

XÁC ĐỊNH CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY THÍCH HỢP ĐỂ SẢN XUẤT GIỐNG KHỞI ĐỘNG TỪ NẤM MỐC *RHIZOPUS ORYZAE* WENT VÀ PRINSEN *GEERLINGS*

Determine of Appropriate Cultural Growth Conditions for Production of Starter Culture from *Rhizopus oryzae* Went and Prinsen *Geerlings*

Lê Minh Nguyệt¹, Nguyễn Trường Thành¹, Nguyễn Thị Thanh Loan²

¹*Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

²*Sinh viên K51 ngành Bảo quản chế biến, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Địa chỉ email tác giả liên lạc: nguyetlmh@yahoo.com

Ngày gửi đăng: 26.04.2011; Ngày chấp nhận: 22.06.2011

TÓM TẮT

Giống khởi động là nguồn cung cấp vi sinh vật thuần chủng để sản xuất các sản phẩm lên men truyền thống ổn định chất lượng và đảm bảo an toàn. Trong giống khởi động có chứa các bào tử nấm mốc và hệ các enzyme thủy phân được tạo thành trong quá trình nấm mốc sinh trưởng. Thí nghiệm đã xác định được các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự tạo thành thành bào tử và sinh tổng hợp enzym protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings nhằm xây dựng quy trình sản xuất giống khởi động phục vụ cho sản xuất chao. Cụ thể là đã xác định được nguồn cơ chất thích hợp cho sản xuất giống khởi động từ nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings là bột ngô hoặc bột đậu tương; tỷ lệ phối trộn với bột gạo là 60/40. Nguyên liệu được hấp khử trùng, làm nguội, trải thành lớp mỏng 2 cm, tiếp giống bằng hỗn dịch bào tử có mật độ 2.10^7 bt/ml với tỷ lệ là 2 ml dịch giống/ 100 g môi trường nuôi cấy. Thời gian nuôi cấy là 54 h có đảo trộn 1 lần sau 24h. Sau khi nuôi cấy thu được chế phẩm thô, nhằm bảo toàn hoạt lực enzym và bào tử sống của giống khởi động nên sấy đông khô (-45°C) hoặc ở 40°C bằng tủ sấy thường đến khi đạt độ ẩm là 10%.

Từ khóa: Giống khởi động, nấm mốc, *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings.

SUMMARY

A starter culture is a source of pure microorganisms used to produce traditional fermented products of high quality, stability, and safety. The starter culture contains spores and hydrolysis enzymes produced during mold growth. This work was conducted to determine the appropriate cultural growth conditions for *Rhizopus oryzae* and biosynthesis of the protease enzymes, and then set up a manufacturing process for the starter culture which can be used to produce the fermented product from tofu. The microorganism was most successfully cultured with corn or soybean meal and rice flour in a 60/40 ratio. The flour mixture was autoclaved, spread to a height of 2 cm followed by the addition of the spore suspension with a density of 2.10^7 bt/ml at a rate of 2 ml of spores/100 g culture medium. Incubation lasted 54 h with a turning at 24h. After incubation, spores and enzymes were preserved through freeze drying (-45°C) or oven drying (40°C) until a moisture of 10% was reached.

Key words: Mold, *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings, starter culture.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, các sản phẩm thực phẩm lên men chủ yếu được sản xuất bằng kỹ thuật lên men truyền thống, sử dụng các vi sinh vật có sẵn trong tự nhiên nên rất dễ bị nhiễm tạp các vi sinh vật không mong muốn, đặc biệt là các loại nấm mốc sinh độc tố gây nguy hiểm cho người sử dụng (Nguyễn Hữu Phúc, 1998). Do đó, việc nghiên cứu để sử dụng các chủng nấm mốc thuần chủng vào sản xuất các sản phẩm lên men truyền thống ở nước ta là rất cần thiết.

Từ một lượng nhỏ mốc giống ban đầu qua quá trình nhân giống người ta sẽ thu được “giống khởi động”. Giống khởi động còn được gọi là “mốc giống” hay “hoa mốc”. Mục đích chính của quá trình sản xuất giống khởi động là tạo điều kiện thuận lợi cho nấm mốc sinh trưởng và phát triển trên cơ chất để làm nguồn cung cấp vi sinh vật cho quá trình sản xuất sau này. Ngoài ra trong giống khởi động còn có một lượng các enzym nhất định mà nấm mốc sinh tổng hợp được trong quá trình phát triển, do đó giống khởi động còn đóng vai trò quan trọng trong việc thủy phân tinh bột và protein của nguyên liệu, cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật và tạo hương cho sản phẩm cuối cùng.

Tùy thuộc vào mỗi loại sản phẩm mà người ta sử dụng các loại giống khởi động được sản xuất từ các loại nấm mốc khác nhau. Để sản xuất chao (đậu phụ lên men) người ta sử dụng giống khởi động làm từ nấm mốc *Mucor*, *Rhizopus*, *Actionomucor*... vì các giống nấm mốc này có màu trắng đục, trắng ngà không làm ảnh hưởng tới màu sắc của sản phẩm; hệ sợi nấm mảnh nhưng dài có khả năng tạo thành một lớp màng mỏng xung quanh miếng đậu chao, có tác dụng giữ hình dáng miếng chao tốt (Nguyễn Hữu Phúc, 1998); có khả năng sinh enzym protease; chỉ hình thành bào tử sau một khoảng thời gian nuôi cấy nhất định...

Thí nghiệm này được tiến hành nhằm xác định các điều kiện nuôi cấy thích hợp để sản xuất ra giống khởi động tốt từ nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings nhằm phục vụ cho quá trình sản xuất chao.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings đã được phân lập từ đậu tương thối hỏng và bánh men, sau đó được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử tại Phòng thí nghiệm về Nấm học, Trường Đại học Catholique de Louvain, Vương quốc Bỉ (MUCL).

Bố trí thí nghiệm

Sử dụng phương pháp thay đổi một nhân tố, các nhân tố khác giữ nguyên, sau khi chọn được giá trị thích hợp của nhân tố đó thì giá trị này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Các thí nghiệm được bố trí để nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố như nguồn nguyên liệu, mức độ thoáng khí, thời gian nuôi cấy, tỷ lệ giống nấm mốc cấy vào, sự đảo trộn trong quá trình nuôi, chế độ sấy... đến hoạt tính, nhằm xác định các điều kiện nuôi cấy thích hợp. Điều kiện tiến hành thí nghiệm ban đầu là 100 g cơ chất được khử trùng và làm chín có độ ẩm 55% trải thành lớp mỏng 3 cm trên khay inox, được làm nguội và tiếp giống bằng cách dùng xylanh hút 2 ml hỗn dịch bào tử giống (2.10^7 bào tử/ml) rồi phun đều lên lớp nguyên liệu, nhiệt độ nuôi cấy là 30°C, thời gian nuôi cấy là 48h, không đảo trộn. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cơ chất đối với khả năng sinh tổng hợp enzym protease và khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings được tiến hành trên bốn loại môi trường khác nhau là

bột gạo, bột sắn, bột đậu tương và bột ngô, các loại bột được bổ sung 15% trấu nhằm tạo độ thoáng khí.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian đến khả năng tổng hợp enzyme protease và khả năng hình thành bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings thí nghiệm nuôi cấy chủng này trong những khoảng thời gian khác nhau tương ứng là 36h, 42h, 48h, 54h, 60h.

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy vào đến khả năng sinh tổng hợp enzyme protease và khả năng tạo bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings được tiến hành cấy nấm mốc này với lượng giống mốc cấy vào khác nhau lần lượt là 1ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml hỗn dịch bào tử nấm mốc (2.10^7 bào tử/ml)/100 g cơ chất.

Thí nghiệm về ảnh hưởng của mức độ thoáng khí trong môi trường nuôi cấy rắn đến khả năng sinh bào tử và tổng hợp enzyme protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* được tiến hành bằng cách nuôi chủng này trên các lớp môi trường có độ dày khác nhau lần lượt là 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm.

Thí nghiệm về ảnh hưởng của chế độ sấy được tiến hành với 4 công thức, một công thức ở chế độ sấy đông khô và 3 công thức ở tủ sấy với các mức nhiệt độ khác nhau, sấy đến khi mẫu đạt độ ẩm 10%. Mỗi lần sấy 2 kg chế phẩm ướt.

Các chỉ tiêu theo dõi: Hoạt độ enzyme protease, số lượng bào tử và trạng thái hệ sợi nấm mốc.

Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng phương pháp Anson cải tiến để xác định hoạt lực của enzyme protease trong chế phẩm enzyme thô (Lê Thanh Mai và cs., 2005). Xác định số lượng bào tử của nấm mốc bằng phương pháp trực tiếp bằng buồng đếm Gorjaev – Thom (Nguyễn Thành Đạt và cs.,

1990). Xác định số lượng bào tử sống bằng phương pháp gián tiếp: nuôi và đếm số khuẩn lạc trên môi trường PDA (Nguyễn Thành Đạt và cs., 1990).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất cảm ứng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme protease và khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

Enzym protease là enzym cảm ứng điển hình của nấm mốc nói chung và của *Rhizopus* nói riêng. Nguồn cơ chất cảm ứng tốt nhất của enzym protease là các nguồn nitơ hữu cơ như bột ngô, bột mỳ, bột đậu tương...

Số liệu bảng 1 cho thấy rằng khả năng sinh enzym protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings khi nuôi cấy trên môi trường bột ngô ở CT 1.4 là cao nhất (2,58 đv/g) và thấp nhất khi nuôi cấy trên môi trường bột sắn ở CT 1.2 (0,76 đv/g). Đó là do protease là enzym được tổng hợp với cơ chất cảm ứng là nguồn nitơ hữu cơ, bột đậu tương và bột ngô có hàm lượng protein cao hơn so với gạo và bột sắn nên lượng enzym protease tạo thành cao hơn.

Về khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings: khi nuôi cấy trên môi trường bột ngô ở CT 1.4 là cao nhất ($3,23.10^7$ bt/g) và thấp nhất khi nuôi cấy trên môi trường bột sắn ($1,60.10^7$ bt/g). Như vậy, môi trường bột ngô và bột đậu tương đều là những môi trường thích hợp cho sự sinh tổng hợp enzym protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings. Tuy nhiên, xét về tính thông dụng và mục đích của mốc giống là tạo ra nhiều bào tử nên nghiên cứu này đã chọn bột ngô là nguồn cơ chất cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất đến khả năng sinh tổng hợp enzyme protease và khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

CT	Hoạt độ enzym protease (đv/g)	Số lượng bào tử (bt/g)	Mô tả trạng thái hệ mốc giống
CT 1.1	0,88 ^c	1,98.10 ⁷	- Hệ sợi nấm bao phủ kín hạt cơm - Sợi nấm có màu trắng - Đã xuất hiện bào tử
CT 1.2	0,72 ^c	1,60.10 ⁷	- Hệ sợi nấm ngắn, màu trắng - Chưa bao phủ hết bề mặt cơ chất. - Bào tử xuất hiện rất ít
CT 1.3	1,76 ^b	2,66.10 ⁷	- Hệ sợi nấm bao phủ toàn bộ bề mặt cơ chất - Sợi nấm mọc dài, có màu trắng - Có xuất hiện bào tử đen
CT 1.4	2,58 ^a	3,23.10 ⁷	- Hệ sợi nấm bao phủ toàn bộ bề mặt cơ chất - Sợi nấm dài màu trắng - Bào tử đen xuất hiện nhiều
LSD _{0,05}	0,23		

(Trong cùng một cột, các số có chữ cái giống nhau thì không khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$)
CT1.1: Bột gạo; CT1.2: Bột sắn; CT1.3: Bột đậu tương; CT1.4: Bột ngô;

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu

Khả năng tổng hợp sinh khối của vi sinh vật không những phụ thuộc vào mỗi nguồn nitơ mà còn phụ thuộc vào cả tỷ lệ cacbon và nitơ trong môi trường. Tỷ lệ này thích hợp sẽ tạo cho nấm mốc khả năng trao đổi chất, khả năng tích tụ cao các sản phẩm sinh tổng hợp và đặc biệt là sinh bào tử cao. Do đó, ở thí nghiệm này, bột gạo và bột ngô được phối trộn theo các tỷ lệ khác nhau (Bảng 2).

Số liệu cho thấy, khả năng sinh bào tử và khả năng sinh tổng hợp enzyme protease khi nuôi cấy trên môi trường ở công thức 2.1 là cao nhất (4,34.10⁷ bt/g và 3,65 U/g) và ít nhất khi nuôi cấy trên môi trường ở công thức 2.3 (2,78.10⁷ bt/g và 1,56 U/g). Kết quả thí nghiệm chỉ ra môi trường nuôi cấy với tỷ lệ 40% bột gạo và 60% bột ngô là môi trường thích hợp nhất cho sự sinh bào tử và khả năng tổng hợp enzym protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Kết quả cho thấy sau 36h nuôi mốc, khả năng sinh enzym protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

cao nhất (2,47 đv/g) và thấp nhất ở 60h (0,62

đv/g). Thời gian nuôi mốc càng kéo dài thì hoạt độ enzyme trong khối nguyên liệu giảm nhưng ngược lại thì khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings lại tăng. Số lượng bào tử tăng mạnh từ giờ thứ 36 đến giờ thứ 48, từ giờ thứ 54 trở đi thì số lượng bào tử tăng chậm lại. Trong giai đoạn đầu quá trình sinh trưởng của nấm mốc (36h đầu tiên), nấm mốc sẽ thủy phân các nguồn cơ chất để tích lũy sinh khối và khả năng sinh tổng hợp enzym protease là cao nhất (Bảng 3). Khi thời gian càng kéo dài thì hoạt độ của enzym protease càng giảm vì lúc này nấm mốc đã chuyển sang giai đoạn sinh bào tử nhưng số lượng bào tử chỉ tăng nhanh đến một giới hạn nào đó rồi chững lại. Đây là quá trình sản xuất mốc giống nên khả năng sinh bào tử là mục đích chính, vì thế cần quan tâm đến số lượng bào tử nhiều hơn khả năng sinh enzym protease. Số lượng bào tử chênh nhau không nhiều giữa 2 thời điểm 54h và 60h nên có thể kết thúc thời gian nuôi mốc ở giờ thứ 54 hay giờ thứ 60 đều thích hợp. Tuy nhiên, trong sản xuất thì phải quan tâm tính kinh tế, để giảm chi phí sản xuất, mức thời

gian là 54h được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu đến khả năng sinh bào tử và khả năng sinh tổng hợp enzyme protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

CT	Hoạt độ enzym protease (đv/g)	Số lượng bào tử (bt/g)	Mô tả trạng thái mốc giống
CT2.1	3,65 ^a	4,34.10 ⁷	- Hệ sợi nấm dài, màu trắng bao phủ toàn bộ cơ chất - Có bào tử đen
CT2.2	1,95 ^a	3,62.10 ⁷	- Hệ sợi nấm không phát triển cao nữa, đã bắt đầu xẹp xuống - Xuất hiện bào tử đen
CT2.3	1,56 ^b	2,78.10 ⁷	- Sợi nấm màu trắng, bao phủ kín bề mặt cơ chất - Có bào tử đen
LSD _{0,05}	0,85		

(Trong cùng một cột, các số có chữ cái giống nhau thì không khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$)
CT2.1: (40% bột gạo : 60% bột ngô) ; CT2.2: (50% bột gạo : 50% bột ngô) ; CT2.3: (60% bột gạo : 40% bột ngô).

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp enzyme protease và khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

Thời gian nuôi mốc	Hoạt độ enzym protease (đv/g)	Số lượng bào tử (bt/g)	Mô tả trạng thái mốc giống
36h	2,47 ^a	3,55.10 ⁷	- Sợi nấm bao phủ toàn bộ khối cơ chất - Sợi nấm phát triển dài, màu trắng - Đã xuất hiện bào tử
42h	1,92 ^b	5,20.10 ⁷	- Sợi nấm bao phủ toàn bộ khối cơ chất thành dạng bánh - Sợi nấm dài, màu trắng - Bào tử màu đen xuất hiện nhiều
48h	1,05 ^c	7,93.10 ⁷	- Sợi nấm bông xốp, màu trắng, bao phủ kín cơ chất - Bào tử đen xuất hiện nhiều
54h	0,65 ^d	22,5.10 ⁷	- Sợi nấm không phát triển cao nữa - Đã có hiện tượng xẹp xuống - Bào tử đen xuất hiện rất nhiều.
60h	0,62 ^d	27,8.10 ⁷	- Sợi nấm xẹp xuống. - Bào tử xuất hiện rất nhiều tạo thành lớp màu đen trên bề mặt cơ chất.
LSD _{0,05}	0,17		

(Trong cùng một cột, các số có chữ cái giống nhau thì không khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$)

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy đến khả năng sinh tổng hợp enzym protease và khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

Tỷ lệ giống cấy	Hoạt độ enzyme protease (đv/g)	Số lượng bào tử (bt/g)	Mô tả trạng thái mốc giống
1 ml	0,436 ^d	7,63.10 ⁷	- Sợi nấm bắt đầu xẹp xuống. - Sợi nấm bao phủ toàn bộ khối cơ chất, có màu trắng - Nhiều bào tử đen xuất hiện
2 ml	0,681 ^c	32,3.10 ⁷	- Sợi nấm bao phủ kín khối cơ chất - Sợi nấm bắt đầu xẹp xuống - Có rất nhiều bào tử đen
3 ml	0,699 ^b	27,3.10 ⁷	- Sợi nấm bao phủ toàn bộ khối cơ chất - Sợi nấm có hiện tượng xẹp xuống - Bào tử đen xuất hiện
4 ml	1,203 ^a	6,23.10 ⁷	- Sợi nấm xẹp xuống, có màu trắng - Bào tử xuất hiện ít hơn
LSD _{0,05}	0,018		

(Trong cùng một cột, các số có chữ cái giống nhau thì không khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$)
Mật độ bào tử trong giống cấy vào là 2.10^7 bt/ml.

3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy

Kết quả bảng 4 cho thấy, ở các tỷ lệ giống cấy vào khác nhau thì khả năng sinh bào tử của nấm mốc cũng khác nhau. Khi tỷ lệ giống cấy vào môi trường tăng từ 1- 2 ml thì khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings tăng, nếu tiếp tục tăng tỷ lệ giống cấy lên 3 – 4 ml thì khả năng sinh bào tử bắt đầu có xu hướng giảm dần. Bên cạnh đó thì hoạt lực của enzyme protease lại tăng dần khi tỷ lệ giống cấy vào càng nhiều. Hoạt lực enzyme protease cao nhất khi tỷ lệ giống cấy vào 4 ml ($1,203$ đv/g) và thấp nhất khi ở 1 ml giống cấy vào môi trường nuôi cấy ($0,436$ đv/g). Có thể giải thích kết quả này do khi đưa vào môi trường nuôi cấy tỷ lệ giống càng cao thì nấm mốc phát triển hệ sợi nấm, kết thành bánh và phát triển sinh khối nhiều. Nếu giảm tỷ lệ giống sẽ dẫn đến hệ sợi nấm sinh trưởng ở dạng bào tử và giảm hiệu suất hình thành enzyme. Xét mục đích tạo mốc giống thì khả năng sinh bào tử phải nhiều để đảm bảo rằng khi sử dụng giống khởi động cho các sản phẩm lên men, chỉ sử dụng một lượng càng ít càng tốt, vì vậy mức tỷ lệ giống cấy vào là 2 ml hỗn dịch (2.10^7 bào tử/ml) cho 100 g nguyên liệu ở các thí nghiệm tiếp theo đã được chọn.

3.5. Ảnh hưởng của mức độ thoáng khí

Nấm mốc là loại vi sinh vật hô hấp hiếu khí, vì thế mức độ thoáng khí là một trong những ảnh hưởng quan trọng tới sự phát triển của chúng.

Theo số liệu bảng 5, độ dày lớp nguyên liệu khác nhau thì khả năng sinh bào tử và khả năng sinh tổng hợp enzyme của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings là khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Khả năng sinh bào tử và khả năng sinh tổng hợp enzyme cao nhất khi nuôi cấy độ dày lớp nguyên liệu là 2 cm ($5,28.10^8$ bt/g; $0,421$ U/g). Hoạt độ enzyme thấp nhất khi nuôi cấy ở độ dày 4 cm ($2,64.10^8$ bt/g, $0,212$ U/g). Độ dày lớp nguyên liệu càng mỏng thì diện tích mặt thoáng càng lớn và ngược lại. Mặt thoáng rộng thì sự tiếp xúc của nấm mốc với môi trường không khí càng cao, sự hấp thụ oxy càng lớn, sự trao đổi chất diễn ra càng mạnh, sản phẩm tạo ra càng nhiều. Vì vậy độ dày nguyên liệu 2 cm rất thích hợp cho nấm mốc *Rhizopus oryzae* sinh bào tử và enzyme protease. Độ dày nguyên liệu này được lựa chọn để dùng cho thí nghiệm tiếp theo.

3.6. Ảnh hưởng của sự đảo trộn

Khi hệ sợi nấm phát triển rất mạnh trên bề mặt cơ chất rắn sẽ tạo thành bánh hoặc mảng khiến độ thoáng khí trong môi trường giảm, khi có tác động phá vỡ cấu trúc hệ sợi nấm dạng bánh hoặc mảng đó sẽ làm thay đổi trạng thái chung của khối nấm mốc.

Bảng 5. Ảnh hưởng của mức độ thoáng khí đến khả năng sinh tổng hợp enzyme protease và khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

Độ dày lớp nguyên liệu	Hoạt độ enzyme protease (đv/g)	Số lượng bào tử (bt/g)	Mô tả trạng thái mốc giống
2cm	$0,421^a$	$5,3.10^8$	- Sợi nấm bắt đầu xẹp xuống, bao phủ kín toàn bộ khối cơ chất - Bào tử đen dày phủ kín bề mặt
3cm	$0,391^a$	$4,4.10^8$	- Sợi nấm đang xẹp xuống - Bào tử đen rất nhiều
4cm	$0,217^c$ $0,272^b$	$2,6.10^8$ $3,1.10^8$	- Sợi nấm đã xẹp xuống - Bào tử đen lốm đốm trên bề mặt cơ chất - Sợi nấm màu trắng phủ kín khối cơ chất

5cm		- Rất nhiều bào tử đen
LSD _{0,05}	0,027	

(Trong cùng một cột, các số có chữ cái giống nhau thì không khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$)

Bảng 6. Ảnh hưởng của sự đảo trộn đến khả năng sinh tổng hợp enzyme protease và khả năng sinh bào tử của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

CT	Hoạt độ enzyme protease (đv/g)	Số lượng bào tử (bt/g)	Mô tả trạng thái mốc giống
CT 6.1	0,115 ^a	5,7 . 10 ⁸	- Sợi nấm màu trắng bao phủ toàn bộ khối cơ chất - Có nhiều bào tử đen
CT 6.2	0,477 ^a	7,7 . 10 ⁸	- Sợi nấm ngắn, màu trắng, mọc từng cụm - Bào tử đen mọc dày đặc phủ kín bề mặt khối cơ chất
CT 6.3	0,246 ^a	6,8 . 10 ⁸	- Hệ sợi nấm màu trắng, ngắn, thưa thớt - Bào tử đen lốm đốm
LSD _{0,05}	0,02		

(Trong cùng một cột, các số có chữ cái giống nhau thì không khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$)
CT 6.1: Không đảo trộn; CT 6.2: Đảo trộn 1 lần sau 24h; CT 6.3: Đảo trộn 2 lần sau 24h và 48h

So sánh 3 công thức với các mức độ đảo trộn khác nhau thì khả năng sinh bào tử và khả năng tổng hợp enzyme protease của nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings là không khác nhau với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$ (Bảng 6). Số lượng bào tử và hoạt độ enzyme là cao nhất khi đảo trộn 1 lần ở CT 6.2 (7,68.10⁸ bt/g; 0,477 U/g). Ở CT 6.1, khi không đảo trộn thì số lượng bào tử và hoạt độ enzym là thấp nhất (5,76.10⁸ bt/g; 0,115U/g).

Do cấu tạo hệ sợi nấm không phân nhánh, sợi nấm khi sinh phát triển dài, phát triển lan tràn, tạo bánh sau một thời gian phát triển sinh khối. Sau 24h nuôi cấy, hệ sợi nấm còn chưa phát triển chưa ổn định nên chưa tạo độ vững chắc, vì vậy khi đảo trộn sẽ phá vỡ sự ổn định của cấu trúc hệ sợi, sau đó những sợi gãy đó tiếp tục phát triển một pha mới nên sẽ kéo dài thời gian sinh trưởng và phát triển, vì vậy số lượng bào tử và khả năng sinh tổng hợp enzyme được tăng lên so với khi không đảo trộn. Ở CT 6.3, lần đảo trộn thứ 2 sau 48h nuôi cấy và kết thúc thí nghiệm sau 54h, khi đó hệ sợi nấm

bị phá vỡ cấu trúc lần thứ hai nên chưa đủ thời gian để nó phát triển ổn định sang một pha mới. Vì vậy số lượng bào tử tuy có nhiều hơn so với khi không đảo trộn nhưng lại thấp hơn khi đảo trộn 1 lần. Thí nghiệm đã chọn chế độ đảo trộn 1 lần sau 24h nuôi mốc.

3.7. Ảnh hưởng của chế độ sấy

Giống khởi động thu được sau khi nuôi cấy có độ ẩm khoảng 55%, nếu chưa được sử dụng ngay, thường được sấy khô đến độ ẩm khoảng 8 – 10%, loại bỏ trấu đựng trong các bao polyetylen hoặc giấy chống ẩm để dùng dần cho sản xuất.

Khả năng sống sót của bào tử sau khi sấy cao nhất khi chế phẩm được sấy đông khô (25,4%) và thấp nhất khi sấy ở nhiệt độ 50°C (6,8%) bằng tủ sấy thường (Bảng 7). Tương tự như vậy, hoạt độ enzym protease sau khi sấy còn lại cao nhất khi chế phẩm được sấy ở chế độ sấy đông khô (96,5%) và thấp nhất khi sấy ở 50°C bằng tủ sấy thường (54,3%). Khi chế phẩm được sấy bằng tủ sấy thường ở nhiệt độ 40°C (83,89%) thì hoạt độ enzym sau khi sấy cao nhất. Hoạt độ enzym của chế phẩm khi sấy ở các mức nhiệt độ

khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức $\alpha = 5\%$. Nguyên nhân ở đây là do khi sấy đông khô, quá trình sấy được thực hiện ở nhiệt độ sấy rất thấp (dưới -45°C) với áp suất chân

không nên quá trình làm khô nhanh, sự biến tính protein của tế bào vi sinh vật, trong đó kể cả sự phá huỷ của hệ thống enzyme có thể coi là rất ít, ở mức thấp nhất.

Bảng 7. Ảnh hưởng của chế độ sấy tới hoạt tính của enzyme protease và khả năng sống của bào tử nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings

Chế độ sấy	Hoạt độ enzyme protease (% so với trước khi sấy)	Số lượng bào tử sống (% so với trước khi sấy)	Mô tả trạng thái giống khởi động sau khi sấy
Sấy đông khô (-45°C)/15h	96,5 ^a	25,4	- Chế phẩm sấy xong vẫn giữ nguyên màu sắc của sợi nấm màu trắng. - Chế phẩm bông xốp, nhiều bào tử. - Cơ chất cùng sợi nấm bị biến màu, không giữ được màu sắc của sợi nấm
40 $^{\circ}\text{C}$ /24h	83,9 ^b	19,9	- Chế phẩm có màu vàng, và màu đen của bào tử
45 $^{\circ}\text{C}$ /20h	65,9 ^c	13,6	- Chế phẩm có màu vàng sẫm sau khi sấy
50 $^{\circ}\text{C}$ /17h	54,3 ^d	6,8	- Chế phẩm có màu sẫm hơn trước khi sấy
LSD _{0,05}	4,0		

(Trong cùng một cột, các số có chữ cái giống nhau thì không khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 5\%$)

Mặt khác trong quá trình đông khô một số lớn vi sinh vật bị chết, nhưng tỷ lệ của vi sinh vật sống sót còn khoảng 5 – 30%, khi cho nước vô phẩm vào vật phẩm đông khô thì phục hồi được môi trường chứa vi sinh vật, giữ nguyên vẹn toàn bộ khả năng sinh phát triển và những đặc tính trao đổi chất của vi sinh vật. Còn khi sấy bằng tủ sấy thường, do sấy ở nhiệt độ cao, thời gian sấy kéo dài, sự phá huỷ của hệ thống enzyme cao, khả năng chịu nhiệt của bào tử cũng chỉ ở giới hạn nhất định, nếu vượt quá ngưỡng giới hạn thì bào tử sẽ mất khả năng sống.

Kết quả ở bảng 7 cho thấy rằng khi giống khởi động được sấy ở chế độ sấy đông khô thì hoạt lực enzyme được bảo tồn lớn nhất và khả năng sống của bào tử là cao nhất. Đối với tủ sấy bình thường, hoạt lực enzyme và khả năng sống của bào tử đạt giá trị cao nhất khi chế phẩm được sấy ở nhiệt độ 40 $^{\circ}\text{C}$. Nếu không có thiết bị sấy đông khô, có thể chọn nhiệt độ sấy là 40 $^{\circ}\text{C}$ khi sấy giống khởi động bằng tủ sấy thường.

4. KẾT LUẬN

Trên cơ sở những kết quả thu được, nghiên cứu đã đưa ra các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình sản xuất giống khởi

động từ nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings như sau: nguồn cơ chất thích hợp cho sản xuất giống khởi động từ nấm mốc *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerlings có thể là bột ngô, bột đậu tương, tốt nhất là bột ngô; tỷ lệ phối trộn với bột gạo là 60/40. Nguyên liệu được hấp khử trùng, làm nguội, trải thành lớp mỏng 2 cm, tiếp giống bằng hỗn dịch bào tử có mật độ 2.10^7 bt/ml với tỷ lệ là 2 ml dịch giống/ 100 g môi trường nuôi cấy. Thời gian nuôi cấy là 54h có đảo trộn 1 lần sau 24h. Sau khi nuôi cấy thu được chế phẩm thô, nhằm bảo toàn hoạt lực enzyme và bào tử sống của giống khởi động nên sấy đông khô (-45°C) hoặc ở 40 $^{\circ}\text{C}$ bằng tủ sấy thường đến khi đạt độ ẩm là 10%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Trọng Cần, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang, Trần Thị Luyến (1998). Công nghệ enzyme. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
 Nguyễn Thành Đạt, Nguyễn Duy Thảo, Vương Trọng Hảo (1990). Thực hành vi sinh học. NXB. Giáo dục, 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. NXB. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Lương Đức Phẩm (2000). Vi sinh vật học và vệ sinh an toàn thực phẩm. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.

Nguyễn Hữu Phúc (1998). Các phương pháp lên men thực phẩm truyền thống ở Việt Nam và các nước trong vùng. NXB. Nông nghiệp, Tp. Hồ Chí Minh.