

SẢN XUẤT ~~NẤM MỐC~~-NẤM MỐC TỪ AMYLOMYCES ROUXII

Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Xuân Phong¹

ABSTRACT

Production ~~The present thesis addresses the study of of starter processing from the selected target strain of the mould~~ *Amylomyces rouxii* ~~was studied~~. *A. rouxii* was able to produce up to 28% (w/v of fermented moulded mass) glucose during the saccharification. The mixed ingredients of broken maize and rice husk were favourable to be used for production of mould starter. ~~The viable spores~~ ~~The growth and the development of the mould~~ were determined by fluorescent counting in which the mould viability was at 10⁶ spores/g mould starter. The results showed that after a 2 months storage test of mould starter at ambient temperature, the mould viability and its ability of glucose production trended to decrease although its contribution in the saccharification was also clearly performed.

Keywords: mould, -starter, *Amylomyces rouxii*

Title: Starter ~~production~~ ~~essing~~ of mycelial fungi from *Amylomyces rouxii*

TÓM TẮT

~~Đề tài này nhằm nghiên cứu sản xuất bột mốc thuần từ nguồn giống chủng là nấm mốc~~ *Amylomyces rouxii* đã được ~~nghiên cứu tuyển chọn~~. *A. rouxii* có hoạt tính cao trong quá trình đường hóa, hàm lượng glucos có thể đạt đến 28% (w/v). Môi trường thích hợp dùng cho sự sản xuất bột mốc gồm có bắp mảnh và trấu. ~~Mật số sinh trưởng và phát triển của bào tử nấm mốc còn sống~~ được xác định bằng phương pháp đếm huỳnh quang, ~~kết quả với mật số nấm mốc có thể~~ đạt đến nồng độ 10⁶ bào tử/g bột mốc. Kết quả cho thấy sau 2 tháng thử nghiệm tồn trữ bột giống ở điều kiện nhiệt độ tự nhiên, tuy nấm mốc vẫn còn thể hiện hoạt tính đường hóa nhưng mật số và hoạt tính của nấm mốc có chiều hướng giảm.

Từ khóa: nấm mốc, nguồn giống, *Amylomyces rouxii*

1 GIỚI THIỆU

Các sản phẩm rượu lên men truyền thống ở vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long là loại thức uống có cồn nổi tiếng từ lâu đời và đặc biệt được ưa thích, tuy nhiên cho đến nay vẫn còn có hạn chế trong vấn đề năng suất và chất lượng rượu còn thấp và không ổn định. Một trong những yếu tố đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình sản xuất rượu lên men truyền thống, đó là sự chuẩn bị và sử dụng men làm rượu như nguồn giống chủng. Ba nhóm vi sinh vật là nấm mốc, nấm men và vi khuẩn hiện diện và phối hợp hoạt động trong các loại viên men (Nguyễn Đức Lương, 2004; Trần Thị Thanh, 2001). Trong đó nấm mốc và nấm men có vai trò quan trọng trong quá trình thủy phân tinh bột và đường hóa, và quá trình lên men rượu (Nout & Aidoo, 2002), do đó chất lượng của sản phẩm cuối cùng tùy thuộc chủ yếu vào hoạt tính của các vi sinh vật này. Nấm mốc là tác nhân mở đầu cho quá

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học

trình lên men thể hiện bằng khả năng sản xuất ra các enzyme phân giải tinh bột và khả năng đường hóa, chủ yếu sản xuất ra đường glucoz.

Nấm mốc *Amylomyces rouxii* thuộc **giống** Zygomycetes là loại vi sinh vật thường hiện diện trong thực phẩm, là vi sinh vật đa bào thường tạo thành những khối sợi có nhánh gọi là khuẩn ty hay sợi nấm và có nhiều bào tử vách dày (chlamydo-spores). *A. rouxii* được thử nghiệm trong quá trình đường hóa từ nếp than cho thấy có khả năng thủy phân tinh bột sản xuất glucoz đạt đến nồng độ 25% (w/w) và hoạt tính amyloglucosidaz đạt đến 0,6 U/g khối mốc ủ (Dung *et al.*, 2006; 2007). Việc sử dụng giống vi sinh vật thuần có hoạt tính cao trong quá trình sản xuất nguồn giống chủng là hết sức cần thiết. Nội dung của đề tài này là từ nấm mốc *Amylomyces rouxii* (CBS 111757) đã được phân lập và tuyển chọn, tiến hành thử nghiệm sản xuất bột mốc với môi trường thích hợp và bước đầu khảo sát tính ổn định của bột mốc sau thời gian tồn trữ.

Mục tiêu nghiên cứu

- Xác định hoạt tính của nấm mốc *A. rouxii* dùng làm nguồn giống chủng.
- Thử nghiệm sản xuất bột mốc thuần.
- Xác định hoạt tính của bột mốc sau một thời gian tồn trữ.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Xác định khả năng đường hóa của nấm mốc *Amylomyces rouxii*

Trước khi sử dụng làm nguồn giống chủng trong sản xuất bột mốc, *A. rouxii* được xác định hoạt tính trong quá trình đường hóa từ nếp. Thí nghiệm có 3 lần lặp lại.

Chuẩn bị giống chủng: nuôi cấy nấm mốc trên môi trường khoai tây – glucoz – agar (PGA) trong 5 ngày ở 30°C, thu hoạch sinh khối với một lượng nước muối sinh lý 0,85% có bổ sung 0,01% Tween 80 đã được khử trùng sao cho mật số bào tử nấm mốc trong dịch huyền phù đạt 106 bào tử/ml.

Xác định khả năng đường hóa: cho 50 g nếp và 60 ml nước cất vào bình tam giác loại 250 ml, đập bằng nút gòn và nắp giấy, ngâm trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó hấp ở 100°C trong 1 giờ. Nếp đã hồ hóa được làm nguội đến 30-40°C, chủng giống vào, trộn đều và ủ 3 ngày ở 30°C. Dịch đường sinh ra được thu hoạch bằng cách ly tâm 7000 vòng/phút, trong 20 phút ở 4°C và thực hiện phân tích các chỉ tiêu.

2.2 Thử nghiệm sản xuất bột mốc thuần

Mục đích tìm ra những thành phần cơ chất thích hợp có thể sử dụng làm môi trường để sản xuất bột mốc. Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức (MT1, MT2, MT3, MT4 và MT5) với 3 lần lặp lại. Sử dụng các loại cơ chất thông thường và dễ tìm như tấm gạo, bột khoai mì, cám và bắp mảnh để tiến hành nuôi mốc. Trấu nhỏ được bổ sung vào môi trường với tỷ lệ 30% so với khối lượng cơ chất nhằm tạo độ xốp. Thành phần khoáng được bổ sung dựa trên tổng khối lượng cơ chất và trấu: (NH₄)₂SO₄ 0,2%; KH₂PO₄ 0,1%; MgSO₄ 0,05%; CaSO₄ 0,02%. Lượng nước dùng để điều chỉnh độ ẩm của môi trường là 50% tổng khối lượng cơ chất và trấu. Thành phần cơ chất của từng loại môi trường được thể hiện trong Bảng 1.

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Cách thực hiện: nấm mốc được nuôi trong bình tam giác loại 500 ml gồm khối lượng cơ chất trong mỗi bình là 50 g, bổ sung trấu và hòa tan chất khoáng vào nước trước khi cho vào bình, trộn đều và giữ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ, đậy bằng nút gòn và nắp giấy trước khi đưa đi tiệt trùng ở 121°C trong 1 giờ. Môi trường sau khi tiệt trùng được làm nguội đến 30- 40°C và chủng 5 ml dịch huyền phù nấm mốc đã được chuẩn bị, trộn đều, đậy bằng nút gòn và ủ ở 30°C trong 7 ngày. Khối mốc sau khi ủ được đem sấy khô ở 42°C, thời gian sấy được xác định dựa trên sự theo dõi khối lượng của mẫu đại diện 5 g được sấy đồng thời đến khi khối lượng không thay đổi. Sau đó khối mốc được xay nhỏ thành dạng bột và trữ ở điều kiện nhiệt độ tự nhiên trong bọc PP, ép miệng. Lấy mẫu phân tích các chỉ tiêu trước và sau khi tồn trữ 1 tháng và 2 tháng.

Bảng 1: Thành phần cơ chất trong các loại môi trường dùng nuôi mốc

Môi trường nuôi mốc	Loại cơ chất	Thành phần cơ chất (%)
MT1	Tấm gạo	100
MT2	Tấm gạo	80
MT3	Bột khoai mì	20
	Tấm gạo	80
MT4	Cám	20
	Bắp mảnh	100
MT5	Bắp mảnh	80
	Cám	20

2.3 Phương pháp phân tích các chỉ tiêu

2.3.1 Khả năng đường hóa của nấm mốc *Amylomyces rouxii*

- Quan sát sự phát triển của hệ khuẩn ty nấm mốc và sự rỉ nước dịch từ khối nếp lên men, mỗi lần quan sát cách nhau 24 giờ.
- Xác định pH bằng pH kế (Sartorius, PB-20, Đức): nếp sau 4 giờ ngâm, dịch rỉ đường sinh ra sau 3 ngày ủ mốc.
- Xác định hàm lượng glucoz bằng phương pháp dùng kit thử glucoz oxidaz (Megazim-GLC 9/96): dịch rỉ đường sinh ra sau giai đoạn đường hóa.
- Xác định thể tích dịch rỉ bằng phương pháp ly tâm 7000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C (Hettich-Zentrifligen, 4810, Đức).

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

2.3.2 Thử nghiệm sản xuất bột mốc thuần

- Xác định khả năng đường hóa của bột mốc (xem 2.3.1)
- Xác định mật số bào tử nấm mốc còn sống trong bột mốc bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang, đếm dưới kính hiển vi huỳnh quang bằng buồng đếm hồng cầu Burk-Turk.
- Xác định độ ẩm của bột mốc trước và sau thời gian tồn trữ.

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

2.3.3 Xử lý thống kê

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

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng đường hóa của nấm mốc *Amylomyces rouxii*

Trong thí nghiệm này sử dụng nguồn giống chủng là dịch huyền phù nấm mốc được chuẩn bị từ nấm mốc *Amylomyces rouxii* đã phát triển trên môi trường PGA sau 5 ngày ủ ở 30°C, quá trình đường hóa được thực hiện từ khối nếp hấp. Hoạt tính của nấm mốc được xác định thông qua việc xác định hàm lượng glucoz sinh ra trong dịch ri và thể tích dịch ri sinh ra sau 3 ngày ủ mốc ở 30°C. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Khả năng đường hóa của nấm mốc *Amylomyces rouxii*

Lặp lại	pH		Xuất hiện khuẩn ty			Xuất hiện dịch ri			Hàm lượng glucoz (% w/v)	Thể tích dịch ri (ml)
	Nếp sau ngâm	Sau ủ mốc	1 ngày	2 ngày	3 ngày	1 ngày	2 ngày	3 ngày		
A	5,85	4,35	+*	++	+++	+	++	+++	27,54	58,48
B	5,88	4,31	+	++	+++	+	++	+++	28,32	55,54
C	5,87	4,31	+	++	+++	+	++	+++	27,93	57,01
Trung bình	5,87	4,32	+	++	+++	+	++	+++	27,93	57,01

* Mức độ xuất hiện của khuẩn ty và dịch ri tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++)

Kết quả quan sát cho thấy sự xuất hiện của khuẩn ty và dịch ri tăng dần theo thời gian trong quá trình ủ mốc. Dịch ri được sinh ra nhiều, rất sánh và trong. Hàm lượng glucoz đạt đến 27,93% cho thấy khả năng đường hóa cao của nấm mốc *A. rouxii*, kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trước của Dung (2006), Nghiệp (2006), Linh (2006). Việc thực hiện xác định khả năng đường hóa cao của nấm mốc là hết sức cần thiết, cần phải thực hiện mỗi khi bắt đầu được sử dụng làm nguồn giống chủng cho quá trình sản xuất, do vi sinh vật rất nhạy, dễ bị ảnh hưởng bởi điều kiện nuôi cấy và qua quá trình tồn trữ; đặc biệt là trong giai đoạn bước đầu còn đang thử nghiệm tính ổn định của nguồn giống. Việc khẳng định hoạt tính trước khi sử dụng làm nguồn giống chủng là rất quan trọng vì đây là khâu đầu tiên trong quá trình sản xuất. Với kết quả thu được như trên, chất lượng nấm mốc này được xác định là đạt yêu cầu để sử dụng làm nguồn giống chủng.

3.2 Thử nghiệm sản xuất bột mốc thuần

Thử nghiệm sản xuất bột mốc từ 5 loại môi trường khác nhau, để tìm ra cơ chất thích hợp cho nấm mốc phát triển. Các loại cơ chất được tuyển chọn dựa trên nguyên tắc là chọn các loại cơ chất thông thường, rẻ tiền, dễ tìm và phổ biến trong vùng. Mật số bào tử nấm mốc đếm được trong các loại bột mốc sản xuất từ các loại cơ chất khác nhau là một trong các chỉ tiêu chủ yếu để đánh giá khi tuyển chọn cơ chất làm môi trường nuôi mốc. Thông thường mật số vi sinh vật có thể được đếm bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu hay phương pháp đếm gián tiếp nuôi cấy và đếm khuẩn lạc trên đĩa môi trường. Ngoài ra, phương pháp đếm bằng cách nhuộm huỳnh quang cũng được sử dụng, trong đó các chất nhuộm huỳnh quang được sử dụng là cFDA và PI. Với phương pháp này vừa có thể xác

định nhanh vừa có thể phân biệt được các tế bào và bào tử còn sống (có màu xanh) hay các bào tử đã chết (có màu đỏ) khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Trong thí nghiệm này mật số bào tử nấm mốc trong bột mốc được sản xuất từ các loại môi trường khác nhau được thực hiện bằng phương pháp đếm huỳnh quang và kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Mật số bào tử nấm mốc của bột mốc nuôi cấy trên các loại cơ chất khác nhau

Tên môi trường	Loại cơ chất	Thành phần cơ chất (%)	Log bào tử/g bột mốc
MT1	Tầm gạo	100	~*
MT2	Tầm gạo	80	-
MT3	Bột khoai mì	20	-
	Tầm gạo	80	
MT4	Cám	20	6,6
	Bắp mảnh	100	
MT5	Bắp mảnh	80	6,2
	Cám	20	

*: không phát hiện bào tử trên buồng đếm.

Khi quan sát bằng mắt thường các môi trường nuôi cấy sau 7 ngày ủ ở 30°C, ở các môi trường MT1, MT2, MT3 chỉ thấy các sợi khuẩn ty nấm mốc phát triển rất ít trên bề mặt của môi trường, do đó bào tử sinh ra cũng rất ít. Điều này có thể giải thích vì sao không thể phát hiện được bào tử nấm mốc trên buồng đếm khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Trong khi ở môi trường MT4 và MT5 khuẩn ty phát triển mạnh lan tỏa khắp trên bề mặt và cả bên trong khối môi trường.

Ngoài ra, khả năng đường hóa của bột mốc trên khối nếp hấp cũng là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá hoạt tính của bột mốc, hoạt tính này được thể hiện dựa trên thể tích dịch rỉ sinh ra sau 3 ngày ủ mốc ở 30°C và hàm lượng glucoz trong dịch rỉ. Khả năng đường hóa của các loại bột mốc sản xuất từ các loại cơ chất khác nhau được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4: Khả năng đường hóa của các loại bột mốc được nuôi cấy từ các loại cơ chất khác nhau

Loại bột mốc	pH		Xuất hiện khuẩn ty			Xuất hiện dịch rỉ			Hàm lượng glucoz (% w/v)	Thể tích dịch rỉ (ml)
	Nếp sau ngâm	Sau ủ mốc	1 ngày	2 ngày	3 ngày	1 ngày	2 ngày	3 ngày		
MT1	6,05	4,31	-	-	-	-	+	++	0,11c*	31,54a
MT2	6,01	4,24	-	-	-	-	+	++	0,46c	27,60b
MT3	6,01	4,57	-	-	-	-	+	++	0,15c	30,12a
MT4	6,00	4,53	-	+	+++	+	++	+++	24,18a	30,78a
MT5	6,03	4,52	-	+	++	-	++	+++	12,21b	31,01a

* Giá trị trung bình của ba lần lặp lại có các mẫu tự giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Khi chủng các loại bột mốc MT1, MT2, MT3 khuẩn ty gần như không xuất hiện trên khối nếp hấp sau 3 ngày ủ mốc mặc dù lượng dịch rỉ thu được khá nhiều nhưng rất đục và lỏng. Ngược lại khi chủng hai loại bột mốc là MT4 và MT5 thì

dịch ri được sinh ra từ khối nếp hấp nhiều, sánh và trong; khuẩn ty phát triển phủ đều khắp bề mặt khối nếp.

Kết quả thống kê cho thấy sự khác biệt về hoạt tính của 5 loại bột mốc dựa trên thể tích dịch ri và hàm lượng glucoz sinh ra trong dịch ri sau giai đoạn ủ mốc có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Thể tích dịch ri sinh ra từ khối nếp hấp được chùng từ bột mốc MT2 có sự khác biệt và thấp hơn so với 4 loại bột mốc còn lại. Trong 4 loại bột mốc còn lại thì bột mốc MT4 có hoạt tính cao nhất với hàm lượng glucoz sinh ra là 24,18% (w/v). Do đó, môi trường MT4 gồm có bắp mảnh và trấu là môi trường thích hợp nhất cho nấm mốc phát triển.

3.3 Hoạt tính của bột mốc sau thời gian tồn trữ

Sau khi tìm được môi trường thích hợp để có thể sản xuất bột mốc, việc theo dõi hoạt tính của bột mốc trong quá trình tồn trữ cũng rất cần thiết nhằm đánh giá tính ổn định của nó trước khi tiến hành sản xuất với số lượng lớn. Trong thí nghiệm này, bột mốc được sản xuất và tồn trữ trong bọc PP, ép miệng và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ môi trường tự nhiên xung quanh. Kết quả xác định hoạt tính của bột mốc trước và sau thời gian tồn trữ được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5: Mật số, khả năng đường hóa và độ ẩm của bột mốc trước và sau tồn trữ

Thời gian trữ (tháng)	Mật số bào tử nấm mốc (Log bào tử/g bột mốc)	Hàm lượng glucoz (%w/v)	Thể tích dịch ri (ml)	Độ ẩm (% w/w)
0	6,6a*	23,11a	30,89a	8,51b
1	6,2b	22,55a	30,41a	8,57a
2	6,1c	19,33b	30,70a	8,58a

* Giá trị trung bình của ba lần lặp lại có các mẫu tự giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả cho thấy trong thời gian 2 tháng tồn trữ mật số bào tử nấm mốc có sự khác biệt có ý nghĩa và giảm dần theo thời gian, nhưng vẫn duy trì ở mức 10^6 bào tử/g bột mốc. Thể tích dịch ri sinh ra gần như không thay đổi nhưng hàm lượng glucoz giảm vào tháng thứ hai. Như vậy, có sự quan hệ giữa mật số và hoạt tính của bột mốc. Trong khi đó, độ ẩm của bột mốc chỉ tăng lên vào tháng thứ nhất và duy trì ổn định đến tháng thứ hai. Do thời gian hạn chế nên không thể tiếp tục theo dõi với thời gian tồn trữ lâu hơn, tuy nhiên kết quả bước đầu cho thấy bột mốc có hoạt tính đường hóa khá ổn định trong điều kiện tồn trữ ở nhiệt độ thường với điều kiện môi trường xung quanh.

4 KẾT LUẬN

- Hoạt tính đường hóa của nấm mốc *Amylomyces rouxii* cao với hàm lượng glucoz sinh ra ~~có thể~~ đạt đến 28% (w/v), ~~có thể~~ được sử dụng làm nguồn giống chùng để sản xuất men rượu.
- Bắp mảnh và trấu là cơ chất thích hợp dùng làm môi trường sản xuất bột mốc từ nấm mốc *A. rouxii*.
- Kết quả bước đầu cho thấy bột mốc có hoạt tính đường hóa khá ổn định trong điều kiện tồn trữ ~~trong sau~~ 2 tháng ở nhiệt độ thường với điều kiện môi trường xung quanh.

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese

CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn tổ chức International Foundation for Science (IFS), Stockholm, Thụy Điển và Bộ Giáo dục và Đào tạo, Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí thực hiện thí nghiệm.

Formatted: English (United States)

Formatted: Font: 11 pt

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dung, N.T.P, F.M. Rombouts & M.J.R.Nout (2006). "Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters", Food Microbiology 23, pp. 331-340.
- Dung, N.T.P, F.M. Rombouts, M.J.R.Nout (2007), "Characteristics of some traditional starch-based rice wine fermentation starters (Men)", LWT/Food Science and Technology 40, pp. 130 - 135.
- Đình Bá Nghiệp (2006), Khả năng sản xuất rượu vang nếp Phú Tân, Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư ngành Công Nghệ Thực Phẩm, Đại học An Giang.
- Nguyễn Đức Lượng (2004), Công nghệ vi sinh vật, Tập 1, Nhà xuất bản Đại học Kỹ thuật TP. Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Phương Linh (2006), Tuyển chọn nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao từ men rượu Xuân Thạnh, Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công Nghệ Sinh Học, Đại học Cần Thơ.
- Nout, M.J.R., and Aidoo, K.E. (2002), Asian Fungal Fermented Food, In The Mycota. Vol.X "Industrial applications". ed. H.D. Osiewacz, pp. 23 – 47, Berlin-Heidelberg-New York:Springer-Verlag.
- Trần Thị Thanh (2001), Công nghệ vi sinh, Nhà xuất bản giáo dục, TP. Hồ Chí Minh.

Formatted: References, Indent: Left: 0 cm, First line: 0 cm, Space Before: 0 pt, Line spacing: single

Formatted: Vietnamese

Formatted: Vietnamese