NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM MỐC THUẦN CHỦNG TRONG GIAI ĐOẠN Ủ MỐC TẠO ENZIM TRONG SẢN XUẤT NƯỚC TƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH

ĐẶNG HỒNG ÁNH, NGUYỄN THU VÂN, PHẠM THỊ THU GIANG THẾ VIỆT, PHẠM HOÀI THU, PHẠM NGỌC THÁI
Viện Công nghiệp thực phẩm

Tóm tắt:

Trong quy trình sản xuất nước tương bằng phương pháp vi sinh giai đoạn ủ mốc tạo enzim là quan trọng nhất (quá trình này gọi là quá trình nuôi mốc Koji). Nghiên cứu sử dụng chế phẩm mốc bào tử thuần chủng để làm giống cho giai đoạn này và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình nuôi đến việc tạo hệ enzim thủy phân. Kết quả thu được cho thấy công thức phối trộn nguyên liệu đã được chọn lựa phù hợp với quá trình nuôi mốc Koji là: đậu tương hấp và lúa mì rang tỉ lệ 1:1; đậu tương hấp và đậu tương rang tỉ lệ 1:1. Điều kiện thích hợp cho quá trình nuôi tạo Koji có hoạt lực enzim proteaza và α-amylaza cao: Độ ẩm ban đầu của khối ủ là 42-45%, có bổ sung hơi ẩm bão hòa trong suốt quá trình nuôi.

- Nhiệt độ 33-35°C trong 24 giờ đầu thích hợp cho nấm mốc phát triển hệ sợi và 25-28°C trong 48 giờ sau thích hợp cho sự tạo thành enzim proteaza,

- Tỷ lệ bào tử mốc giống 0,35 g/kg nguyên liệu khô (2.10^9/g giống mốc) độ dày khối ủ là 3 cm, đảo trộn định kỳ 8 giờ/lần.

STUDYING THE USE OF BIO-PRODUCT MOULD SPORE IN MOULD INCUBATION PERIOD FOR CREATING ENZYME IN SOYBEAN SAUCE PROCESSING BY BIOLOGICAL METHOD

Astract:

In the soybean sause processing by biological method, the mould incubation period to create enzyme is the most important (this called koji). Studying the bio-product mould spore for creating variety and taking the survey of the factors impacting in this incubation to hyprolyze enzyme. The result showed that the procedures of mixing materials selected appropriately to koji are: steaming soybean and dried wheat flour 1:1; steaming soybean and dried soybean 1:1. The appropriately conditions for the process of koji incubation to have high active enzyme proteaza and α-amylaza: The primary temperature from 42-45°C, added saturated humidity during incubation.

- Temperature from 33-35°C within 24 h was appropriate to mould fibre development and temperature 25-28°C after 48h is appropriate to the enzyme proteaza creation.

The rate: 0,35 g/kg raw material: 2.10^9/g mould spore, the thick incubation is 3 cm, periodical mix is 8h/time.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nước tương là một loại nước chấm chế biến từ đậu tương, được tiêu dùng rộng rãi từ lâu đời ở các nước châu Á. Nguyên liệu chính dùng để sản xuất nước tương là đậu tương do vậy trong nước tương rất giàu đạm thực vật và rất tốt cho sức khỏe người dùng. Tuy nhiên, thời gian gần đây một vấn đề nổi cộm về vệ sinh an toàn thực phẩm là trong hầu hết các sản phẩm nước tương sản xuất tại Việt Nam đều có chứa hàm lượng chất 3-monoclopropan-1,2-diol (viết tắt là 3-MCPD) cao gấp nhiều lần mức cho phép, thậm chí có sản phẩm hàm lượng này cao hơn mức cho phép hàng nghìn lần; 3-MCPD gây ung thư khi sử dụng ở nồng độ cao trong thời gian dài. Sở dĩ trong sản phẩm nước tương của Việt Nam hàm lượng 3-MCPD cao đến như vậy là do công nghệ sản xuất tại Việt Nam chủ yếu là dùng axit HCl để thủy phân đạm thực vật ở nhiệt độ cao.

Hiện nay, công nghệ sản xuất nước tương được sử dụng tại Nhật là các chủng nấm mốc thuần chủng có hoạt lực cao được dùng để nuôi chế phẩm Koji tạo hệ enzim có khả năng thuỷ phân protein và tinh bột cao sau đó sử dụng chế phẩm này để lên men thành sản phẩm nước tương. Công nghệ này có nhiều tính ưu việt, không sử dụng axit và nhiệt độ cao nên tạo ra sản phẩm nước tương chất lượng cao không có 3-MCPD, đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm và tạo sản phẩm có hương vị lên men đặc trưng thơm ngon, hấp dẫn.

Tại Việt Nam trong thời gian gần đây đã có các nghiên cứu sản xuất nước tương theo phương pháp lên men nhưng chất lượng nước tương chưa cao chủ yếu do chủng vi sinh vật sử dụng có hoạt tính tạo enzim không cao nên không thể thủy phân triệt để thành phần đạm dẫn tới mùi vị của nước tương không tốt. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tạo ra quy trình ứng dụng chế phẩm mốc giống thuần chủng để xây dựng quy trình công nghệ quá trình nuôi mốc Koji có hoạt lực enzim cao, từ đó làm cơ sở để tạo ra sản phẩm nước tương có hương vị thơm ngon tốt cho sức khoẻ người tiêu dùng, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Đậu tương vàng ở các tỉnh phía Bắc.

- Lúa mì, khô đậu tương được nhập khẩu từ Mỹ và tiêu thụ rộng rãi trên thị trường Việt Nam.

- 6 chủng nấm mốc có nguồn gốc từ Nhật Bản và Việt Nam có trong bộ sưu tập giống của Viện CNTP.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân tích hóa lý và hóa sinh

- Xác định độ ẩm theo phương pháp sấy đến 105°C trong 3 giờ đến trọng lượng không đổi.

- Xác định hoạt độ enzim α-amylaza theo phương pháp của Nhật.

Nguyên tắc: Đo cường độ màu tạo thành giữa phản ứng của tinh bột và enzim α-amylaza có trong mẫu cần phân tích với Iod là chất hiện màu.

- Xác định hoạt độ enzim proteaza theo phương pháp của Nhật:

Nguyên tắc: Trên cơ sở thuỷ phân casein bởi enzim có trong dịch chế phẩm nghiên cứu. Định lượng lượng axit amin được tạo thành trong phản ứng thuỷ phân bằng phản ứng

màu với thuốc thử Folin. Dựa vào đồ thị chuẩn của tyrozin để tính lượng sản phẩm tương ứng do enzim xúc tác tạo nên.

2.2.2. Phương pháp vi sinh

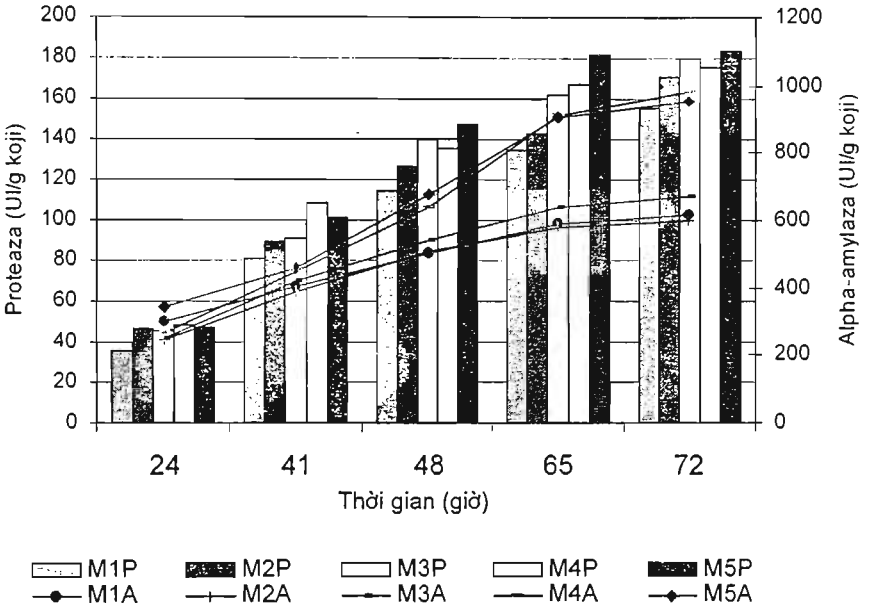
- Xác định khả năng thủy phân tinh bột bằng phương pháp đục lỗ thạch và đo vòng thủy phân tinh bột.

- Xác định khả năng thủy phân casein bằng phương pháp đục lỗ thạch và đo vòng thủy phân casein.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian ngâm đậu tương đến hoạt tính enzim được tạo thành

Các mẫu đậu tương được ngâm trong các khoảng thời gian khác nhau: 4 giờ (mẫu M1), 8 giờ (mẫu M2), 12 giờ (mẫu M3), 16 giờ (mẫu M4), 20 giờ (mẫu M5). Sau khi ngâm đậu tương được hấp chín, làm nguội rồi được rắc nấm mốc tiến hành nuôi tạo Koji.

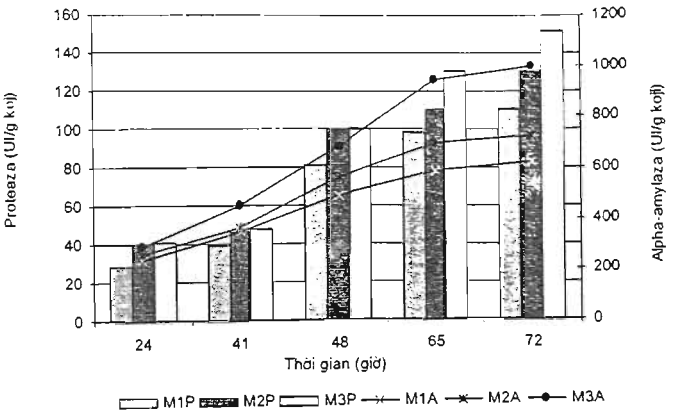


Hình 1. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji khi ngâm đậu tương ở các khoảng thời gian khác nhau

Kết quả cho thấy đậu tương được ngâm trong thời gian 16 giờ đến 20 giờ cho hoạt độ enzim cao nhất. Ngâm đậu dài hơn thì hoạt độ enzim cũng không tăng thêm và ngâm ở thời gian ngắn hơn hoạt độ enzim tạo thành sẽ thấp hơn. Do vậy, chọn thời gian ngâm đậu tương là từ 16 đến 20 giờ, đủ cho hạt đậu tương trương nở để khi hấp đảm bảo chín hạt, đồng thời mang lại cho đậu tương độ ẩm phù hợp với yêu cầu độ ẩm nguyên liệu ban đầu trong quá trình nuôi chế phẩm Koji.

3.2. Ảnh hưởng của chế độ hấp đậu tương đến hoạt tính enzim được tạo thành

Tiến hành hấp đậu tương ở các chế độ khác nhau: 100^{0}C trong 90 phút (M1), 121^{0}C trong 30 phút (M2), 115^{0}C trong 60 phút (M3). Trong quá trình nuôi mốc, hoạt độ enzim proteaza và α- amylaza được xác định theo thời gian nuôi.

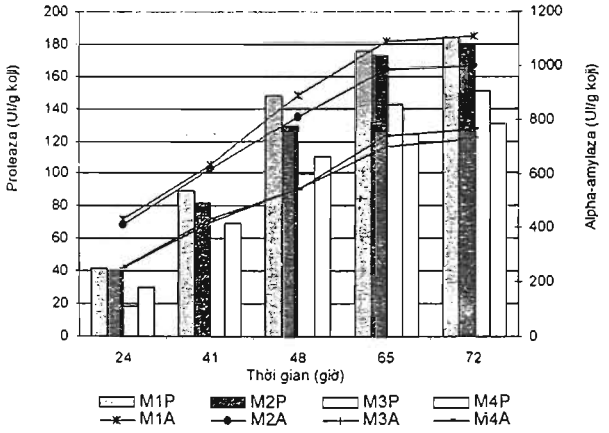


Hình 2. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji khi hấp đậu tương ở các chế độ khác nhau

Như vậy với thời gian ngâm đậu là 16-20 giờ thì kết quả cho thấy chế độ hấp đậu tương ở 115^{0}C trong 60 phút là tốt nhất, Koji thu được cho hàm lượng enzim proteaza và α-amylaza cao nhất. Chọn chế độ hấp đậu tương ở 115^{0}C trong 60 phút.

3.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ phối chế nguyên liệu đến hoạt tính enzim được tạo thành

Tiến hành khảo sát 4 công thức nguyên liệu là: Đậu tương hấp và lúa mì rang theo tỷ lệ 1:1 (M1), đậu tương hấp và đậu tương rang tỷ lệ 1:1 (M2), khô đậu tương hấp và lúa mì rang tỷ lệ 1:1 (M3) và hoàn toàn dùng khô đậu tương hấp (M4).



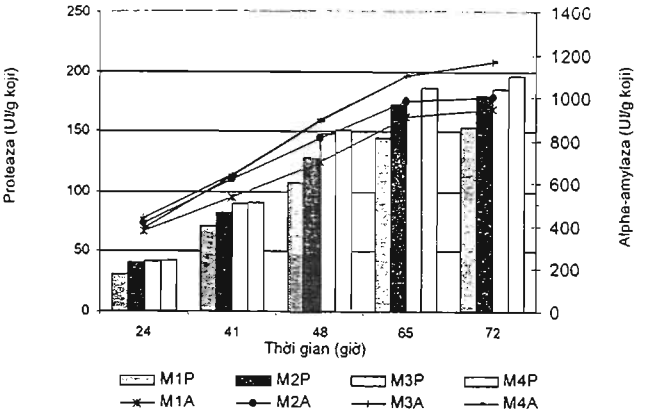
Hình 3. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji khi sử dụng 4 loại công thức nguyên liệu khác nhau

Kết quả cho thấy các mẫu Koji được nuôi cấy trên công thức nguyên liệu có thành phần khô đậu tương đều cho hoạt độ enzim thấp. Hai mẫu Koji nuôi cấy trên công thức nguyên liệu đậu tương hấp và lúa mì rang tỉ lệ 1:1, đậu tương hấp và đậu tương rang tỉ lệ 1:1 có hoạt độ enzim cao hơn trong đó mẫu Koji từ đậu tương hấp và lúa mì rang là tốt nhất. Điều này có thể được lí giải là do chất lượng của khô đậu không được tốt (do trong ngành công nghệ sản xuất dầu ăn khi trích ly chất béo đã sử dụng các hoá chất gây ức chế sự phát triển tạo enzim của nấm mốc). Do đó, công thức nguyên liệu để nuôi cấy chế phẩm nấm mốc Koji cho chất lượng tốt là công thức đậu tương hấp và lúa mì rang tỉ lệ 1:1, đậu tương hấp và đậu tương rang tỉ lệ 1:1.

3.4. Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện nuôi cấy thích hợp để tạo chế phẩm Koji có hoạt lực enzim cao

- Ảnh hưởng của tỷ lệ mốc giống đến hoạt lực enzim của chế phẩm Koji

Tiến hành khảo sát các tỷ lệ mốc giống/nguyên liệu như sau: 0,25 g chế phẩm mốc/kg nguyên liệu (M1); 0,3 g chế phẩm mốc/kg nguyên liệu (M2) 0,35 g chế phẩm mốc/kg nguyên liệu (M3) và 0,4 g chế phẩm mốc/kg nguyên liệu (M4).

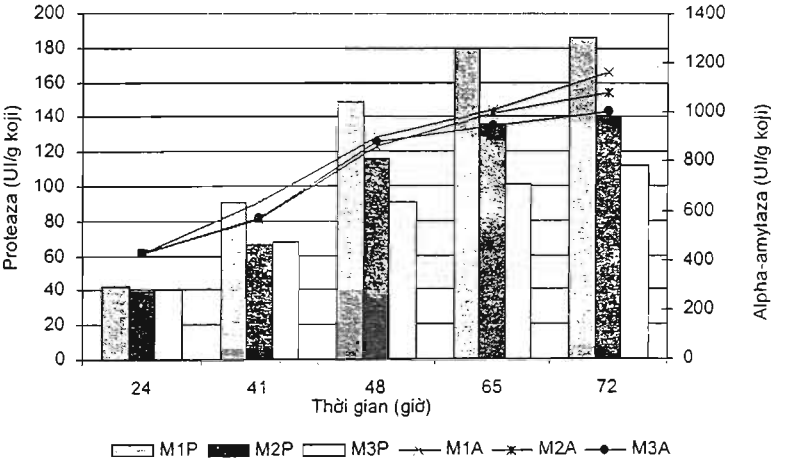


Hình 4. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji với tỷ lệ giống ban đầu khác nhau

Với lượng chế phẩm mốc thấp (0,25; 0,3 g/kg đậu tương) thì hệ sợi phát triển kém hơn và lượng enzim tạo thành cũng kém hơn sau 72 giờ nuôi. Khi tăng tỷ lệ bào tử mốc giống từ 0,35 g chế phẩm mốc/kg nguyên liệu lên 0,4 g chế phẩm mốc/kg nguyên liệu thì lượng enzim tạo thành nhiều hơn hầu như không đáng kể. Do vậy, chúng tôi chọn tỷ lệ bào tử mốc giống/nguyên là 0,35 g/kg nguyên liệu cho quá trình nuôi cấy chế phẩm mốc Koji.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ đến đến hoạt lực enzim của chế phẩm Koji

Các mẫu thí nghiệm được nuôi ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau: Nuôi ở 33 -35^{0}C trong 24 giờ đầu, 25 - 28^{0}C trong 48 giờ sau (M1), nuôi ở 33 - 35^{0}C trong 36 giờ đầu, 25 - 28 ^{0}C trong 36 giờ sau (M2) và nuôi ở 33 - 35 ^{0}C trong 72 giờ (M3).



Hình 5. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji nuôi ở các khoảng nhiệt độ khác nhau

Kết quả thu được cho thấy nhiệt độ nuôi có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt độ của enzim proteaza và α-amylaza. Khi nuôi mốc Koji ở nhiệt độ 33-35^{0}C trong suốt 72 giờ thì hoạt độ hai enzim tạo thành là rất thấp đặc biệt là enzim proteaza, sau đó là mẫu M2 nuôi ở 33 - 35^{0}C trong 36 giờ đầu và 25 - 28^{0}C trong 36 giờ sau cho lượng enzim cao hơn so với mẫu M3. Với chế độ nuôi là 33-35^{0}C trong 24 giờ đầu, 25 - 28^{0}C trong 48 giờ tiếp sau thì hoạt độ hai enzim tạo thành là cao nhất. Điều này cho thấy trong khoảng 24 giờ đầu nhiệt độ 33 - 35^{0}C là thích hợp cho nấm mốc phát triển tạo hệ sợi và ở các giờ tiếp theo 25 - 28^{0}C thích hợp cho việc tạo enzim, đặc biệt là enzim proteaza. Do vậy, chế độ nuôi ở nhiệt độ là 33 - 35°C trong 24 giờ đầu, 25 - 28^{0}C trong 48 giờ sau được chúng tôi lựa chọn.

3.5. Ảnh hưởng của việc bổ sung và duy trì độ ẩm đến hoạt lực enzim của chế phẩm Koji

Trong quá trình nuôi mốc Koji độ ẩm đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng đến hoạt độ enzim tạo thành. Vì vậy việc tiến hành nghiên cứu các điều kiện ẩm khác nhau để tìm ra chế độ ẩm thích hợp nhất cho quá trình nuôi tạo chế phẩm mốc Koji là rất cần thiết. Thí nghiệm được tiến hành với các mẫu như sau:

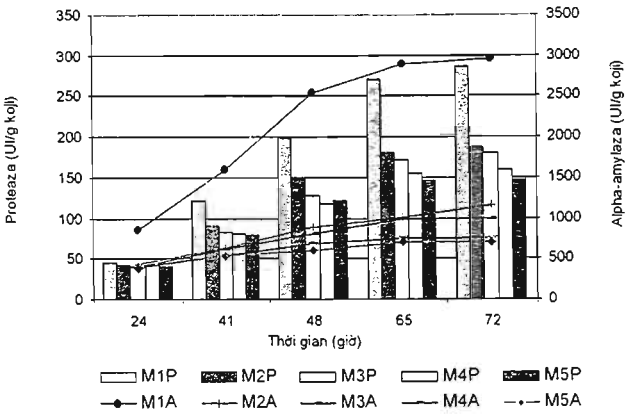
- Mẫu M1: bổ sung ẩm gián tiếp bằng hơi ẩm bão hoà (dùng máy phun ẩm) trong quá trình nuôi.

- Mẫu M2: không bổ sung ẩm trong suốt quá trình nuôi.

- Mẫu M3: bổ sung ẩm trực tiếp vào nguyên liệu, luôn giữ độ ẩm đạt 30% trong quá trình nuôi.

- Mẫu M4: bổ sung ẩm trực tiếp vào nguyên liệu, luôn giữ độ ẩm đạt 35% trong quá trình nuôi.

- Mẫu M5: bổ sung ẩm trực tiếp vào nguyên liệu, luôn giữ độ ẩm đạt 40% trong quá trình nuôi.



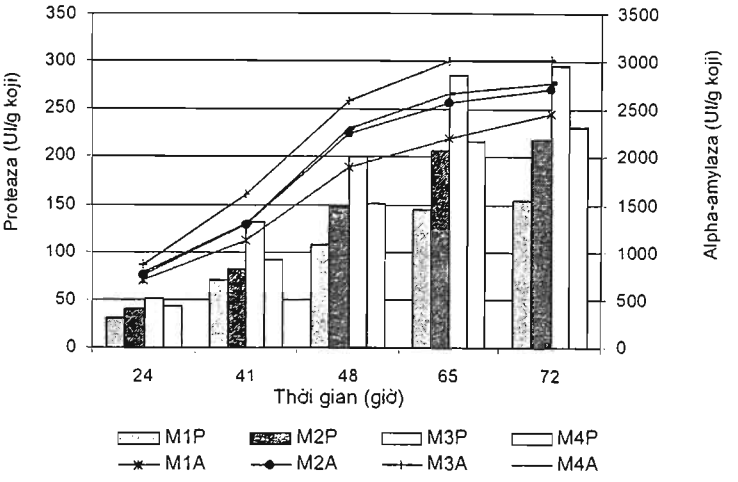
Hình 6. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji nuôi ở các điều kiện ẩm khác nhau

Kết quả thu được cho thấy nếu bổ sung ẩm gián tiếp bằng hơi ẩm bão hoà (dùng máy phun ẩm) trong quá trình nuôi thì hoạt độ enzim tạo thành cao hơn rất nhiều so với mẫu không bổ sung ẩm và các mẫu bổ sung ẩm trực tiếp vào nguyên liệu với các độ ẩm khác nhau. Đặc biệt càng bổ sung ẩm trực tiếp vào nguyên liệu thì lượng enzim tạo thành càng ít. Do đó chúng tôi chọn chế độ bổ sung ẩm gián tiếp bằng hơi ẩm bão hòa trong suốt quá trình nuôi.

3.6. Ảnh hưởng của độ dày khối ủ đến hoạt lực enzim của chế phẩm Koji

Các thí nghiệm được tiến hành với các mẫu có độ dày khối ủ khác nhau nhằm tìm được độ dày thích hợp cho hoạt độ enzim cao nhất: có độ dày khối ủ là 1 cm, 2 cm, 3 cm và 4 cm (M1, M2, M3, M4).

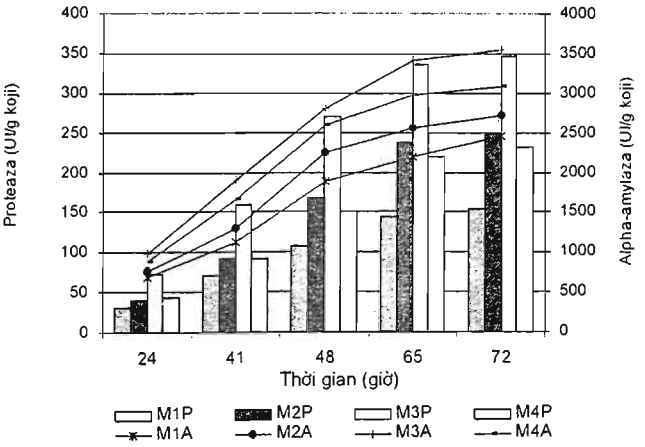
Kết quả thu được cho thấy với mẫu có độ dày khối ủ là 3 cm cho hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza cao nhất. Vì vậy chúng tôi chọn độ dày khối ủ 3 cm là thích hợp nhất khi nuôi tạo chế phẩm Koji.



Hình 7. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji nuôi ở các độ dày khác nhau

3.7. Ảnh hưởng của mức độ đảo trộn đến hoạt lực enzim của chế phẩm mốc

Các thí nghiệm được tiến hành với các mẫu có mức độ đảo trộn khác nhau như sau: không đảo trộn (M1), đảo 4 giờ/lần (M2), đảo 8 giờ/lần (M3), đảo 12 giờ/lần (M4).



Hình 8. Hoạt độ enzim proteaza và α-amylaza của mốc Koji ở các mức độ đảo trộn khác nhau

Kết quả thu được cho thấy việc tiến hành đảo trộn định kỳ 8 giờ/lần thu được chế phẩm mốc Koji có hoạt độ enzim cao hơn hẳn. Với các mẫu không đảo trộn hay đảo trộn ít (4 giờ/lần) thì nấm mốc không được cung cấp đủ không khí, ảnh hưởng đến sự phát triển tạo hệ sợi ban đầu, nấm mốc phát triển cục bộ chủ yếu ở phía trên bề mặt khối ủ. Còn với

mẫu đảo trộn nhiều hơn 8 giờ/lần thì lượng enzim tạo thành cũng không cao, điều này là do khi đảo trộn quá nhiều thì hệ sợi của nấm mốc sẽ bị gãy ảnh hưởng đến việc hình thành enzim. Hơn nữa việc thông thoáng quá sẽ tạo điều kiện cho khối ủ tiếp xúc nhiều với không khí nên rất dễ hình thành bào tử, ảnh hưởng trực tiếp tới việc tạo thành enzim proteaza và α-amylaza. Do vậy chúng tôi lựa chọn chế độ đảo trộn định kỳ 8 giờ/lần cho quá trình nuôi mốc Koji là thích hợp nhất.

IV. KẾT LUẬN

1. Lựa chọn được 2 loại công thức phối trộn nguyên liệu phù hợp với quá trình nuôi mốc Koji đó là: Đậu tương hấp và lúa mì rang tỉ lệ 1:1; đậu tương hấp và đậu tương rang tỉ lệ 1:1.

2. Xác định được các điều kiện thích hợp đảm bảo cho quá trình nuôi mốc Koji có hoạt lực enzim cao: Thời gian ngâm đậu tương: 16-20 giờ, chế độ hấp đậu tương ở 115^{0}C trong thời gian 60 phút, tỷ lệ bào tử mốc giống ban đầu và nguyên liệu khô: 0,35 g/kg, nhiệt độ nuôi cấy tạo chế phẩm nấm mốc-Koji: 33-35^{0}C trong 24 giờ đầu và 25-28^{0}C trong 48 giờ tiếp theo, độ ẩm ban đầu của khối ủ là 42-45% và bổ sung ẩm gián tiếp bằng máy phun ẩm trong quá trình nuôi, độ dày khối ủ: 3 cm, chế độ đảo trộn định kỳ 8 giờ/lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Kiều Hữu Ảnh (1982), Vi sinh vật học công nghiệp, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.*
2. *Nguyễn Trọng Cẩn, Nguyễn Thị Hiền, Đỗ Thị Giang (2000), Công nghệ enzim, Trường đại học Bách khoa Hà Nội, Hà Nội.*
3. *Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty (1972), Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.*
4. *Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (2003),Vi sinh vật học, Nxb Giáo dục, Hà Nội.*
5. *Nguyễn Lân Dũng (1982), Một số sản phẩm của vi nấm. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, 1982.*
6. *Nguyễn Thị Hiền (2006), Công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩn lên men cổ truyền, NXB KH&KT Hà Nội.*
7. *Nguyễn Thị Hiền và Phan Thị Kim (1999), Nghiên cứu và áp dụng enzim từ hạt nảy mầm và từ vi sinh vật, Hội thảo sinh học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam*
8. *Nguyễn Đức Lượng, Công nghệ vi sinh tập, NXB Đại học Quốc gia - TP. HCM*
9. *Lê Xuân Phương (2001), Vi sinh vật công nghiệp, Nhà xuất bản Xây dựng.*
10. *Nguyễn Thanh Thuỷ (2004), Bài giảng: Enzim trong công nghệ sản xuất thực phẩm, Trường đại học Bách khoa Hà Nội.*

11. *Alagasamy Sumantha, Chamdran Sandhya et al (2005), Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation- Food technol. Bio technol, 313 - 319.*

12. *Alagasamy Sumantha, Paul Deepa et al (2006), Pice brain as a substrate for proteolytic enzyme production, Brazilian archives of biology and technology.*

13. *D. Fukushima (1981), Soy proteins for foods centering around soy sauce and tofu, Journal of Fermented products, 346-354.*

14. *D. Fukushima (2001), Soy sauce, Committee of Bio-industry Association, Handbook of Fermentation, Tokyo: Kyoritsu Shuppan Corp, 588-592.*

15. *Horikoshi Koki (1996), Alkalophiles from an industrial poit of view, FEM, Microbial. Rev, 259-270.*

16. *Nunomura, M. Sasaki (1986), Soy sauce, Legume-based fermented foods, 5-46.*

17. *Ke Shun Liu (1995), Soy Sauce as Natural Seasoning, University of Missouri, Columbia.*

18. *Tzou-Chi Huang and Der-Feng Teng (1998), Soy Sauce: Manufacturing and Biochemical Changes, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan.*

19. *WH. Hsu, MN. Lai, DL. Lin, CD. Jan, (1974), Studies on the brewing of soy sauce with mixed fermentation, Food Industry Research and Development Institute report.*