

TUYỂN CHỌN NẤM MỐC CÓ HOẠT TÍNH ĐƯỜNG HÓA CAO TỪ MEN RƯỢU XUÂN THẠNH

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Huỳnh Xuân Phong,
Nguyễn Phương Linh và Ngô Thị Phương Dung¹

ABSTRACT

With the aim to contribute the way for improvement of the yield and the quality of Xuan Thanh wine, the present research objectives are to study and to select the enzymatically active moulds in the saccharification of cooked rice starch. The moulds were isolated from 14 different starters collected in Xuan Thanh by BiRDI, CTU. Total mould, yeast and bacteria counts were 6,3 – 8,5; 5,8 - 8,3 and 5,6 – 6,4 log cfu/g of starter dry weight sample, respectively. Of 43 mould isolates tested for the starch degrading activity, 9 strains were selected and further examined for their performance in the saccharification. Three strains showed significantly high activity during the saccharification (95% confidence level), in which they were able to produce up to 37% (w/v of saccharified liquid). The target strains of moulds were identified as Rhizopus that belongs to genera of the Zygomycetes and the order Mucorales.

Keywords: Xuan Thanh wine, moulds, saccharification

Title: Selection of enzymatically active moulds from Xuan Thanh rice wine starters

TÓM TẮT

Nhằm góp phần nâng cao năng suất cũng như chất lượng rượu Xuân Thạnh, thực hiện đề tài này nhằm tuyển chọn được những dòng nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao trong các viên men rượu Xuân Thạnh đã được Viện NC&PT CNSH thu thập. Tổng số mật số nấm mốc, nấm men và vi khuẩn theo thứ tự là 6,3 – 8,5; 5,8 – 8,3 và 3,6 – 6,4 Log cfu/g trọng lượng khô của viên men, bên cạnh đó cũng đã phân lập được 43 dòng nấm mốc từ các viên men trên. Sau đó, 43 dòng nấm mốc này được khảo sát khả năng phân giải tinh bột và đã chọn được 9 dòng có khả năng phân giải tinh bột cao nhất với độ tin cậy 95%. Tuyển chọn được 3 dòng nấm mốc có khả năng đường hóa cao nhất với hàm lượng glucose đạt đến 36 – 37% (w/v) ở độ tin cậy 95%. Các dòng nấm mốc tuyển chọn được định danh sơ bộ thuộc giống Rhizopus thuộc giống Zygomycetes và Mucorales.

Từ khóa: rượu Xuân Thạnh, nấm mốc, đường hóa

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, sản xuất rượu cổ truyền là một nghề thủ công lâu đời và mang nét đặc trưng cho từng vùng. Tuy nhiên, nhìn chung từ cách làm viên men, lên men đến cất rượu của đa số các nơi sản xuất rượu đều mang tính thủ công, năng suất và chất lượng rượu còn thấp và chưa ổn định, từ đó làm ảnh hưởng không tốt đến sức khỏe của người tiêu dùng. Vì vậy việc nghiên cứu để nâng cao chất lượng rượu cổ truyền ở nước ta là rất cần thiết. Một trong những nghiên cứu đó là nâng cao chất lượng viên men rượu mà trước tiên là phải chọn lọc được các hệ vi sinh vật phù hợp và có hoạt tính cao. Trong viên men rượu nói chung thường hiện diện ba hệ vi sinh vật chủ yếu là nấm mốc, nấm men và vi khuẩn (chủ yếu là vi khuẩn lactic)

¹ Viện Nghiên Cứu Phát Triển Công Nghệ Sinh Học

(Ardhana & Fleet, 1989; Steinkraus, 1989). Trong đó nấm mốc là hệ vi sinh vật rất quan trọng, là một trong các hệ vi sinh vật có khả năng sản xuất ra các enzyme phân giải tinh bột, đặc biệt là α -amylase và amyloglucosidase (Ray, 2001a, 2001b; Shigechi *et al.*, 2002). Do đó, nấm mốc là tác nhân mở đầu cho quá trình lên men bằng khả năng phân giải tinh bột và khả năng đường hóa. Cùng với nấm men, nấm mốc trong viên men cũng có vai trò quyết định giúp kiểm soát được quá trình lên men và dự đoán được sản phẩm.

Nội dung của đề tài này là chọn lọc những giống nấm mốc có hoạt tính đường hoá cao từ viên men rượu Xuân Thạnh nhằm góp một phần vào việc nâng cao chất lượng viên men làm rượu.

Mục tiêu nghiên cứu

- Xác định được mật số hệ vi sinh vật hiện diện và phân lập được những dòng nấm mốc thuần từ các viên men rượu.
- Khảo sát và chọn ra những dòng nấm mốc có khả năng phân giải tinh bột cao.
- Từ kết quả trên tiếp tục tuyển chọn những dòng nấm mốc có khả năng đường hóa mạnh nhất.
- Nhận dạng, định danh các dòng nấm mốc đã được tuyển chọn ở mức độ giống.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Xác định mật số vi sinh vật và phân lập nấm mốc trong các viên men rượu

Xác định được mật số vi sinh vật gồm nấm mốc, nấm men và vi khuẩn lactic và phân lập được các dòng nấm mốc thuần. Thí nghiệm 1 nhân tố, 3 lần lặp lại.

Thu thập mẫu: Trong phạm vi khảo sát, các quá trình để sản xuất viên men và rượu gạo được ghi nhận và 14 viên men rượu Xuân Thạnh đã được Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học thu thập tại ấp Xuân Thạnh, xã Hòa Thuận, huyện Châu Thành, tỉnh Trà Vinh. Men khô được khảo sát phân tích mật số vi sinh vật ngay sau khi thu thập bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa Petri, sau đó tiếp tục phân lập các nấm mốc từ các đĩa Petri đã được xác định mật số vi sinh vật.

Các mẫu được trữ ở 4°C trong suốt quá trình thí nghiệm.

Mỗi loại men được tán nhuyễn, cân lấy 1g cho vào túi (stomacher bag) chứa sẵn 99ml dung dịch NaCl 0,85%, đồng hóa bằng máy đồng hóa Stomacher Lab-blender trong 1 phút ở tốc độ 260 vòng/phút. Pha loãng nhiều lần bằng dung dịch NaCl 0,85%. Chọn 3 nồng độ pha loãng liên tiếp thích hợp: để đếm nấm mốc, nấm men chọn 3 nồng độ pha loãng là 10^{-5} , 10^{-6} và 10^{-7} ; để đếm vi khuẩn lactic chọn 3 nồng độ pha loãng là 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} . Cấy 1ml dịch mẫu ở mỗi nồng độ vào 6 đĩa petri, sau đó cho vào 3 đĩa môi trường Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar) và 3 đĩa môi trường De Man, Rogosa & Sharpe Agar (MRS Agar), Natamycin 0,2%, lắc đều và ủ trong tủ ủ ở 30°C trong 3 ngày.

Đếm số khuẩn lạc nấm mốc và nấm men và vi khuẩn lactic. Chọn các đĩa ở nồng độ pha loãng có số khuẩn lạc bé hơn 250 để tính log các đơn vị tạo khuẩn lạc (log colony forming units – log cfu) trên gam trọng lượng khô.

Từ các đĩa thạch có các khuẩn lạc nấm mốc phát triển tốt, riêng rẽ, chọn các khuẩn lạc có đặc điểm khác nhau như màu sắc, đường kính, độ dày của hệ khuẩn ty.

Các dòng mốc được cấy chuyên nhiều lần và sau khi thuần được trữ trên môi trường Khoai tây 20%, Glucose 2%, Agar 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2%, MgSO_4 0,05%, CaSO_4 0,02%, KH_2PO_4 0,1%.

2.2 Phương pháp khảo sát khả năng phân giải tinh bột

Với mục đích tuyển chọn được những dòng nấm mốc có hoạt tính enzyme cao, tất cả 43 dòng nấm mốc thuần được khảo sát khả năng phân giải tinh bột trong môi trường tinh bột nếp-agar. Môi trường chứa 0,5% tinh bột nếp, 0,1% pepton (Oxoid, L34) và 1,5% agar (Oxoid, L13). Cấy mốc bằng cách dùng kim cấy cấy một mẫu nấm mốc đặt vào giữa đĩa môi trường tinh bột agar và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Xác định sự phân giải tinh bột bằng cách nhỏ vào đĩa môi trường 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. Thí nghiệm 1 nhân tố, 3 lần lặp lại.

2.3 Tuyển chọn nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao

50 gam nếp than cùng 60ml nước cất được chứa trong bình tam giác 250ml đầy bằng nút gòn, ngâm trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng (22°C). Sau khi ngâm, nếp được hấp bằng autoclave trong 1 giờ ở 100°C. Nếp đã hấp được để nguội đến 35-45°C, sau đó chủng mốc và trộn thật đều, với mốc chủng đã được ủ 4 ngày ở 30°C trên môi trường malt extract agar nghiêng (Oxoid, CM59) và pha trộn với dung dịch nước muối vô trùng ở nồng độ tin cậy tạo dịch huyền phù sao cho nồng độ cuối cùng đạt 10^6 bào tử/g nếp hấp. Nếp hấp đã chủng mốc được ủ trong 4 ngày ở 30°C và sau đó thu hoạch để phân tích. Thí nghiệm 1 nhân tố, 3 lần lặp lại.

Phân tích các chỉ tiêu

- pH: đo bằng pH kế WTW pH 525
- Ước tính tổng số lượng đường khử: bằng cách đo °Brix (dùng Manual Refractometer FG102/112, Euromex-Holland)
- Xác định hàm lượng đường khử: bằng phương pháp Bertrand
- Xác định hàm lượng glucose: bằng kit thử glucose oxidase (Megazyme – glc 9/96)
- Đo tổng thể tích lượng đường thử bằng cách: Thu hoạch hết khối nếp ủ, ly tâm 7000 vòng/phút, 20 phút, thu hoạch lấy phần trong và đo thể tích.

2.4 Nhận dạng và định danh các nấm mốc đã được tuyển chọn

Các nấm mốc tuyển chọn có hoạt tính enzyme cao được nhận dạng dựa trên các đặc tính hình thái và sinh trưởng. Các loài mốc được phân loại dựa vào sự mô tả và khóa phân loại. (Ellis *et al.*, 1976; Hesseltine, 1991; Samson & Hoekstra, 2002).

2.5 Xử lý thống kê

Các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng chương trình Stagraphic Plus Version 5, Manugistics, Inc., Rockville, USA.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định mật số vi sinh vật và phân lập nấm mốc trong các viên men rượu

3.1.1 Mật số vi sinh vật trong các viên men

Mật số vi sinh vật của 14 viên men rượu tính bằng log đơn vị tạo khuẩn lạc (log cfu) trên gam trọng lượng khô được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: Mật số nấm mốc, nấm men và vi khuẩn lactic trong 14 viên men rượu Xuân Thạnh (log cfu/g trọng lượng khô)

Viên men	Nơi mua	Mật số vi sinh vật		
		Nấm mốc	Nấm men	Vi khuẩn lactic
1	Lò rượu Ba Phát	6,3	6,9	6,0
2	Lò rượu Minh Hồng	7,8	8,3	5,7
3	Lò rượu Minh Hồng	7,1	5,8	6,4
4	Lò rượu Cô Sáu	7,8	8,1	5,8
5	Lò rượu chị Tươi	8,5	7,6	5,8
6	Lò rượu chị Tươi	7,5	7,7	4,6
7	Lò rượu Ba Tạo	7,1	7,5	4,4
8	Đại lí men Hòa Thuận	6,8	7,1	6,3
9	Đại lí men Hòa Thuận	7,6	7,8	4,1
10	Lò rượu chị Duyên	6,3	5,7	4,5
11	Lò rượu Anh Đức	7,9	8,1	3,6
12	Lò rượu Hai Khỏe	7,7	7,8	4,0
13	Lò rượu Hai Khỏe	8,3	8,3	6,3
14	Lò rượu Út Dừa	6,3	6,1	4,2

Kết quả thí nghiệm cho thấy mật số nấm mốc, nấm men trong các viên men nằm trong khoảng 6,3 – 8,5 log cfu/g trọng lượng khô, trong khi đó mật số vi khuẩn lactic khoảng 3,6 – 6,4 log cfu/g thấp hơn so với nấm mốc và nấm men. Kết quả này cũng tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của Dung *et al.*, 2005 và cho thấy được sự chiếm ưu thế của nấm mốc và nấm men trong viên men rượu so với vi khuẩn lactic. Qua đó có thể kết luận sơ bộ rằng nấm mốc và nấm men trong hầu hết 14 viên men rượu Xuân Thạnh trên có khả năng ức chế được sự phát triển của vi khuẩn bất lợi, giúp cho quá trình lên men chủ động hơn.

Mặc dù mật số nấm mốc thường thể hiện cho khả năng nảy mầm của nấm mốc hơn là cho sinh khối của nấm mốc nhưng trong trường hợp này, việc sử dụng số liệu log cfu/g trọng lượng khô là hoàn toàn phù hợp vì khả năng nảy mầm là biểu hiện thiết yếu cho khả năng lên men của nấm mốc.

3.1.2 Các dòng nấm mốc phân lập được từ các viên men rượu

Bốn mươi ba dòng nấm mốc phân lập từ 14 viên men rượu Xuân Thạnh. Số lượng các dòng nấm mốc phân lập được từ các viên men có thể giống hoặc khác nhau. Bên cạnh đó, tuy các dòng nấm mốc được phân lập từ cùng một viên men có hình thái và cấu tạo khác nhau nhưng có một số dòng nấm mốc của những viên men khác nhau thì lại có hình thái và cấu tạo giống nhau. Tuy nhiên, chưa thể khẳng định các dòng nấm mốc đó giống hay khác nhau mà phải tiến hành các thí nghiệm tiếp theo để khảo sát hoạt tính của 43 dòng nấm mốc này.

3.2 Thử khả năng phân giải tinh bột của nấm mốc

Bảng 2: Kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột của nấm mốc

STT	Viên men	Đòng mốc	Sự hiện diện của hệ khuẩn ty	Đường kính vùng phân giải tinh bột (mm) ¹			
				A ²	B	C	Trung bình
1	1	1.1	nhiều	90	90	90	90,00 a
2	1	1.2	nhiều	90	90	90	90,00 a
3	1	1.3	nhiều	90	90	90	90,00 a
4	1	1.4	nhiều	90	90	90	90,00 a
5	2	2.1	nhiều	90	80	90	88,33 a
6	3	3.1	trung bình	58	60	60	59,33 efghi
7	3	3.2	trung bình	60	60	60	60,00 efghi
8	3	3.3	trung bình	55	50	55	53,33 hijklm
9	3	3.4	trung bình	50	50	55	51,67 ijklm
10	3	3.5	trung bình	50	50	50	50,00 jklm
11	4	4.1	trung bình	58	55	90	67,67 bcde
12	4	4.2	trung bình	53	50	50	51,00 ijklm
13	4	4.3	trung bình	55	52	52	53,00 hijklm
14	4	4.4	trung bình	60	65	60	61,67 defgh
15	4	4.5	trung bình	50	55	50	53,33 hijklm
16	4	4.6	nhiều	20	20	20	20,00 o
17	5	5.1	trung bình	70	70	70	70,00 bcd
18	5	5.2	trung bình	46	45	45	45,33 m
19	5	5.3	trung bình	70	70	70	70,00 bcd
20	6	6.1	trung bình	55	60	60	58,33 fghij
21	6	6.2	ít	60	60	60	60,00 efghi
22	7	7.1	nhiều	80	80	70	76,67 b
23	7	7.2	trung bình	65	65	70	66,67 cdef
24	8	8.1	trung bình	28	55	50	54,33 ghijklm
25	8	8.2	nhiều	75	75	80	76,67 b
26	9	9.1	ít	30	20	25	25,00 no
27	9	9.2	trung bình	55	60	60	58,33 fghij
28	9	9.3	nhiều	70	80	80	76,67 b
29	9	9.4	trung bình	45	60	45	50,00 jklm
30	10	10.1	nhiều	90	90	90	90,00 a
31	10	10.2	nhiều	90	90	90	90,00 a
32	10	10.3	trung bình	80	70	65	71,67 bc
33	11	11.1	trung bình	60	50	55	55,00 ghijkl
34	11	11.2	nhiều	20	45	25	30,00 n
35	11	11.3	trung bình	65	65	60	63,33 cdefg
36	12	12.1	trung bình	50	60	60	56,67 ghijk
37	12	12.2	trung bình	50	45	45	46,67 lm
38	12	12.3	trung bình	55	50	40	48,33 klm
39	13	13.1	trung bình	55	50	45	50,00 jklm
40	13	13.2	nhiều	90	90	90	90,00 a
41	14	14.1	trung bình	55	60	55	56,67 ghijk
42	14	14.2	trung bình	60	60	90	70,00 bcd
43	14	14.3	nhiều	90	90	90	90,00 a

¹Các giá trị trung bình của đường kính phân giải tinh bột có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%. Các giá trị trung bình được theo sau các mẫu tự alphabet giống nhau thì không khác biệt ở mức P = 0,05.

² A, B và C là 3 lần lặp lại.

Để tuyển chọn các dòng nấm mốc có hoạt tính enzyme α -amylase cao, tất cả 43 dòng nấm mốc đã phân lập từ 14 viên men được khảo sát khả năng phân giải tinh bột trên môi trường tinh bột nếp. Nấm mốc được chuyển vào môi trường tinh bột nếp bằng cách dùng kim cấy cất một mẫu nấm mốc đặt vào giữa đĩa môi trường và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Xác định sự phân giải tinh bột bằng cách nhỏ vào đĩa môi trường dung dịch Iod 0,25% và đo đường kính của vùng không màu (vì nếu còn tinh bột thì khi nhỏ dung dịch Iodine vào sẽ tạo màu xanh điển hình).

Bảng 2 thể hiện kết quả khả năng sinh trưởng của nấm mốc (sự hiện diện của hệ khuẩn ty) và đường kính vùng phân giải tinh bột (tính bằng mm) trên môi trường tinh bột nếp sau khi ủ 2 ngày ở 30°C.

Đa số các dòng nấm mốc đều phát triển tốt trên môi trường tinh bột nếp nhưng không có nghĩa là chúng đều có khả năng phân giải tinh bột tốt. Bên cạnh hầu hết các dòng nấm mốc đều phân giải tinh bột theo kiểu hệ khuẩn ty phát triển đến đâu sẽ phân giải hết tinh bột đến đó thì còn có một số dòng cá biệt như 4.6 và 11.2 tuy hệ khuẩn ty sinh trưởng và phát triển rất tốt nhưng khả năng phân giải tinh bột lại rất kém: vùng phân giải tinh bột chỉ tập trung quanh điểm cấy mốc hoặc chỉ phân giải một lớp mỏng trên bề mặt.

Kết quả xử lý thống kê cho thấy khả năng phân giải tinh bột (được xác định dựa trên đường kính vùng phân giải tinh bột) của 43 dòng nấm mốc có sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$). Trong đó, 9 dòng nấm mốc 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 10.1, 10.2, 13.2 và 14.3 có khả năng phân giải tinh bột cao nhất có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Vì vậy, 9 dòng nấm mốc này được chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo là khảo sát khả năng đường hóa của chúng.

3.3 Thử khả năng đường hóa của nấm mốc

Chín dòng nấm mốc có khả năng phân giải tinh bột cao nhất chọn từ thí nghiệm 2 tiếp tục được khảo sát về khả năng đường hóa. Các dòng mốc này được chủng vào các bình tam giác chứa nếp đã được gelatin hóa sau đó ủ ở 30°C trong 3 ngày. Kết quả về khả năng đường hóa của 9 dòng nấm mốc được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Kết quả khảo sát khả năng đường hóa của nấm mốc

STT	Dòng mốc	PH		°Brix sau ủ	Thể tích dịch rỉ (ml)	Hàm lượng đường khử (%w/v)	Hàm lượng Glucose (%w/v)
		Trước ủ	Sau ủ				
1	1.1	6,15	4,44	32,00	40.05	24.50 c	29.79177 b
2	1.2	6,12	4,48	29,77	32.05	25.11 c	26.70930 b
3	1.3	6,05	4,51	29,53	34.22	23.84 c	27.11920 b
4	1.4	6,01	4,48	29,80	35.88	24.84 c	27.79144 b
5	2.1	6.01	4,28	23,03	1.33	10.69 d	14.46139 c
6	10.1	6,00	4,51	19,53	4.03	10.53 d	16.42892 c
7	10.2	5,99	4,17	>32	43.38	35.50 b	37.43237 a
8	13.2	5,98	4,13	>32	42.38	36.28 ab	37.87506 a
9	14.3	6,03	4,08	>32	43.22	33.44 a	36.23545 a

°Brix >32 có nghĩa là °Brix của mẫu vượt quá mức tối đa trong khúc xạ kế.

Các giá trị pH, °Brix, thể tích dịch rỉ, hàm lượng đường khử và hàm lượng glucose là các giá trị trung bình của ba lần lặp lại.

Các giá trị trung bình được theo sau các mẫu tự alphabet giống nhau thì không khác biệt ở mức $P = 0,05$.

Tất cả các dòng mốc, ngoại trừ hai dòng 2.1 và 10.1, sau một ngày ủ đã thấy xuất hiện dịch rỉ và lượng dịch rỉ này gia tăng theo thời gian ủ. Ở các dòng nấm mốc trên không thấy được sự phát triển nhiều của hệ khuẩn ty, riêng hai dòng mốc 2.1 và 10.1 thì hệ khuẩn ty phát triển dày đặc trong các bình tam giác và lượng dịch rỉ sau 3 ngày rất ít. Qua đó ta có thể nhận thấy trong 9 dòng nấm mốc trên có hai đặc tính khác nhau: một dạng là theo hướng sinh ra enzyme (các dòng 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 10.2, 13.2 và 14.3), một dạng là theo hướng phát triển sinh khối (các dòng 2.1 và 10.1).

Thể tích dịch rỉ tách ra được ở các nghiệm thức có sự khác biệt rất lớn. Ở hai dòng nấm mốc 2.1 và 10.1 hạt nếp hầu như còn nguyên, dịch rỉ rất ít và giống như nước cháo đặc. Trái lại, ở ba dòng nấm mốc 10.2, 13.2 và 14.3 dịch rỉ rất nhiều và trong suốt, sau khi ly tâm phần xác nếp còn lại rất xộp và rời rạc với nhau. Các dòng nấm mốc còn lại dịch rỉ hơi đục, sau khi thủy phân thì phần xác nếp còn hơi nhão nên dính vào nhau.

Sau 3 ngày ủ giá trị pH đã giảm nhanh chóng từ khoảng 6 xuống còn khoảng 4,0 – 4,5. Khoảng pH này là một trong những chỉ tiêu đánh giá sự thành công của quá trình lên men khối mốc ủ vì nếu bị tạp nhiễm bởi các vi khuẩn có hại (thường là vi khuẩn gây chua) thì giá trị pH thường giảm thấp một cách đáng kể chỉ còn khoảng 3,0.

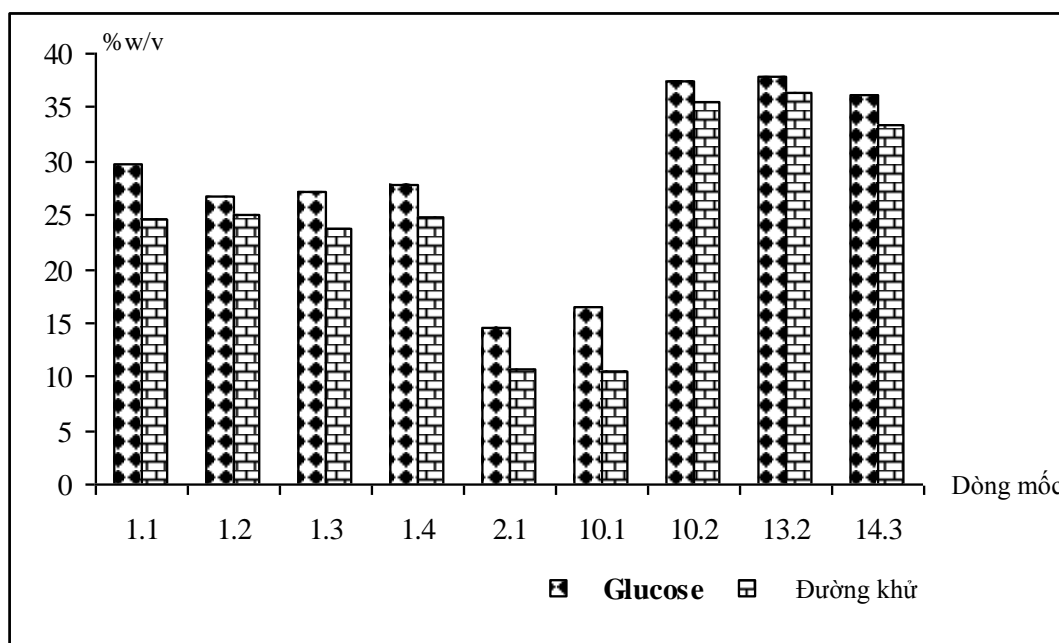
Mối tương quan giữa hàm lượng đường khử và hàm lượng Glucose được sinh ra trong quá trình đường hóa được thể hiện trong Hình 1. Qua đó cho thấy có mối tương quan giữa hàm lượng đường khử và hàm lượng glucose: hàm lượng đường khử cao thì hàm lượng glucose sẽ cao và ngược lại. Điều này chứng tỏ lượng đường khử do nấm mốc tạo ra chủ yếu là glucose. Do vậy, 9 dòng mốc được chia làm ba nhóm dựa trên sự khác nhau về hàm lượng đường khử và hàm lượng glucose được tạo ra. Ba nhóm nấm mốc được sắp xếp theo hàm lượng đường khử và glucose từ cao đến thấp như sau: nhóm 1 bao gồm các dòng 10.2, 13.2 và 14.3; nhóm 2 gồm 1.1, 1.2, 1.3 và 1.4; nhóm 3 gồm 2.1 và 10.1. Kết quả thống kê cho thấy có sự khác biệt giữa ba nhóm nấm mốc trên có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Hàm lượng glucose cao nhất đạt được là 37% w/v dịch rỉ.

Bên cạnh đó kết quả còn cho thấy được mối tương quan giữa thể tích dịch rỉ và hàm lượng glucose được sinh ra. Các dòng mốc có khả năng tạo được lượng dịch rỉ nhiều thì đồng thời hàm lượng glucose sinh ra sẽ cao và ngược lại. Hiện tượng này có thể giải thích dựa trên nguyên tắc của sự biến đổi tinh bột. Sau khi nếp đã được gelatin hóa hoàn toàn bằng cách hấp ở 100°C, tinh bột sẽ hòa tan vào nước tạo thể huyền phù có độ nhớt cao. Độ nhớt này sẽ giảm dần do sự thủy phân tinh bột bởi α -amylase và cuối cùng là sự đường hóa tạo ra glucose.

So sánh giữa hàm lượng đường tổng số ($^{\circ}$ Brix) với hàm lượng đường khử và hàm lượng glucose ta thấy chúng có mối tương quan thuận với nhau, nghĩa là $^{\circ}$ Brix càng cao thì hai hàm lượng đường khử và glucose càng cao. Tuy nhiên ở hai dòng nấm mốc 2.1 và 10.1 tuy có $^{\circ}$ Brix tương đối gần bằng các dòng nấm mốc còn lại nhưng hàm lượng đường khử và hàm lượng glucose lại rất thấp. Kết quả này là do dịch rỉ tạo ra rất nhớt và đục dẫn đến kết quả đo $^{\circ}$ Brix không chính xác. Do đó, $^{\circ}$ Brix cũng chỉ là một thông số ban đầu để đánh giá sơ bộ khả năng đường hóa của nấm mốc, tuy nhiên để tuyển chọn được những dòng nấm mốc có hoạt tính đường

hóa cao cần những phương pháp có độ tin cậy cao hơn như phương pháp Bertrand hay dùng Kit glucose.

Tóm lại, qua thí nghiệm khảo sát khả năng đường hóa của nấm mốc đã tuyển chọn được 3 dòng nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao nhất (có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%) là 10.2, 13.2 và 14.3 thể hiện ở kết quả thống kê của hàm lượng glucose được sinh ra. Ba dòng nấm mốc này sẽ được tiến hành định danh sơ bộ ở mức độ giống.

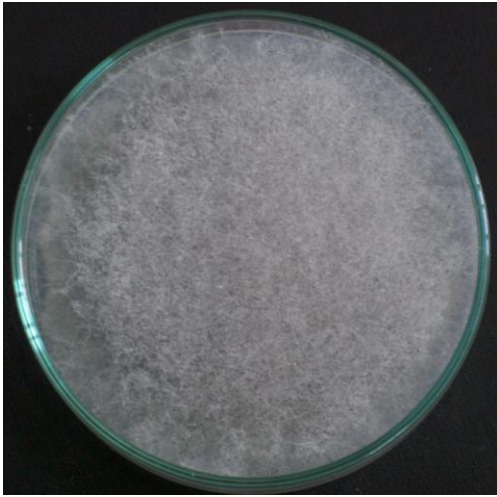


Hình 1: Mối tương quan giữa hàm lượng đường khử và hàm lượng Glucose được sinh ra trong quá trình đường hóa

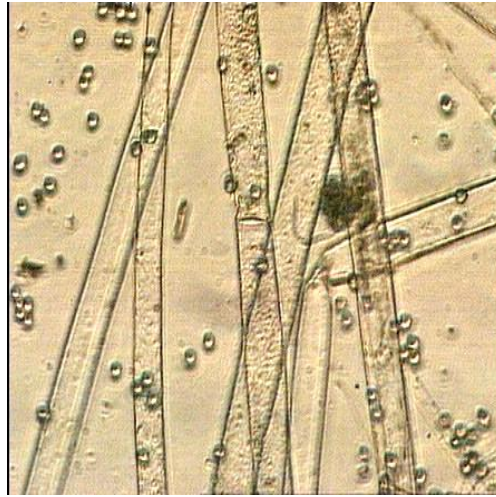
3.4 Nhận dạng, định danh các nấm mốc đã được tuyển chọn ở mức độ giống

Ba dòng nấm mốc có khả năng đường hóa cao nhất được tuyển chọn qua thí nghiệm 3 là 10.2, 13.2 và 14.3 được nuôi cấy trên môi trường Khoai tây 20%, Glucose 2%, Agar 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2%, MgSO_4 0,05%, CaSO_4 0,02%, KH_2PO_4 0,1% trong đĩa petri và ủ ở 30°C. Sau 3 ngày, quan sát một số đặc điểm bằng mắt thường và trên kính hiển vi. Qua kết quả quan sát thì 3 dòng nấm mốc trên có chung một số đặc tính như sau:

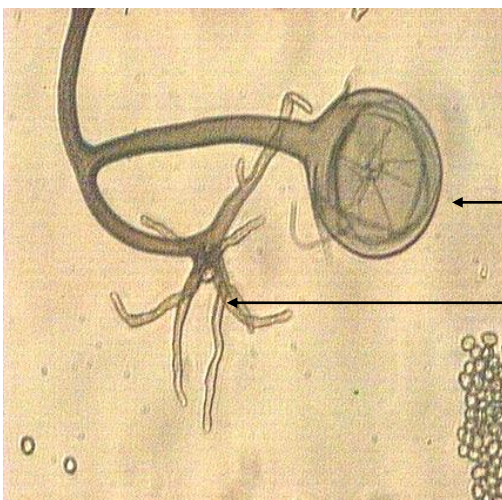
- Khuẩn ty mọc dày, lan khắp đĩa, cao chạm nắp đĩa. Sợi khuẩn ty màu trắng, bào tử rất nhiều có màu xám đen.
- Sợi nấm không có vách ngăn, không phân nhánh, bên dưới có rễ giả (rhizoids). Túi bào tử (sporangium) hình cầu phồng to chứa rất nhiều bào tử (spore).
- Từ các đặc tính trên, định danh sơ bộ cả 3 dòng nấm mốc 10.2, 13.2 và 14.3 đều thuộc giống Rhizopus. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Nguyễn Đức Lượng (1998) cho thấy Rhizopus là một trong những giống nấm mốc chiếm ưu thế trong các viên men rượu.



Hình 2a: Khuẩn lạc trên đĩa Petri



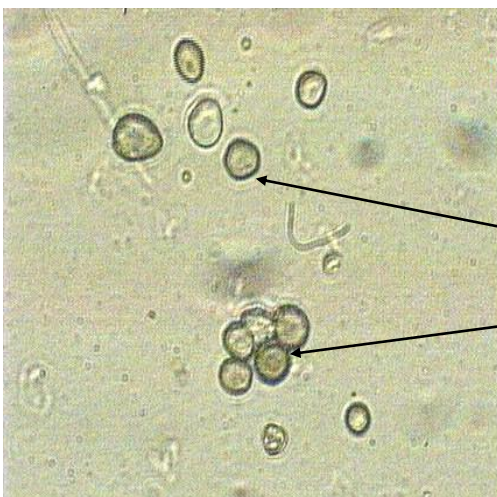
Hình 2b: Sợi nấm không có vách ngăn ở X40



Túi bào tử (sporangium)

Rễ giả (rhizoids)

Hình 2c: Khuẩn ty với túi bào tử (sporangium) và rễ giả (rhizoids) ở X40



Các bào tử (spore)

Hình 2d: Hình dạng các bào tử (spore) ở X100

Hình 2: Một số đặc điểm chung của 3 dòng nấm mốc được tuyển chọn

4 KẾT LUẬN

Từ 14 viên men rượu Xuân Thạnh được thu thập đã xác định mật số nấm mốc, nấm men và vi khuẩn theo thứ tự là 6,3 – 8,5; 5,8 – 8,3 và 3,6 – 6,4 log cfu/g trọng lượng khô của viên men; đã phân lập được 43 dòng nấm mốc thuần chủng.

Qua thí nghiệm khảo sát khả năng phân giải tinh bột của các dòng nấm mốc thuần đã chọn được 9 dòng nấm mốc có khả năng phân giải tinh bột cao nhất có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% gồm có các dòng 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 10.1, 10.2, 13.2 và 14.3.

Từ 9 dòng nấm mốc trên, khảo sát khả năng đường hóa và đã tuyển chọn được 3 dòng 10.2, 13.2 và 14.3 có hoạt tính đường hóa cao nhất với hàm lượng glucose cao nhất đạt đến 37% (w/v) dịch rỉ có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Ba dòng này được phân lập từ các viên men tương ứng là viên men 10, 13 và 14.

Qua kết quả định danh sơ bộ đã xác định 3 dòng nấm mốc trên thuộc giống *Rhizopus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ardhana, M. M., and Fleet, G. H., 1989. The microbial ecology of tape ketan fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 9, 157-165.
- Dung, N. T. P., Rombouts, F. M. and Nout, M. J. R., 2007. Characteristic of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (*men*). *Swiss Society of Food Science and Technology, Elsevier*, 130-135.
- Ellis, J. J., Rhodes, L. J., and Hesseltine, C. W. 1976. The genus *Amylolyces*. *Mycologia* 68, 131-143.
- Hesseltine, C. W., 1991. *Zygomycetes in food fermentations*. *Mycologist* 5, 152-169.
- Nguyễn Đức Lượng, 1998, Thực phẩm lên men truyền thống, Công nghệ vi sinh vật tập 3, Đại học Khoa học Kỹ thuật thành phố Hồ Chí Minh.
- Samson, R. A. and Hoekstra, E. S., 2002. *Introduction to food and airborne fungi*. Sixth edition, Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Ray, B., 2001a. Food ingredients and enzymes of microbial origin. In *Fundamental food microbiology*. Second edition ed. B. Ray, pp. 189-200. Boca Raton, Florida: CRC press.
- Ray, B., 2001b. Microorganism used in food fermentation. In *Fundamental food microbiology*. Second edition ed. B. Ray, pp. 109-118. Boca Raton, Florida: CRC press.
- Shigechi, H., Uyama, K., Fujita, Y., Matsumoto, T., Ueda, M., Tanaka, A., Fukada, H., and Kondo, A., 2002. Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and codisplaying or secreting α -amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17, 179-187.
- Steinkraus, K. H., 1989. *Industrialization of indigenous fermented foods*. New York and Marcel Dekker, Inc.