái được rửa sạch, gọt vỏ, thái lát mỏng đều (độ dày khoảng 2 – 3 mm), sau đó để ráo tự nhiên, tiến hành sấy bằng không khí nóng ở 50°C đến khối lượng không đổi. Mẫu gừng khô được nghiền nhỏ và tiến hành ngâm chiết với dung môi ethanol 99,7% theo tỷ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10 (w/v) trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó lọc lấy dịch lọc. Bã đem ngâm lại với dung môi, lặp lại 3 lần cho đến khi dịch lọc trong, mỗi lần trong 24 giờ. Dịch lọc sẽ được loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 45°C, tốc độ quay 100 rpm. Cao chiết thu được sẽ được bảo quản ở nhiệt độ - 4°C.

2.4. Phương pháp xác định hiệu quả ức chế của cao dịch chiết củ gừng đối với nấm mốc gây hư hỏng bánh mochi

Khả năng ức chế sợi nấm của cao dịch chiết được đánh giá bằng phương pháp ức chế sợi nấm và bào tử được thực hiện theo Tyagi và Malik (2010) [19].

Phương pháp ức chế sợi nấm: Tiệt trùng môi trường PDA, khi chai môi trường đạt nhiệt độ khoảng 55 - 60°C thì đưa cao dịch chiết gừng đã pha loãng theo dãy nồng độ lần lượt là: 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100 µg/mL và mẫu đối chứng (không bổ sung cao dịch chiết) được chuyển vào các đĩa petri. Phơi khô đĩa dưới đèn UV. Sử dụng cork borer có đường kính 6 mm cắt một khối nấm trên đĩa nấm, sau đó cấy lên đĩa môi trường vừa chuẩn. Ủ mẫu ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 24 giờ, quan sát, đo đường kính của tản nấm theo từng ngày và ghi nhận kết quả. Khi đường kính của tản nấm ở mẫu đối chứng không còn phát triển thì kết thúc thí nghiệm. Hoạt tính kháng nấm (HTKN) của cao chiết củ gừng (%) được tính theo công thức của Tyagi và Malik (2010) [19]:

$$HTKN(\%) = \frac{R - r}{R} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: R là đường kính nấm phát triển ở mẫu đối chứng (cm), r là đường kính nấm ở mẫu cao dịch chiết (cm).

Phương pháp ức chế bào tử nấm: Bào tử nấm được thu nhận từ đĩa nuôi cấy thuần bằng cách nhỏ 2 mL nước cất vô trùng vào bề mặt thạch, cạo nhẹ bằng que cấy để thu dịch huyền phù bào tử, sau đó lọc qua gạc vô trùng để loại bỏ mảnh sợi nấm. Một số bào tử trong dịch huyền phù được xác định bằng buồng đếm hồng cầu (hemocytometer) và điều chỉnh về nồng độ 10^6 CFU/mL bằng cách pha loãng với nước cất vô trùng. Tiếp theo, sử dụng micropipet hút 100 µL từ eppendorf cho vào đĩa có chứa môi trường đã bổ sung cao chiết ở các nồng độ lần lượt là: 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL và mẫu đối chứng (không bổ sung dịch chiết). Dùng que cấy trang, trang đều mặt đĩa cho đến khi khô. Ủ mẫu ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 24 giờ và so sánh khác biệt sự phát triển của bào tử ở những nồng độ khác nhau.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các số liệu của thí nghiệm được ghi nhận, phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm Excel và Statgraphics 19, ở mức ý nghĩa 5% và kiểm định LSD. Độ tương đồng trình tự nấm phân lập được so sánh với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng chương trình BLASTn. Cây phả

hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega11 dựa trên thuật toán Neighbour-joining [20] với giá trị bootstrap là 1.000 lần lặp lại [21].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập nấm mốc trên bánh mochi KLT

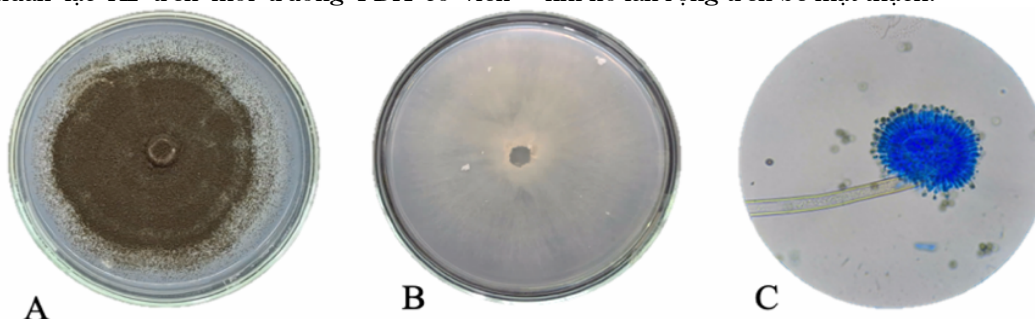
Ban đầu, trên bề mặt sản phẩm bánh mochi xuất hiện các đốm nhỏ màu trắng ngà hoặc xám nhạt (tơ nấm non). Sau 2 - 3 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), tơ nấm chuyển dần sang màu xám đậm, nâu sẫm, rồi màu đen đặc trưng khi nấm trưởng thành. Nấm mốc ban đầu mọc theo từng đốm tròn nhỏ, sau đó lan rộng ra tạo thành các mảng lớn, tạo thành lớp bề mặt mốc xù xì, bông xốp. Sản phẩm có mùi hôi đặc trưng và chua. Ở các khu vực bị mốc kèm theo sự xuất hiện của các vết ướt hoặc nhớt nhẹ. Khối bánh mochi KLT sau khi xuất hiện các dấu hiệu trên được đem đi phân lập. Kết quả phân lập được chủng nấm A1 và A2. Các chủng nấm phân lập được có các đặc điểm tương tự với chủng *Aspergillus* sp. về hình thái của sợi nấm và bào tử quan sát dưới kính hiển vi theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Huy Thuần và cs (2021) [22].

Sau 7 ngày nuôi cấy trên đĩa petri ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$, đường kính khuẩn ty nấm đạt kích thước từ 5 - 7 cm. Sợi nấm ngắn, thẳng và có màu đen, mọc sát vào môi trường thạch (Hình 2A). Đường kính khuẩn ty nấm phân lập từ môi trường có kích thước lớn hơn so với kết quả nghiên cứu của Akhtar và cs (2014) [23], sau 5 - 7 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng đạt kích thước là 4 - 5 cm. Theo Nguyễn Thu Mai và cs (2009) [24], sau 7 ngày nuôi cấy ở $27 - 32^\circ\text{C}$, đường kính khuẩn ty nấm đạt 4,4 - 5,8 cm.

Hình thái ban đầu của khuẩn ty nấm *Aspergillus* sp. trên môi trường PDA bông xốp và có màu trắng. Giai đoạn đầu này thể hiện sự phát triển tích cực của hệ sợi nấm. Tuy nhiên, khi nấm trưởng thành và bắt đầu sinh sản bào tử, khuẩn ty nấm nhanh chóng chuyển sang màu đen đặc trưng. Sự hóa đen này là do sản xuất các bào tử vô tính (conidia) có sắc tố tối màu, tạo thành một lớp dày đặc trên bề mặt hệ sợi [25]. Kết cấu của khuẩn ty nấm trưởng thành đặc và trở nên có dạng hạt, có

bột do số lượng lớn các cuống sinh bào tử (conidiophore) và bào tử mọc dày đặc. Các mép của khuẩn lạc A2 trên môi trường PDA có viền

màu vàng nhạt, vùng ngoại vi nhạt màu này cho thấy mặt trước của hệ sợi đang tích cực phát triển khi nó lan rộng trên bề mặt thạch.



Hình 2. Hình thái nấm chủng A2 sau 7 ngày phát triển trên thạch PDA

(A. Mặt trước; B. Mặt sau; C. Hình thái cuống sinh bào tử nấm dưới kính hiển vi ở vật kính 100X)

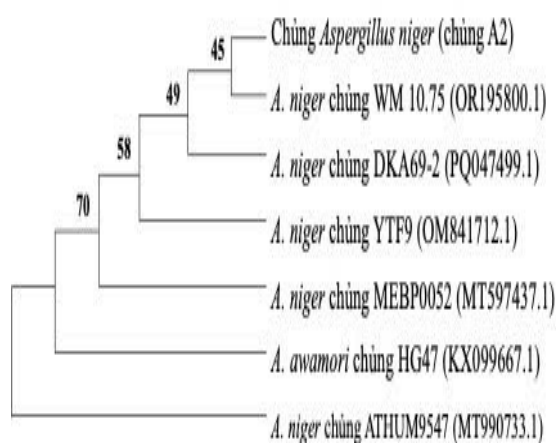
Khi quan sát mặt dưới của khuẩn lạc *Aspergillus* sp. phát triển trên môi trường PDA (Hình 2B), có màu vàng nhạt. Sắc tố này ở mặt dưới của khuẩn lạc là một đặc điểm dùng để phân biệt *Aspergillus* sp. với các loại nấm khác, do *Aspergillus* sp. có thể tạo ra các màu sắc khác nhau ở mặt dưới [26]. Ngoài ra, khi khuẩn ty nấm phát triển có thể quan sát thấy trên môi trường PDA có xuất hiện các vết nứt hoặc rãnh tỏa tròn trên môi trường thạch. Nguyên nhân có thể liên quan đến sự mất nước của thạch do quá trình trao đổi chất của nấm hoặc áp lực vật lý do hệ sợi đang phát triển gây ra [26].

Khi quan sát dưới kính hiển vi, các sợi nấm có vách ngăn, trong suốt. Các cuống sinh bào tử dài, thành nhẫn và trong suốt, trở nên sẫm màu hơn khi tiến gần đến đỉnh, ngay dưới túi bào tử (Hình 2C). Túi bào tử được bao phủ bởi hai lớp tế bào là tế bào trung gian và tế bào sinh bào tử. Các tế bào sinh bào tử tạo ra các chuỗi bào tử hình cầu, màu đen với bề mặt thô ráp, các bào tử tập hợp tạo thành chuỗi bào tử tỏa ra từ túi bào tử. Theo Li và cs (2007) [27], màu sắc đen của bào tử là do sự hiện diện của các sắc tố melanin trong thành tế bào bào tử. Các mô tả về loại nấm này phù hợp với mô tả về chủng *A. niger* được phân lập và mô tả theo kết quả nghiên cứu của Barwant và Lavhate (2020) [28], cho thấy các đầu bào tử lớn, màu nâu sẫm đến đen. Theo Akhtar và cs (2014) [23], bào tử phân lập từ *Aspergillus* sp. tạo thành chuỗi và chủ yếu có màu nâu đen hoặc đen. Đồng thời, kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thu Mai và cs (2009)

[24] cũng cho thấy, bào tử của chủng *A. niger* khi quan sát dưới kính hiển vi có hình gai và xù xì, bề mặt của bào tử phân lập không nhẫn mà có kết cấu thô ráp.

3.2. Kết quả định danh chủng nấm phân lập A2

Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rDNA trên NCBI cho thấy, chủng nấm phân lập A2 tương đồng 97,26% với chủng *Aspergillus niger* chủng WM 10.75 (OR195800.1), 97,26% với chủng *Aspergillus niger* chủng DKA69-2 (PQ047499.1) và 97,26% với chủng *Aspergillus niger* chủng YTF9 (OM841712.1). Kết quả xây dựng cây phả hệ cho thấy, chủng nấm phân lập A2 có mối quan hệ gần với chủng *Aspergillus niger* chủng WM 10.75 (OR195800.1) (Hình 3).



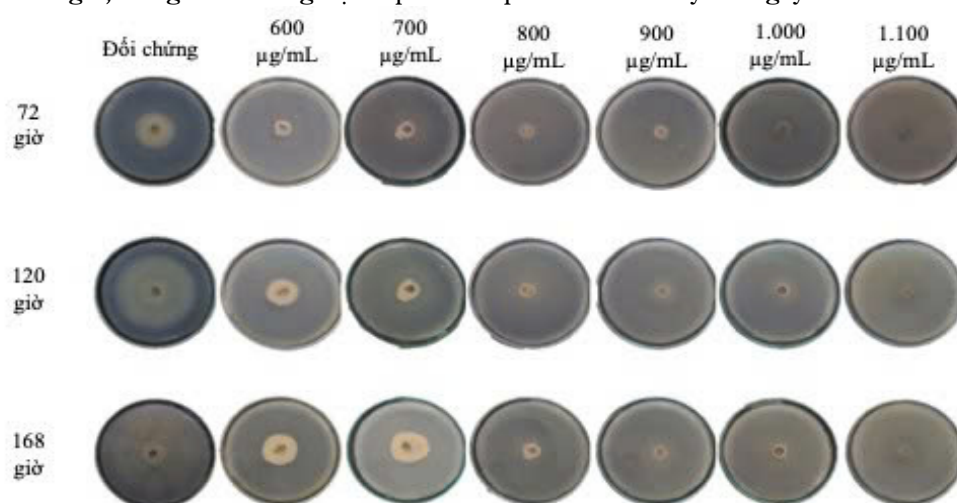
Hình 3. Cây phả hệ xác định loài và mối quan hệ phân loại của chủng nấm phân lập A2

3.3. Kết quả xác định hoạt tính kháng nấm của cao chiết củ gừng đối với sợi nấm

Quan sát thí nghiệm cho thấy, sau 168 giờ nuôi cấy, sợi nấm ở mẫu đối chứng đã phát triển mạnh, bao phủ toàn bộ bề mặt môi trường, chứng tỏ điều kiện nuôi cấy thuận lợi cho sự sinh trưởng của nấm mốc. Ngược lại, ở các mẫu có bổ sung cao chiết gừng, đường kính tán nấm giảm dần theo nồng độ cao chiết, thể hiện xu hướng ức chế rõ rệt. Đặc biệt, ở nồng độ 1.000 - 1.100 $\mu\text{g/mL}$, sự phát triển của nấm gần như bị kìm hãm hoàn toàn ngay cả sau 168 giờ, trong khi ở nồng độ thấp hơn

(600 – 800 $\mu\text{g/mL}$), tán nấm vẫn tăng trưởng nhưng tốc độ chậm so với mẫu đối chứng. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy, thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả ức chế.

Ở giai đoạn 72 giờ, sự khác biệt giữa các nồng độ chưa thể hiện rõ ràng. Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian nuôi cấy đến 120 và 168 giờ, xu hướng giảm tốc độ phát triển tán nấm theo nồng độ càng rõ rệt. Điều này chứng minh rằng, hiệu quả ức chế của cao chiết gừng không chỉ phụ thuộc vào liều lượng sử dụng mà còn duy trì ổn định trong suốt quá trình nuôi cấy dài ngày.



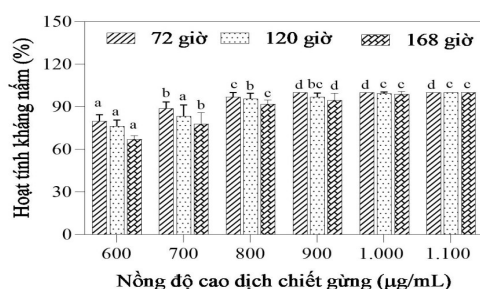
Hình 4. Đường kính tán nấm *A. niger* của cao dịch chiết gừng ở các nồng độ theo thời gian

HTKN của cao chiết củ gừng ở các nồng độ khác nhau đối với sự phát triển của sợi nấm *A. niger* ở các khoảng thời gian nuôi cấy được thể hiện ở hình 5. Đường kính khuẩn ty chủng nấm *Aspergillus niger* qua 168 giờ khảo sát đều có xu hướng tăng dần. Ở các nghiệm thức bổ sung cao dịch chiết gừng đều có khả năng ức sự phát triển của nấm *A. niger* và khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Kết quả cũng cho thấy, nghiệm thức xử lý cao dịch chiết với nồng độ càng cao thì HTKN càng cao. Tại cùng một thời gian, các đĩa chứa cao dịch chiết gừng với nồng độ 1.000 và 1.100 $\mu\text{g/mL}$ đều cho thấy khả năng kháng nấm tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$).

Ở thời điểm 72 giờ sau khi xử lý (GSKXL), cả 3 nghiệm thức 900, 1.000 và 1.100 $\mu\text{g/mL}$ đều có hiệu quả ức chế nấm *A. niger* là 100%. Trong khi đó, 3 nghiệm thức 600, 700 và 800 $\mu\text{g/mL}$ có

HTKN lần lượt là 80,1; 86,6; 95,0%. Ở thời điểm 120 GSKXL, đường kính khuẩn ty nấm ở tất cả các nghiệm thức xử lý đều có xu hướng tăng lên, đồng thời HTKN chủng nấm A2 ở các nghiệm xử lý đều có xu hướng giảm dần, trừ nghiệm thức 1.100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). Nghiệm thức 1.000 $\mu\text{g/mL}$ ở thời điểm 120 GSKXL có HTKN giảm xuống so với thời điểm 72 GSKXL và thấp hơn 0,6% so với nghiệm thức 1.100 $\mu\text{g/mL}$ ở cùng thời gian xử lý. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa 2 nghiệm thức này không có ý nghĩa thống kê. Do đó, ở thời điểm 120 GSKXL, cao chiết củ gừng bổ sung ở 2 nồng độ 1.000 và 1.100 $\mu\text{g/mL}$ đều có hiệu quả ức chế chủng nấm A2 cao nhất. Trong khi đó, nghiệm thức bổ sung cao chiết củ gừng ở nồng độ 600 $\mu\text{g/mL}$ là nghiệm thức có HTKN thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Ở thời điểm 168 GSKXL, đường kính khuẩn ty nấm mốc tiếp tục tăng và

HTKN cũng tiếp tục giảm dần. Nghiệm thức 600, 700, 800 và 900 $\mu\text{g/mL}$ có HTKN trung bình giảm 6,52% so với thời điểm 120 GSKXL và 10,47% so với thời điểm 72 GSKXL. Trong đó, nghiệm thức bổ sung cao chiết củ gừng ở nồng độ 600 $\mu\text{g/mL}$ có HTKN thấp nhất (65,83%), giảm 14,27% so với thời điểm 72 GSKXL. Hai nghiệm thức bổ sung cao chiết củ gừng với nồng độ 1.000 và 1.100 $\mu\text{g/mL}$ vẫn là hai nghiệm thức có HTKN cao nhất đối với sự phát triển của khuẩn ty chủng nấm A2.



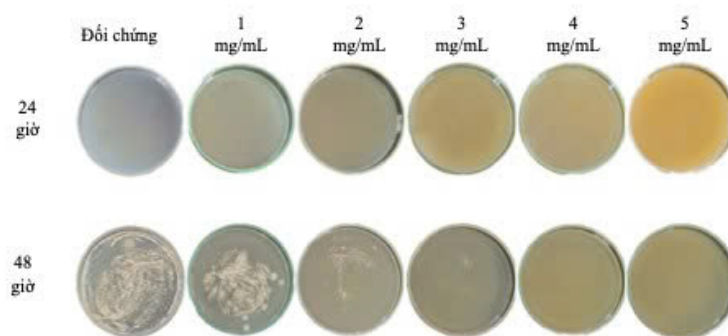
Hình 5. Hoạt tính kháng nấm (%) chủng nấm A2 sau 168 giờ quan sát của cao chiết củ gừng

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một nồng độ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử LSD. Số liệu trong hình là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại.

Kết quả nghiên cứu HTKN nấm *A. niger* của cao chiết củ gừng cho thấy, HTKN đạt cao nhất ở nồng độ 1.000 và 1.100 $\mu\text{g/mL}$ tại tất cả các thời điểm khảo sát ($p < 0,05$). Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Ficker và cs (2003) [29], theo đó các hợp chất có hoạt tính sinh học trong gừng ở nồng độ 1 mg/mL có khả năng chống lại sự phát triển của các chủng vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên, kết quả trên lại cao hơn kết quả nghiên cứu của Eldesouky và cs (2023) [30], ở nồng độ 800 $\mu\text{g/mL}$ hiệu quả ức chế nấm *Fusarium solani* đạt 83,33%. Trong khi đó, theo kết quả nghiên cứu của Xi và cs (2022) [31], cao chiết củ gừng với nồng độ 20 mg/mL mới ức chế hoàn toàn được sự phát triển của sợi nấm của *F. Solani*; Agrawal và cs (2018) [32] là 62,5 mg/mL mới đạt hiệu quả ức chế *Candida albicans*.

3.4. Kết quả xác định hoạt tính kháng bào tử nấm của cao chiết củ gừng

Hoạt tính kháng bào tử nấm *A. niger* của cao chiết củ gừng ở các nồng độ khác nhau được thể hiện ở hình 6. Kết quả cho thấy, sau 48 giờ quan sát, ở nồng độ 4 mg/mL cao dịch chiết gừng có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của bào tử nấm *A. niger*.



Hình 6. Sự phát triển bào tử nấm *A. niger* sau 24 và 48 giờ quan sát

Theo Ghosh và cs (2008) [33], các hợp chất tự nhiên được chiết xuất từ cao chiết thực vật đều có khả năng kháng khuẩn. Các hợp chất phenolic chủ yếu là gingerol, shogaol và paradol, tạo nên nhiều hoạt tính sinh học khác nhau của gừng [34]. Kết quả nghiên cứu của Ali và cs (2016) [35], đã xác định các thành phần trong gừng có hoạt tính sinh học như: α -pinene, 1,8-cineole và borneol, đều có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum gloeosporioides*. Đồng thời, kết

quả nghiên cứu của Beristain-Bauza và cs (2019) [36] cũng đã chứng minh các hợp chất terpene như: β -bisabolene, α -curcumene, zingiberene, α -farnesene, α -pinene, borneol, camphene và linalool trong gừng đều có đặc tính kháng khuẩn. Ngoài ra, các thành phần có chứa trong cao dịch chiết gừng như: 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol và 6-shogaol đã cho thấy hiệu quả trong việc ức chế sự hình thành màng sinh học và sợi nấm [37]. Các thành phần γ -terpinene và citral trong tinh dầu

gừng cũng cho thấy, hoạt tính kháng nấm đối với *A. flavus* [38]. Kết quả nghiên cứu của Aghazadeh và cs (2016) [39] cũng chỉ ra rằng, cao chiết gừng có khả năng kháng nấm và hình thành màng sinh học tốt bởi nấm đối với *C. albicans* và *C. krusei*. Tuy nhiên, do sự khác biệt về số lượng và thành phần nên đặc tính kháng nấm của cao dịch chiết không phải do một cơ chế cụ thể mà tác động bởi nhiều cơ chế khác nhau ở mức độ tế bào. Các thành phần có hoạt tính sinh học trong gừng có khả năng tác động đến vi nấm bằng cách gây chết tế bào hoặc ức chế enzyme liên quan đến sinh tổng hợp axit amino [40]. Theo Burt (2004) [40], điều này là do sự hiện diện của các hợp chất như: Terpenoid, alkaloid và polyphenol, những chất có thể tương tác với enzyme và protein của màng tế bào, dẫn đến sự phân tán của dòng proton ra ngoài tế bào. Ngoài ra, khả năng kỵ nước của các cao dịch chiết giúp chúng dễ dàng thâm nhập vào màng tế bào vi nấm và ty thể, gây rối loạn cấu trúc màng và thay đổi tính thấm, dẫn đến tế bào nấm bị tổn thương và chết [41]. Một số nghiên cứu cũng cho thấy, cao dịch chiết thực vật có thể ảnh hưởng đến hệ thống enzyme, gây ức chế hô hấp và dẫn đến sự suy thoái của tế bào [40]. Phá vỡ màng tế bào sợi nấm và gây bất hoạt enzyme liên quan đến quá trình tổng hợp thành tế bào hoặc trao đổi chất, đồng thời ức chế quá trình phân chia tế bào, làm chậm hoặc ngừng sự phát triển của sợi nấm [42].

HTKN của cao dịch chiết gừng càng tăng khi tăng nồng độ xử lý từ 600 lên 1.000 µg/mL đối với sợi nấm và từ 1 lên 4 mg/mL đối với bào tử nấm. Nguyên nhân là do, khi nồng độ cao dịch chiết tăng, hàm lượng các hợp chất ức chế sợi nấm như: Phenolic, alkaloid, hoặc các hợp chất bay hơi cũng tăng. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Rawai và Adhikari (2016) [43], theo đó vùng ức chế nấm *F. oxysporum* của cao dịch chiết gừng tăng từ 11 - 16,27 mm khi tăng nồng độ xử lý từ 250 lên 750 mg/mL. Đồng thời, kết quả nghiên cứu của Mahmoud và cs (2011) [44] cũng chỉ ra rằng, cao chiết lá neem ức chế khả năng gây bệnh của nấm *A. flavus*, *A. fumigatus* và *A. niger* tăng dần khi tăng nồng độ xử lý. Kết quả nghiên cứu của Sultana và cs (2008) [45] cho thấy, ở nồng độ 100 µg/mL thu nhận từ cây sầu đâu có khả năng

phá hủy màng tế bào nấm nhanh hơn so với nồng độ thấp.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 2 chủng nấm *Aspergillus* gây hư hỏng trên sản phẩm bánh mochi KLT. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA chủng nấm phân lập A2 tương đồng 97,26% với loài *Aspergillus niger* chủng WM 10.75 (OR195800.1). Hoạt tính kháng nấm của cao dịch chiết củ gừng đối với chủng nấm *A. niger* sau 168 giờ nuôi cấy là 1.000 µg/mL. Đồng thời, hoạt tính kháng bào tử của cao dịch chiết củ gừng đối với chủng nấm *A. niger* sau 48 giờ nuôi cấy là 4 mg/mL. Kết quả này khẳng định tiềm năng ứng dụng của cao chiết củ gừng trong việc kiểm soát sự phát triển của nấm mốc *A. niger* trên bánh mochi KTL trong điều kiện *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chuang, G. C. C. & Yeh, A. I. (2006). Rheological characteristics and texture attributes of glutinous rice cakes (mochi). *Journal of Food Engineering*, 74(3), 314 - 323.
2. Chuang, C. C. & Yeh, A. I. (2002). Effects of product temperature and moisture content on viscoelastic properties of glutinous rice extrudates. *Cereal Chemistry*, 79(1), 36 - 40.
3. Kang, H. J., Park, J. D., Lee, Y. Y. & Kum, J. S. (2013). Effect of grapefruit seed extracts and acid regulation agents on the qualities of Topokkidduk. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(6), 948 - 956.
4. Ying, J., Zhu, K., Qian, H. & Zhou, H. (2007). Staling of cake prepared from rice flour and sticky rice flour. *Food Chemistry*, 104(1), 53 - 58.
5. Wang, J., Park, J. H., Choi, N. J., Ha, S. D. & Oh, D. H. (2016). Microbiological analysis of rice cake processing in Korea. *Journal of Food protection*, 79(1), 157 - 162
6. Kim, J. H., Chung, H. J., Choi, S. H. & Eun, J. B. (2016). Effect of retort sterilization on microbial safety and quality characteristics of a rice cake, songpyeon. *Food Science and Biotechnology*, 25, 1047 - 1052.

7. Oyinloye, T. M. & Yoon, W. B. (2020). Effects of low-temperature drying with intermittent gaseous chlorine dioxide treatment on texture and shelf-life of rice cakes. *Processes*, 8(3), 1 - 18.
8. Mekuriya, W. & Mekibib, B. (2018). Review on the medicinal values of ginger for human and animal ailments. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 9(2), 9 - 12.
9. Bode, A. M. & Dong, Z. (2004). Ginger, in herbal and traditional medicine. CRC Press. 157 - 168.
10. Kumar, G., Karthik, L. & Rao, K. B. (2011). A review on pharmacological and phytochemical properties of *Zingiber officinale* Roscoe (*Zingiberaceae*). *Journal of Pharmacy Research*, 4(9), 2963 - 2966.
11. Jubair, A. F., Al-Haidery, A. A. & Al-Haidary, F. H. (2020). Effect of ginger and *Cinnamomum* extracts in protect orange fruits from infection *Penicillium digitatum* the pathogen of green mould disease. *Plant Archives*, 20(1), 886 - 890.
12. Al-Isawi, H. I. N. (2022). Effects of applying cold and hot aqueous extracts of ginger to control onion rot disease caused by *Aspergillus niger*. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 20(3), 611 - 616.
13. Tagoe, D., Baidoo, S. & Dadzie, I. (2009). A comparison of the antimicrobial (antifungal) properties of garlic, ginger and lime on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Cladosporium* herbarum using organic and water base extraction methods. *The Internet Journal of Tropical Medicine*, 7(1), 1 - 11.
14. Muhammad, A., Rahman, Z., Ayub, M., Durrani, Y., Ali, S., Tabassum, A., Shakoor, A., Khan, M. & Khan, A. (2014). Inhibitory effect of ginger and turmeric on *Rhizopus stolonifer* growth on bread. *Journal of Food Processing & Technology*, 5(5), 1 - 6.
15. Ren, B., Xie, H., Guo, L., Zhong, K., Huang, Y. & Gao, H. (2020). Effect of konjac glucomannan on sensory, physical and thermal properties of mochi. *International Journal of Food Engineering*, 16(3), 20190227.
16. Araújo, W. L., Maccheroni, W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O. & Azevedo, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(3), 229 - 236.
17. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, 18(1), 315 - 322.
18. Basri, D. F. & Fan, S. (2005). The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. *Indian journal of Pharmacology*, 37(1), 26 - 29.
19. Tyagi, A. K. & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: Microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC complementary and Alternative medicine*, 10, 1 - 11.
20. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and Evolution*, 4(4), 406 - 425.
21. Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar (2021). Mega11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and Evolution*, 38(7), 3022 - 3027.
22. Nguyễn Huy Thuần, Lê Thị Hạnh, Trần Đăng Khánh và Nguyễn Văn Giang (2021). Đặc điểm sinh học của một số chủng nấm mốc phân lập từ bánh men rượu Thanh Hoá. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(3), 322 - 330.
23. Akhtar, N., Shoaib, A. Munir, S. Ali, A. and Khurshid, S. (2014). Isolation, identification and enzyme production profile of *A. niger*. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(5), 1438 - 1443.
24. Nguyễn Thu Mai, Lâm Thị Việt Hà và Nguyễn Bảo Lộc (2009). Phân lập và định danh sơ bộ một số loài *Aspergillus* trên hạt đậu phộng ở chợ Xuân Khánh - thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 11(b), 301 - 309.

25. Oliver, R. P. (2024). Diseases caused by fungi, in Agrios' Plant Pathology. Elsevier, 339 - 427.
26. Ward, M., Wilson, L., Carmona, C. & Turner, G. (1988). The oliC3 gene of *Aspergillus niger*: Isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. *Current genetics*, 14, 37 - 42.
27. Li, D. W., Yang, C. S. & Harrington, F. (2007). Microscopic analytical methods for fungi. Sampling and analysis of indoor microorganisms. *CRC Press*, 75 - 103.
28. Barwant, M. & Lavhate, N. (2020). Isolation and maintenance of fungal pathogens *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 9(3), 47 - 52.
29. Ficker, C., Smith, M. Akpagana, K. Gbeassor, M. Zhang, J. Durst, J. Assabgui, R. & Arnason, J. (2003). Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytotherapy research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural product derivatives*, 17(8), 897 - 902.
30. Eldesouky, E., Abbas, E., Osmam, A. & Sitohy, M. (2023). Antioxidant and antifungal activity of ginger (*Zingiber officinale*) methanolic extract. *IJCBS*, 24, 482 - 488.
31. Xi, K. Y., Xiong, S. J., Li, G., Guo, C. Q., Zhou, J., Ma, J. W., Yin, J. L., Liu, Y. Q. & Zhu, Y. X. (2022). Antifungal activity of ginger rhizome extract against *Fusarium solani*. *Horticulturae*, 8(11), 1 - 15.
32. Agrawal, P., Kotagiri, D. & Kolluru, V. (2018). Comparative analysis of antimicrobial activity of herbal extracts against pathogenic microbes. *Advances in Biochemistry and Biotechnology*, 10, 2574 - 2578.
33. Ghosh, A., Das, B. K., Roy, A., Mandal, B. & Chandra, G. (2008). Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *Journal of Natural medicines*, 62, 259 - 262.
34. Stoner, G. D. (2013). Ginger: Is it ready for prime time? *Cancer Prevention Research (Phila)*, 6(4), 257 - 262.
35. Ali, A., Hei, G. K. & Keat, Y. W. (2016). Efficacy of ginger oil and extract combined with gum arabic on anthracnose and quality of papaya fruit during cold storage. *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1435 - 1444.
36. Beristain-Bauza, S. D. C., Hernández-Carranza, P., Cid-Pérez, T. S. Ávila-Sosa, R., Ruiz-López, I. I. & Ochoa-Velasco, C. E. (2019). Antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) and its application in food products. *Food Reviews International*, 35(5), 407 - 426.
37. Mao, Q. Q., Xu, X. Y., Cao, S. Y., Gan, R. Y., Corke, H., Beta, T. & Li, H. B. (2019). Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 8(6), 1 - 21.
38. Moon, Y. S., Lee, H. S. & Lee, S. E. (2018). Inhibitory effects of three monoterpenes from ginger essential oil on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and their gene regulation in aflatoxin biosynthesis. *Applied Biological Chemistry*, 61, 243 - 250.
39. Aghazadeh, M., Bialvaei, A. Z., Aghazadeh, M., Kabiri, F., Saliani, N., Yousefi, M., Eslami, H. & Kafil, H. S. (2016). Survey of the antibiofilm and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* (in vitro study). *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(2), e30167.
40. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food microbiology*, 94(3), 223 - 253.
41. Gill, A. & Holley, R. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food microbiology*, 108(1), 1 - 9.
42. Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M. & Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum,

Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8 - 9), 2227 - 2238.

43. Rawal, P. & Adhikari, R. S. (2016). Evaluation of antifungal activity of *Zingiber officinale* against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Advances in Applied Science Research*, 7(2), 5 - 9.

44. Mahmoud, D., Hassanein, N., Youssef, K. & Zeid, A. M. (2011). Antifungal activity of

different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1007 - 1016.

45. Sultana, B., Anwar, F. & Chatha, S. A. S. (2008). Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y aceites*, 59(3), 205 - 217.

ASSESSMENT OF THE ANTIFUNGAL EFFICACY OF GINGER RHIZOME (*Zingiber officinale* L.) EXTRACT ON *Aspergillus* sp. ISOLATES FROM PURPLE SWEET POTATO MOCHI

Nguyen Trung Truc¹, Dang Phi Yen¹, Quach Van Cao Thi¹

¹*Faculty of Biochemistry and Food technology,
Vinh Long University of Technology Education*

Abstract

Purple sweet potato mochi, a traditional product combining glutinous rice cake with purple sweet potato, is characterized by high nutritional value and elevated moisture content. However, its soft and elastic structure, together with high water activity, provides favorable conditions for microbial spoilage, particularly mold contamination. Developing safe and effective preservation strategies from natural sources has therefore become an important research focus. The present study aimed to evaluate the antifungal potential of ginger extract against mould isolated from spoiled purple sweet potato mochi. A spoilage mold strain was isolated and identified through sequencing, revealing 97.26% similarity to *Aspergillus niger* strain WM 10.75 (OR195800.1) in the GenBank database. In vitro antifungal assays were conducted to assess the inhibitory effects of ginger extract on both mycelial growth and spore germination of the isolate. The results demonstrated that ginger extract exhibited significant antifungal activity. Complete inhibition of mycelial growth was observed at a concentration of 1000 µg/mL after 168 hours of cultivation. Furthermore, spore germination was effectively inhibited at a concentration of 4 mg/mL after 48 hours of cultivation. Overall, these findings indicate that ginger extract possesses strong inhibitory activity against *A. niger* under in vitro conditions. This highlights its potential application as a natural antifungal agent for extending the shelf life and ensuring the fungal safety of purple sweet potato mochi.

Keywords: *Aspergillus niger*, ginger extract, antifungal activity, mochi.

Ngày nhận bài: 4/8/2025

Ngày chuyển phản biện: 12/8/2025

Ngày thông qua phản biện: 5/9/2025

Ngày duyệt đăng: 3/10/2025