

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT STARTER *ACTINOMUCOR ELEGANS* CÓ MẬT SỐ VÀ SỨC SỐNG CAO DÙNG CẢI TIẾN CHẤT LƯỢNG CHAO TRUYỀN THỐNG

Nguyễn Văn Thành¹ và Trần Nguyễn Ngọc Quỳnh²

ABSTRACT

In order to improve the quality of traditional sufu, researching on the optimal production of starter culture of Actinomucor elegans to be applied for sufu processing was performed. The results showed that the maximum spore - yield (10^{10} spores/g dry weight) of A. elegans was obtained with the treatment consisted of broken-rice and rice-bran with the ration 2:1, inoculated 10^5 spores/gdw, and to be harvested after 6 days of incubation at 30°C . The optimum drying temperature, drying time, and grinding time for the maximum amounts of live spores were 42°C , 48 hours, and 1 minute, respectively. After 5 months of preservation, the maximum of live spores (88.57%) was found at the treatment which was preserved at 4°C (in refrigerator) in polypropylene bag, its viable spores were decreased by 2.2% compared to the initial sample (90.77%). In contrasting, the treatment was preserved at 25°C (in desicator) in polypropylene bag, its viable spores retained lowest (80.65%), decreased by 10.12% compared to the initial sample. Based on the optimal data obtained, the flow-chart for optimal starter culture production (high spore-yield) and storage (high viable spores retained) was established, as a result, optimal starter culture of A. elegans has been produced to be applied to the sufu productive process to improve the quality of traditional sufu.

Keywords: *Actinomucor elegans, spores, starter-culture, storage, viable spores*

Title: *Researching to produce the starter culture of Actinomucor elegans having a high density and activity for improving the quality of traditional sufu*

TÓM TẮT

Nhằm mục đích cải tiến chất lượng chao truyền thống, nghiên cứu về sản xuất tối ưu bột bào tử nấm mốc Actinomucor elegans để ứng dụng vào quy trình sản xuất chao đã được tiến hành. Kết quả cho thấy mật số bào tử A. elegans đạt cao nhất (10^{10} bào tử/g cơ chất khô) với nghiệm thức gồm cơ chất tằm và cám gạo tỉ lệ 2:1, chủng 10^5 bào tử/gck và thu hoạch sau 6 ngày ủ ở 30°C . Nhiệt độ, thời gian sấy, và thời gian xay tối ưu cho số lượng bào tử sống lần lượt là 42°C , 48 giờ và 1 phút. Sau 5 tháng bảo quản, mật số bào tử sống còn duy trì tối đa là 88,57% ở nghiệm thức bảo quản ở 4°C (trong tủ lạnh) trong túi nhựa polypropylen, bào tử sống của nó giảm đi 2,2% so với mẫu ban đầu (90,77%). Ngược lại, nghiệm thức bảo quản ở 25°C (trong bình hút ẩm) và trong túi nhựa polypropylen mật số bào tử sống duy trì thấp nhất (80,65%) giảm 10,12% so với mẫu ban đầu (90,77%). Dựa trên những số liệu tối ưu thu được từ các thí nghiệm, một quy trình sản xuất giống bột bào tử mốc (mật số cao) và bảo quản tối ưu (bào tử sống duy trì cao nhất) đã được thiết lập. Kết quả giống bột bào tử mốc A. elegans tối ưu đã được sản xuất để ứng dụng vào quy trình cải tiến chất lượng chao truyền thống.

Từ khóa: *Actinomucor elegans, bào tử, giống chủng, bảo quản, bào tử sống*

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Học viên lớp Cao học Công nghệ Sinh học Khóa 14

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Chao (sufu) là một sản phẩm được lên men đậu hũ (làm từ đậu tương) nhờ nấm mốc *Actinomucor elegans*. Chao là sản phẩm được sử dụng phổ biến như gia vị trong nấu ăn và nước chấm trong bữa ăn. Chao bổ sung thêm phần protein và các acid amin quan trọng, cung cấp đáng kể nguồn năng lượng, khoáng, vitamin,... trong bữa ăn của người châu Á nói chung và Việt Nam nói riêng. Tuy nhiên, ở Việt Nam ta, vùng đồng bằng sông Cửu Long các cơ sở sản xuất chao đều áp dụng phương pháp cổ truyền lên men tự nhiên nên chất lượng chao không ổn định, thậm chí nhiễm cả nấm mốc độc như *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* sinh ra độc tố aflatoxin có thể gây ung thư cho người dùng (Võ Thị Hạnh *et al.*, 2001).

Hiện nay, chủng nấm mốc *Actinomucor elegans* thuần chủng đã được phân lập và sản xuất ra giống mốc bột bào tử để áp dụng vào quy trình sản xuất chao trên quy mô công nghiệp ở các nước như Đài Loan, Trung Quốc. Nhờ đó sản phẩm lên men có thêm nhiều ưu điểm là đảm bảo vệ sinh hơn, kiểm soát được chất lượng và giữ được tính ổn định và lượng sản phẩm đáp ứng nhu cầu trong và ngoài nước

Trên cơ sở đó, mục tiêu nghiên cứu này là sản xuất giống *Actinomucor elegans* bột bào tử chất lượng cao (mật số và sức sống cao) nhằm áp dụng vào quy trình cải tiến chất lượng sản phẩm chao truyền thống, tăng cường dinh dưỡng, đảm bảo sức khỏe người tiêu dùng, đáp ứng nhu cầu sử dụng thực phẩm ngày càng tiêu chuẩn hóa hiện nay.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1 Phương tiện nghiên cứu

2.1.1 Nguyên vật liệu

- Giống mốc thuần *Actinomucor elegans* có xuất xứ từ ngân hàng giống của Hoa Kỳ (ATCC) được mua về và đang tồn trữ giống tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Cần Thơ.
- Gạo tằm, bắp mảnh, đậu nành mảnh, cám lúa mì, cám gạo (mua ở chợ Cần Thơ).

2.1.2 Hóa chất và môi trường nuôi cấy

- Hoá chất thông thường: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , H_2SO_4 ,...
- Chất chỉ thị/ đánh dấu huỳnh quang: (1) cFDA [5-(and-6)carboxyfluorescein diacetate] ; (2) PI (Propidium iodide).
- Malt extract agar (MEA) (Oxoid CM 59)
- RBCC: Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (Oxoid CM 549) (Baggerman, 1983).

2.1.3 Thiết bị và Dụng cụ

- Kính hiển vi Olympus-CTH; Kính hiển vi huỳnh quang Olympus-BH2-RFL-T2, Japan
- Máy xay mẫu Bioblock (Đức) HERMLE- Z233M-2 cỡ lưới 14
- Bếp đun cách thuỷ (Julabo-TW20)
- Máy ly tâm Eppendorf HERMLE-Z233M-2
- Buồng cấy vô trùng Testar-AV100
- Túi nhựa PP (polypropylen)(16x 25cm)
- Buồng đếm hồng cầu Bürk-Türk
- Chai thuỷ tinh nắp đen (1,5 x 7cm)

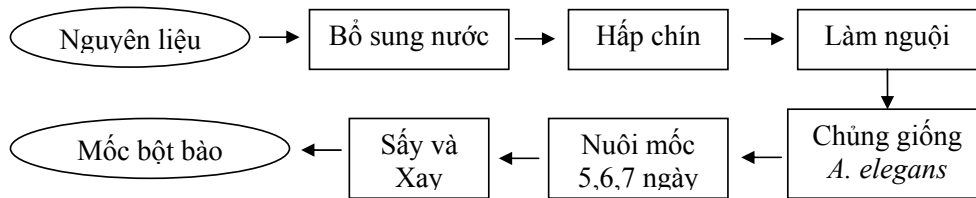
2.2 Phương pháp nghiên cứu

* Nuôi cấy giống trong ống thạch nghiêng: Chuẩn bị môi trường thạch nghiêng MEA; Chủng *A. elegans* và ủ ở 30°C, trong 5 ngày.

* Chuẩn bị dịch trích bào tử: cho 5ml nước cất vô trùng vào mỗi ống thạch nghiêng. Dùng kim cấy vô trùng trích bào tử vào dung dịch sao cho thu được mật số 10⁷ bào tử/ml dịch trích. Dịch trích này được sử dụng như dịch stock để chủng vào cơ chất đã thanh trùng theo các nghiệm thức của bố trí thí nghiệm.

* Quy trình chung nghiên cứu sản xuất giống bột bào tử nấm mốc

Trong nghiên cứu sản xuất starter bào tử nấm mốc *A. elegans* các thí nghiệm được tiến hành theo quy trình chung Hình 1.



Hình 1: Quy trình chung sản xuất bột bào tử nấm *Actinomucor elegans*

* Nuôi cấy nấm mốc trong túi nhựa polypropylen (PP):

+ Cơ chất (nguyên liệu) trong túi PP được trộn với 40% nước được thanh trùng nhiệt uớt ở 121°C, 30 phút, để nguội đến 38-40°C. Cơ chất thanh trùng được bổ sung đạm (NH₄)₂SO₄ 1,5M (0,00594g/g cơ chất khô) và chỉnh pH cơ chất về 4 bằng H₂SO₄ 0,5M (0,02ml/gck) nhằm hạn chế nhiễm khuẩn. Chủng dịch trích bào tử vào cơ chất sao cho đạt mật số mong muốn 10⁵, 10⁴ và 10³ bào tử/gck. Trộn đều, sau đó ủ ở 30°C trong 5-7 ngày, thu hoạch mẫu.

Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1 Thí nghiệm 1: Nghiên cứu tìm điều kiện nuôi cấy thích hợp để cho sản lượng bào tử cao nhất

a. Mục đích: Tìm ra tổ hợp (thành phần cơ chất, mật số bào tử chủng và thời gian nuôi cấy) tốt nhất để đạt sản lượng cao nhất bào tử *Actinomucor elegans*.

b. Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 nhân tố 2 lần lặp lại: (1) Loại cơ chất: Tầm: Cám gạo (tỉ lệ 1:1); Tầm: Cám gạo (2:1); (2) Mật số bào tử chủng/gck: 10³, 10⁴, 10⁵/gck; (3) Thời gian thu hoạch: 5,6 và 7 ngày.

(*Các mức độ được bố trí trong TN này là kết quả rút ra từ TN thăm dò trước đó).

Tổng số nghiệm thức: $2 \times 3 \times 3 = 18$ (tổng số đơn vị thí nghiệm: $18 \times 2 = 36$).

c. Phương pháp thực hiện: Thí nghiệm được tiến hành tương tự theo quy trình chung ở hình 1.

d. Chỉ tiêu theo dõi:

- Xác định số lượng bào tử tổng số: Phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu Bürk-Türk (Thanh và Nout, 2004). Cân 1g cơ chất chứa bào tử cho vào 99ml nước cất vô trùng. Dịch trích bào tử được khuấy mạnh và lọc bằng màng lọc Millipore. Dịch trích bào tử được pha loãng với mật số thích hợp và được đếm bằng buồng đếm Bürk-Türk. Sau khi đếm số bào tử trên buồng đếm, tính bào tử tổng số/g cơ chất tươi theo công thức: $N = [(a/b) \times (256/0,1)] \times 10^3 \times 10n$.

2.2.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy mẫu đến số lượng bào tử sống

a. Mục đích: Tìm ra nhiệt độ, thời gian sấy khô mẫu thích hợp nhằm hạn chế thấp nhất sự tổn thương gây ra do nhiệt độ và cơ học đến khả năng sống của bào tử.

b. Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố, 2 mức độ và 3 lần lặp lại. (1) Nhiệt độ sấy khô mẫu với 2 mức độ: 42 và 45°C; (2) Thời gian sấy khô có 2 mức độ: 24 và 48 giờ. Tổng số nghiệm thức: $2 \times 2 = 4$; tổng số mẫu thí nghiệm là $4 \times 3 = 12$.

c. Phương pháp thực hiện:

- Chuẩn bị nguyên liệu: Từ kết quả của thí nghiệm trước, nghiệm thức tốt nhất được chọn để tiến hành trong thí nghiệm này với lượng bào tử chủng vào là 10^5 /gck, thời gian ủ là 6 ngày.

- Thí nghiệm được tiến hành tương tự theo quy trình chung ở hình 1.

d. Chỉ tiêu theo dõi:

- Xác định số lượng bào tử tổng số: như trên (Thanh và Nout, 2004).

- Xác định số lượng bào tử sống, chết và miên trạng: Phương pháp huỳnh quang với chất cFDA và PI: Dịch trích bào tử được rửa hai lần (bằng dung dịch đệm phosphate pH=4) bằng cách ly tâm 10.000 vòng/phút, 5 phút. Tiếp theo, dịch trích bào tử được ủ ở 40°C có sự hiện diện của cFDA và PI trong 20 phút, chúng được giữ lạnh bằng cách đặt vào trong nước đá và được đếm trong buồng đếm Bürk-Türk bằng kính hiển vi huỳnh quang. Dưới kính hiển vi huỳnh quang, bào tử sống phát ra huỳnh quang xanh với cFDA, bào tử chết phát ra huỳnh quang đỏ với PI. Cách tính số lượng bào tử tương tự như cách tính bào tử tổng số.

- Phương pháp huỳnh quang hiện đại có nhiều ưu điểm hơn so với phương pháp đếm sống cổ điển như sau 20 phút là có thể biết được kết quả so với phải chờ đến 24-48 giờ. Phương pháp huỳnh quang ngày càng được sử dụng bởi nhiều tác giả Davey và Key (1996), Breeuwer và Abee (2000), Bunthof *et al.* (2001), Thanh và Nout (2004) để xác định tế bào sống của vi khuẩn, nấm men và nấm mốc.

- Xác định số bào tử sống trên môi trường RBCC: Dùng dịch trích bào tử trên pha loãng ở những nồng độ thích hợp, trải đều dịch trích trên môi trường RBCC trong đĩa Petri và ủ từ 24-36 giờ, sau đó tiến hành đếm khuẩn lạc (Baggerman, 1983).

2.2.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng xay mẫu và thời gian xay đến số lượng bào tử sống; So sánh 2 phương pháp đếm sống: huỳnh quang và môi trường RBCC

a. Mục đích: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xay mẫu đến số lượng bào tử sống, chết và miên trạng của bào tử *A. elegans*, nhằm tìm ra thời gian xay mẫu thích hợp hạn chế thấp nhất sự tổn thương cơ học gây ra có ảnh hưởng đến khả năng sống của bào tử.

b. Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 1 nhân tố, 3 mức độ, 3 lần lặp lại: (1) Thời gian xay mẫu có 3 mức độ: 1 phút, 2 phút và 3 phút (bằng máy xay mẫu). (2) Đối chứng là mẫu không xay. Tổng số nghiệm thức: $3+1 = 4$; tổng số mẫu $(3 + 1) \times 3 = 12$.

c. Phương pháp thực hiện: Chuẩn bị nguyên liệu dựa vào kết quả của thí nghiệm trước. Thí nghiệm được tiến hành tương tự như thí nghiệm 2.

d. Chỉ tiêu theo dõi:

- Xác định số lượng bào tử sống, chết và miên trạng bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang (Thanh và Nout, 2004), mẫu trước và sau xử lý.

- Xác định số bào tử sống trên môi trường RBCC.

2.2.4 Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện tồn trữ đến mật số bào tử sống, chết và miên trạng theo thời gian

a. Mục đích: Nhằm tìm ra sự ảnh hưởng nhiệt độ và dụng cụ bảo quản đến khả năng sống của bào tử theo thời gian.

b. Bố trí thí nghiệm:

- Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 2 nhân tố, 3 lần lặp lại, như sau: (1) Dụng cụ bảo quản với 2 loại: Chai nắp đen (chai) và túi polypropylen; (2) Nhiệt độ bảo quản với 3 mức độ: 5°C (tủ lạnh); 25°C (bình hút âm) và 25°C (nhiệt độ phòng); Tổng số nghiệm thức: $2 \times 3 = 6$; tổng số đơn vị thí nghiệm là $6 \times 3 = 18$.

c. Phương pháp thực hiện:

Từ kết quả thu được ở thí nghiệm 1, 2 và 3 chọn được nghiệm thức tốt nhất với các nhân tố tối ưu để sản xuất lượng lớn bào tử để sử dụng cho thí nghiệm này.

d. Chỉ tiêu theo dõi:

Xác định số bào tử sống bằng phương pháp huỳnh quang (Thanh và Nout, 2004): 1 lần mỗi tháng.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sản xuất bào tử *Actinomucor elegans* mật số cao

Kết quả thí nghiệm bảng 1 cho thấy hầu hết các nghiệm thức với cơ chất là tằm: cám (1:1) và tằm: cám (2:1) đều cho kết quả mật số bào tử cao. Tuy nhiên, các

nghiệm thức tằm: cám (2:1) có phần cao hơn. Bên cạnh đó sản lượng bào tử có khuynh hướng đạt giá trị cao khi chủng với lượng bào tử cao và thời gian ủ 6 ngày. Đáng chú ý nhất là ở nghiệm thức 17: tằm: cám (2:1), chủng 10^5 bào tử/gck; 6 ngày ủ cho sản lượng bào tử cao nhất là Log_{10} bào tử/gck=10,1 (10^{10} bào tử/gck).

Bảng 1: Sản lượng bào tử theo các nghiệm thức

Nghiệm Thức	Tổ hợp các yếu tố			Sản lượng bào tử (Log_{10} bào tử/gck)
	Loại cơ chất (tỉ lệ) Tằm : Cám	Lượng bào tử chủng/gck	Ngày thu hoạch	
1	1 : 1	10^3	5	8,85 ^l
2	1 : 1	10^3	6	9,17 ^{fg}
3	1 : 1	10^3	7	9,13 ^g
4	1 : 1	10^4	5	9,26 ^f
5	1 : 1	10^4	6	9,47 ^e
6	1 : 1	10^4	7	8,99 ^h
7	1 : 1	10^5	5	9,55 ^{de}
8	1 : 1	10^5	6	9,87 ^b
9	1 : 1	10^5	7	9,12 ^g
10	2 : 1	10^3	5	8,89 ⁱ
11	2 : 1	10^3	6	9,6 ^d
12	2 : 1	10^3	7	9,27 ^f
13	2 : 1	10^4	5	9,73 ^c
14	2 : 1	10^4	6	9,72 ^c
15	2 : 1	10^4	7	8,93 ^{hi}
16	2 : 1	10^5	5	9,8 ^{bc}
17	2 : 1	10^5	6	10,1 ^a
18	2 : 1	10^5	7	9,01 ^h

* Số liệu trong bảng là kết quả trung bình của hai lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có cùng chữ cái khác biệt không ý nghĩa 5% ($p < 0,05$). CV = 4,03%

Wang và Hesseltine (1975) sản xuất lượng lớn bào tử *Rhizopus oligosporus* trên cơ chất tấm gạo và lúa mì đạt sản lượng 10^9 /gck. Theo nghiên cứu của Maheva et al. (1984), nấm mốc *Penicillium roqueforti* nuôi cấy trên môi trường bán rắn, sản lượng bào tử chỉ đạt được 10^8 bào tử/gck. Kết quả đạt được của chúng tôi có ý nghĩa rất lớn trong sản xuất giống vi sinh vật, vì cho đến nay chưa có báo cáo về nghiên cứu sản xuất bào tử *Actinomucor elegans* và để đạt được sản lượng 10^{10} /gck với loài nấm mốc này là điều rất khó. Kết quả phân tích thống kê cho thấy sản lượng Log_{10} bào tử/g = 10,1 (10^{10} bào tử/gck) của nghiệm thức 17 là cao nhất và khác biệt với các nghiệm thức còn lại ở mức 5% ($p < 0,05$). Nghiệm thức này sẽ được sử dụng để tiến hành cho các thí nghiệm sau.

3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy đến số lượng bào tử sống

Nguyên liệu được dùng cho thí nghiệm sấy này được tiến hành theo cùng các nhân tố và thông số của nghiệm thức 17 (cơ chất 2 tằm : 1 cám; chủng 10^5 /gck; 6 ngày ủ). Kết quả thu được sản lượng bào tử Log_{10} bào tử/g = 10,15 (Bảng 2).

Kết quả ở bảng 2 cho thấy lượng bào tử sau khi sấy giảm một ít do hao hụt. Số lượng bào tử sống trong thí nghiệm được xác định bằng 2 phương pháp: đếm sống và huỳnh quang. Phương pháp đếm sống khuẩn lạc trên môi trường RBCC cho thấy số lượng khuẩn lạc luôn cao hơn số lượng bào tử tổng số, trong khi đó phương pháp huỳnh quang cho kết quả số lượng bào tử sống nhỏ hơn một ít hơn so

với bào tử tổng số tương ứng (do một số bào tử chết và miên trạng). Kết quả chỉ ra phương pháp huỳnh quang cho kết quả bào tử sống tốt hơn phương pháp đếm sống truyền thống. Nguyên nhân đã được giải thích là đếm sống trên RBCC không chỉ bào tử mà cả các khuẩn ty cũng tạo nên khuẩn lạc làm cho số lượng cao hơn tổng số bào tử. Kết quả này là phù hợp và tương tự như kết quả nghiên cứu của Võ Thị Nguyệt Thủy (2007), Thanh và Nout (2002).

Bảng 2: Số lượng bào tử sống và chết sau khi sấy mẫu

Nghiệm thức	Tổ hợp NT		Âm độ sau sấy	Bào tử tổng số (Log ₁₀ bào tử/g)	Số khuẩn lạc trên RBCC (1) (Log ₁₀ cfu/g)	Bào tử sống (2) % (Log ₁₀ bào tử/g)	Bào tử chết (3) % (Log ₁₀ bào tử/g)
	nhiệt độ sấy (°C)	thời gian sấy (giờ)					
1	42	24	8,55 ^a	10,12	10,16	96,48 ^a (9,76)	3,52 ^a (0,36)
2	42	48	7,47 ^c	10,09	10,14	97,92 ^a (9,88)	2,08 ^a (0,21)
3	45	24	8,50 ^b	10,10	10,20	98,04 ^a (9,90)	1,96 ^a (0,20)
4	45	48	5,72 ^d	10,08	10,25	94,44 ^a (9,52)	5,55 ^a (0,56)

Số liệu trong bảng là kết quả trung bình của ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có cùng chữ cái khác biệt không ý nghĩa 5% (p<0,05); (1) Xác định số bào tử sống trên môi trường Rose Bengal Chloramphenicol; (2) Xác định số bào tử sống bằng phương pháp đánh dấu huỳnh quang cFDA; (3) Xác định số bào tử chết bằng phương pháp đánh dấu huỳnh quang PI.

Trên cơ sở đó, số liệu kết quả từ phương pháp huỳnh quang ở Bảng 2 cho thấy số lượng bào tử sống: 96,48% của nghiệm thức (NT) 1 (42°C, 24 giờ); 97,92% của NT 2 (42°C, 48 giờ); 98,04% của NT 3 (45°C, 24 giờ) và 94,44% của NT 4 (45°C, 48 giờ) là khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% (p<0,05). Điều này chứng tỏ công đoạn sấy không ảnh hưởng nhiều đến sức sống của bào tử. Tuy nhiên giá trị âm độ sau sấy giữa các NT có sự khác biệt nhau. Theo nguyên tắc âm độ của mẫu bảo quản phải thấp hơn 7,5-8%. Nghiệm thức 2 (sấy 42°C, 48 giờ) có âm độ 7,47% và số lượng bào tử sống cao 97,92% (Log₁₀bào tử/g = 9,88) và số lượng bào tử chết thấp 2,08% không khác biệt với NT 3: 1,96% nên NT 2 (sấy 42°C, 48 giờ) là tốt nhất. Kết quả thí nghiệm là rất phù hợp với báo cáo của Thanh và Nout (2002) khi sấy bào tử *Rhizopus oligosporus* ở 42°C, 48 giờ bào tử sống vẫn duy trì ở mức cao nhất. Do đó nghiệm thức 2 sấy bào tử *Actinomucor elegans* ở 42°C, 48 giờ được chọn cho các thí nghiệm sau.

3.3 Ảnh hưởng của xay mẫu đến số lượng bào tử sống của *Actinomucor elegans*

Bảng 3: Số lượng tế bào tử sống, chết, và miên trạng sau khi xay mẫu

Nghiệm thức	Mẫu (*)	Tổng số (Log ₁₀ bào tử/g)	RBCC (Log ₁₀ cfu/g)	Sống % (Log ₁₀ bào tử/g)	Chết % (Log ₁₀ bào tử/g)	Miên trạng % (Log ₁₀ bào tử/g)
0	Sau khi sấy (không xay)	10,15	10,18	87,44 ^a (8,88)	4,76 ^a (0,48)	7,79 ^a (0,79)
1	Xay 1 phút	10,13	10,16	84,62 ^a (8,57)	10,25 ^a (1,04)	5,13 ^a (0,52)
2	Xay 2 phút	9,87	9,92	65,28 ^b (6,44)	30,55 ^b (3,02)	4,17 ^a (0,41)
3	Xay 3 phút	9,70	9,83	21,68 ^c (2,10)	71,67 ^c (6,95)	6,67 ^a (0,65)

Số liệu trong bảng là kết quả trung bình của ba lần lặp lại. Trong cùng một cột các số liệu có cùng chữ cái khác biệt không ý nghĩa 5% (p<0,05); (*) Sản lượng bào tử là 10,22 đơn vị Log.

Bảng 3 cho thấy kết quả số lượng khuẩn lạc đếm trên môi trường RBCC (Log₁₀cfu/g) luôn cao hơn số lượng tế bào sống xác định bằng phương pháp huỳnh

quang. Điều này càng chứng tỏ phương pháp huỳnh quang chính xác hơn cho trường hợp định lượng bào tử sống trong mẫu giống mốc bột bào tử (Võ Thị Nguyệt Thủy, 2007; Thanh và Nout, 2002).

Kết quả chỉ ra trong 3 nghiệm thức (NT) xay 1, 2 và 3 phút, NT 1 xay 1 phút có số lượng bào tử sống cao nhất 84,62% khác biệt có ý nghĩa với các NT còn lại (65,28% và 21,68%). Ngược lại, số lượng bào tử chết và miên trạng ở NT 1 là thấp nhất (10,25% và 5,13%) và càng tăng lên theo thời gian xay mẫu ở NT 2 và 3. Khi so sánh với mẫu trước khi xay (0), NT 1 (xay 1 phút) có số lượng bào tử sống, chết và miên trạng tương đương và khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% ($p < 0,05$). Điều này càng chứng minh NT 1 (xay 1 phút) là tốt nhất và ít tổn thương nhất đến sức sống bào tử. Nghiệm thức này sẽ được sử dụng cho thí nghiệm sau.

3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ và dụng cụ bảo quản đến số lượng bào tử sống (Log10 N/g) theo thời gian tồn trữ

Bảng 4: Số lượng bào tử sống duy trì trong thời gian tồn trữ

NT (Tháng)	Tủ lạnh - Túi	Tủ lạnh - Chai	Phòng - Túi	Phòng - Chai	Bình hút ẩm - Túi	Bình hút ẩm - Chai
0	90,77 ^a	90,77 ^a	90,77 ^a	90,77 ^a	90,77 ^a	90,77 ^a
1	90,24 ^a	89,18 ^{ab}	89,47 ^a	89,18 ^a	89,18 ^a	88,89 ^{ab}
2	90,00 ^a	89,18 ^{ab}	89,18 ^a	88,89 ^a	88,89 ^a	88,57 ^{abc}
3	89,74 ^a	88,89 ^{ab}	84,61 ^b	83,77 ^a	84,61 ^b	85,86 ^{bc}
4	88,89 ^{ab}	87,87 ^b	83,77 ^b	82,84 ^{ab}	83,77 ^b	85,00 ^{bcd}
5	88,57 ^{ab}	87,09 ^{bc}	82,84 ^{bc}	81,25 ^{ab}	80,65 ^c	84,51 ^{cd}

(*Số liệu trong bảng là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột, các số liệu có cùng chữ cái khác biệt không có ý nghĩa 5% ($p \leq 0,05$). Nhiệt độ: Tủ lạnh = 4°C; Phòng và Bình hút ẩm = 25°C; Túi = Túi polypropylene; Chai = Chai thủy tinh nắp đen (1,5 x 5cm). Sản lượng bào tử Log₁₀bào tử/g = 10,33; số lượng bào tử sống sau sấy (chưa xay) là 91,03%; số lượng bào tử sống sau xay là 90,77%.

Kết quả theo dõi trong suốt thời gian 5 tháng bảo quản (Bảng 4) cho thấy số lượng bào tử sống ở tất cả các nghiệm thức vẫn duy trì sức sống cao và khác biệt nhiều sau 3-4 tháng (Bình hút ẩm và Phòng) hoặc 4-5 tháng (Tủ lạnh) bảo quản. Kết quả này là khác với kết quả của Thanh và Nout (2002) khi nghiên cứu trên bào tử của *Rhizopus oligosporus*, khả năng sống của bào tử đã giảm đi nhiều sau 1 tháng bảo quản ở 25°C cũng như 5°C và tiếp tục giảm ít đi sau đó. Giải thích cho kết quả khác biệt này là do loại nấm mốc được sử dụng của hai nghiên cứu là khác nhau nên kết quả không thể giống nhau.

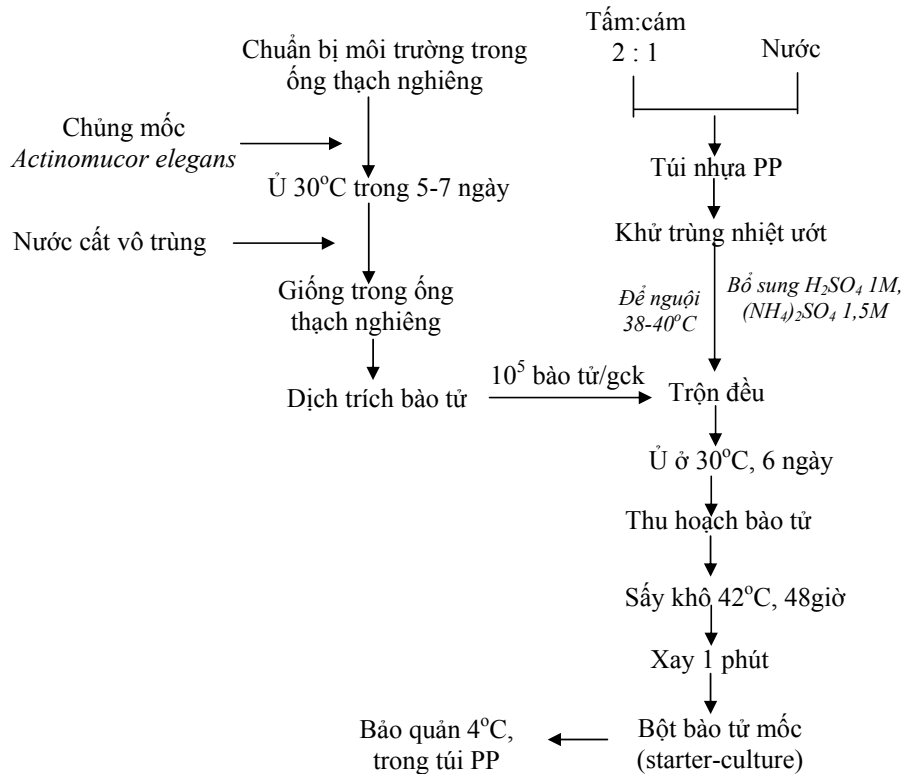
Bào tử duy trì sức sống cao trong điều kiện trữ trong tủ lạnh (4°C). Trong khi đó các nghiệm thức trữ trong phòng và trong bình hút ẩm (25°C) duy trì sức sống thấp hơn và tương đương nhau. Điều này chứng tỏ nhiệt độ 4°C (tủ lạnh) là tốt nhất cho trữ giống mốc bột bào tử. Kết quả này là phù hợp với nghiên cứu bảo quản mốc giống bột bào tử *Rhizopus oligosporus* (dùng sản xuất tempeh) của nhiều tác giả. Shambuyi et al. (1992), kết quả chỉ rằng sức sống của bào tử vẫn duy trì mức cao sau 30 tuần bảo quản ở 5, 25 và 37°C nhưng tốt nhất ở 5°C. Wang và Hesselstine (1975) công bố rằng khi trữ giống bột bào tử ở 4°C trong 6 tháng, số lượng bào tử sống giảm không đáng kể, tuy nhiên khi trữ ở nhiệt độ phòng số lượng bào tử sống giảm đi một cách khác biệt. Trong các nghiệm thức trữ trong tủ lạnh (4°C), nghiệm

thức duy trì sức sống cao nhất là nghiệm thức Tủ-Túi polypropylene, lượng bào tử sống không khác biệt sau 5 tháng bảo quản (từ 90,77% - 88,57%).

Bên cạnh đó nghiệm thức Tủ lạnh-Chai (thủy tinh), lượng bào tử sống không khác biệt sau 3 tháng bảo quản (từ 90,77% - 88,89%), nhưng bắt đầu khác biệt sau 4 tháng (còn 88,57%) bảo quản. Điều này chứng tỏ có sự khác biệt nhỏ về dụng cụ chứa mẫu, túi polypropylen là thích hợp hơn cho trữ giống mốc bột bào tử.

4 KẾT LUẬN

- Trong sản xuất giống bào tử nấm mốc *Actinomucor elegans*, hỗn hợp cơ chất tốt nhất là tằm và cám (2:1), mật số chủng là 10^5 bào tử/gck và thời gian ủ là 6 ngày ủ ở 30°C. Tổ hợp nghiệm thức này sẽ đạt được sản lượng cao nhất 10^{10} bào tử/gck. Trong công đoạn xử lý để sản xuất bột bào tử nấm mốc *A. elegans*, nhiệt độ sấy, thời gian sấy và thời gian xay mẫu tốt nhất để bào tử sống cao nhất là ở 42°C trong 48 giờ và xay 1 phút (bằng máy xay mẫu Bioblock).
- Sức sống của bào tử *A. elegans* vẫn duy trì mức cao sau 5 tháng bảo quản (85,78%). Điều kiện bảo quản tốt nhất để duy trì bào tử sống cao nhất là trữ ở 4°C trong túi polypropylene ép kín miệng.
- Quy trình tối ưu sản xuất giống bột bào tử mốc *Actinomucor elegans* dùng sản xuất chao chất lượng cao đã được thiết lập (Hình 2).



Hình 2: Quy trình sản xuất bột bào tử mốc *Actinomucor elegans*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baggerman, W.I., 1983. A modified rose bengal medium for the enumeration of yeasts and moulds from foods, *European J Appl Microbiol biotechnol* **12**, 242 – 247.
- Breeuwer, P., and Abee, T., 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 193-200.
- Bunthof, C. J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F. M., and Abee, T., 2001. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology* **67**, 2326-2335.
- Davey, H. M., and Kell, D. B., 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiology Reviews* **60**, 641-696.
- Maheva, E., G.Djelveh, C.Larroche and J.B.Gros, 1984. Sporulation of penicillium roqueforti in solid substrate fermentation. *Biotechnology letters*. Vol, 6, No. 2, 97-102.
- Nguyễn Đức Lượng, 2006. Công nghệ vi sinh, Tập 3. Các sản phẩm lên men truyền thống. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia TP HCM.
- Shambuyi, M., L. R. Beuchat, Y. C. Hung, and T. Nakayama, 1992. Evaluation of substrates and storage conditions for preparing and maintaining starter cultures for tempeh fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **15**, 77-85.
- Thanh, N. V., and Nout, M. J. R., 2002. *Rhizopus oligosporus* biomass, sporangiospore yield and viability as influenced by harvesting age and processing conditions. *Food Microbiology* **19**, 91-96.
- Thanh, N. V., and Nout, M. J. R., 2004. Dormancy, activation and viability of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores. *International Journal of Food Microbiology* **92**, 171-179.
- Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Đỗ Thị Luyn, Lê Tấn Hưng, Trần Thị Thanh, 2001. Nghiên cứu sản xuất bào tử nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học công nghệ (1999-2000). Viện Sinh Học Nhiệt Đới TP Hồ Chí Minh. Nhà xuất bản Nông Nghiệp TP. Hồ Chí Minh.
- Võ Thị Nguyệt Thủy, 2007. Nghiên cứu sản xuất giống *Aspergillus oryzae* dùng sản xuất tương, nước tương. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Wang, H. L., E. W. Swain, and C.W. Hesseltine, 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *Journal of Food Science* **40**, 168-170.