

DOI:10.22144/ctu.jsi.2016.033

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN XỬ LÝ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH ENZYME AMYLASE VÀ PROTEASE TỪ *Aspergillus oryzae* TRÊN KOJI NẤM BÀO NGU (*Pleurotus SPP.*)

Nguyễn Thị Ngọc Giang và Nguyễn Minh Thủy

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 24/10/2016

Title:

Production of enzyme by *Aspergillus oryzae* on oyster mushroom koji as affected by treatment conditions and wheat flour supplement

Từ khóa:

Amylase, *Aspergillus oryzae*, koji, nấm bào ngư, protease

Keywords:

Amylase, *Aspergillus oryzae*, koji, oyster mushroom, protease

ABSTRACT

The manufacture of most fermented sauce involves two fermentation stages - the koji stage and the moromi stage. Fermented sauce has been widely used as one of the main seasoning agents in Asian countries. Koji describes the preparation in which selected species of mold are grown on cooked materials. Koji serves as a source of enzymes that breakdown or hydrolyze natural plant constituents into simpler compounds. Koji for soy sauce is made from steamed oyster mushroom (*Pleurotus Spp.*) and wheat flour addition, with *Aspergillus oryzae* used as koji starter. Enzymes produced by *Aspergillus oryzae* play an important role in koji stage, which is one of two steps of fermentation process. Using oyster mushroom, the study aimed to investigate the influence of steaming temperature and time (80, 90, 100°C and 0, 2, 4, and 6 min, respectively) and wheat flour supplement (0, 10 and 20%) on amylase and protease activities during koji stage. The results showed that the highest activities of amylase and protease were immediately obtained (0 min – the sample was taken at the temperature has just reached 90°C) when oyster mushroom was steamed at 90°C and 10% of wheat flour was added. The highest amylase and protease activities were 37.12 and 8.90 Unit/g of dry weight. Moreover, increase of enzyme activities on koji correlated with growth of this mold. The spores of *Aspergillus oryzae* (growth of mold through the formation of mycelium on koji surfaces) were formed after 30 hours of cultivation period. Additionally, the highest amylase and protease activities were also shown in this stage (62.45 and 13.25 Unit/g of dry weight, respectively).

TÓM TẮT

Công nghệ sản xuất hầu hết các loại nước chấm lên men thường bao gồm hai giai đoạn: giai đoạn koji và giai đoạn moromi. Nước chấm lên men cũng là loại thực phẩm được sử dụng rộng rãi như một gia vị chính ở các nước châu Á. Thuật ngữ koji diễn tả quá trình chuẩn bị dòng nấm mốc có thể phát triển được trên các loại nguyên liệu nấu chín. Koji cũng chính là nguồn enzyme có thể phân giải hoặc thủy phân các thành phần phức tạp trong thực vật thành những dạng đơn giản hơn. Các enzyme được sinh ra từ nấm mốc *Aspergillus oryzae* đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn koji. Nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian hấp (80, 90, 100°C và 0, 2, 4, 6 phút, tương ứng) nấm bào ngư *Pleurotus spp.* cùng với tỷ lệ bột mì bổ sung (0, 10, 20%) đến hoạt tính enzyme amylase và protease trong giai đoạn koji. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt tính enzyme amylase và protease cao nhất (37,72 và 8,90 đv/g chất khô, tương ứng) khi hấp nấm bào ngư ở nhiệt độ 90°C tại thời điểm mẫu vừa đạt được nhiệt độ 90°C – 0 phút cùng với lượng bột mì bổ sung 10%. Hơn nữa, sự tăng hoạt tính enzyme có liên quan đến sự phát triển của nấm mốc. Sự phát triển của nấm mốc (thông qua việc hình thành sợi nấm trên bề mặt môi trường) được tìm thấy ở 30 giờ nuôi cấy. Cũng trong thời gian này, hoạt tính enzyme amylase và protease sinh ra được tìm thấy cao nhất, tương ứng là 62,45 và 13,25 đv/g chất khô.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Ngọc Giang và Nguyễn Minh Thủy, 2016. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý đến khả năng sinh enzyme amylase và protease từ *Aspergillus oryzae* trên koji nấm bào ngư (*Pleurotus spp.*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 1): 147-155.

1 GIỚI THIỆU

Lên men koji là bước đầu tiên trong quá trình sản xuất nước chấm lên men. *Aspergillus oryzae* là chủng có khả năng biến đổi tinh bột thành đường tạo cho sản phẩm có vị ngọt. Nấm mốc này khi mọc có màu vàng nên dân gian hay gọi là mốc hoa cau (Nguyễn Đức Lượng, 2006). Nấm mốc *Aspergillus oryzae* là tác nhân chủ yếu lên men trong sản xuất nước tương theo phương pháp vi sinh vật (Nguyễn Thị Hiền, 2006). Trong quá trình lên men koji, nấm mốc *Aspergillus oryzae* sinh ra các enzyme amylase, invertase, maltoase, protease và catalase có khả năng phân giải tinh bột và protein thành đường và acid amin, tương ứng (Ward *et al.*, 2006; Trần Xuân Ngạch, 2008). Hơn nữa, nấm mốc *Aspergillus oryzae* có kiểu gen đặc trưng và được xem là một sinh vật an toàn cho sản xuất thực phẩm vì không sản sinh độc tố aflatoxin (Machida *et al.*, 2005).

Trong lên men truyền thống, lên men cơ chất rắn (SSF) là thích hợp cho nấm mốc phát triển bởi độ ẩm thấp và cho phép các khuẩn ty của nấm xâm nhập vào cơ chất (Chancharoonpong *et al.*, 2012). Độ ẩm thấp trong môi trường rắn làm cho vi sinh vật có khả năng sản xuất ra enzyme (Ruijter *et al.*, 2002). Thành phần môi trường có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả thu nhận enzyme. Xử lý nguyên liệu là giai đoạn rất quan trọng trong quá trình sản xuất nước chấm lên men, xử lý tốt hay xấu sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng mốc giống, độ ngấu của dịch, cuối cùng ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm và hiệu suất tận dụng nguyên liệu (Ngọc Văn Đậu, 1983). Nấu chín nguyên liệu giúp các chất đậm dễ dàng chịu tác động của các enzyme trong mốc hơn. Thời gian và nhiệt độ khi nấu nguyên liệu có ảnh hưởng đến màu sắc và vị của nước tương thành phẩm, thời gian nấu càng dài nước tương có màu càng sậm (Nguyễn Thị Hiền, 2006). Vì vậy, khi hấp cần chú ý đến nhiệt độ hấp, thời gian hấp để nguyên liệu có hàm lượng nước thích hợp và mềm hóa đầy đủ. Nếu hấp với thời gian quá lâu và nhiệt độ quá cao thì protein trở thành chất mà enzyme không phân giải được và làm cho các acid amin bị phân hủy. Đối với tinh bột, nếu không hấp đúng qui định sẽ không chuyển thành dạng α mà là dạng β làm cho mốc không sử dụng được (Ngọc Văn Đậu, 1983). Lựa chọn tỷ lệ bột mì bổ sung sẽ ảnh hưởng đến hàm lượng các chất dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy (nguồn C, nguồn N, chất cảm ứng, chất khoáng) và ảnh hưởng tới hoạt tính enzyme được tạo ra bởi nấm mốc. Bột mì được phối trộn sẽ là nguồn tinh bột mà mốc sử dụng làm nguồn thức ăn để sinh trưởng và phát triển mạnh. Sự phát triển mạnh của mốc

giống sẽ lấn át các loại tạp mốc khác xâm nhập và phát triển, giúp cho độ thủy phân cao hơn.

Nấm ăn nói chung và nấm bào ngư nói riêng là loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, hàm lượng protein chỉ sau thịt, cá, bao gồm các acid amin tan trong nước và các acid amin thiết yếu như lysine, tryptophan, các acid amin chứa nhóm lưu huỳnh. Nấm còn giàu các chất khoáng và chứa một lượng lớn các vitamin quan trọng. Thành phần các chất dinh dưỡng chính của một số loài nấm bào ngư bao gồm: carbohydrate và protein là thành phần chính, chiếm từ 70 đến 90% trọng lượng khô quả thể, tro~10% chứa nhiều loại chất khoáng. Trong đó, chất béo có hàm lượng thấp trong hầu hết các loài và dao động trong khoảng 1 - 2% (Lê Xuân Thám, 2010).

Hoạt tính enzyme là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng sinh enzyme của nấm mốc *Aspergillus oryzae* trên các môi trường có các độ ẩm khác nhau. Mục tiêu của nghiên cứu là xác lập được nhiệt độ và thời gian hấp nấm cùng với tỷ lệ bột mì bổ sung phù hợp cho môi trường nuôi cấy *Aspergillus oryzae*, nhằm sản sinh enzyme protease và amylase có hoạt tính cao nhất ứng dụng trong sản xuất nước chấm lên men.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chuẩn bị nguyên liệu cho quá trình lên men koji

Nấm bào ngư sau khi thu hoạch (tại khu thực nghiệm Trường Đại học An Giang) được loại bỏ gốc rễ, rửa sạch và làm ráo. Nấm bào ngư được cắt nhỏ và sử dụng ngay. Bột mì đa dụng Meizan được rang vàng ở 80°C trong 15 phút. Nấm mốc *Aspergillus oryzae* (0,02%/nấm bào ngư) được sử dụng (nguồn này được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ).

2.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí với 3 nhân tố và lặp lại 3 lần, bao gồm (i) Nhiệt độ hấp: 80, 90, 100°C; (ii) thời gian hấp: 0, 2, 4, 6 phút và (iii) hàm lượng bột mì: 0, 10, 20%.

2.3 Phương pháp thực hiện

200 g nấm bào ngư hấp ở các nhiệt độ 80, 90 và 100°C ở các mức thời gian 0, 2, 4 và 6 phút. Bột mì rang vàng và được phối trộn 0, 10, 20% vào nấm bào ngư đã hấp. 0,4 g mốc (0,02%) cho vào phối trộn đều và đem ủ mốc koji ở 28 – 32°C. Trong quá trình nuôi mốc, hoạt độ enzyme protease và α -amylase được xác định theo thời gian nuôi. Lấy mẫu sau mỗi 6 giờ và phân tích hoạt độ của

enzyme protease và α -amylase. Tiến trình lấy mẫu kết thúc khi hoạt độ enzyme giảm.

2.4 Các chỉ tiêu theo dõi

Hoạt tính enzyme amylase (đv/g), hoạt tính enzyme protease (đv/g) và hàm ẩm (%).

2.5 Phương pháp phân tích

2.5.1 Phương pháp xác định hoạt độ enzyme α -amylase (Hà Duyên Tư, 2013)

Một đơn vị hoạt độ amylase được biểu diễn bằng lượng men có khả năng xúc tác thủy phân 1 g tinh bột trong 1 giờ ở điều kiện nhiệt độ 30°C và pH = 4,7 – 4,8. Mật độ quang học của dung dịch được đo trên máy so màu với chiều dài lớp chất lỏng là 1 cm và bước sóng $\lambda = 656$ nm. Hiệu số mật độ quang học giữa dung dịch kiểm chứng và dung dịch thí nghiệm sẽ tương ứng với lượng tinh bột đã chịu tác dụng của amylase.

2.5.2 Phương pháp xác định hoạt độ enzyme protease (Lê Thanh mai và ctv., 2005)

Phương pháp này dựa trên cơ sở thủy phân casein bởi enzyme có trong dung dịch chế phẩm nghiên cứu. Định lượng acid amin được tạo thành trong phản ứng thủy phân bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin. Dựa vào đồ thị chuẩn của tyrosin để tính lượng sản phẩm tương ứng do enzyme xúc tác tạo nên. Đơn vị hoạt độ protease là lượng enzyme chuyển hóa được một lượng caseinat natri thành dạng không bị kết tủa bởi acid tricloacetic tương đương với 1 μ mol tyrosin ở 30°C trong thời gian 1 phút. Một mol tyrosin bằng 0,181 mg.

2.5.3 Xác định độ ẩm (TCVN 5610 – 2007)

Thực hiện bằng phương pháp sấy mẫu ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi, độ ẩm W(%) được tính theo công thức:

$$W(\%) = \frac{(m_{cd} - m_{cc}) \times 100}{m}$$

Với m_{cd} là khối lượng mẫu và cốc trước khi sấy (g), m_{cc} là khối lượng mẫu và cốc sau khi sấy (g) và m là khối lượng mẫu (g)

2.6 Phân tích số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion 16.1, Excel.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ hấp, thời gian hấp nấm bào ngư và hàm lượng bột mì bổ sung đến khả năng sinh enzyme (amylase và protease) của nấm mốc *Aspergillus oryzae*

So sánh khả năng sinh enzyme của nấm mốc *Aspergillus oryzae* trên các môi trường có các độ

ẩm khác nhau có thể dựa vào hoạt tính enzyme amylase và protease của các mẫu nấm bào ngư được xử lý ở các mức độ khác nhau về nhiệt độ hấp, thời gian hấp và tỷ lệ bột mì bổ sung. Hàm ẩm của khối nguyên liệu, hoạt tính enzyme amylase và protease sinh ra trong quá trình lên men koji được cho ở Bảng 1.

Kết quả thu nhận được cho thấy trong cùng nhiệt độ hấp và thời gian hấp nấm bào ngư, khi tăng tỷ lệ bột mì thì hàm ẩm của khối nguyên liệu giảm và thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (mức ý nghĩa 5%). Mặt khác, hoạt tính amylase sinh ra tăng cao khi hàm lượng bột mì bổ sung 10 và 20% (không khác biệt ý nghĩa ở hai tỷ lệ này) và hoạt tính protease thể hiện cao với hàm lượng bột mì bổ sung 10% và mẫu không bổ sung bột mì (0%) (không thể hiện rõ sự khác biệt ý nghĩa ở mức 5% giữa hai mức độ này). Khi độ ẩm tăng cao hơn 70% sẽ làm giảm độ thoáng khí, tuy nhiên nếu độ ẩm thấp hơn 50% thì sẽ kìm hãm sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật cũng như quá trình sinh enzyme (Nguyễn Đức Lượng, 2004). Thực tế cho thấy, khi không bổ sung bột mì, hàm ẩm của khối nguyên liệu luôn lớn hơn 70%. Do đó, tỷ lệ bột mì bổ sung 10% được xem là phù hợp. Kết quả này cũng phù hợp với tài liệu của Nguyễn Thị Hiền (2006) là phối trộn 10% bột mì vào 90% khô đậu và cho thêm 60 – 75% nước so với khối lượng trên.

Độ ẩm là yếu tố quan trọng trong quá trình nuôi cấy nấm mốc để thu nhận enzyme. Kết quả phân tích thể hiện đồng thời ở Bảng 1 cho thấy, hàm ẩm của khối nguyên liệu giảm khi tăng nhiệt độ hấp và khác biệt ở mức ý nghĩa 5% giữa các mẫu hấp ở 80°C so với mẫu hấp 90 và 100°C.

Đồng thời, khi thời gian hấp là 4 phút thì hàm ẩm là thấp nhất và khác biệt ở ý nghĩa 5% so với các thời gian hấp còn lại. Nấm bào ngư là loại nguyên liệu giàu protein (30,4 g/100 g nấm khô (FAO, 1972)) nên khi hấp dưới tác dụng của nhiệt sẽ giảm thể tích và trọng lượng (Lê Mỹ Hồng, 2005).

Kết quả thu nhận cho thấy, hoạt tính enzyme amylase sinh ra trong quá trình nuôi mốc cao nhất ở thời điểm nấm hấp vừa đạt nhiệt độ 90°C (0 phút). Hoạt tính enzyme protease sinh ra cao nhất ở nhiệt độ hấp 90°C và khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% khi thời gian hấp là 0 phút (vừa đạt nhiệt độ cần thiết được bổ tri) và hấp 4 phút.

Vì vậy, thí nghiệm tiếp theo được thực hiện với các khoảng nhiệt độ 50 đến 100°C (cách nhau 10°C) khi mẫu vừa đạt được nhiệt độ thí nghiệm với tỷ lệ bột mì bổ sung là 10%. Kết quả phân tích

được thể hiện ở Bảng 2. Hoạt tính enzyme là chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng sinh enzyme của nấm mốc trên các môi trường có độ ẩm khác nhau. Kết quả phân tích cho thấy, hoạt tính enzyme sinh ra (amylase và protease) khi mẫu vừa đạt nhiệt độ hấp là 90°C là cao nhất. Vì vậy,

nguyên liệu được xử lý ở điều kiện hấp nấm khi mẫu vừa đạt nhiệt độ 90°C (ký hiệu là 0 phút), tỷ lệ bột mì bổ sung 10% là môi trường thích hợp cho nấm mốc *Aspergillus oryzae* phát triển sinh enzyme (amylase và protease) với hoạt tính cao nhất.

Bảng 1: Hàm ẩm của khối nguyên liệu, hoạt tính enzyme amylase và protease sinh ra theo tổ hợp các nhân tố (nhiệt độ hấp, thời gian hấp và tỷ lệ bột mì bổ sung)*

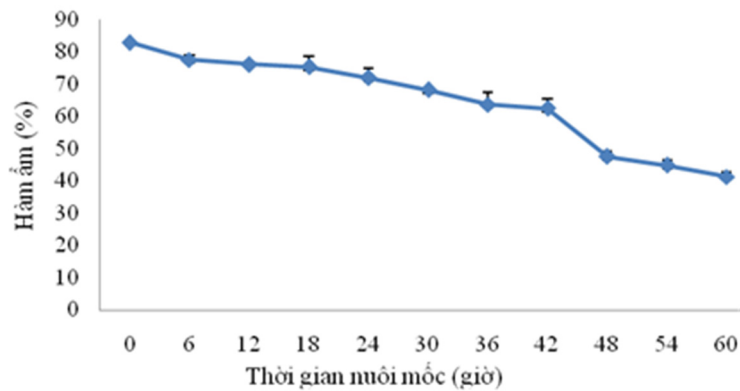
Thức	Nhiệt độ hấp (°C)	Thời gian hấp (phút)	Bột mì (%)	Ẩm (%)	Hoạt tính enzyme (đv/g chất khô)	
					Amylase	Protease
1	80	0	0	71,00 ^l	16,55 ^{ijk}	0,82 ^{ab}
2	80	0	10	60,82 ^{gh}	27,64 ^r	0,75 ^a
3	80	0	20	57,67 ^{ef}	27,26 ^r	0,98 ^{abc}
4	80	2	0	82,14 ^{qr}	11,85 ^{cd}	1,12 ^{abcd}
5	80	2	10	69,84 ^{kl}	11,88 ^{cd}	1,00 ^{abc}
6	80	2	20	61,82 ^{ghi}	12,75 ^{def}	1,20 ^{abcd}
7	80	4	0	77,33 ^{no}	13,66 ^{fg}	4,25 ^{ijklm}
8	80	4	10	63,45 ^{ij}	20,83 ^{op}	7,45 ⁿ
9	80	4	20	52,51 ^c	16,77 ^{kl}	4,98 ^{lm}
10	80	6	0	79,70 ^{pq}	8,24 ^a	1,34 ^{abcd}
11	80	6	10	67,94 ^k	17,26 ^l	1,80 ^{abcdef}
12	80	6	20	59,91 ^{gh}	15,71 ^{hij}	1,721 ^{abcde}
13	90	0	0	81,88 ^{qr}	13,58 ^{efg}	3,54 ^{hijkl}
14	90	0	10	65,01^j	36,81^v	8,90ⁿ
15	90	0	20	53,36 ^c	34,07 ^u	3,27 ^{fghij}
16	90	2	0	74,84 ^m	19,09 ⁿ	3,95 ^{ijklm}
17	90	2	10	53,31 ^c	15,89 ^{hij}	3,42 ^{ghijk}
18	90	2	20	53,07 ^c	18,81 ⁿ	1,93 ^{abcdef}
19	90	4	0	68,51 ^k	21,67 ^p	2,26 ^{bcdefgh}
20	90	4	10	56,70 ^e	30,66 ^s	5,41 ^m
21	90	4	20	47,94 ^b	32,10 ^t	2,12 ^{abcdefgh}
22	90	6	0	77,32 ^{no}	23,63 ^q	2,37 ^{abcde}
23	90	6	10	59,65 ^{fg}	15,41 ^h	1,78 ^{abcde}
24	90	6	20	54,37 ^{cd}	12,08 ^{cd}	1,74 ^{abcde}
25	100	0	0	82,62 ^r	12,58 ^{de}	2,22 ^{bcdefgh}
26	100	0	10	62,07 ^{hi}	12,82 ^{def}	2,02 ^{bcdefg}
27	100	0	20	52,88 ^c	14,23 ^g	2,26 ^{bcdefgh}
28	100	2	0	78,23 ^{nop}	16,62 ^{jkl}	1,83 ^{abcdef}
29	100	2	10	60,53 ^{gh}	20,53 ^o	2,52 ^{defghi}
30	100	2	20	48,94 ^b	11,19 ^{bc}	1,72 ^{abcde}
31	100	4	0	76,89 ^{mn}	15,66 ^{hi}	4,85 ^{klm}
32	100	4	10	56,00 ^{de}	10,31 ^b	2,33 ^{cdefgh}
33	100	4	20	43,42 ^a	14,23 ^g	1,87 ^{abcdef}
34	100	6	0	79,51 ^{op}	18,51 ^m	2,85 ^{efghij}
35	100	6	10	65,13 ^j	18,71 ⁿ	1,89 ^{abcdef}
36	100	6	20	52,73 ^c	20,98 ^{op}	1,83 ^{abcdef}

Bảng 2: Thay đổi hoạt tính enzyme amylase và protease sinh ra khi thay đổi nhiệt độ hấp (50 – 100°C) ở thời điểm mẫu vừa đạt nhiệt độ thí nghiệm, bột mì bổ sung 10%

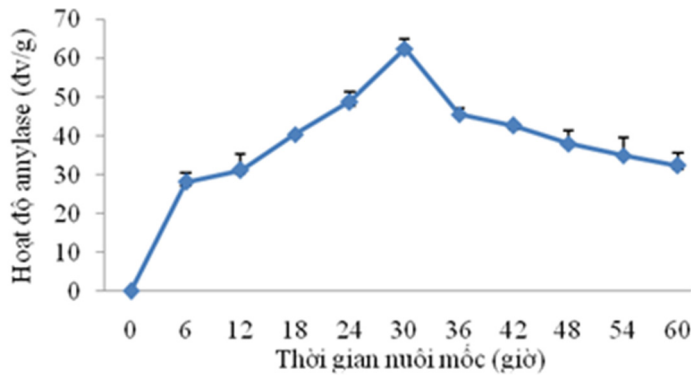
Mẫu	Nhiệt độ hấp (°C)	Hoạt tính enzyme (đv/g chất khô)	
		Amylase	Protease
1	50	8,85 ^a	0,72 ^a
2	60	29,40 ^c	0,56 ^a
3	70	27,05 ^{bc}	0,65 ^a
4	80	24,31 ^b	1,00 ^a
5	90	38,18 ^d	9,37 ^c
6	100	12,34 ^a	2,67 ^b

3.2 Thay đổi hàm ẩm, hoạt tính enzyme amylase và protease theo thời gian lên men koji

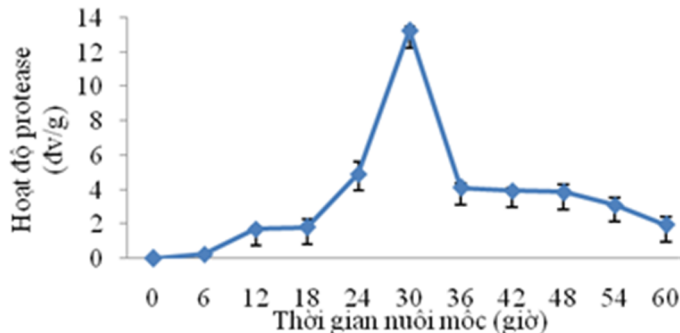
Để tìm hiểu rõ hơn về quá trình lên men koji, nghiên cứu sẽ theo dõi sự thay đổi hàm ẩm của khối môi trường, hoạt tính enzyme (amylase và protease) sinh ra theo thời gian lên men koji ở điều kiện xử lý nguyên liệu là hấp nầm ở thời điểm mẫu vừa đạt nhiệt độ 90°C và tỷ lệ bột mì bổ sung là 10%. Quá trình nuôi mốc (hay còn gọi là quá trình lên men koji) nhằm thu nhận chất lượng và số lượng enzyme cao (Nguyễn Thị Hiền, 2006). Kết quả thu nhận được thể hiện ở Hình 1, Hình 2 và Hình 3.



Hình 1: Thay đổi hàm ẩm của khối koji trong quá trình nuôi mốc



Hình 2: Thay đổi hoạt độ amylase trong quá trình nuôi mốc



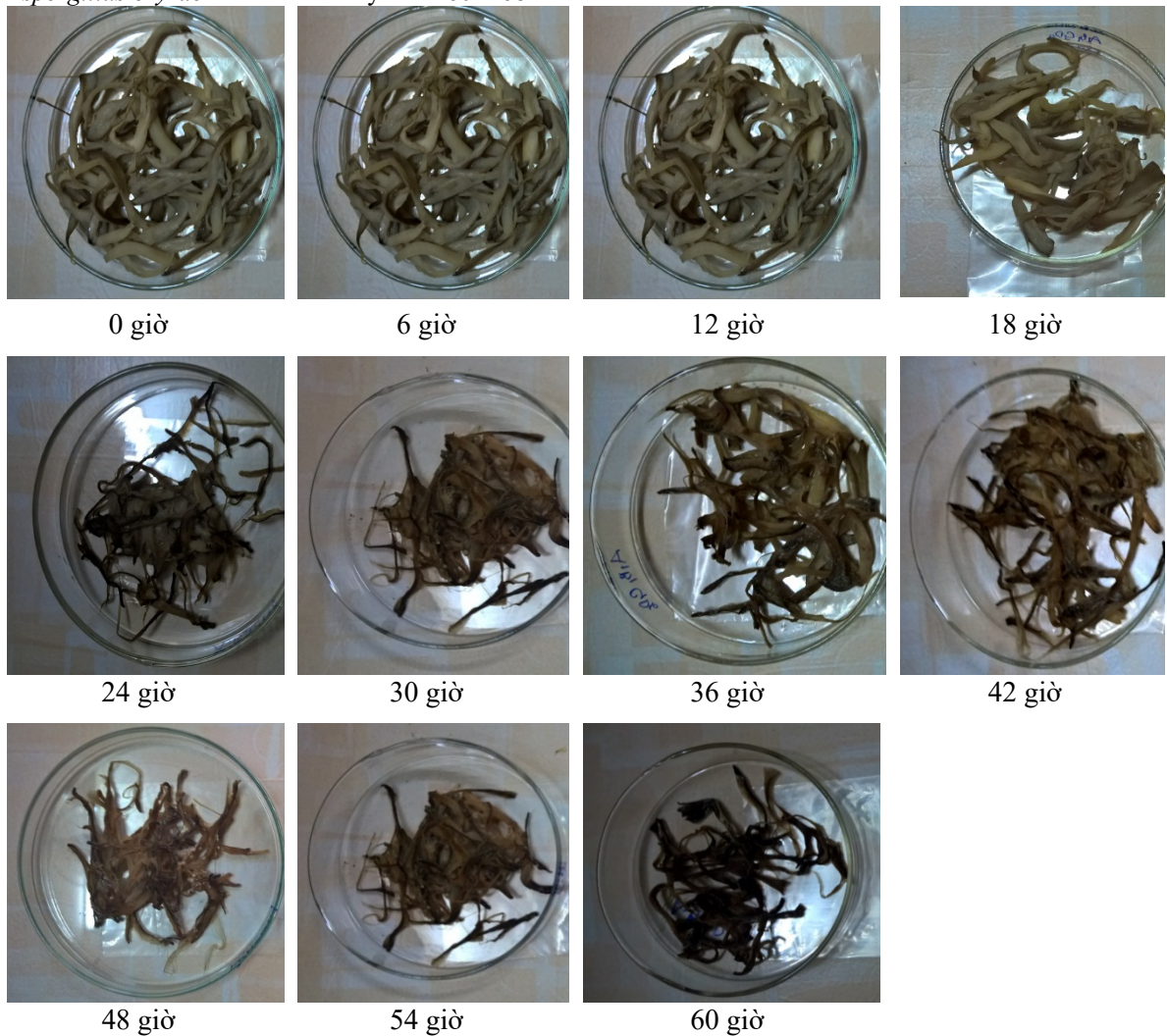
Hình 3: Thay đổi hoạt độ protease trong quá trình nuôi mốc

Kết quả thể hiện ở Hình 1 cho thấy hàm ẩm của khối môi trường giảm dần theo thời gian nuôi mốc. Trong khi đó, dữ liệu được trình bày ở Hình 2 và 3 lại cho thấy hoạt tính enzyme amylase và protease sinh ra tăng nhanh chóng và đạt cao nhất ở thời điểm 30 giờ của quá trình nuôi mốc. Sau đó, hoạt tính enzyme giảm dần. Hoạt tính enzyme amylase sinh ra cao nhất là 62,45 đv/g, của enzyme protease là 13,25 đv/g, tương ứng với hàm ẩm khối nguyên liệu là 68,26%. Kết quả này cũng phù hợp với tài liệu của Ngạc Văn Dầu (1983), Lê Ngọc Tú (2002), Nguyễn Đức Lượng (2004), Nguyễn Thị Hiền (2006) là độ ẩm thích hợp để nấm mốc *Aspergillus oryzae* hình thành enzyme là 60 – 68%

và thời gian sinh enzyme cao từ 30 – 42 giờ. Do đó, thời gian nuôi mốc được xác định là 30 giờ để nấm mốc *Aspergillus oryzae* sinh enzyme (amylase và protease) có hoạt tính cao.

3.3 Sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc *Aspergillus oryzae* trong quá trình lên men koji

Sự gia tăng hoạt tính enzyme cũng liên quan đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm mốc *Aspergillus oryzae* (Chancharoonpong *et al.*, 2012). Sự sinh trưởng của nấm mốc *Aspergillus oryzae* ở các tỷ lệ bổ sung bột mì khác nhau (0, 10, 20%) được thể hiện ở Hình 4, Hình 5 và Hình 6.



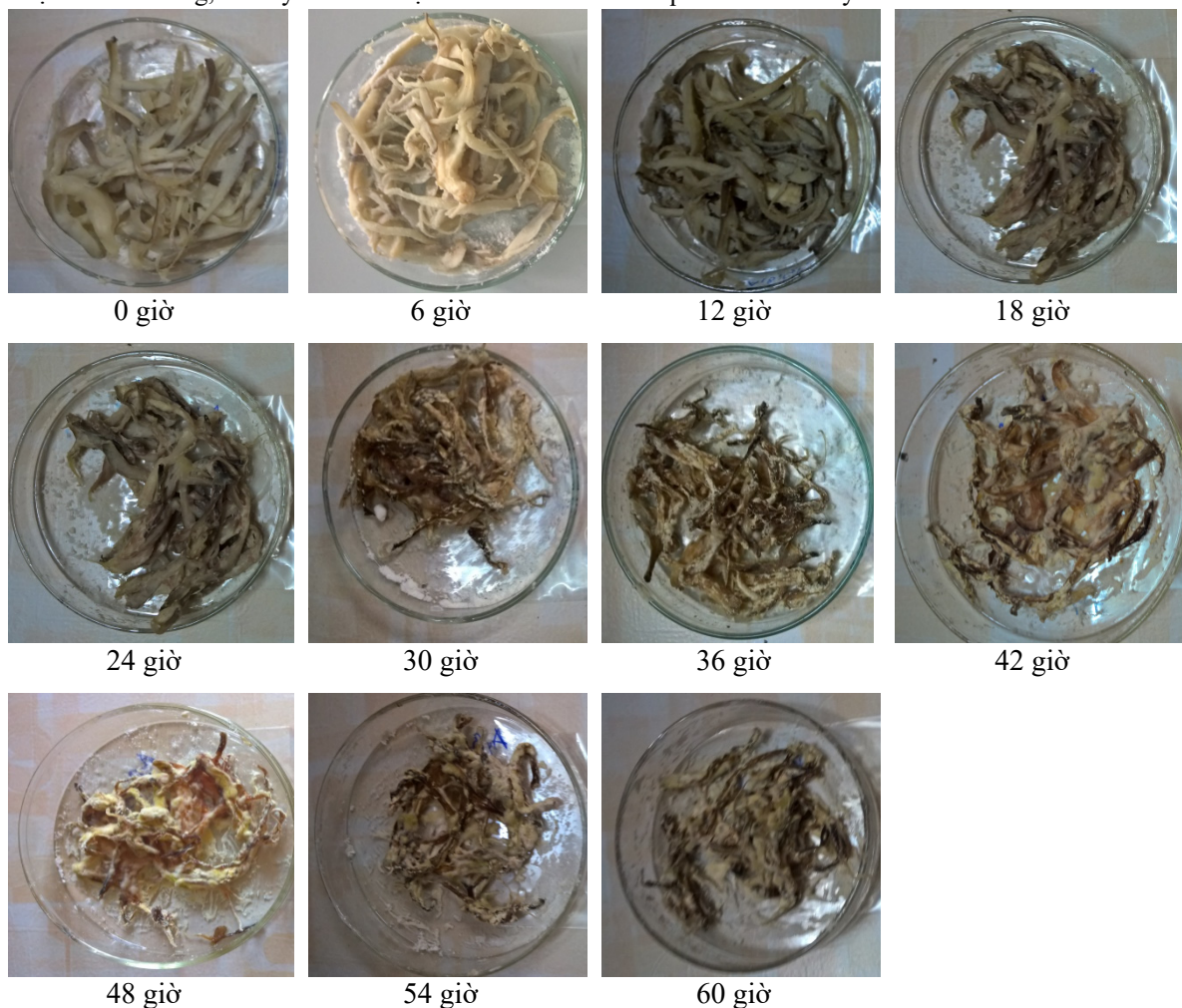
Hình 4: Sự phát triển của mốc *Aspergillus oryzae* theo thời gian nuôi mốc ở mẫu đối chứng (không bổ sung bột mì)

Hình 4 cho thấy trên môi trường đối chứng (không có bổ sung bột mì), ở 18 giờ nuôi cấy bắt đầu xuất hiện những đốm trắng trên môi trường. Những đốm trắng xuất hiện nhiều hơn ở những giờ nuôi cấy tiếp theo và sự bung tơi của nấm mốc rất

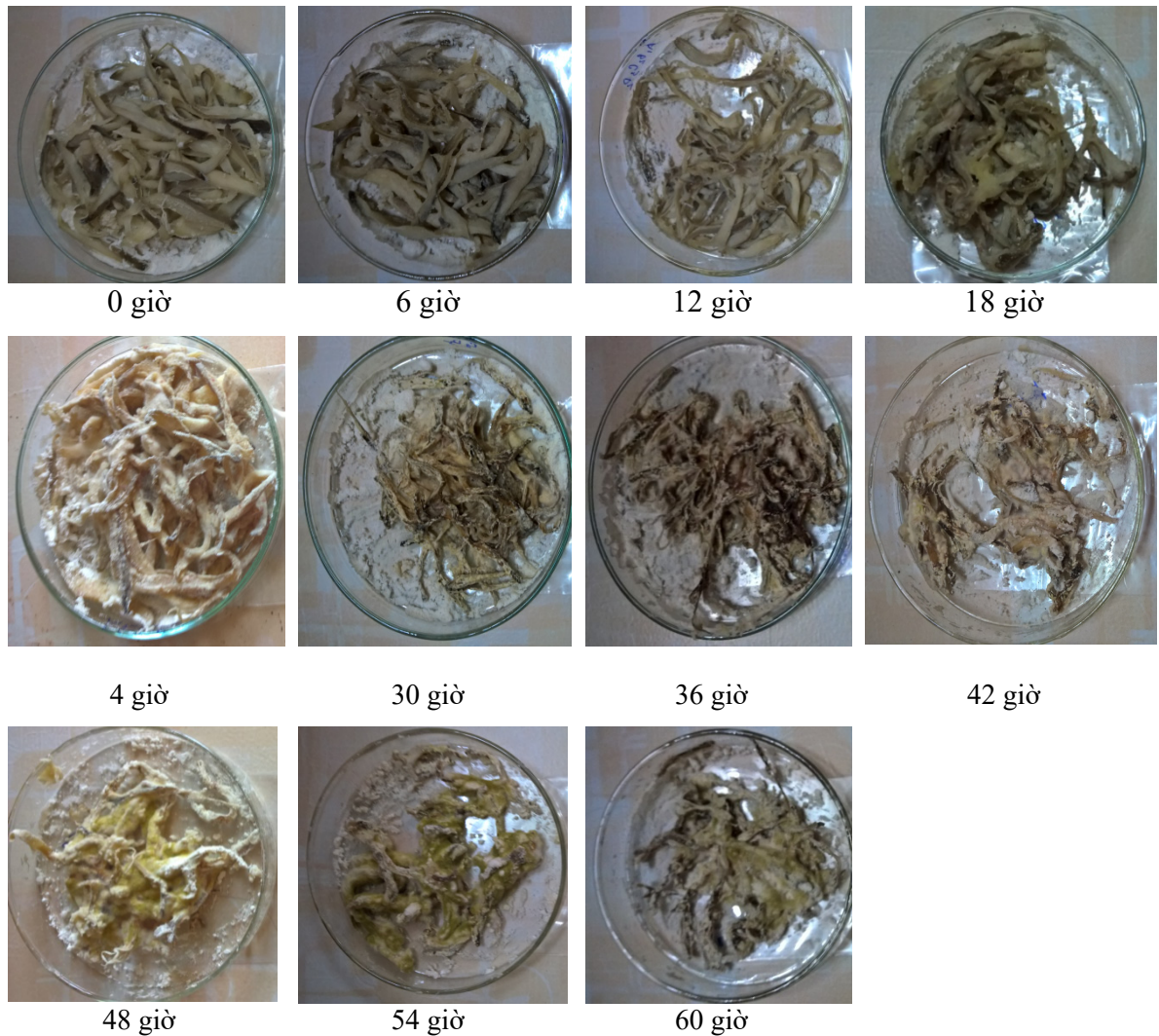
ít. Những đốm trắng biến mất ở 54 giờ nuôi cấy. Quan sát không thấy có sự hình thành bào tử ở các mẫu môi trường đối chứng (không bổ sung bột mì). Hình 5 và Hình 6 cho thấy không có sự hình thành sợi nấm cũng như bào tử ở 18 giờ nuôi cấy.

nấm bắt đầu mọc ở 24 giờ nuôi cấy và ở 30 giờ thì sợi nấm lan ra rộng trong khối môi trường có bổ sung 10 và 20% bột mì. Bào tử nấm mốc chuyển màu vàng hoa cau bắt đầu ở 48 giờ nuôi cấy. Kết quả này cho thấy rằng, sự hình thành sợi nấm và bào tử có liên quan đến sự sinh enzyme của nấm mốc và liên quan đến tỷ lệ bột mì bổ sung. Tinh bột là nguồn carbon của nhiều chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzyme (Nguyễn Đức Lương, 2004). Mặt khác, kết quả thống kê ở Bảng 1 cho thấy hoạt tính enzyme sinh ra cao ở tỷ lệ bột mì bổ sung 10%. Sự hình thành sợi nấm, bào tử và hoạt tính enzyme cao đều được tìm thấy ở 30 – 48 giờ nuôi cấy. Kết quả cũng được chứng minh tương tự trong thí nghiệm của Narahara *et al.* (2012). Lý do đã được báo cáo rằng, chu kỳ vô tính hoặc hình thành

bào tử có liên quan đến việc sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp, như enzyme và acid hữu cơ (Ward *et al.*, 2006). Bên cạnh đó, sự phát triển của nấm mốc cũng cho thấy mối quan hệ tương phản với độ ẩm. Nấm mốc *Aspergillus oryzae* sử dụng nước trên bề mặt khối môi trường để sinh trưởng và tạo ra sợi nấm, hình thành bào tử (Lương Đức Phẩm, 2010). Sự tạo bào tử là hiện tượng không mong muốn vì thường làm giảm hoạt tính enzyme. Sự tạo enzyme cực đại thường kết thúc khi nấm mốc bắt đầu sinh đĩnh bào tử (Nguyễn Đức Lương, 2004). Như vậy, sự phát triển của nấm mốc (thông qua việc hình thành sợi nấm trên bề mặt môi trường) trên môi trường bổ sung tinh bột 10% và enzyme sinh ra có hoạt tính cao nhất được tìm thấy ở thời điểm 30 giờ của quá trình nuôi cấy.



Hình 5: Sự phát triển của mốc *Aspergillus oryzae* theo thời gian nuôi mốc với lượng bột mì bổ sung 10%



Hình 6: Sự phát triển của mốc *Aspergillus oryzae* theo thời gian nuôi mốc với lượng bột mì bổ sung 20%

4 KẾT LUẬN

Hoạt tính enzyme là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng sinh enzyme của nấm mốc *Aspergillus oryzae* trên các môi trường có các độ ẩm khác nhau. Kết hợp điều kiện xử lý nấm bào ngư với hàm lượng bột mì bổ sung nhằm xác định được môi trường thích hợp để nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus oryzae* sinh trưởng và phát triển sinh enzyme amylase và protease có hoạt tính cao. Koji thu được trong giai đoạn này được sử dụng tiếp tục trong quá trình lên men moromi để rút ngắn giai đoạn thủy phân trong sản xuất nước chấm lên men từ nấm bào ngư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chancharoonpong C., Hsieh P., Sheu S., 2012. Production of enzyme and growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji. 2(4):2-5. doi:10.7763/IJBBB. V2.106.

Hà Duyên Tư, 2013. Phân tích hóa học thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.

Food and Agriculture Organization (FAO), 1972. Food composition table for use in East Asia. Food Policy and Nutrition Div., Food Agric. Organ. U.N.

Lê Mỹ Hồng, 2005. Giáo trình Công nghệ chế biến thực phẩm đóng hộp. Trường Đại học Cần Thơ.

Lê Ngọc Tú, 2002. Hóa sinh công nghiệp. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng, Lê Thị Lan Chi, 2005. Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Lê Xuân Thám, 2010. Nấm bào ngư *Pleurotus spp.* Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Lương Đức Phẩm, 2010. Giáo trình công nghệ lên men. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

Machida M., Asai K., Sano M., Tanaka T., Kumagai T., Terai G., Kusumono K., Arima T., Akita O.,

- Kashiwagi Y., 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature 438, 1157 - 1161.
- Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Pichangkura S., Ueda R., Taguchi H., 1982. Growth and enzyme production in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. J. Ferment Technol; 60: 311-9.
- Ngọc Văn Đậu, 1983. Chế biến đậu nành và lạc thành thức ăn giàu protein. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Nguyễn Đức Lương, 2004. Công nghệ enzyme. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Đức Lương, 2006. Công nghệ vi sinh Tập 3: Thực phẩm lên men truyền thống. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thị Hiền, 2006. Công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩm lên men cổ truyền. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Ruijter G., Biesebeke R., Rahardjo Y.S.P., Hoogschagen M.J., Heerikhuisen M., Levin A., 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations progress report on a multi-disciplinary Project. *FEM Yeast Research*, vol.2, pp. 245-248.
- Trần Xuân Ngạch, 2008. Công nghệ enzyme. Đại học Bách Khoa Đà Nẵng.
- Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J., and Singh A., 2006. Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. App. Microbiol*, vol.58, pp. 1-55.