

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM MỐC PHÂN LẬP TỪ BÁNH MEN RƯỢU THANH HOÁ

Nguyễn Huy Thuần¹, Lê Thị Hạnh², Trần Đăng Khánh³, Nguyễn Văn Giang^{2*}

¹Trung tâm Sinh học Y - Dược, Trường Y - Dược, Đại học Duy Tân

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Viện Di truyền Nông nghiệp

*Tác giả liên hệ: nvgiang@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 10.08.2020

TÓM TẮT

Thí nghiệm này được tiến hành với mục đích tìm được chủng vi nấm từ các mẫu bánh men rượu thu tại Nga Sơn và Hậu Lộc (Thanh Hoá) có khả năng đường hoá cao và sinh trưởng tốt trong điều kiện bình thường để tăng năng suất rượu, rút ngắn thời gian ủ trong quá trình sản xuất rượu. Nội dung nghiên cứu bao gồm phân lập các chủng nấm mốc từ men rượu cổ truyền, khảo sát khả năng sinh enzyme amylase, khảo sát khả năng đường hóa, đánh giá ảnh hưởng điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme amylase, định danh chủng nấm mốc phân lập được theo các phương pháp được mô tả bởi Xu-Cong & cs., 2012; Scheherazed & cs., 2016; Samson & Hoekstra, 2002. Kết quả của thí nghiệm đã phân lập được 17 chủng nấm mốc có khả năng thủy phân tinh bột, hoạt độ amylase từ 2,0 đến 4,5 U/ml. Trong số đó 2 chủng nấm mốc NS1.1 và HL2 tạo dịch rỉ đường nhanh và nhiều nhất trên khối nếp ủ. Hàm lượng đường trong dịch thu được từ khối ủ cơm rượu với chủng NS1.1 đạt 7,02 μ M, với chủng HL2 đạt 6,18 μ M. Nhiệt độ thích hợp cho các chủng nấm được tuyển chọn biểu hiện hoạt tính dao động từ 25-35°C, tốt nhất tại 30°C. Kết quả so sánh trình tự nucleotide 18S rRNA cho thấy chủng 1,1 có độ tương đồng 99% với chủng *Rhizopus oryzae* 150138 và được đặt tên là *Rhizopus oryzae* NS1.1.

Từ khoá: Bánh men rượu, enzyme amylase, quá trình đường hoá, nấm mốc, *Rhizopus* sp.

Characterization of Fungal Strains Isolated from Alcoholic Fermentation Starters of Nga Son, Thanh Hoa Province

ABSTRACT

This experiment was conducted to find the fungal strains with high saccharification activity isolated from the alcohol fermentation starters collected in Nga Son, Hau Loc district, Thanh Hoa province and growing well under normal conditions to increase the alcohol yield and decrease fermentation time in alcohol production. The contents of the study include the isolation of mold strains from traditional alcoholic fermentation starters, evaluation of amylase production, and saccharification of the isolated fungal strains using methods described by Xu-Cong & cs., (2012); Scheherazed & cs., (2016); Samson & Hoekstra (2002). Besides, the effects of cultural conditions on the saccharification of selected fungal strains were surveyed. Seventeen strains of fungi isolated from alcoholic fermentation starter samples produced amylase with activities from 2.0 to 4.5 U/ml. Among them, two mold strains NS1.1 and HL2 exhibited the highest saccharification when they grew on the block of sticky rice. The sugar content in the solution obtained from the fermented rice block of the NS 1.1 strain reached 7.02 μ M, 6.18 μ M with the HL2 strain. The appropriate temperature for the selected strains exhibited amylase activity ranging from 25°C-35°C, optimum at 30°C. The comparative result of the 18S rRNA nucleotide sequence showed that the strain NS 1.1 has 99% similarity to the one of *Rhizopus oryzae* strain 150138 and was named *Rhizopus oryzae* strain NS1.1.

Keywords: Alcoholic fermentation starter, amylase, saccharification, fungi, *Rhizopus* sp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, rượu là đồ uống truyền thống, được sử dụng thường xuyên trong cuộc sống. Sản xuất rượu truyền thống mang lại nguồn thu nhập đáng kể cho nông dân. Chúng ta có thể tìm thấy rất nhiều loại rượu truyền thống khác nhau như rượu nếp, rượu đế, rượu Nàng Vân, rượu Bàu đá, rượu Nga sơn, rượu cần, rượu cái.

Sản xuất rượu truyền thống thường được tiến hành trong điều kiện tự nhiên, không vô trùng, tại các hộ gia đình và sử dụng các loại bánh men rượu có nguồn gốc khác nhau. Để sản xuất rượu, cơm được ủ với men rượu ở nhiệt độ thường, khi kết thúc lên men (khoảng 3 ngày) trên bề mặt cơm, cơm rượu được trộn với nước và tiếp tục lên men chìm khoảng 6-8 ngày. Sau đó, toàn bộ sản phẩm của quá trình lên men được chưng cất để thu rượu. Nồng độ cồn trong các loại rượu gạo của Việt Nam thường thay đổi và có thể đạt tới 15 ml/100 ml khi chưng cất (Dung & cs., 2005).

Các thông tin về phương thức sản xuất bánh men, thành phần vi sinh vật của bánh men rất hạn chế. Bánh men được sản xuất từ bột gạo chưa được nấu, nước, các loại thảo dược và các chủng vi sinh vật. Bánh men được sản xuất thành những viên tròn hay dẹt, được ủ ở nhiệt độ khoảng 30°C trong khoảng 1 tuần. Trong thời kỳ này, cộng đồng vi sinh vật phát triển và các viên men mất nước. Các viên men có thể được bảo quản ở nhiệt độ thường, cộng đồng vi sinh vật vẫn duy trì khả năng sống sót trong ít nhất 6 tháng. Ba nhóm vi sinh vật chính trong bánh men rượu truyền thống là nấm mốc, nấm men và vi khuẩn (Dung & cs., 2006; 2007). Nấm mốc là sinh vật chính tổng hợp amylase thủy phân tinh bột thành đường, nấm men chuyển hoá đường thành rượu. Do đó, nấm mốc chính là tác nhân cần thiết để khởi đầu quá trình lên men thông qua phân giải tinh bột và chuyển hoá tinh bột thành đường (quá trình đường hoá). Chủng nấm mốc trong bánh men có hoạt lực chuyển hoá tinh bột mạnh, hàm lượng đường cung cấp cho nấm men nhiều, lượng rượu thu được sẽ cao. Thí nghiệm được triển khai với mục đích tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng đường hoá cao, góp phần cải thiện chất lượng bánh men rượu. Đồng

thời, một số thông số về pH, nhiệt độ môi trường nuôi cấy chủng nấm mốc được tuyển chọn cũng được khảo sát.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu bánh men khô được thu nhận tại: xã Nga Bạch; xã Nga Điền; xã Nga Thủy, huyện Nga Sơn và xã Cầu Lộc, huyện Hậu Lộc, tỉnh Thanh Hóa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập

Các mẫu bánh men được nghiền mịn, lấy 10g mẫu pha loãng trong 90ml nước muối sinh lý 0,85% và tiến hành pha loãng mẫu đến các nồng độ 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Hút 1ml dịch mẫu ở mỗi nồng độ pha loãng 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} cấy trang lên đĩa petri chứa môi trường thạch PDA (Potato Dextrose Agar). Các đĩa petri này được ủ ở 30°C trong 3 ngày. Chọn những khuẩn lạc nấm mốc mọc riêng, tiến hành cấy chuyển sang đĩa thạch PDA khác nhiều lần đến khi mẫu hoàn toàn thuần (Xu-Cong & cs., 2012). Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường thạch PDA ở nhiệt độ 30°C; sau 72 giờ, kích thước, màu sắc, hình dạng khuẩn lạc được quan sát và mô tả (Phan Thị Thanh Diễm & cs., 2018). Các chủng nấm mốc được cấy chuyển nhiều lần và sau khi thuần được nuôi trên môi trường thạch PDA (thành phần g/l: Potato extract 4g, Glucose 20g, Agar 15g pH $5,6 \pm 0,2$) và bảo quản trong tủ ở nhiệt độ -20°C.

2.2.2. Khảo sát hoạt tính enzyme amylase của các chủng vi nấm phân lập được

Tất cả các dòng nấm mốc thuần được nuôi trên môi trường tinh bột-agar. Môi trường chứa 0,5% tinh bột, 0,1% pepton và 1,5% agar. Cắt một mẫu nấm mốc đặt vào giữa đĩa môi trường tinh bột agar và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Hoạt tính phân giải tinh bột được xác định bằng cách nhỏ vào đĩa môi trường nuôi các chủng nấm thí nghiệm dung dịch Iod 0,25%. Sự phân giải tinh bột xảy ra khi không có sự nhuộm màu xanh điển hình giữa tinh bột và dung dịch Iod (Dung

& cs., 2006). Hoạt độ enzyme amylase của các chủng nấm mốc thí nghiệm được xác định theo phương pháp được mô tả bởi Xu-Cong & cs. (2012). Một đơn vị hoạt độ amylase được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol đường khử maltose trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm (Scheherazed & cs., 2016).

2.2.3. Tuyển chọn các chủng nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao

Trộn 50g gạo nếp cùng 60ml nước cất được chứa trong bình tam giác 250ml đậy nắp, ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 22°C. Sau đó, hấp khử trùng ở 100°C trong 1 giờ. Nếp sau khi hấp được để nguội đến 35-40°C, và trộn đều với 2ml dịch huyền phù bào tử nấm mốc, mật độ 10^6 bào tử/ml. Hỗn hợp được ủ trong 3 ngày ở điều kiện 30°C, quan sát khuẩn ty và lượng dịch rỉ đường tạo thành theo từng ngày. Sau 3 ngày, thu toàn bộ sản phẩm để phân tích.

Chuẩn bị huyền phù bào tử: nấm mốc đã thuần được nuôi trên môi trường PDA được ủ 4 ngày ở 30°C, bào tử nấm mốc được thu bằng cách làm ngập bề mặt thạch với nước cất vô trùng chứa 0,1% Tween 80 (Xu-Cong & cs., 2012). Dịch huyền phù được pha loãng với nước cất sao cho nồng độ cuối cùng đạt 10^6 bào tử/ml và dùng để cấy vào gạo nếp đã chuẩn bị để lên men.

Các chỉ tiêu theo dõi

pH: đo bằng máy đo pH. Độ Brix được đo bằng khúc xạ kế đo độ ngọt Atago Master-20M (0,0 ~ 20,0% Brix). Hàm lượng đường khử của các chủng nấm mốc khi nuôi trên môi trường xốp (Bernfeld, 1955) được xác định như sau: mỗi ống nghiệm chứa 0,5 ml lượng dịch được tạo ra, 0,5ml đệm PBS 0,1M pH 6,5; 1ml thuốc thử DNSA. Các ống nghiệm được ủ 10 phút, tại 100°C trong bể ổn nhiệt, sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung vào mỗi ống nghiệm 8ml nước cất. Ống đối chứng: nước cất. Đo giá trị OD_{540} của các ống thí nghiệm và so sánh với đo được với phương trình tương quan giữa giá trị OD_{540} với hàm lượng đường maltose ($Y_{OD} = 0,1236x + 0,0056$, hệ số tương quan $R^2 = 0,9954$). Tổng thể tích lượng đường khử được xác định bằng cách: Thu hoạch hết khối nếp ủ, ly tâm 7.000 vòng/phút trong 20 phút, thu hoạch lấy phần trong và đo thể tích.

2.2.4. Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng đường hóa

Nếp hấp đã cấy nấm mốc (chuẩn bị giống như tại mục 2.2.3) được ủ ở 30°C để đo hàm lượng đường theo ngày: 2, 3, 4 và 5 ngày sau ủ. Bố trí thí nghiệm tương tự, nhưng các mẫu thí nghiệm được ủ tại nhiệt độ 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C. Hàm lượng đường khử được xác định dựa vào đường chuẩn Maltose (như mục 2.2.3).

2.2.5. Định danh chủng nấm mốc được tuyển chọn

Các chủng nấm mốc tuyển chọn có khả năng đường hoá cao được nhận dạng dựa trên các đặc tính hình thái và sinh trưởng. Các chủng nấm mốc được phân loại dựa vào sự mô tả và khóa phân loại (Alexopoulos & cs., 1996; Samson & Hoekstra, 2002), kết hợp với so sánh trình tự nucleotide 18S rRNA của chủng nấm mốc được tuyển chọn với trình tự nucleotides trên ngân hàng gen NCBI. Cây phát sinh chủng loại được dựng bằng phần mềm BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có hoạt tính amylase cao

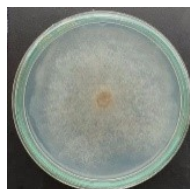
Từ các mẫu bánh men rượu thu được từ các địa điểm khác nhau thuộc huyện Nga Sơn, tỉnh Thanh Hóa, trên môi trường PDA, chúng tôi đã phân lập được 17 dòng nấm mốc khác nhau dựa trên các đặc điểm màu sắc tản nấm, hình thái sợi nấm, cuống mang bào tử (Hình 1). Các chủng nấm mốc được phân lập từ cùng một bánh men có thể có đặc điểm hình thái khác nhau, ngược lại một số chủng nấm mốc được phân lập từ các bánh men khác nhau lại có thể có đặc điểm tương đối giống nhau. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm & cs. (2006) đã kết luận về sự đa dạng của các chủng nấm mốc trong các bánh men rượu được thu thập từ các địa phương khác nhau. Lee & Fujio (1999) khi nghiên cứu hệ vi sinh vật trong bánh men rượu của Việt Nam đã phân lập được 20 chủng nấm mốc và 33 chủng nấm men. Nấm mốc được Lee & Fujio (1999) xác định chủ yếu thuộc loài *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Mucor circinilloides* và *Amylomyces*

rouxii. Nấm men được xác định thuộc *Saccharomyces cerevisiae*, *Hyphopichia burtonii*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala* và *Candida* sp. Từ 29 mẫu bánh men thu thập được từ vùng châu thổ sông Mê Kông, Dung & cs. (2007) đã phân lập được 53 chủng nấm mốc, trong đó các chủng *Amylomyces*

rouxii, *Rhizopus oligosporus* và *Rhizopus oryzae* biểu hiện hoạt tính mạnh nhất. Xu-Cong & cs. (2012) cũng đã tách được 43 chủng nấm mốc từ các bánh men để sản xuất rượu gạo. Kết quả này khẳng định mức độ đa dạng của các chủng nấm mốc trong bánh men của các địa phương khác nhau.



Chủng NS1.1
Hệ sợi phân nhánh, phát triển bao phủ bên ngoài cơ chất, tạo thành một lớp mốc trắng.



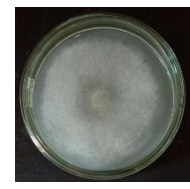
Chủng NS1.2.
Hệ sợi phát triển mạnh, có màu trắng, phân nhánh.



Chủng NS1.3.
Hệ sợi phát triển mạnh, có màu trắng, phân nhánh.



Chủng NS 1.4.
Hệ sợi phát triển nhanh, tạo thành lớp màng màu trắng bao phủ bên ngoài cơ chất.



Chủng NS1.5.
Hệ sợi rất phát triển sau 24h, có màu trắng, bông xốp.



Chủng NS1.6
Hệ sợi có màu trắng, hệ sợi bông xốp, phân nhánh.



Chủng NS1.7
Hệ sợi có màu trắng, thưa, mọc sát bề mặt môi trường.



Chủng HL1
Sau 24h nuôi cấy hệ sợi có màu trắng, bông xốp, phân nhánh.



Chủng HL2
Sau 24h nuôi cấy hệ sợi có màu trắng ngà, phân nhánh, bông xốp.



Chủng HL3
Sau 24h nuôi cấy, hệ sợi phát triển mạnh, có màu trắng.



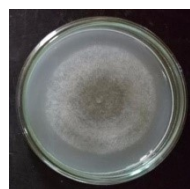
Chủng HL4
Hệ sợi mọc thưa và có màu trắng.



Chủng HL5
Hệ sợi có màu xám.



Chủng NS4.1
Hệ sợi bông xốp, có màu trắng, phân nhánh.



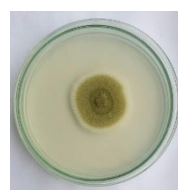
Chủng NS4.2
Hệ sợi có màu trắng, bông xốp.



Chủng NS4.3
Hệ sợi mảnh và có màu trắng mọc sát bề mặt môi trường.



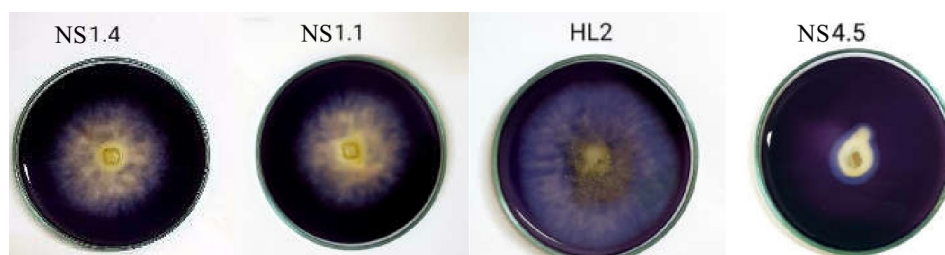
Chủng NS4.4. Hệ sợi có màu xám, mọc sát bề mặt môi trường.



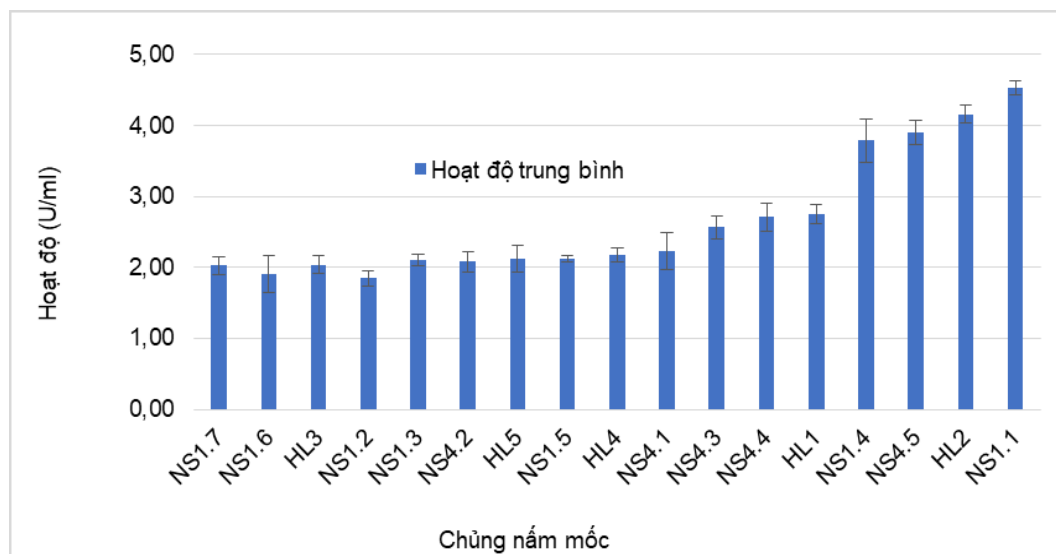
Chủng NS4.5 Hệ sợi mịn, có màu trắng, chuyển dần sang màu vàng hoa cau, sau chuyển sang màu xanh rêu đậm.

Hình 1. Kết quả phân lập các chủng nấm mốc từ bánh men rượu

Đặc điểm sinh học của một số chủng nấm mốc phân lập từ bánh men rượu Thanh Hoá



A



B

Hình 2. Khả năng phân giải tinh bột (A) và hoạt độ amylase (B) của các chủng nấm mốc mới phân lập

Tất cả 17 dòng nấm mốc đã phân lập từ các bánh men được khảo sát khả năng phân giải tinh bột trên môi trường tinh bột (Huỳnh Ngọc Thanh Tâm & cs, 2006).

Các chủng nấm mốc thí nghiệm tuy sinh trưởng và phát triển rất tốt, nhưng khả năng phân giải tinh bột của nhiều chủng không cao (Hình 2A), vùng phân giải tinh bột chỉ tập trung quanh điểm cấy mốc hoặc chỉ phân giải một lớp rất mỏng trên bề mặt.

Kết quả thí nghiệm xác định hoạt độ enzyme amylase (Hình 2B) cho thấy, hoạt độ amylase của các chủng này dao động trong khoảng từ 2,0 đến 4,5 U/ml; trong số đó hoạt độ amylase của các chủng NS1.4; NS1.1, HL2 và NS4.5 cao nhất và đạt lần lượt 3,79; 4,53; 4,16 và 3,90 U/ml, tuy nhiên vẫn rất thấp so với hoạt

độ amylase của các chủng vi nấm trong nghiên cứu của Xu-Cong & cs. (2012), của các chủng vi nấm lượng enzyme cần thiết thích hợp khác nhau để chúng biểu hiện hoạt tính

3.2. Tuyển chọn các chủng nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao

Bốn chủng nấm mốc có khả năng phân giải tinh bột cao nhất tiếp tục được khảo sát khả năng đường hóa. Các chủng nấm mốc này được cấy vào các bình tam giác chứa gạo nếp đã được hồ hoá và ủ ở 30°C trong 3 ngày. Khả năng đường hóa của 4 chủng nấm mốc được thể hiện tại bảng 1.

Sau 1 ngày ủ, hệ khuẩn ty nấm mốc đã xuất hiện trên khối nếp. Khuẩn ty phát triển tăng dần theo mức độ từ ít đến nhiều sau 3 ngày ủ,

lượng dịch rỉ đường xuất hiện chỉ sau 1 ngày ủ ở tất cả các bình và tăng dần theo thời gian ủ mốc. Sau 2 ngày ủ, khuẩn ty nấm mốc phát triển nhanh và ăn sâu vào cơ chất, dịch rỉ sánh và trong. Ngày thứ 3, lượng dịch rỉ đường sinh ra nhiều rõ rệt. Hạt gạo nếp sau ủ trở nên rất mềm. Giá trị pH của tất cả các bình đều giảm và ở trong khoảng từ 4,4-4,6. Kết quả này tương đương với kết quả được Huỳnh Ngọc Thanh Tâm & cs công bố năm 2006. Giá trị pH này chứng tỏ quá trình lên men khối gạo nếp ủ với nấm mốc diễn ra thành công, hạn chế được sự tạt nhiễm của các vi khuẩn gây chua, vì nếu nhiễm các vi khuẩn gây chua thì pH của khối ủ giảm đáng kể, chỉ đạt khoảng 3 (Huỳnh Ngọc Thanh Tâm & cs., 2006).

Hàm lượng maltose sinh ra và °Brix có mối tương quan thuận với nhau. Hàm lượng maltose và °Brix của chủng NS1.1 và chủng HL2 cao

nhất so với các chủng NS1.4 và chủng NS4.5. Thể tích dịch rỉ sinh ra từ khối nếp hấp được cấy nấm mốc chủng 4.5 có sự khác biệt và thấp nhất với 3 chủng nấm mốc còn lại.

Từ kết quả của các thí nghiệm trên, chủng nấm NS1.1 và HL2 có ý nghĩa trong quá trình đường hóa nên được tuyển chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme amylase của các chủng nấm mốc tuyển chọn

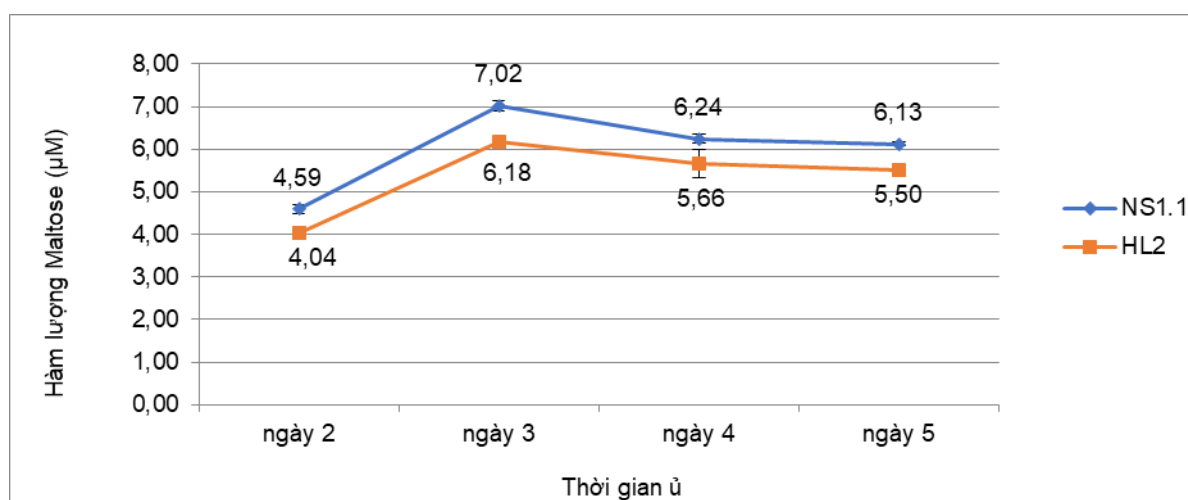
3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Các chủng nấm mốc được cấy và ủ ở 30°C trong 3 ngày trên khối gạo nếp sau khi hấp và làm nguội đến 30°C. Hàm lượng đường maltose của hai chủng nấm mốc NS1.1 và HL2 được xác định sau 2, 3, 4 và 5 ngày (Hình 3).

Bảng 1. Khả năng đường hóa của các chủng nấm mốc mới phân lập

Chủng nấm mốc	pH		Thời gian xuất hiện khuẩn ty (ngày)			Thời gian xuất hiện dịch rỉ (ngày)			Hàm lượng Maltose (µM)	Độ Brix (°Br)	Thể tích dịch rỉ (ml)
	Nếp trước ủ nấm mốc	Nếp sau ủ nấm mốc	1	2	3	1	2	3			
NS1.1	6,22 ± 0,01	4,47 ± 0,03	+	++	+++	+	++	+++	7,083	42,80	57,03
NS1.4	6,23 ± 0,01	4,65 ± 0,02	+	++	+++	+	++	+++	5,804	39,20	54,93
HL2	6,22 ± 0,01	4,41 ± 0,04	+	++	+++	+	++	+++	6,217	42,07	56,33
NS4.5	6,22 ± 0,01	4,66 ± 0,03	+	++	+++	+	++	+++	5,389	37,47	47,13

Ghi chú: Khuẩn ty, và dịch rỉ xuất hiện theo mức độ tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian ủ đến khả năng đường hoá của chủng NS1.1 và HL2

Từ ngày thứ hai dịch rỉ đường đã bắt đầu xuất hiện, khối nếp không còn độ keo như ban đầu, hệ sợi phát triển ăn sâu vào bên trong khối nếp. Hàm lượng đường trong dịch lên men bởi chủng nấm NS1.1 là $4,59\mu\text{M}$ cao hơn hàm lượng đường trong dịch của khối ủ nếp với chủng HL2 ($4,04\mu\text{M}$). Ngày thứ 3, hệ sợi nấm phát triển mạnh, dịch rỉ đường nhiều hơn, trong và sánh. Hàm lượng đường được tạo ra bởi các chủng NS1.1 và HL2 đều tăng, đạt lần lượt là $7,02\mu\text{M}$, $6,18\mu\text{M}$. Ngày thứ 4, hệ sợi phát triển mạnh, dịch rỉ nhiều hơn và bắt đầu chuyển sang màu vàng nhẹ, hàm lượng đường trong dịch của khối nếp ủ với hai chủng NS1.1 và HL2 giảm, tương ứng đạt là $6,24\mu\text{M}$ và $5,66\mu\text{M}$. Sang ngày thứ 5 lượng dịch nhiều và có màu vàng không còn trong như ở ngày thứ 2 và ngày thứ 3, hàm lượng đường giảm. Như vậy có thể kết luận thời gian ủ khối nếp với nấm mốc thích hợp nhất là 3 ngày, có khác với kết quả được công bố bởi Dung & cs. (2006)

3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng đường hóa

Ở nước ta, rượu được chưng cất thủ công và phải qua giai đoạn ủ cơm rượu với bánh men. Quá trình lên men trên cơ chất xốp này thường diễn ra ở điều kiện thường, kéo dài 2-3 ngày trong điều kiện hiếu khí. Sau đó, toàn bộ khối vật liệu này được trộn với nước và trải qua giai đoạn lên men chìm, khoảng 3-4 ngày (Dung, 2013). Thí nghiệm này được tiến hành với mục đích xác định được khoảng nhiệt độ thích hợp

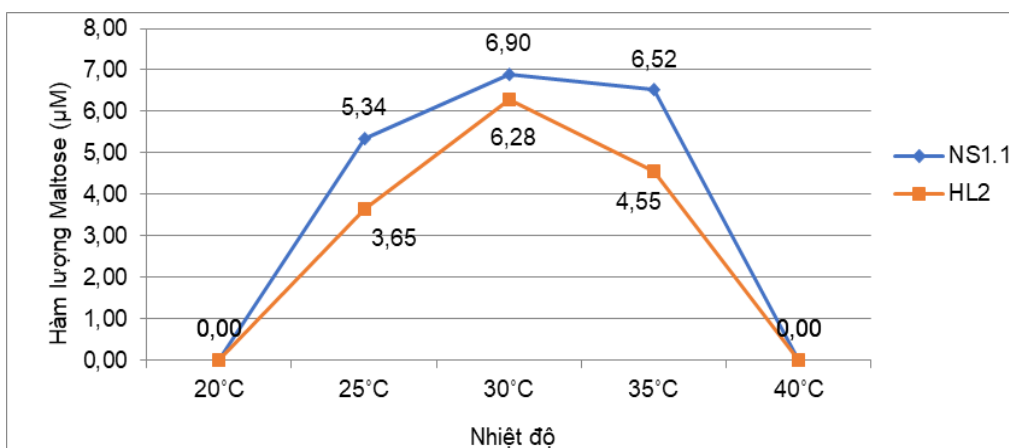
cho quá trình lên men xốp khi trộn nấm mốc với cơm rượu. Các chủng nấm mốc được cấy vào khối cơm rượu và ủ tại các nhiệt độ 20°C , 25°C , 30°C , 35°C , 40°C trong thời gian 3 ngày theo kết quả khảo sát ở thí nghiệm mục 3.4.1. Kiểm tra hàm lượng đường trong dịch của khối ủ cơm rượu với các chủng nấm mốc NS1.1 và HL2 ở các nhiệt độ này. Kết quả được thể hiện ở hình 4.

Tại ngưỡng nhiệt độ 20°C , nấm mốc vẫn phát triển, nhưng rất yếu và không tạo ra dịch rỉ đường, ở nhiệt độ 40°C cả hai chủng đều không phát triển, chứng tỏ ngưỡng 20°C và 40°C không phải là nhiệt độ thích hợp với hai chủng NS1.1 và HL2. Hai chủng này phát triển và tạo ra dịch rỉ đường trong khoảng từ 25°C đến 35°C , tốt nhất ở 30°C với hàm lượng đường trong dịch của khối nếp ủ với chủng NS1.1 đạt $6,91\mu\text{M}$, với chủng HL2 đạt $6,28\mu\text{M}$. Peng & cs. (2013) công bố khả năng đường hoá và phát triển của chủng *Rhizopus oryzae* ATCC2809 trong khoảng nhiệt độ từ $24-36^{\circ}\text{C}$ và tốt nhất từ $30-34^{\circ}\text{C}$.

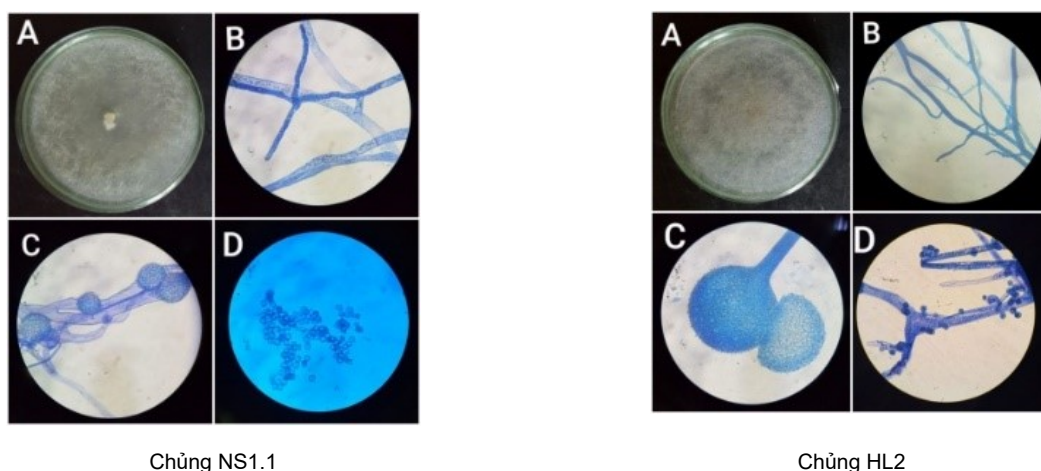
3.4. Đặc điểm hình thái, cuống sinh bào tử, bào tử của các chủng nấm mốc NS1.1 và HL2

3.4.1. Chủng NS1.1

Trên môi trường PDA, khuẩn lạc phát triển rất nhanh ở 30°C , hệ sợi có màu trắng, phân nhánh, bông xốp, cuống sinh bào tử dài, sợi nấm không có vách ngăn. Bọc bào tử có hình cầu, ban đầu có màu trắng, sau khi già có màu đen, phát triển bao phủ bên ngoài cơ chất, tạo thành một lớp mốc trắng, chứa nhiều nhân (đa nhân).

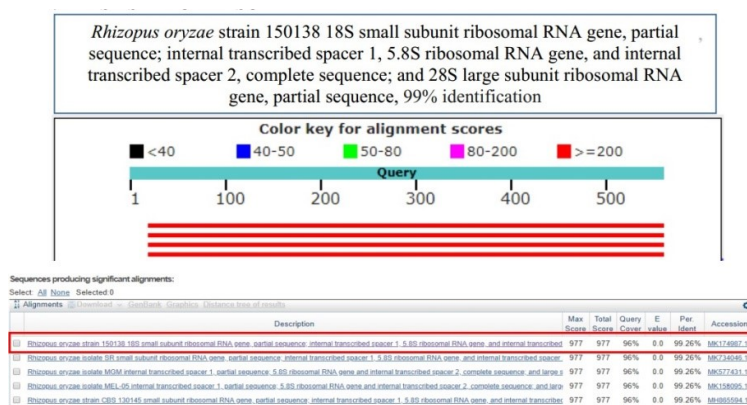


Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy tới khả năng đường hoá của chủng nấm 1.1 và HL2



Ghi chú: A. Khuẩn lạc; B. Sợi nấm; C. Cuống bào tử; D. Bào tử.

Hình 5. Đặc điểm hình thái, khuẩn lạc và bào tử của chủng NS1.1 và HL2



Hình 6. Kết quả tìm kiếm trên công cụ BLAST

3.4.2. Chủng HL2

Trên môi trường PDA, khuẩn lạc phát triển rất nhanh tại 30°C. Khuẩn lạc tròn, sợi nấm mọc tỏa tròn, dài, bông xốp, ban đầu hệ sợi có màu trắng, sau già chuyển dần thành màu trắng ngà. Có rễ giả, cuống bào tử dài, sợi không có vách ngăn, mọc đơn lẻ hay thành từng chùm từ thân bò. Bào tử giả, cuống bào tử dài, hình ovan.

Các đặc điểm của hai chủng nấm NS1.1 và HL2 tương đồng với nhiều đặc điểm của chi nấm *Rhizopus* được mô tả bởi Lee & Fujio (1999) và Huỳnh Ngọc Thanh Tâm & cs. (2006)

3.5. Kết quả định danh chủng nấm mốc NS1.1

Kết quả các thí nghiệm cho thấy chủng nấm mốc NS1.1 có nhiều ưu điểm vượt trội so với

chủng HL2 do đó được gửi tới Công ty Phù Sa để giải trình tự 18S rRNA và định danh. Kết quả định danh như hình 6.

Trình tự nucleotide của gen 18S rRNA của chủng NS1.1 được so sánh với trình tự nucleotide 18S rRNA của các chủng nấm mốc đã công bố trên ngân hàng gen NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kết quả (Hình 6) cho thấy chủng vi nấm NS1.1 có mức độ tương đồng 99% với chủng *Rhizopus oryzae* strain 150138. Kết hợp kết quả so sánh trình tự nucleotide 18S rRNA và các đặc điểm hình thái, có thể kết luận, chủng NS1.1 thuộc loài *Rhizopus oryzae* và đặt tên lại cho chủng này là *Rhizopus oryzae* strain NS1.1.

Nấm *Rhizopus oryzae* là một trong các loài nấm thường gặp nhất trong bánh men rượu truyền thống của Việt Nam. Vu Nguyen Thanh

& cs., (2008) đã xác định được nấm *Rhizopus oryzae* trong 47 mẫu bánh men từ 52 mẫu bánh men được kiểm tra. Lee & Fujio (1999) tiến hành khảo sát quần thể vi sinh vật trong bánh men rượu của Việt Nam và đã kết luận chi nấm *Rhizopus* spp. thuộc nhóm vi nấm gặp nhiều nhất trong bánh men rượu của Việt Nam. Dung & cs. (2006) đã đánh giá chức năng của các chủng vi sinh vật trong bánh men rượu của Việt Nam và công bố các chủng vi nấm, bao gồm *Rhizopus* spp., trong bánh men rượu có vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hoá tinh bột thành đường, nguồn nguyên liệu cho chủng nấm men *Sacchromyses* spp. trong bánh men chuyển hoá thành rượu. Chủng nấm *Rhizopus oryzae* cũng được phát hiện trong bánh men khô dùng để sản xuất rượu tại Ấn Độ (Sha & cs., 2018).

4. KẾT LUẬN

Từ 17 chủng nấm mốc được phân lập từ các mẫu bánh men rượu truyền thống thu thập tại Nga Sơn, Thanh Hoá, chúng tôi chọn được chủng NS1.1 và HL2 có khả năng sinh enzyme amylase và khả năng đường hóa cao. Hoạt độ enzyme amylase của hai chủng nấm này lần lượt đạt 4,53 và 4,16 U/ml.

Hiệu quả đường hoá của hai chủng vi nấm NS1.1 và HL2 cao nhất tại ngày thứ 3 khi được ủ với khối cơm rượu. Hàm lượng đường trong dịch thu được từ khối ủ cơm rượu với chủng NS1.1 đạt 7,018 μ M, với chủng HL2 đạt 6,176 μ M. Nhiệt độ thích hợp cho các chủng nấm được tuyển chọn biểu hiện hoạt tính dao động từ 25-35°C, tốt nhất tại 30°C.

Kết quả so sánh trình tự 18S rRNA cho thấy chủng NS1.1 có quan hệ gần với *Rhizopus oryzae* strain 150138. Kết hợp với các đặc điểm hình thái, có thể kết luận chủng NS1.1 là *Rhizopus oryzae* và đặt tên lại cho chủng này là *Rhizopus oryzae* strain NS1.1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. (1996). Introductory Mycology. 4th Ed. New York; John Wiley and Sons, Inc. p. 1869.
Bernfeld P. (1955). Amylases α and β . Methods Enzymol. 1: 49-158.

Dung N.T.P, Romboutsb F.M. & Nout M.J.R. (2006). Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. Food Microbiology. 23: 331-340.
Dung N.T.P., F.M. Romboutsb, M.J.R. Nout (2007). Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men). LWT 40: 130-135
Dung N.T.P (2013). Vietnamese rice-based alcoholic beverages. International Food Research Journal 20(3): 1035-1041.
Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Phương Linh & Ngô Thị Phương Dung (2006). Tuyển chọn nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao từ men rượu Xuân Thạnh. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học. 6: 162-171.
Lee A.C. & Fujio Y. (1999). Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 15: 57-62.
Peng Wang, Feng Ying Zhang & Maohua Qu (2013). Study on the Novei Strain *Rhizopus Oryzae* ATCC 2809's Growth and Fermentation. International Journal of Scientific Engineering and Reseach (IJSER). 1(3).
Phan Thị Thanh Diễm, Phạm Thị Ngọc Lan, Ngô Thị Bảo Châu & Trần Quốc Dung (2018). Phân lập và sàng lọc một số chủng nấm mốc phục vụ cho nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen pectinase. Tạp chí Khoa học, Đại học Huế. DOI: 10.26459/hueuni-jns.v127i1C.4885. 127(1C): 95-106.
Samson R.A., Hoeksrea E.S., Frisval J.C. & Filtenborg O. (1995). Introduction to food-borne fungi. Ed. 4: 322.
Scheherazed D.D., Leila B., Amel A.K., Kenza L., Tahar N., Zoubida G.A. & Zahia M. (2016). An optimization study of α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. Advances in Bioscience and Biotechnology. 7: 123-132. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2016.73011>
Sha S.P., Suryavanshi M.V., Jani K., Sharma A., Shouche Y. & Tamang J.P. (2018) Diversity of Yeasts and Molds by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods for Mycobiome Surveillance of Traditionally Prepared Dried Starters for the Production of Indian Alcoholic Beverages. Front. Microbiol. 9: 2237. doi: 10.3389/fmicb.2018.02237
Vu Nguyen Thanh, Le Thuy Mai & Duong Anh Tuan (2008). Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE. International Journal of Food Microbiology. 128: 268-273.
Xu-Cong Lv, Zhi-Qing Huang, Wen Zhang, Ping-Fan Rao & Li Ni (2012). Identification and characterization of fi fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing. J. Gen. Appl. Microbiol. 58: 33-42.