

Nghiên cứu gốc

TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MỐC CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME AMYLASE CAO NHẤT TỪ CƠM RƯỢU VÀ LÀ MỘT TIỀM NĂNG CHO CÔNG NGHIỆP ENZYME

Võ Phương Mai, Nguyễn Duy Tân, Nguyễn Hữu Thanh, Nguyễn Phú Thọ✉

Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập và đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase cao nhất từ các chủng nấm mốc của cơm rượu.

Phương pháp: Nghiên cứu bao gồm việc phân lập và sàng lọc ban đầu khả năng phân giải tinh bột các chủng nấm mốc thông qua sự hình thành vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc sử dụng môi trường tinh bột agar và dung dịch i-ốt. Các chủng tiềm năng sau đó được nuôi cấy trong môi trường dịch tinh bột và xác định hoạt tính enzyme amylase. Chủng nấm mốc sản xuất amylase cao nhất được định danh bằng sinh học phân tử.

Kết quả: Tổng cộng có 14 chủng nấm mốc đã được phân lập và phân tích đặc điểm hình thái, quan sát kính hiển vi cũng như khả năng phân giải tinh bột. Kết quả cho thấy chủng CRBK1 có hoạt tính amylase cao nhất, đạt khoảng 70% và 3,5 U/mL, vượt trội so với các chủng khác. Phân tích định danh bằng trình tự ITS rDNA xác định CRBK1 thuộc chủng *Rhizopus arrhizus*, với mức độ tương đồng trên 96% so với các chủng trong cơ sở dữ liệu GenBank.

Kết luận: Nghiên cứu mở ra tiềm năng sử dụng nguồn nấm mốc bản địa để sản xuất enzyme amylase. Nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung tối ưu hóa lên men, cải thiện quy trình tinh chế amylase từ chủng *Rhizopus arrhizus* và đánh giá tính ổn định enzyme trong ứng dụng công nghiệp thực phẩm và năng lượng sinh học.

Từ khóa: Cơm rượu, enzyme amylase, phân giải tinh bột, *Rhizopus arrhizus*.

SELECTION OF AMYLASE-PRODUCING MOLDS FROM *Com Ruou* (SWEET FERMENTED GLUTINOUS RICE) AS A POTENTIAL CANDIDATE FOR ENZYME INDUSTRY

ABSTRACT

Aims: This study aims to isolate and evaluate the amylase enzyme biosynthetic capability of fungal strains derived from *Com Ruou* (Sweet fermented glutinous rice).

Methods: The research involves the initial isolation and screening of fungal strains for their ability to degrade starch through the formation of clear zones around colonies using starch agar and iodine solution. Potential strains were subsequently cultured in a starch liquid medium to assess amylase enzyme activity. The strain with the highest amylase biosynthesis was identified using molecular biology techniques.

Results: A total of 14 fungal strains were isolated and analyzed for morphological characteristics, microscopic observation, and starch degradation capability. Results indicated that the strain CRBK1 exhibited the highest amylase activity, reaching approximately 70% and 3.5 U/mL, significantly surpassing the other strains.

✉ Tác giả liên hệ: Nguyễn Phú Thọ
Email: nptho@agu.edu.vn
Doi: 10.56283/1859-0381/885

Nhận bài: 12/3/2025 Chỉnh sửa: 25/3/2025
Chấp nhận đăng: 13/6/2025
Công bố online: 14/6/2025

ITS rDNA sequencing identified CRBK1 as belonging to the species *Rhizopus arrhizus*, with over 96% similarity to strains in the GenBank database.

Conclusion: This research highlights the potential for utilizing indigenous fungal sources for amylase enzyme production. Future research will focus on optimizing fermentation processes, improving the purification of amylase from *Rhizopus arrhizus*, and assessing the enzyme's stability in food industry and bioenergy applications.

Keywords: *Com ruou*, amylase enzyme, starch degradation, *Rhizopus arrhizus*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cơm rượu là một sản phẩm lên men truyền thống phổ biến tại nhiều quốc gia châu Á, được hình thành từ quá trình lên men gạo nhờ sự hoạt động của vi sinh vật, đặc biệt là nấm mốc và nấm men. Trong quá trình này, các enzyme thủy phân tinh bột thành đường đơn để lên men thành rượu, góp phần tạo nên hương vị đặc trưng của sản phẩm [1]. Các chủng vi sinh vật trong cơm rượu không chỉ đóng vai trò quan trọng trong quá trình lên men mà còn có tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp sinh học, đặc biệt là trong sản xuất các enzyme như amylase, protease và cellulase [2,3]. Tuy nhiên, hiện nay vẫn thiếu các nghiên cứu tập trung vào việc phân lập và đánh giá khả năng sản xuất amylase của các chủng nấm mốc từ nguồn này. Nghiên cứu gần đây của Hoàng Tuấn Thanh và cs (2024) đã phân lập được 5 chủng nấm mốc từ cơm rượu sản xuất ở Thành phố Cần Thơ, nhưng không khảo sát khả năng sinh amylase của các chủng này [1]. Tương tự, nghiên cứu của Nguyễn Huy Thuần và cs (2021) trên bánh men rượu đã phân lập được 17 chủng nấm mốc có khả năng thủy phân tinh bột, với hoạt độ amylase từ 2,0 đến 4,5 U/mL, trong đó hai chủng sinh amylase cao được xác định là *Rhizopus oryzae* [4]. Những nghiên cứu này thường không khai thác hết tiềm năng của các chủng nấm mốc bản địa, dẫn đến việc

chưa xác định được những nguồn tiềm năng mới cho sản xuất enzyme.

Amylase là một trong những enzyme quan trọng nhất trong công nghiệp, được sử dụng rộng rãi trong chế biến thực phẩm, sản xuất đường, dệt may và sản xuất bioethanol [5]. Trong tự nhiên, enzyme amylase có thể do nhiều sinh vật tổng hợp, đặc biệt là nấm mốc thuộc các chi *Aspergillus*, *Rhizopus* và *Mucor* [6]. Trong số đó, các chủng thuộc chi *Rhizopus* được ghi nhận là có khả năng sinh enzyme amylase mạnh và thích nghi tốt với nhiều điều kiện môi trường khác nhau [3]. Do đó, việc phân lập và đánh giá khả năng sản xuất amylase của nấm mốc từ các nguồn tự nhiên, như cơm rượu, có ý nghĩa quan trọng trong khai thác enzyme phục vụ công nghiệp sinh học.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và định danh các chủng nấm mốc từ cơm rượu bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường chọn lọc và quan sát đặc điểm hình thái. Các chủng có tiềm năng sản xuất amylase được đánh giá hoạt tính enzyme bằng phương pháp thủy phân tinh bột và đo quang phổ. Chủng nấm mốc sản xuất amylase cao nhất được định danh bằng sinh học phân tử dựa trên vùng gen ITS (Internal Transcribed Spacer). Kết quả thu được giúp xác định chủng có khả năng sinh amylase cao, từ đó mở ra hướng ứng dụng trong sản xuất enzyme

và công nghiệp thực phẩm. Nghiên cứu này không chỉ góp phần làm sáng tỏ hệ vi sinh vật trong cơm rượu mà còn cung cấp

cơ sở khoa học cho việc ứng dụng nấm mốc bản địa trong sản xuất enzyme amylase.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập mẫu và phân lập nấm mốc

Nấm mẫu cơm rượu được mua từ các chợ địa phương tại Long Xuyên, An Giang, Việt Nam. Mỗi mẫu có khối lượng khoảng 100 g, được đựng trong túi nhựa tiệt trùng có khóa zip, ghi nhãn thông tin về địa điểm, thời gian thu thập và điều kiện bảo quản. Các mẫu sau đó được vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong hộp giữ lạnh và bảo quản ở nhiệt độ 4°C để đảm bảo tính ổn định sinh học. Mẫu cơm rượu được hòa trong 10 mL nước cất

tiệt trùng, sau đó thực hiện pha loãng liên tiếp vào bốn bình khác nhau. Một lượng nhỏ từ mỗi mẫu đã pha loãng được cấy lên đĩa môi trường Potato Dextrose Agar (PDA, Himedia, Ấn Độ) và ủ ở 37°C trong 48 giờ để hỗ trợ sự phát triển của nấm mốc. Các dòng nuôi cấy thuần được xác định đặc điểm hình thái và bảo quản trên môi trường PDA ở 4°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Quan sát dưới kính hiển vi

Các chủng được xác định dựa trên đặc điểm hình thái theo khóa phân loại của Constantine (2007) [7]. Cả đặc điểm vĩ mô và vi mô của các chủng đều được quan sát. Để xác định vi mô, bào tử được hòa trong dung dịch lactose phenol blue

(Sigma-Aldrich, Mỹ) trên một phiến kính, và cách sắp xếp bào tử được quan sát dưới kính hiển vi Olympus CX23 (Nhật Bản). Trong quan sát vi mô, màu sắc, kết cấu và hình dạng của các khuẩn lạc được ghi nhận và phân tích.

2.3. Sàng lọc ban đầu các chủng nấm mốc sinh tổng hợp enzyme amylase

Sàng lọc ban đầu cho sản xuất amylase từ các nấm mốc phân lập được thực hiện bằng cách sử dụng môi trường tinh bột agar kết hợp với dung dịch i-ốt (0,4% KI + 0,2% I₂, Sigma-Aldrich, Mỹ). Các chủng nấm mốc được cấy vào môi trường PDA chứa 1% tinh bột và ủ ở 28 ± 2°C trong 24 giờ trong tủ ẩm (Memmert,

Đức). Sau đó, các đĩa được đổ đầy dung dịch i-ốt. Sự hiện diện của vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc cho thấy sự sản xuất amylase. Để đánh giá hiệu suất phân giải, đường kính của vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc được đo bằng thước kẻ [8].

2.4. Định lượng khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase của các chủng nấm mốc

Các chủng nấm mốc được sàng lọc định lượng khả năng sản xuất amylase trong môi trường dịch tinh bột, bao gồm các thành phần: tinh bột hòa tan (20 g/L, Xilong, Trung Quốc), KH₂PO₄ (14 g/L, Xilong, Trung Quốc), NH₄NO₃ (10 g/L, Xilong, Trung Quốc), KCl (0,5 g/L, Xilong, Trung Quốc), MgSO₄·7H₂O (0,1 g/L, Himedia, Ấn Độ) và FeSO₄·7H₂O (0,01 g/L, Himedia, Ấn Độ). Độ pH của

môi trường được điều chỉnh về 6,9 và hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 7 ngày ở 30°C. Dung dịch Tween 80 (Sigma-Aldrich, Mỹ) với nồng độ 0,1% được sử dụng để phân tán và hòa tan bào tử. Mười mililit dung dịch bào tử (1 × 10⁶ bào tử/mL) được chuyển vào 90 mL dung dịch môi trường và khuấy trộn ở 200 vòng/phút ở 30°C trong 3 ngày. Sau đó,

các nuôi cấy được ly tâm ở 5.000 vòng/phút và 4°C trong 15 phút. Dung

2.5. Xác định hoạt tính enzyme amylase

Hoạt tính enzyme amylase được đánh giá bằng hai phương pháp. Phương pháp đầu tiên đánh giá thông qua sự giảm cường độ màu xanh của tinh bột trong phản ứng với i-ốt. Cụ thể, tổng cộng 10 mL dung dịch tinh bột 2% (trong dung dịch đệm pH 6,5) được trộn với 2 mL dung dịch enzyme thô và ủ ở 55 °C thời gian 10 phút trên bể điều nhiệt Memmert (Đức). Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 5 mL dung dịch HCl 5 N (Xilong, Trung Quốc), sau đó khuấy trộn trong 10 phút. Hỗn hợp phản ứng được trung hòa bằng 2 mL NaOH 4 N (Xilong, Trung Quốc) và định mức về 100 mL bằng nước cất. Sau đó, lấy 5 mL hỗn hợp thêm với 5 mL dung dịch i-ốt 2% và đo độ hấp thụ ở 680 nm trên máy quang phổ UV-Vis (Thermo Fisher, Mỹ). Một mẫu đối chứng được chuẩn bị theo cùng quy trình, trong đó 2 mL dung dịch đệm phosphate được thay thế bằng dung dịch enzyme thô. Hoạt tính amylase được tính toán theo công

dịch enzyme thô sau ly tâm được phân tích xác định hoạt tính amylase [9].

thức: Hoạt tính amylase (%) = $100 \times (B - A) / B$, trong đó B là độ hấp thụ của mẫu trắng và A là độ hấp thụ của mẫu thử [10,11].

Phương pháp thứ hai đánh giá thông qua hàm lượng glucose được tạo thành. Theo đó, trộn 1 mL tinh bột 2% w/v (pH 6,5) với 1 mL dung dịch enzyme thô và ủ ở 55°C thời gian 10 phút trong một Waterbath. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 6 mL axit 3,5-dinitrosalicylic (Sigma-Aldrich, Mỹ). Các ống nghiệm sau đó được đun sôi trong 5 phút trước khi đo độ hấp thụ ở 540 nm trên máy quang phổ UV-Vis (Thermo Fisher, Mỹ). Hàm lượng glucose giải phóng được định lượng dựa vào đường chuẩn glucose (Sigma-Aldrich, Mỹ). Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là số micromol đường khử (biểu thị dưới dạng glucose tương đương) được sản xuất mỗi phút dưới các điều kiện thí nghiệm [10, 11].

2.6. Định danh phân tử chủng nấm mốc sản xuất amylase cao nhất

Chiết xuất acid deoxyribonucleic (ADN) bộ gen được thực hiện theo phương pháp như mô tả trước đây của Zhang *et al.* (2010). Cụ thể, sinh khối nấm mốc được thu thập từ môi trường nuôi cấy PDA sau 7 ngày và nghiền trong nitor lỏng bằng chày sứ. Sau đó, 500 µL đệm chiết xuất CTAB 2% (Sigma-Aldrich, Mỹ) chứa NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM (pH 8), EDTA 20 mM (pH 8) và β-mercaptoethanol 0,2% được thêm vào mẫu. Hỗn hợp được ủ ở 65°C trong 30 phút, thỉnh thoảng đảo nhẹ. Tiếp theo, quá trình tinh chế được thực hiện với dung dịch phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, Sigma-Aldrich, Mỹ), sau đó ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu pha nước. ADN được kết tủa

bằng isopropanol lạnh (-20°C, Merck, Đức), sau đó rửa hai lần bằng ethanol 70% và hòa tan trong 50 µL nước không có nuclease (Invitrogen, Mỹ) [12]. Để khuếch đại phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), 1 µL chiết xuất DNA được sử dụng làm khuôn mẫu. Các môi phổ quát cho vùng gen ITS, cụ thể là ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), đã được sử dụng cho xác định phân tử. Các điều kiện chu kỳ PCR được thiết lập trên máy PCR Bio-Rad T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Mỹ) bao gồm biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, sau đó là 30 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn ở 55°C trong 30 giây và kéo dài

ở 72°C trong 1 phút, với kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. Các sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng bộ tinh sạch FavorPrep™ GEL/PCR (Favorgen, Đài Loan) và phân tích trên gel agarose 1,2%. Các sản phẩm PCR tinh sạch sau đó được giải trình tự và so sánh với trình

tự tham chiếu có sẵn trên NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) để định danh. Sử dụng phần mềm MEGA 11 để xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS rDNA bằng thuật toán Neighbor-Joining với bootstrap 1.000 lần lặp lại [9].

2.7. Phân tích thống kê

Mỗi phép đo được thực hiện ba lần độc lập ($n=3$), kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Sử dụng phần mềm

STATGRAPHICS để phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Duncan các trung bình nghiệm thức.

III. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả phân lập các chủng nấm mốc

Bảng 1. Các chủng nấm mốc được phân lập từ cơm rượu thu thập tại Long Xuyên, An Giang

Chủng nấm mốc	Hình thái khuẩn ty	Quan sát dưới kính hiển vi	Chủng nấm dự đoán
CRMB1, CRMB2, CRMX1, CRMX2, CRMQ1, CRMQ2,	Sợi phát triển dạng sợi màu vàng nhạt pha chút xám chuyển sang màu vàng nâu khi hình thành bào tử.	Các sợi nấm có vách ngăn, cuống bào tử không phân nhánh đầu bào tử hình cầu.	<i>Aspergillus</i> spp.
CRLX1, CRLX2, CRLX3, CRLX4	Sợi nấm mọc vòng tròn trên không, màu trắng, sau đó chuyển sang nâu và sẫm màu khi trải qua quá trình hình thành bào tử.	Sợi nấm không có vách ngăn với các bào tử thẳng mang nhiều bào tử hình cầu.	<i>Mucor</i> spp.
CRBK1, CRBK2, CRMX3, CRMX4	Sợi nấm màu trắng, thon dài và sẫm màu khi trải qua quá trình hình thành bào tử.	Sợi nấm không có vách ngăn, phân nhánh dài với bào tử hình cầu.	<i>Rhizopus</i> spp.

Từ 5 mẫu cơm rượu, nghiên cứu đã phân lập được 14 chủng nấm mốc với đặc điểm hình thái và quan sát kính hiển vi như mô tả ở Bảng 1. Các chủng CRMB1, CRMB2, CRMX1, CRMX2, CRMQ1 và CRMQ2 cho thấy sự phát triển của hệ sợi nấm màu vàng nhạt pha chút xám, dần

chuyển sang màu vàng nâu khi bào tử hình thành. Quan sát dưới kính hiển vi, các sợi nấm có vách ngăn, cuống bào tử không phân nhánh với đầu bào tử hình cầu, cho thấy đặc điểm điển hình của *Aspergillus* spp. Trong khi đó, các chủng CRLX1, CRLX2, CRLX3 và CRLX4

phát triển với hệ sợi mọc thành vòng trên không, ban đầu có màu trắng, sau đó chuyển dần sang nâu và sẫm màu khi bào tử hình thành. Quan sát kính hiển vi cho thấy các sợi nấm không có vách ngăn, bào đài thẳng mang nhiều bào tử hình cầu, đặc trưng của *Mucor* spp. Cuối cùng, các chủng CRBK1, CRBK2, CRMX3 và CRMX4 có hệ sợi màu trắng, dài và trở nên sẫm màu khi bào tử hình thành. Quan

sát kính hiển vi cho thấy sợi nấm không có vách ngăn, phân nhánh dài với bào tử hình cầu, phù hợp với đặc điểm của *Rhizopus* spp. Như vậy, kết quả phân lập từ mẫu cơm rượu cho thấy sự hiện diện của ba nhóm nấm mốc chính là *Aspergillus* spp., *Mucor* spp. và *Rhizopus* spp., trong đó *Aspergillus* spp. có mặt ở nhiều mẫu nhất.

3.2. Sàng lọc ban đầu về khả năng phân giải tinh bột

Bảng 2. Khả năng phân giải tinh bột của các chủng nấm mốc được phân lập từ cơm rượu thu thập tại Long Xuyên, An Giang

Chủng nấm mốc	Đường kính khuẩn lạc* (mm)	Đường kính vùng phân giải* (mm)	Chỉ số phân giải tinh bột** (%)
CRBK1	41,00 ± 1,00 ^d	40,67 ± 2,65 ^a	99,19
CRBK2	9,50 ± 1,00 ^{hij}	4,67 ± 0,58 ^g	31,11
CRLX1	70,50 ± 2,50 ^a	17,67 ± 2,08 ^d	25,06
CRLX2	11,00 ± 1,03 ^{hi}	8,00 ± 1,00 ^f	72,73
CRLX3	9,00 ± 1,00 ^{ij}	6,33 ± 0,58 ^{fg}	70,37
CRLX4	13,33 ± 1,00 ^g	12,33 ± 1,53 ^e	92,50
CRMB1	66,17 ± 1,26 ^b	33,67 ± 1,15 ^b	50,88
CRMB2	36,00 ± 1,00 ^e	35,67 ± 1,53 ^b	99,07
CRMQ1	11,50 ± 1,50 ^{gh}	1,33 ± 0,58 ^h	11,59
CRMQ2	8,50 ± 0,50 ⁱ	7,33 ± 0,58 ^f	86,27
CRMX1	40,50 ± 0,50 ^d	39,00 ± 2,52 ^a	96,30
CRMX2	17,00 ± 1,00 ^f	16,00 ± 2,00 ^d	94,12
CRMX3	45,00 ± 1,30 ^c	30,67 ± 2,52 ^c	68,15
CRMX4	34,00 ± 1,00 ^e	33,67 ± 1,00 ^b	99,02

* Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$, kiểm định Duncan). **Chỉ số phân hủy tinh bột được tính bằng tỷ lệ phần trăm giữa tổng đường kính của vùng phân giải và đường kính khuẩn lạc.

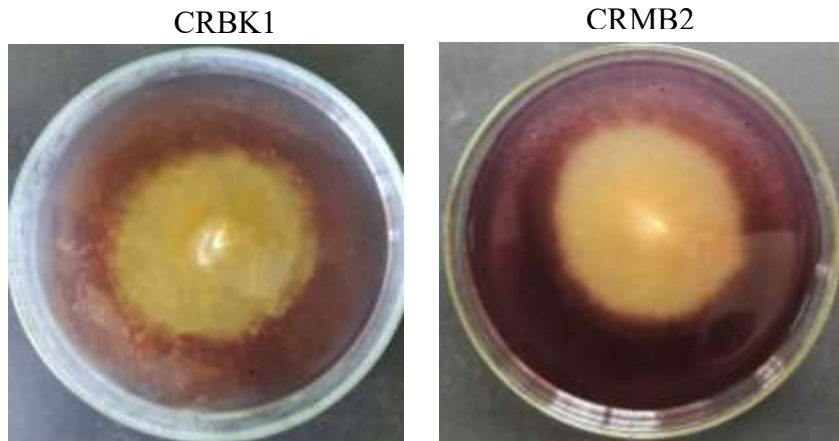
Kết quả phân giải tinh bột của các chủng nấm mốc phân lập từ cơm rượu cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa các chủng về khả năng phát triển sợi nấm, đường kính vùng phân giải và chỉ số phân hủy tinh bột (Bảng 2). Chỉ số phân giải tinh bột phản ánh hiệu suất sản xuất enzyme amylase ngoại bào của nấm mốc trên môi trường rắn chứa tinh bột. Chỉ số phân giải tinh bột càng cao cho thấy vùng

phân giải lớn hơn so với kích thước khuẩn lạc, đồng nghĩa với việc chủng nấm mốc tiết nhiều enzyme amylase ra môi trường và có khả năng phân giải tinh bột mạnh. Trong số các chủng được khảo sát, CRBK1, CRMB2, CRMX1 và CRMX4 có khả năng phân giải tinh bột cao nhất với chỉ số phân giải tinh bột lần lượt là 99,19%, 99,07%, 96,30% và 99,02%, đồng thời cũng có vùng phân giải lớn ($\geq$

33,67 mm). Đặc biệt, CRBK1 có mức tăng trưởng sợi nấm nhanh (41,00 mm) và vùng phân giải rộng nhất (40,67 mm), cho thấy khả năng phân hủy tinh bột mạnh mẽ (Hình 1). Ngược lại, các chủng CRMQ1, CRLX1 và CRBK2 có mức phân hủy tinh bột thấp nhất, với chỉ số lần lượt là 11,59%, 25,06% và 31,11%, đi kèm với vùng phân giải nhỏ ($\leq 17,67$ mm). Các chủng này thể hiện sự phát triển hạn chế và hiệu suất phân hủy tinh bột kém hơn đáng kể so với các chủng có chỉ số cao.

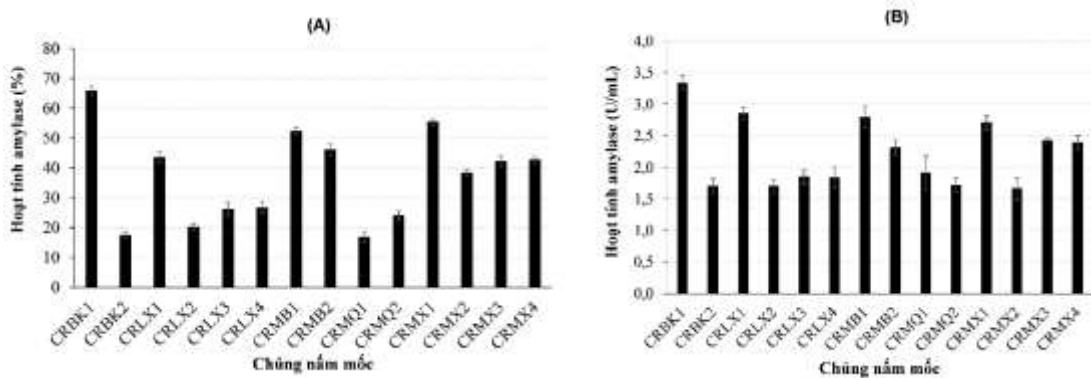
Nhóm các chủng còn lại như CRMX2 (94,12%), CRLX4 (92,50%) và CRMQ2

(86,27%) cũng có khả năng phân giải tinh bột tương đối cao, mặc dù mức độ phát triển sợi nấm và vùng phân giải có sự khác biệt. Tóm lại, trong số các chủng được khảo sát, CRBK1 có chỉ số phân giải tinh bột cao nhất (99,19%), vượt trội hơn so với CRMB2 (99,07%) và CRMX1 (96,30%). Kết quả này cho thấy CRBK1 có hoạt tính amylase mạnh nhất và là ứng viên tiềm năng để nghiên cứu sâu hơn cho các ứng dụng công nghiệp liên quan đến enzyme amylase.



Hình 1. Đường kính vùng phân giải tinh bột của chủng nấm mốc CRBK1 ($d=40,6$ cm) và CRMB2 ($d=35,6$ cm)

3.3. Khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase



Hình 2. Sản xuất amylase của các chủng nấm mốc phân lập từ cơm rượu.

(A) Hoạt tính amylase (%) được xác định dựa trên sự giảm cường độ màu xanh của phức hợp tinh bột-iodine, (B) Hoạt tính amylase (U/mL) được đo thông qua lượng đường khử giải phóng, xác định bằng phương pháp axit dinitrosalicylic. Các chữ cái khác nhau ở đầu cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; kiểm định Duncan)

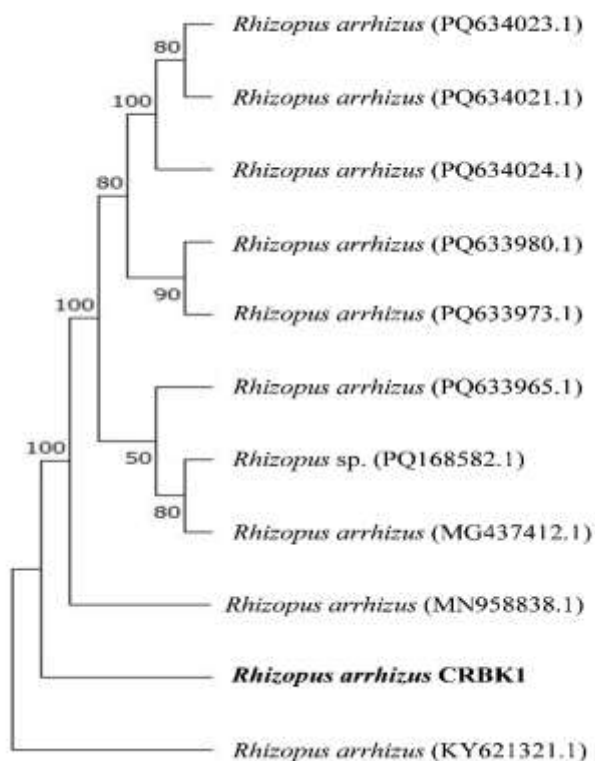
Phân tích hoạt tính amylase (U/mL), kết quả định lượng cho thấy CRBK1 tiếp tục thể hiện khả năng sản xuất amylase cao nhất (~3,5 U/mL). Các chủng CRMB1, CRMB2 và CRMX1 cũng có hoạt tính amylase cao, đạt từ 2,5-3,0 U/mL. Nhóm các chủng CRBK2, CRLX1, CRLX3, CRMQ1 và CRMQ2

có hoạt tính thấp hơn (dưới 2,0 U/mL), cho thấy khả năng sản xuất enzyme hạn chế. Nhìn chung, CRBK1, CRMB1, CRMB2 và CRMX1 là những chủng nấm mốc có tiềm năng cao trong sản xuất amylase, có thể được nghiên cứu và ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm hoặc thủy phân tinh bột.

3.4. Định danh phân tử chủng nấm mốc sinh amylase cao nhất

Kết quả định danh chủng nấm mốc CRBK1, chủng có hoạt tính amylase cao nhất, được xác định dựa trên phân tích trình tự gen ITS. Kết quả BLAST cho thấy chủng CRBK1 có mức độ tương đồng cao nhất với loài *Rhizopus arrhizus*, với tỉ lệ nhận dạng lên tới 96,47 – 96,98% so với các trình tự tham chiếu trên GenBank (PQ633980.1, PQ634024.1,

PQ634021.1, MG437412.1, v.v.). Kết quả cây phát sinh loài Hình 3 ghi nhận chủng CRBK1 được nhóm cùng với các chủng *R. arrhizus* trong cây phát sinh loài. Nhánh chứa CRBK1 có độ hỗ trợ cao, chứng tỏ mối quan hệ gần gũi với loài *R. arrhizus* hơn so với các loài *Rhizopus* khác như *Rhizopus* sp. hoặc *R. oryzae*.



Hình 3. Cây phát sinh loài của chủng nấm mốc CRBK1 được xây dựng bằng cách so sánh trình tự gen ITS rDNA sử dụng phần mềm MEGA 11 với phần trăm giá trị bootstrap (1.000 lần lặp lại)

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này đã thành công trong việc phân lập và xác định nhiều chủng nấm mốc từ cơm rượu, một sản phẩm lên men nổi tiếng với sự đa dạng sinh học phong phú. Trong số các chủng phân lập, các thành viên thuộc chi *Rhizopus*, *Aspergillus*, và *Mucor* đã được tìm thấy, trong đó *Rhizopus* là chi chiếm ưu thế với hoạt tính amylase mạnh. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó cho thấy các loài *Rhizopus* đóng vai trò quan trọng trong quy trình lên men truyền thống, đặc biệt là trong quá trình thủy phân tinh bột [13]. Sự chiếm ưu thế của *Rhizopus* trong quá trình lên men cơm rượu có khả năng là do khả năng tiết ra các enzyme thủy phân mạnh mẽ, giúp phân hủy tinh bột thành các đường lên men một cách hiệu quả. Quan sát này cũng nhất quán với mô tả của Lennartsson *et al.* (2014) [3] đã báo cáo rằng các loài *Rhizopus* đóng góp đáng kể vào quá trình chuyển đổi tinh bột thành đường trong sản xuất thực phẩm và đồ uống lên men, đặc biệt là ở Đông Nam Á.

Kết quả sàng lọc khả năng sản xuất amylase cho thấy tất cả các chủng phân lập đều có hoạt tính enzyme, tạo ra các vùng trong suốt trên môi trường tinh bột. Đặc biệt, chủng CRBK1 thể hiện hoạt tính amylase cao hơn đáng kể so với các chủng khác, với khả năng phân giải tinh bột rõ rệt. Hầu hết các nghiên cứu về amylase từ nấm mốc, đặc biệt trong các ứng dụng thương mại, chủ yếu tập trung vào các loài *Aspergillus*, có thể do sự phổ biến rộng rãi và yêu cầu dinh dưỡng không khắt khe của chúng [14]. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã chỉ ra rằng các loài *Rhizopus*, cụ thể là CRBK1, được phân lập từ mẫu cơm rượu, sản xuất amylase cao hơn so với *Aspergillus*. Giống với nghiên cứu này, Ayogu và Amadi (2009) đã phân lập *Rhizopus nigricans*, loài này cũng sản xuất một

lượng amylase đáng kể trong môi trường đơn giản trong môi trường đơn giản là ngô nghiền luộc [15].

Chủng sản xuất amylase mạnh nhất, CRBK1, đã được xác định là *R. arrhizus* thông qua phân tích phân tử. Loài này nổi tiếng với khả năng enzym đa dạng, đặc biệt trong việc sản xuất amylase, protease và lipase [13,16]. Hoạt tính amylolytic mạnh mẽ của nó cho thấy vai trò quan trọng trong quá trình đường hóa của lên men cơm rượu truyền thống. Ngoài ra, khả năng phân hủy tinh bột hiệu quả của *R. arrhizus* CRBK1 gợi ý rằng nó có thể được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực công nghệ sinh học khác nhau. Các enzyme thu được từ các loài *Rhizopus* đã được ứng dụng rộng rãi trong ngành thực phẩm, sản xuất bia và bioethanol nhờ khả năng thủy phân tinh bột thành đường lên men [17]. Trong nghiên cứu này, chủng CRBK1 được xác định thuộc loài *Rhizopus arrhizus*, nổi bật với khả năng sản xuất amylase mạnh mẽ. So với các chủng nấm mốc khác, CRBK1 thể hiện hoạt tính amylolytic cao hơn, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong quá trình thủy phân tinh bột. Hơn nữa, khi so sánh với các chủng *Aspergillus* đã biết có khả năng sinh amylase cao (hoạt tính amylase là 30,8%) [10], CRBK1 có thể là một lựa chọn thay thế hiệu quả nhờ vào hoạt tính mạnh (hoạt tính amylase là 70%) và sự thích nghi tốt với điều kiện lên men truyền thống. Điều này gợi ý rằng CRBK1 có thể được khai thác để phát triển enzyme amylase ứng dụng trong công nghiệp một cách bền vững và hiệu quả hơn.

Với hoạt tính amylase mạnh được quan sát thấy ở *R. arrhizus* CRBK1, tiềm năng ứng dụng của nó là rõ ràng. *R. arrhizus* được công nhận là một vi sinh vật lên men công nghiệp quan trọng và đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược

phẩm Hoa Kỳ (FDA) cấp trạng thái Được công nhận chung là An toàn (GRAS) [13]. Tuy nhiên, vẫn cần có những nghiên cứu tiếp theo để tối ưu hóa quy trình sản xuất và ứng dụng amylase từ *R. arrhizus*. Các yếu tố như thành phần cơ chất, điều kiện lên men và quy trình tinh chế enzyme cần được khám phá nhằm nâng cao hiệu suất và độ ổn định. Bên cạnh đó, việc đánh giá hiệu suất của chủng này trong các quy trình công nghiệp quy mô lớn sẽ cung cấp

cái nhìn sâu sắc về khả năng ứng dụng thực tiễn của nó. Nghiên cứu về các đặc điểm di truyền và sinh hóa của amylase từ *R. arrhizus* cũng có thể mở ra cơ hội cho việc cải thiện chủng và kỹ thuật enzyme. Cuối cùng, nghiên cứu này nhấn mạnh tầm quan trọng của sự đa dạng vi sinh vật trong quá trình lên men truyền thống và những đóng góp tiềm năng của nó đối với những tiến bộ công nghệ sinh học.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phân lập và đánh giá khả năng sinh enzyme amylase của các chủng nấm mốc từ cơm rượu. Kết quả cho thấy chủng CRBK1, được định danh là *R. arrhizus*, có hoạt tính amylase cao nhất, đạt ~70% và 3,5 U/mL trong điều kiện nuôi cấy sử dụng môi trường dịch tinh bột ở pH 6,9, nuôi ở 30°C trong 3 ngày với tốc độ lắc 200 vòng/phút, vượt trội so với các chủng khác. Điều này khẳng định tiềm năng ứng dụng của *R. arrhizus* (CRBK1) trong các ngành công nghiệp thực phẩm và sản xuất bioethanol. Việc sử dụng nguồn nấm mốc tự nhiên từ

cơm rượu có thể là một hướng đi triển vọng trong sản xuất enzyme amylase, giúp tận dụng nguồn vi sinh vật bản địa để tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp enzyme. Trong tương lai, các nghiên cứu tiếp theo nên tập trung vào việc tối ưu hóa điều kiện lên men để tăng sinh tổng hợp amylase, cũng như đánh giá tính ổn định enzyme amylase trong môi trường công nghiệp thực tế. Đồng thời, nghiên cứu sâu hơn về các đặc tính sinh hóa của enzyme amylase từ *R. arrhizus* sẽ giúp làm rõ cơ chế hoạt động và cải thiện hiệu suất thủy phân tinh bột.

Lời cảm ơn

Bài báo là một phần kết quả luận văn thạc sĩ của học viên Võ Phương Mai. Tác giả cảm ơn sự giúp đỡ của Khu Thí

nghiệm – Thực hành Trường Đại học An Giang đã hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

1. Hoàng Tuấn Thanh, Huỳnh Quốc Huy, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Lưu Minh Châu, Nguyễn Ngọc Thanh, Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong. Khảo sát chất lượng và phân lập nấm men, nấm mốc từ cơm rượu được sản xuất ở Thành phố Cần Thơ. *CTU Journal of Science*. 2024;60:461-472.
2. Dung NTP, Rombouts FM, Nout MJR. Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men). *LWT - Food Science and Technology*. 2007;40 (1):130-135.
3. Lennartsson PR, Taherzadeh MJ, Edebo L. Rhizopus. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, edited by Batt CA and Tortorello ML. 2014:284-290. Oxford, Academic Press.
4. Nguyễn Huy Thuần, Lê Thị Hạnh, Trần Đăng Khánh, Nguyễn Văn Giang. Đặc điểm sinh học của một số chủng nấm mốc phân lập từ bánh men rượu Thanh Hóa. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 2021;19 (3):322-330.
5. Beltagy EA, Abouelwafa A, Barakat KM. Bioethanol production from immobilized amylase produced by marine *Aspergillus flavus* AUMC10636. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2022;48 (4):325-331.

6. Saleem A, Ebrahim MKH. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for Science*. 2014;8 (2):90-97.
7. Constantine J. Alexopoulos CWM, Meredith M. *Introductory Mycology*. Wiley India Pvt. Limited. 2007.
8. Ogbonna J, Ominyi M, Nwoba E, Ge, Nwagu K, Ke, R U. Isolation of alpha amylase and glucoamylase producing fungi and their application in bioethanol production. *International Journal of Science and Nature*. 2013;4:44-50.
9. Roongrojmongkhon N, Rungjindamai N, Vatanavicharn T, Ochaikul D. Isolation and identification of fungi with glucoamylase activity from Loog-pang-khao-mak (A Thai traditional fermentation starter). *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2020;14 (1):233-247.
10. Omemu A, Bamigbade G, Obadina A, Obuotor T. Isolation and screening of amylase from moulds associated with the spoilage of some fermented cereal foods. *British Microbiology Research Journal*. 2015;5:359-367.
11. Al-Qodah Z. Production and characterization of thermostable alpha-amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnology journal*. 2006;1:850-857.
12. Zhang Y-J, Zhang S, Liu X, Wen HA, Wang M. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in Applied Microbiology*. 2010;51:114-118.
13. Wan B, Tian T, Xiong Y, Wang S, Luo X, Liao W, Liu P, Miao L, Gao R. Isolation and evaluation of *Rhizopus arrhizus* strains from traditional rice wine starters (*Jiuqu*): Enzyme activities, antioxidant capacity, and flavour compounds. *Foods*. 2025;14(2):312.
14. Oyewale M. Statistical analysis of growth and amylase production by *Aspergillus flavus* grown on different carbon sources. *Fountain Journal of Natural and Applied Sciences*. 2013;2(1):39-44.
15. Ayogu TE, Amadi ES. Amylase production by *Rhizopus nigricans* using mashed maize. *The Internet journal of microbiology*. 2009;8(1):1-4.
16. Lopes PHS, Pasin TM, Benassi VM, Nelson DL, Oliveira TBd, Polizeli MdLTdM. Standardization of the cultivation of *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial residues: High production of amylases in pineapple peel. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2024;67:1-9.
17. Londoño Hernández L, Toro C, Ruiz H, Ascacio-Valdés J, Aguilar M, Rodriguez R, Aguilar C. *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 2017;257:110-127.