

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME α -AMYLASE TRONG CHẾ PHẨM KOJI SẢN XUẤT TỪ *Aspergillus oryzae*

Trần Quyết Thắng, Nguyễn Minh Hưng, Trần Ngọc Đào, Phan Thị Hồng Liên*

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: lienpth@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 24/01/2024; Ngày nhận bài sửa: 15/3/2024; Ngày chấp nhận đăng: 22/3/2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme α -amylase trong chế phẩm koji được sản xuất từ *Aspergillus oryzae* trên môi trường gạo nếp và khô đậu phộng như tỉ lệ thành phần môi trường gạo nếp:khô đậu phộng, độ ẩm môi trường ban đầu, tỉ lệ mốc giống bổ sung, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy nấm mốc *A. oryzae* và đưa ra điều kiện nuôi cấy thích hợp. Hoạt độ α -amylase đạt cực đại là $210,80 \pm 9,52$ U/g chất khô khi nuôi cấy *A. oryzae* với các điều kiện thích hợp như sau tỉ lệ thành phần môi trường gạo nếp : khô đậu phộng 7:3 (w/w); độ ẩm môi trường ban đầu 55%; tỉ lệ mốc giống bổ sung 0,5% so với khối lượng cơ chất; nhiệt độ 30 °C trong thời gian 72 giờ nuôi cấy.

Từ khóa: Hoạt độ α -amylase, khô đậu phộng, nếp, *Aspergillus oryzae*.

1. MỞ ĐẦU

Koji là chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* thuần chủng, được sản xuất bằng cách phối trộn mốc giống với các cơ chất như đậu nành, ngô mảnh, cám gạo, cám mì hay gạo nếp và có bổ sung thêm trấu để tăng độ tơi xốp, thoáng khí để nấm mốc phát triển và tạo các enzyme thủy phân [1]. Ngoài trấu, khô đậu phộng cũng được biết đến là một loại phụ phẩm của quá trình sản xuất dầu nhưng có hàm lượng chất dinh dưỡng phong phú tuy nhiên chỉ được tận dụng làm phân bón, thức ăn chăn nuôi. Với độ ẩm của khô đậu phộng đạt khoảng $2,07 \pm 0,31\%$ [2], phù hợp cho việc thay thế trấu trong việc tạo môi trường nuôi cấy *A. oryzae* để tạo ra chế phẩm koji.

α -amylase là một trong số các enzyme ngoại bào được *A. oryzae* sinh tổng hợp theo phương pháp lên men bán rắn (Solid State Fermentation - SSF), xúc tác quá trình thủy phân các liên kết α -1,4-glucoside trong mạch tinh bột và các polysaccharide liên quan giải phóng đường α -anomer và các dextrin giới hạn [3]. Amylase có trong động vật, thực vật và vi sinh vật, trong đó amylase của nấm mốc có nguồn gốc từ các sản phẩm lên men truyền thống. *A. oryzae* là một trong các chủng vi sinh vật được FDA công nhận là vi sinh vật an toàn (Generally Recognized As Safe - GRAS) [4]. Các amylase của nấm, đặc biệt là từ các loài *Aspergillus*, có ý nghĩa về mặt sinh lý, thương mại [5] và được ứng dụng nhiều trong ngành công nghệ thực phẩm như sản xuất rượu bia, phụ gia sản xuất bánh mì [6].

Nhiều đề tài khác nhau nghiên cứu về quá trình sinh tổng hợp enzyme α -amylase của *A. oryzae* bằng SSF đã được thực hiện ở nhiều nước trên thế giới, nổi bật hơn cả là các nghiên cứu tận dụng phế phẩm để làm chất nền để sản xuất enzyme. Trong đó, Pengthamkeerati *et al.* (2012) đã tận dụng bã sản để sản xuất α -amylase, mặc dù thành phần dinh dưỡng của bã sản chủ yếu là tinh bột (59,97% w/w) nhưng hàm lượng nitrogen rất thấp (0,63% w/w) dẫn đến hoạt độ enzyme chỉ đạt ở mức thấp [7]. Kareem *et al.* (2009) thì sử dụng phế phẩm từ đậu đỗ để làm cơ chất để nuôi cấy [8], ngoài ra còn có Ramachandran *et al.* (2004) đã sử dụng bánh dầu dừa, phụ phẩm của quá trình chiết xuất dầu dừa để sản xuất enzyme α -amylase bằng *A. oryzae* [9]. Nhìn chung, các nghiên cứu tận dụng phụ phẩm để sản xuất enzyme đã không còn xa lạ nhưng việc tìm được nguồn cơ chất mới lạ, giúp giảm thiểu chất thải ra môi trường mà vẫn có thể đáp ứng các điều kiện sinh trưởng và phát triển của nấm mốc nói chung và *A. oryzae* nói riêng là rất khó. Khô đậu phộng, một loại phụ phẩm của quá trình sản xuất dầu đậu phộng,

không chỉ cung cấp chất dinh dưỡng tốt mà còn có thể tạo diện tích bề mặt lớn, thoáng khí thích hợp cho *A. oryzae* sinh tổng hợp enzyme. Nhận thấy được tiềm năng to lớn của loại phụ phẩm này nên việc tận dụng nguồn đậu phộng tách dầu hiện đang được các nhà nghiên cứu trong và ngoài nước hướng đến [2, 10, 11].

Hoạt độ enzyme là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng sinh enzyme của nấm mốc *A. oryzae* trên môi trường khô đậu phộng và gạo nếp. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng việc phối trộn hai môi trường gồm khô đậu phộng với gạo nếp, độ ẩm môi trường phối trộn, tỉ lệ mốc giống bổ sung vào môi trường, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy nấm mốc ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp α -amylase bằng *A. oryzae* đã được thực hiện.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mốc giống *A. oryzae* được sử dụng là bột Hwanggukgyun, xuất xứ từ Hàn Quốc có độ ẩm là $6,26 \pm 0,04\%$ với mật độ bào tử trung bình là $127,9 \times 10^6$ (CFU/g). Đây là chế phẩm nấm mốc được sử dụng để sản xuất Meju (một loại nước tương lên men).

Khô đậu phộng sử dụng trong nghiên cứu được lấy từ đậu phộng nguyên liệu sau ép dầu, bảo quản trong túi kín để phân tích với các thành phần carbohydrate $28,50 \pm 0,05\%$; protein $50,07 \pm 0,08\%$; lipid $10,30 \pm 0,10\%$ và độ ẩm $3,98 \pm 0,03\%$. Nguyên liệu đậu phộng được mua ở Công ty TNHH Thương mại Dịch vụ Phú Minh Tâm.

Gạo nếp sử dụng trong nghiên cứu là loại nếp cái hoa vàng được sản xuất tại Công ty TNHH Vinh Hiền có thành phần carbohydrate $79,80 \pm 0,06\%$; protein $5,58 \pm 0,02\%$ và độ ẩm $12,17 \pm 0,02\%$.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng tỉ lệ phối trộn nguyên liệu

Nguyên liệu giàu tinh bột được rửa sạch và hấp chín. 25 g gạo nếp với các tỉ lệ nếp hấp và khô đậu phộng (w/w) được khảo sát ở các tỉ lệ: 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5 cho vào các bình tam giác có dung tích 250 mL (đường kính đáy và chiều cao bình lần lượt là 85 và 140 mm), trải đều với chiều dày khoảng 1-2 cm. Hỗn hợp được hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 15 phút, độ ẩm là 50% sau khi bổ sung 8,71 mL nước cất vô trùng để hiệu chỉnh ẩm và bổ sung thêm 1% (w/w) bột Hwanggukgyun. Sau đó hỗn hợp được ủ để lên mốc ở 30 °C trong 72 giờ. Lấy mẫu môi trường đã lên mốc, xác định hoạt độ α -amylase theo Rukhliadeva [12].

2.2.2. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường ban đầu

25 g nguyên liệu được chuẩn bị và phối trộn với tỉ lệ nếp hấp và khô đậu phộng (w/w) thích hợp thu được từ thí nghiệm 2.2.1, được cho vào các bình tam giác 250 mL với các giá trị độ ẩm ban đầu sau khi hiệu chỉnh khảo sát: 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65% và bổ sung 1% (w/w) bột Hwanggukgyun. Hỗn hợp được lên mốc ở 30 °C trong 72 giờ. Duy trì độ ẩm cần khảo sát bằng cách bổ sung nước cất vô trùng bằng với lượng nước mất đi sau mỗi 8 giờ lên mốc. Lấy mẫu môi trường đã lên mốc, xác định hoạt độ α -amylase theo Rukhliadeva [12].

2.2.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ mốc giống

Các nguyên liệu được chuẩn bị và phối trộn với tỉ lệ nếp hấp và khô đậu phộng (w/w) thích hợp thu được từ thí nghiệm 2.2.1, cân 25 g cho vào các bình tam giác 250 mL với độ ẩm thích hợp thu được từ thí nghiệm 2.2.2 và bổ sung bột Hwanggukgyun với các tỉ lệ khảo sát 0,25%; 0,5%; 0,75% và 1% (w/w). Hỗn hợp được lên mốc ở 30 °C trong 72 giờ. Lấy mẫu môi trường đã lên mốc, xác định hoạt độ α -amylase theo Rukhliadeva [12].

2.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nuôi cấy

Nguyên liệu được chuẩn bị 25 g và phối trộn với tỉ lệ nếp hấp và khô đậu phộng (w/w) thích hợp thu được từ thí nghiệm 2.2.1 được cho vào các bình tam giác 250 mL với độ ẩm môi trường thích hợp thu được từ thí nghiệm 2.2.2 và bổ sung bột Hwanggukgyun với tỉ lệ thích hợp thu được từ thí nghiệm 2.2.3. Các bình tam giác chứa mẫu được lên mốc trong tủ ẩm (Memmert, Đức) ở các điều kiện nhiệt độ 27 °C, 30 °C và 33 °C. Hoạt độ enzyme α -amylase được đánh giá theo các mốc thời gian 24, 48, 72, 96 và 120 giờ lên mốc [12].

2.2.5. Phương pháp phân tích

Xác định hoạt độ enzyme α -amylase

Phương pháp này dựa trên cơ sở thủy phân tinh bột bởi enzyme có trong dịch chế phẩm nghiên cứu. Hoạt độ enzyme α -amylase được xác định theo phương pháp của Rukhliadeva [12]. Cụ thể như sau 5 g mẫu được nghiền mịn và thêm 90 mL nước cất cùng 10 mL đệm acetate (pH = 4,7). Giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 30 °C trong 1 giờ, khuấy đảo định kỳ 10 phút 1 lần. Lọc và thu hồi dịch enzyme thô. Tiếp theo, cho 5 mL dịch enzyme đã pha loãng tác dụng với dung dịch tinh bột 1% (w/v) có nhiệt độ 30 °C trong 10 phút. Sau đó, hút 0,5 mL cho vào cốc 100 mL có chứa 50 mL dung dịch iot phân tích, khuấy đều. Mẫu được đo mật độ quang (OD) ở bước sóng $\lambda = 656$ nm để định lượng hoạt độ enzyme α -amylase. Làm tương tự đối với mẫu kiểm chứng (thay dịch enzyme bằng nước cất). Tính hoạt độ α -amylase theo công thức:

$$\text{Hoạt độ } \alpha\text{-amylase (U/g chất khô)} = \frac{7,264 \times C - 0,03766}{m} \times f$$

Trong đó: C: lượng tinh bột chưa bị thủy phân, $C = \frac{OD_{kc} - OD_{tn}}{OD_{kc}} \times 0,1$; m: khối lượng mẫu (g); f: hệ số pha loãng.

Đơn vị hoạt độ α -amylase (U) là lượng enzyme chuyển hóa được một gam tinh bột tan thành các dextrin có phân tử lượng khác nhau trong thời gian một giờ ở điều kiện nhiệt độ 30 °C và pH = 4,7. 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 α -amylase. Hoạt độ α -amylase được biểu diễn bằng số đơn vị hoạt độ enzyme có trong một gam chế phẩm khô.

Xác định độ ẩm

Thực hiện bằng phương pháp sấy mẫu ở nhiệt độ 105 °C đến khối lượng không đổi theo AOAC [13], độ ẩm W (%) được tính theo công thức:

$$W = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_1 - m}$$

Trong đó: m_1 là khối lượng chén sấy và khối lượng mẫu trước khi sấy (g), m_2 là khối lượng chén sấy và khối lượng mẫu sau khi sấy (g), m là khối lượng chén sấy (g).

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày ở dạng Mean \pm SD. Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê Minitab 21, phương pháp phân tích phương sai ANOVA. Biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft excel 2021.

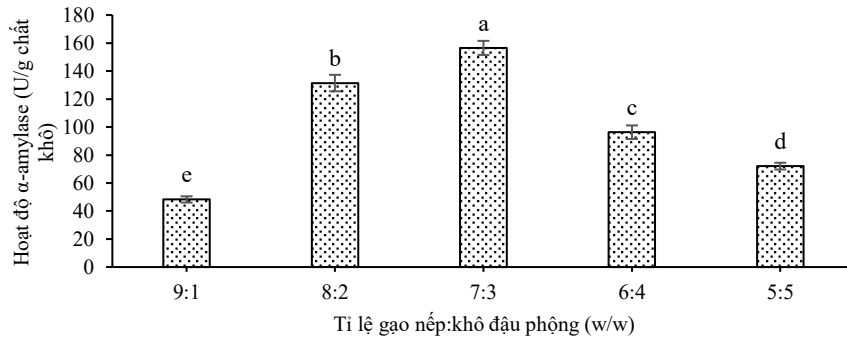
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng tỉ lệ phối trộn nguyên liệu

Ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn gạo nếp và khô đậu phộng đến hoạt độ enzyme α -amylase sau khi lên mốc bằng *A. oryzae* được thể hiện ở Hình 1.

Kết quả cho thấy hoạt độ enzyme α -amylase do nấm mốc sinh ra sau 72 giờ lên mốc ở nhiệt độ 30 °C ($p < 0,05$) bị ảnh hưởng bởi tỉ lệ phối trộn nếp và khô đậu phộng. Sự gia tăng tỉ lệ khô đậu phộng trong khối nguyên liệu sẽ làm hoạt độ α -amylase trong mẫu nghiên cứu tăng lên. Khi tăng tỉ lệ khô đậu phộng, hoạt độ enzyme tăng đáng kể và đạt giá trị cực đại tại tỉ lệ 7:3 (156,52 \pm 5,03 U/g), khác biệt có ý nghĩa với các tỉ lệ phối trộn khác với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tỉ lệ khô đậu phộng lên 40%, hoạt độ α -amylase bắt đầu có xu hướng giảm.

Sự phát triển của nấm mốc bị ảnh hưởng rất lớn từ thành phần dinh dưỡng và độ thoáng khí của môi trường nuôi cấy. Theo Nguyễn Đình Thường và cs (2007), căn cứ vào hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu mà định ra tỉ lệ thành phần môi trường phù hợp để có được chế phẩm koji chứa amylase có hoạt độ cao [14]. Khi bổ sung khô đậu phộng với tỉ lệ thích hợp sẽ giúp cân bằng thành phần dinh dưỡng và tạo độ tơi xốp cho môi trường, đồng thời cung cấp một lượng oxy cần thiết để tạo điều kiện sinh trưởng và phát triển tốt, từ đó enzyme sẽ sản sinh ra nhiều hơn [5]. Ngoài ra, khô đậu phộng còn là một nguồn nitơ tốt cho sự sinh trưởng, phát triển và tổng hợp enzyme của nấm mốc [2].



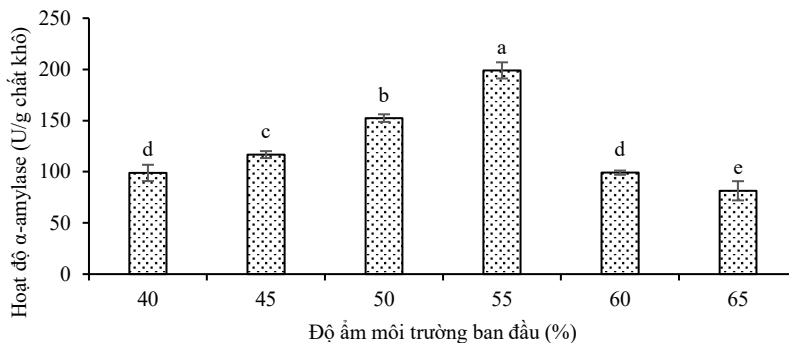
Hình 1. Ảnh hưởng của tỉ lệ gạo nếp: khô đậu phộng đến hoạt độ enzyme α -amylase (Các chữ trên mỗi đầu cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các mẫu ($p < 0,05$))

Chancharoonpong *et al.* (2012) đã thu được hoạt độ enzyme α -amylase cao nhất khi nuôi cấy nấm mốc *A. oryzae* S trên môi trường có tỉ lệ thành phần đậu nành:cám mì là 6:4 với hoạt độ amylase đạt 200 U/g chất khô [15]. Sự khác nhau này có thể do hàm lượng gạo nếp cao, kéo theo hàm lượng tinh bột trong môi trường tăng, dẫn đến sự cảm ứng tổng hợp nhiều enzyme α -amylase.

Từ kết quả trên cho thấy ở tỉ lệ gạo nếp:khô đậu phộng là 7:3 (w/w) thì sự phối trộn gạo nếp và khô đậu phộng giúp cải thiện hoạt độ enzyme và đạt giá trị tốt nhất.

3.2. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường ban đầu

Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường ban đầu đến hoạt độ enzyme α -amylase sau khi lên mốc bằng *A. oryzae* được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường ban đầu đến hoạt độ enzyme α -amylase (Các chữ trên mỗi đầu cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các mẫu ($p < 0,05$))

Kết quả cho thấy hoạt độ enzyme α -amylase do nấm mốc sinh ra sau 72 giờ lên mốc ở nhiệt độ 30 °C ($p < 0,05$) bị ảnh hưởng bởi độ ẩm môi trường nuôi cấy ban đầu. Hoạt độ α -amylase phụ thuộc rất nhiều vào độ ẩm cơ chất, chỉ đạt ở ngưỡng thấp ($98,85 \pm 7,97$ U/g) với độ ẩm 40% nhưng có sự thay đổi rõ rệt khi tăng độ ẩm lên 50% ($152,41 \pm 3,73$ U/g). Tiếp tục tăng độ ẩm môi trường lên đến 55%, hoạt độ enzyme đạt cực đại sau 72 giờ nuôi cấy ($199,00 \pm 7,91$ U/g) và hoạt độ có xu hướng giảm mạnh khi độ ẩm được tăng đến 65%.

Khi không cung cấp đủ độ ẩm cho nấm mốc phát triển sẽ xảy ra hiện tượng thay đổi trạng thái nguyên sinh chất dẫn tới sự đình chỉ của nấm mốc ở trạng thái nghỉ [16]. Ở độ ẩm thấp, áp suất nước cao và độ hòa tan của các chất dinh dưỡng thấp dẫn đến hoạt độ enzyme thấp [17]. Cùng với đó, độ ẩm thấp cũng khiến nấm mốc phát triển chậm, dẫn đến tích tụ enzyme ít và phải kéo dài thời gian nuôi cấy [16]. Với sự gia tăng độ ẩm, sự trương nở của cơ chất diễn ra đảm bảo sự hấp thu chất dinh dưỡng tốt hơn. Nhưng khi gia tăng độ ẩm quá cao, 60%, hoạt độ enzyme giảm mạnh ($99,12 \pm 2,05$ U/g) do nhiều lý do, khoảng cách giữa các phân tử cơ chất môi trường nuôi cấy giảm và có thể dẫn đến sự kết dính

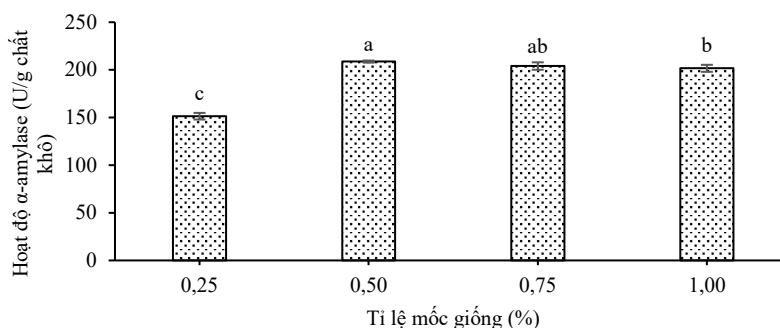
của các phân tử cơ chất, làm giảm độ xốp của môi trường dẫn đến hạn chế sự thông thoáng khí [17, 18] khiến nấm mốc kém phát triển, làm giảm hoạt độ enzyme.

Tác giả Nguyễn Hiền Trang và cs (2014) báo cáo rằng độ ẩm ban đầu của môi trường (cám gạo, trấu và bột mì) thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp enzyme α -amylase là 60% [19], kết quả cao hơn so với kết quả của nghiên cứu này, do môi trường này có độ xốp cao hơn so với gạo nếp và khô đậu phộng nên cần độ ẩm cao hơn để enzyme α -amylase sinh ra từ nấm mốc đạt cực đại. Theo Nguyễn Hoàng Lộc (2007), độ ẩm môi trường nuôi cấy nên giữ ở mức 50-60% [20].

Từ kết quả của nghiên cứu cho thấy độ ẩm môi trường ban đầu 55% là phù hợp để *A. oryzae* phát triển trên môi trường gạo nếp:khô đậu phộng (7:3).

3.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ mốc giống

Ảnh hưởng của tỉ lệ mốc giống đến hoạt độ enzyme α -amylase sau khi lên mốc bằng *A. oryzae* được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ mốc giống đến hoạt độ enzyme α -amylase

(Các chữ trên mỗi đầu cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các mẫu ($p < 0,05$))

Kết quả cho thấy hoạt độ enzyme α -amylase do nấm mốc sinh ra sau 72 giờ lên mốc ở nhiệt độ 30 °C ($p < 0,05$) bị ảnh hưởng bởi tỉ lệ mốc bổ sung. Khi tỉ lệ mốc giống tăng từ 0,25% lên 0,5%, hoạt độ α -amylase tăng và đạt cực đại khi bổ sung 0,5% mốc giống so với khối lượng cơ chất ($208,70 \pm 1,08$ U/g). Tiếp tục tăng tỉ lệ mốc giống, hoạt độ α -amylase khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với mẫu bổ sung 0,5%.

Quá trình sinh tổng hợp enzyme phụ thuộc rất lớn bởi lượng mốc bổ sung, khi bổ sung vào môi trường quá ít, phải cần thời gian dài để nấm mốc sinh trưởng, phát triển và tổng hợp enzyme. Ngược lại, bổ sung mốc giống quá nhiều có thể dẫn đến hiện tượng thiếu chất dinh dưỡng cung cấp cho nấm mốc sinh trưởng [21].

Trong nghiên cứu của Kassim (1983) cũng cho kết quả tương tự, điều kiện tối ưu để sản xuất α -amylase và glucoamylase bởi *A. oryzae* bằng cách sử dụng các nguồn carbon và nitơ khác nhau, môi trường lên men tốt nhất khi bổ sung 0,5% nấm mốc vào môi trường [22]. Tác giả Nguyễn Hiền Trang và cs (2014) đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ nấm mốc bổ sung đến quá trình sinh tổng hợp enzyme α -amylase, koji cho hoạt độ α -amylase cao nhất khi bổ sung nấm mốc với tỉ lệ 0,3% [19]. Sở dĩ có sự khác nhau này có thể là do mật độ bào tử có trong bột Hwanggukgyun được sử dụng trong nghiên cứu này thấp hơn nên phải sử dụng tỉ lệ cao hơn. Theo Nguyễn Hoàng Lộc (2007), tùy vào mật độ bào tử có trong mốc giống mà lượng mốc giống bổ sung dao động trong khoảng 0,2-2% [20].

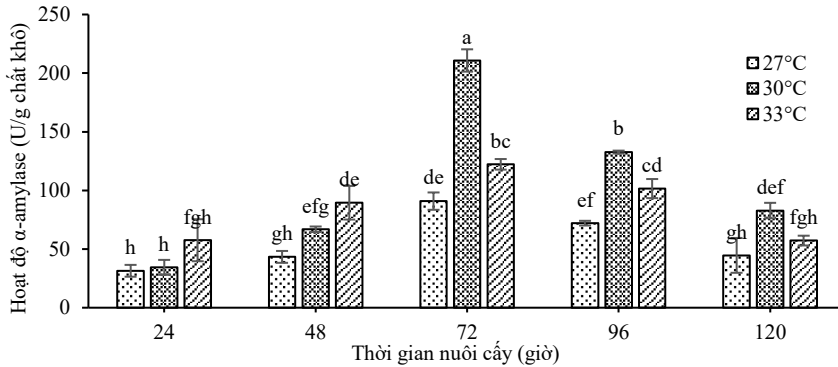
Trong nghiên cứu này, tỉ lệ mốc giống 0,5% (w/w) bổ sung vào môi trường gạo nếp và khô đậu phộng phù hợp hơn so với các tỉ lệ còn lại.

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nuôi cấy

Nhiệt độ và thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme α -amylase sau khi lên mốc bằng *A. oryzae* được thể hiện ở Hình 4.

Kết quả cho thấy hoạt độ enzyme α -amylase trong suốt quá trình lên mốc hỗn hợp gạo nếp:khô đậu phộng (7:3) bị ảnh hưởng có ý nghĩa ($p < 0,05$) bởi nhiệt độ và thời gian nấm mốc hoạt động. Hoạt độ enzyme α -amylase tăng liên tục trong thời gian từ 24 giờ đến 72 giờ và đạt giá trị cực đại ở 72 giờ nuôi cấy. Sau đó, giá trị giảm dần ở 96 giờ. Cả ba nhiệt độ khảo sát 27, 30 và 33 °C đều tuân theo quy luật này.

Về ảnh hưởng của nhiệt độ, kết quả cho thấy nhiệt độ càng cao, hoạt độ enzyme tăng giảm liên tục, quy luật này đúng ở các mốc thời gian khảo sát, trừ hai mốc thời gian 24 và 48 giờ là tăng dần nhưng không đáng kể. Cụ thể, hoạt độ enzyme cao nhất khi *A. oryzae* được nuôi cấy ở 30 °C, tiếp theo là 33 °C và thấp nhất ở 27 °C. Ở thời gian lên mốc 72 giờ, hoạt độ enzyme của mẫu được lên mốc ở 30 °C khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các mẫu còn lại và đạt giá trị cao nhất là $210,80 \pm 9,52$ U/g.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nuôi cấy đến hoạt độ enzyme α -amylase
(Các chữ trên mỗi đầu cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các mẫu ($p < 0,05$))

Trong suốt quá trình mọc sinh trưởng và phát triển (0-96 giờ), nấm mốc có sự thay đổi rõ nét về màu sắc, cụ thể sợi nấm dài hơn, từ màu xanh vàng chuyển sang nâu sẫm [1]. Sự thay đổi màu sắc này cho thấy nấm mốc đã trở nên già. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy đến 120 giờ, hoạt độ enzyme giảm mạnh. Sự suy giảm về sinh khối nấm mốc cộng với hàm lượng chất dinh dưỡng trong môi trường giảm và sự gia tăng các sản phẩm trao đổi chất làm thay đổi điều kiện nuôi cấy sẽ dẫn đến sự giảm dần của hoạt độ α -amylase [18, 23].

Trong nghiên cứu của Ramachandran *et al.* (2004) cũng cho kết quả tương tự, nhóm tác giả đã sử dụng bánh dầu dừa làm chất nền để sản xuất enzyme α -amylase bằng cách nuôi cấy *A. oryzae*, điều kiện tối ưu để thu được hoạt độ α -amylase đạt cực đại là 30 °C trong 72 giờ [9]. Sivaramakrishnan *et al.* (2007) đã nghiên cứu quá trình sản xuất enzyme α -amylase bằng các phụ phẩm công-nông nghiệp (SSF) bởi *A. oryzae* cho hoạt độ enzyme đạt cực đại sau 72 giờ ở 30 °C trên cám lúa mì [24]. Theo Shah *et al.* (2014), khi nuôi cấy *A. oryzae* để thu nhận enzyme α -amylase, hoạt độ đạt cực đại sau 72 giờ nuôi cấy ($4,255$ IU/mL) [25].

Bên cạnh đó, yếu tố nhiệt độ cũng là một yếu tố quan trọng đối với sự sinh trưởng và tạo thành enzyme α -amylase của *A. oryzae*. Bhanja *et al.* (2007) báo cáo rằng, khi sản xuất enzyme α -amylase bằng SSF bởi *A. oryzae* IFO-30103, trong 5 mức nhiệt độ khảo sát 28; 30; 32; 34 và 36 °C, nhiệt độ 30 °C cho hoạt độ α -amylase cao nhất và đạt 12899 U/g [26]. Theo Nguyễn Đức Lượng (2004), nhiệt độ nuôi tối thích để thu nhận enzyme α -amylase đối với nấm sợi thuộc chi *Aspergillus* là 28-30 °C [5].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sử dụng khô đậu phộng kết hợp với gạo nếp làm chất nền để sản xuất koji giàu enzyme α -amylase bằng bột Hwanggukgyun được sản xuất từ *A. oryzae*, đưa ra được các thông số thích hợp cho quá trình sinh trưởng, phát triển và tích tụ enzyme α -amylase có trong koji. Các điều kiện nuôi cấy sẽ được khảo sát thêm và tiến hành tối ưu hóa ở những nghiên cứu tiếp theo nhằm thu nhận chế phẩm enzyme thương mại ứng dụng sản xuất nước chấm lên men từ hạt sen.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 151/HĐ-DCT ngày 01/10/2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thị Hồng Ánh, Nguyễn Bảo Toàn, Phan Thị Hồng Liên, Nguyễn Minh Hưng, Trần Ngọc Đào - Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quy trình sản xuất nước tương hạt sen và đậu nành

- sử dụng *Aspergillus oryzae*. Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm **23** (2) (2023) 14-22. https://doi.org/10.62985/j.huit_ojs.vol23.no2.4
2. Bùi Viết Cường, Lê Thị Kim Dung - Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân bột bánh dầu đậu phộng nhằm thu dịch protein thủy phân bằng sự kết hợp giữa nhiệt và xúc tác HCl. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng **7** (128) (2018) 18-22.
 3. Nguyễn Thị Hiền, Lê Gia Hy, Quân Lê Hà, Từ Việt Phú - Công nghệ sản xuất enzym, protein và ứng dụng. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam (2012) 150.
 4. Castro R. J. S. de and Sato H. H. - Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology **3** (3) (2014) 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.002>
 5. Nguyễn Đức Lượng - Công nghệ enzyme. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (2004) 318.
 6. Trần Liên Hà, Nguyễn Văn Cách, Vũ Thu Đoàn, Đinh Đức Luân - Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng sinh α -amylase cao. Khoa học Công nghệ (2013) 37-41.
 7. Pengthamkeerati P., Numsomboon S., Satapanajaru T. and Chairattanamakorn P. - Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* from cassava bagasse and wastewater sludge under solid-state fermentation. Environmental Progress & Sustainable Energy **31** (1) (2012) 122-129. <https://doi.org/10.1002/ep.10542>
 8. Kareem S., Akpan I. and Oduntan S. - Cowpea waste: A novel substrate for solid state production of amylase by *Aspergillus oryzae*. African Journal of Microbiology Research **3** (12) (2009) 974-977.
 9. Ramachandran S. et al. - Coconut oil cake-a potential raw material for the production of alpha-amylase, Bioresour Technol **93** (2) (2004) 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.021>
 10. Chen Y., Kong Q., Chi C., Shan S. and Guan B. - Biotransformation of aflatoxin B1 and aflatoxin G1 in peanut meal by anaerobic solid fermentation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. International Journal of Food Microbiology **211** (2015) 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.021>
 11. Hu X., Mouming Z., Laihao L., Bao Y., Xianqing Y., Haiyan W. and Jiaoyan R. - Emulsifying properties of cross-linking between proteins extracted from cold/hot pressed peanut meal and hydrolysed fish (*Decapterus maruadsi*) proteins, International Journal of Food Properties **17** (2014) 1750-1762. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.-724755>
 12. Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng, Lê Thị Lan Chi - Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội (2006) 179-182.
 13. AOAC - Official Methods of Analysis, 22nd. Oxford University Press, New York (2023).
 14. Nguyễn Đình Thường, Nguyễn Thanh Hằng - Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic. Tái bản lần thứ 3. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật (2007) 66-69.
 15. Chancharoonpong C., Hsieh P. C. and Sheu S. C. - Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji fermentation, APCBEE Procedia **2** (2012) 57-61.
 16. Nguyễn Thị Việt Anh - Nghiên cứu kỹ thuật nuôi nấm mốc sản xuất từ chế phẩm nấm mốc *Aspergillus oryzae* S2 nhằm cải thiện chất lượng tương Nam Đàn. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn **1** (2016) 59-66.
 17. Sundarram A., Murthy T. P. K. - α -amylase production and applications: A review. Journal of Applied & Environmental Microbiology **2** (4) (2014) 166-175.
 18. Nguyễn Hiền Trang, Phạm Trần Thùy Hương, Nguyễn Thị Thủy Tiên - Ảnh hưởng của một số yếu tố lên hoạt độ protease ngoại bào trong chế phẩm koji tương sản xuất từ chủng *Aspergillus oryzae* N2 nuôi cấy trên môi trường bán rắn. Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp **91** (3) (2013) 37-46. <https://doi.org/10.52714/dthu.3.6.2013.35>
 19. Nguyễn Hiền Trang, Phạm Trần Thùy Hương, Nguyễn Thị Thủy Tiên - Ảnh hưởng của một số

- yếu tố lên hoạt độ amylase ngoại bào trong chế phẩm koji tương sản xuất từ chủng *Aspergillus oryzae* N2 nuôi cấy trên môi trường bán rắn. Hue University Journal of Science **91A** (3) (2014) 247-256. <https://doi.org/10.26459/jard.v91i3.3055>
20. Nguyễn Hoàng Lộc - Giáo trình nhập môn Công nghệ sinh học. Nhà xuất bản Đại học Huế (2007) 77-78.
 21. Nguyễn Văn Tính, Nguyễn Thị Hà - Khảo sát môi trường nuôi cấy nấm *Aspergillus fumigatus* ET3 để tăng hiệu suất sản sinh phytase. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ **37** (1) (2015) 49-56.
 22. Kassim E. A. - Effect of the physiological conditions on alpha-amylase and glucoamylase formation by a selected strain of *Aspergillus oryzae*. Mikrobiologiia **52** (3) (1983) 422-427.
 23. Wang R., Chau Sing Law R., and Webb C. - Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. Process Biochemistry **40** (1) (2005) 217-227. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.12.008>
 24. Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K. M., Soccol C. and Pandey A. - Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. Journal of Scientific and Industrial Research **66** (8) (2007) 621-626.
 25. Shah I. J., Gami P. N., Shukla R. M. and Acharya D. K. - Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. Basic Res J Microbiol **1** (4) (2014) 1-10.
 26. Bhanja T., Rout S., Banerjee R. and Bhattacharyya B. C. - Comparative profiles of α -amylase production in conventional tray reactor and GROWTEK bioreactor. Bioprocess Biosyst Eng **30** (5) (2007) 369-376. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0133-0>

ABSTRACT

EFFECTS OF SOME FACTORS ON THE ABILITY TO BIOSYNTHESIZE ENZYME α -AMYLASE IN KOJI PREPARATION PRODUCED FROM *Aspergillus oryzae*

Tran Quyet Thang, Nguyen Minh Hung, Tran Ngoc Dao, Phan Thi Hong Lien*

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

*Email: lienpth@huit.edu.vn

This study was conducted to investigate several factors affecting the ability to synthesize α -amylase enzyme in koji preparation produced from *Aspergillus oryzae* on sticky rice and peanut dried medium such as the ratio of medium components. Glutinous rice field: dry peanuts, initial environmental humidity, additional mold rate, temperature and time of culturing *A. oryzae* and providing appropriate culture conditions. α -amylase activity reached a maximum of 210.80 ± 9.52 U/g dry solid when culturing *A. oryzae* with the following appropriate conditions: medium ratio of sticky rice:dry peanuts 7:3 (w/w); initial ambient humidity 55%; additional mold rate is 0.5% compared to substrate weight; temperature 30 °C for 72 hours of culture.

Keywords: α -amylase activity, dried peanuts, sticky rice, *Aspergillus oryzae*.