



ỨNG DỤNG VI SINH VẬT VÀ ENZYME PROTEASE ĐỂ CẢI TIẾN CHẤT LƯỢNG NƯỚC TƯƠNG LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

Nguyễn Văn Thành¹ và Trần Thị Yến Minh²

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

²Học viên Cao học Công nghệ Sinh học khóa 16, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/02/2013

Ngày chấp nhận: 20/06/2013

Title:

Application of microorganisms and enzyme protease to improve the quality of traditional fermented soy-sauce

Từ khóa:

Aspergillus oryzae, enzyme protease, koji, nước tương, *Pediococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*

Keywords:

Aspergillus oryzae, koji, enzyme protease, *Pediococcus halophilus*, soy-sauce, *Zygosaccharomyces rouxii*

ABSTRACT

The objectives of the study were to produce soy sauce with high quality, free of toxic 3-MCPD (3-monochloropropane-1,2-diol), and to reduce production time, based on these several experiments were carried out. Results of research showed that inoculating pure starter culture of *Aspergillus oryzae* 10^6 spores/g dry weight (gdw) has shorten the koji incubation time to 52 hours in comparison to 4-5 days of the traditional process. Supplementing of 2% commercializing enzyme into hydrolytic step at 50°C, 36 hours before adding salt (NaCl), the efficiency of amino acid hydrolysis obtained 44,8% which was more higher than that of the control 8,8%. Aroma of soy sauce was improved by inoculating with the bacteria *Pediococcus halophilus* 10^4 cells/g and the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* 10^2 cells/g of mixture together in the period of brine fermentation.

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm tạo ra sản phẩm nước tương có giá trị dinh dưỡng cao, không chứa độc tố 3-MCPD và rút ngắn thời gian sản xuất, từ đó một số thí nghiệm đã được tiến hành. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc chủng giống thuần *Aspergillus oryzae* với mật số 10^6 bào tử/g chất khô (gck) đã rút ngắn thời gian ủ koji xuống còn 52 giờ so với quá trình ủ truyền thống khoảng 4 - 5 ngày. Kết hợp bổ sung 2% chế phẩm enzyme thương mại vào công đoạn thủy phân koji ở 50°C, 36 giờ trước khi bổ sung muối cho hiệu suất thủy phân đạm amin cao nhất 44,8% và cao hơn nhiều so với mẫu đối chứng (không bổ sung enzyme) 8,8%. Trong quá trình lên men trong nước muối bằng phương pháp bổ sung vi khuẩn *Pediococcus halophilus* với mật số 10^4 tế bào/g và nấm men *Zygosaccharomyces rouxii* 10^2 tế bào/g dịch lên men sản phẩm nước tương thu được có hương vị thơm ngon tự nhiên.

1 GIỚI THIỆU

Nước tương là thực phẩm được sử dụng phổ biến ở nước ta, ở Châu Á và ngày càng phổ biến ở nhiều nước trên thế giới, bởi vì nước tương giàu chất dinh dưỡng do chứa

nhều acid amin, là gia vị thường được sử dụng trong bữa ăn hàng ngày và trong chế biến thực phẩm. Tuy nhiên, thời gian gần đây việc sử dụng phương pháp hóa giải trong sản xuất nước tương đã tạo ra nhiều độc tố nhất là

3-MCPD (3-monochloropropane-1,2-diol) gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Ưu điểm của phương pháp này là thời gian sản xuất ngắn, mùi vị đã quen với người tiêu dùng nên được ưa thích. Nhưng nhược điểm là sử dụng acid HCl để thủy phân, gây độc hại và ô nhiễm môi trường. Mặt khác, phương pháp sản xuất nước tương lên men truyền thống thì an toàn cho người tiêu dùng nhưng lượng đậm thủy phân không cao, thời gian sản xuất kéo dài và mùi vị chưa được người tiêu dùng chấp nhận.

Do đó, việc ứng dụng công nghệ sinh học để cải tiến quy trình sản xuất nước tương bằng phương pháp lên men nhằm tạo ra sản phẩm giàu dinh dưỡng, an toàn cho người tiêu dùng với thời gian sản xuất ngắn, không gây ảnh hưởng tác hại đến môi trường là vấn đề đặt ra cần giải quyết. Vì vậy, việc nghiên cứu cải tiến quy trình sản xuất nước tương lên men bằng cách sử dụng vi sinh vật và enzyme protease đã được tiến hành.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ (ĐHCT).

2.1.1 Nguyên liệu

– Đậu nành tách béo, bột mì, muối ăn (NaCl) mua ngoài thị trường.

– Mốc giống *Aspergillus oryzae* có nguồn gốc từ ngân hàng giống của Hoa kỳ ATCC (American Type Culture Collection) và đang tồn trữ giống tại Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, ĐHTC.

– Chủng giống vi khuẩn *Pediococcus halophilus* và nấm men *Zygosacharomyces rouxii* từ Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, ĐHTC.

– Chế phẩm enzyme protease (mua tại Viện Sinh học Nhiệt đới, Thành phố Hồ Chí Minh).

2.1.2 Hóa chất

– Môi trường: MRSA (Man Rogosa Sharpe Agar); PGA (Potato – glucose – agar)

– Hóa chất: NaHPO₄.2H₂O, NaH₂PO₄.H₂O, K₂HPO₄, SDS (Sodium Dodecyl Sulfat), OPA (Ortho-phthaldialdehyde), DTT (Dithiotreitol), Ethanol, CBB (Coomasie brilliant blue), casein, bromoresol green, methyl red, bromophenol blue, formol, TCA (Trichloroacetic acid), acid boric, acid acetic, acid citric, acid sulfuric, acetone, Na₂CO₃, MgO, K₂SO₄, CuSO₄, NaOH, (NH₄)₂SO₄ mua ở cơ sở bán Hóa chất.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ chủng nấm mốc và thời gian ủ koji đến hoạt tính enzyme protease koji

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 2 nhân tố: (1) tỉ lệ mốc giống (3 mức độ: 10⁴, 10⁵, 10⁶ bào tử/g chất khô) và (2) Thời gian ủ koji (3 mức độ: 42, 52, 68 giờ). Thí nghiệm lặp lại 3 lần, nên có 9 (3x3) nghiệm thức và 27 (9 x 3) đơn vị thí nghiệm. Chỉ tiêu khảo sát gồm hoạt tính enzyme protease theo phương pháp Anson cải tiến và hàm lượng protein theo phương pháp Bradford (Lâm Thị Kim Châu, 2004).

2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng chế phẩm enzyme protease đến khả năng thủy phân protein

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 2 nhân tố: (1) Hàm lượng enzyme bổ sung (6 mức độ: 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 %) và (2) Thời gian thủy phân (4 mức độ: 12, 24, 36, 48 giờ). Thí nghiệm lặp lại 3 lần, nên có 24 (4x6) nghiệm thức và 72 (24x3) đơn vị thí nghiệm. Chỉ tiêu khảo sát là hàm lượng đạm amin theo phương pháp chuẩn độ formol.

2.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của chủng giống vi khuẩn *Pediococcus halophilus* và nấm men *Zygosacharomyces rouxii* đến chất lượng và cảm quan nước tương

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên theo hai phương thức bổ sung vi khuẩn và nấm men: (1) bổ sung vi khuẩn - nấm men cùng lúc vào thời gian đầu lên men; (2) bổ sung vi khuẩn trước kiểm tra pH dịch lên men khoảng 5,5 thì

cho nấm men vào. Hai nhân tố: (1) Mật số tế bào vi khuẩn (3 mức độ: 10^2 , 10^4 , 10^6 tế bào/g dịch lên men); (2) Mật số tế bào nấm men (3 mức độ: 10^2 , 10^4 , 10^6 tế bào/gam dịch lên men). Thí nghiệm lặp lại 2 lần, tổng cộng có 40 đơn vị thí nghiệm.

Chỉ tiêu khảo sát: đánh giá cảm quan (Hà Duyên Tư, 2006).

Thử nghiệm sản xuất nước tương cải tiến từ tuyển chọn nghiệm thức tối ưu của thí nghiệm a đồng thời kết hợp so sánh với 2 nghiệm thức đối chứng không bổ sung enzyme protease thương mại và nghiệm thức sản xuất nước tương truyền thống.

Chỉ tiêu khảo sát: phân tích hàm lượng đạm amin, mật số vi khuẩn và nấm men.

2.2.4 Hoàn thiện hóa quy trình sản xuất nước tương và kiểm tra chất lượng sản phẩm

Thí nghiệm sản xuất nước tương theo quy trình cải tiến với các thông số tối ưu từ các thí nghiệm đã thực hiện.

Các chỉ tiêu phân tích: 3-MCPD, aflatoxin,

các chỉ tiêu lý hóa, vi sinh (gửi mẫu phân tích ở Trung tâm kiểm nghiệm).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của tỉ lệ chủng nấm mốc và thời gian ủ koji đến hoạt tính của enzyme protease koji

Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nấm mốc và thời gian ủ ảnh hưởng đến hoạt tính protease koji được trình bày ở Bảng 1.

Kết quả Bảng 1 cho thấy hoạt tính protease koji tại thời điểm 52 giờ với lượng mốc giống chủng vào là 10^6 bào tử/gck đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức 6 (5,13 U/g mẫu). Với cùng lượng mốc giống chủng (10^6 bào tử/gck) nếu tiếp tục kéo dài thời gian ủ đến 68 giờ (nghiệm thức 9), hoạt tính protease đã giảm xuống mức 4,73 U/g mẫu. Kết quả khảo sát cho thấy môi trường koji lúc này có hệ khuẩn ty phát triển chậm và sự hình thành bào tử diễn ra mạnh làm koji chuyển từ vàng xanh sang màu xanh đậm do đó đã làm giảm đi hoạt tính enzyme protease.

Bảng 1: Hoạt tính protease, hàm lượng protein, hoạt tính đặc hiệu của koji

| Nghiệm thức | Tổ hợp thời gian (giờ) và tỉ lệ mốc gốc (bào tử/gck) | Hoạt tính protease koji (U/g mẫu) | Hàm lượng protein (mg/g mẫu) | Hoạt tính đặc hiệu (U/g mẫu) |
|-------------|--|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 42- 10^4 | 2,55 ^h | 153,40 ^g | 16,62 ^g |
| 2 | 42- 10^5 | 3,28 ^g | 166,51 ^f | 19,69 ^b |
| 3 | 42- 10^6 | 4,08 ^f | 213,22 ^e | 19,14 ^d |
| 4 | 52- 10^4 | 4,09 ^f | 238,70 ^d | 17,13 ^f |
| 5 | 52- 10^5 | 4,38 ^d | 250,71 ^a | 17,47 ^{ef} |
| 6 | 52- 10^6 | 5,13 ^a | 242,50 ^c | 21,15 ^a |
| 7 | 68- 10^4 | 4,27 ^e | 242,13 ^c | 17,63 ^e |
| 8 | 68- 10^5 | 4,88 ^b | 249,30 ^a | 19,57 ^{bc} |
| 9 | 68- 10^6 | 4,73 ^c | 245,70 ^b | 19,25 ^{cd} |
| CV(%) | | 1,35 | 0,65 | 1,39 |

*Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% ($p \leq 0.05$)

Tuy nhiên, với tỉ lệ mốc giống 10^4 và 10^5 bào tử/gck thì thời gian ủ từ 42 - 68 giờ hoạt tính protease tiếp tục tăng do khi ủ bào tử nấm mốc nảy mầm và phát triển hệ khuẩn ty chậm hơn so với nghiệm thức được chủng tỉ lệ 10^6 bào tử/gck. Trong cùng một thời gian ủ là 52 giờ nhưng với tỉ lệ mốc giống chủng vào ở 3 mức độ 10^4 , 10^5 , 10^6 bào tử/gck sẽ cho kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% với hoạt

tính protease lần lượt là (4,09 U/g mẫu) ở nghiệm thức 4, (4,38 U/g mẫu) ở nghiệm thức 5, (5,13 U/g mẫu) ở nghiệm thức 6, cho thấy tỉ lệ mốc giống chủng vào có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính protease koji. Đồng thời ở nghiệm thức 6 với thời gian ủ koji là 52 giờ và tỉ lệ mốc giống 10^6 bào tử/gck cho hoạt tính protease đặc hiệu cao nhất 21,15 (U/g mẫu). Kết quả nghiên cứu phù hợp với công bố của

Nguyễn Đức Lượng (2002), thời gian thu nhận enzyme vào khoảng 36 - 60 giờ. Theo Đồng Thị Thanh Thu (2003) thời gian nuôi mốc 40 - 48 giờ khi mốc có màu vàng xanh. Nhiều chủng *Aspergillus* tạo enzyme cao nhất lúc mới bắt đầu sinh bào tử (Lương Đức Phẩm, 1998).

Qua đó, cho thấy tỉ lệ mốc giống và thời gian ủ koji rất ảnh hưởng đến hoạt tính protease của koji. Vì vậy, nghiệm thức 6, với tỉ lệ nấm mốc là 10⁶ bào tử/gck cùng với thời gian ủ là 52 giờ được chọn để tiến hành các thí nghiệm sau.

3.2 Ảnh hưởng chế phẩm enzyme protease bổ sung đến khả năng thủy phân protein

Xác định hoạt tính của chế phẩm enzyme

Kết quả đo hoạt tính chế phẩm enzyme ở

Bảng 2 được sử dụng để tính toán và phân tích các thông số.

Bảng 2: Hoạt tính của chế phẩm enzyme protease

| Chỉ số | Chế phẩm enzyme protease |
|--------------------------|--------------------------|
| Hoạt tính enzyme (U/g) | 12,20 |
| Hàm lượng protein (mg/g) | 352,80 |
| Hoạt tính đặc hiệu (U/g) | 34,58 |

Kết quả là số liệu trung bình của 3 lần lặp lại

Trước khi tiến hành giai đoạn lên men trong nước muối, giai đoạn thủy phân koji được tiến hành ở 50°C có bổ sung chế phẩm enzyme protease. Chế phẩm enzyme được bổ sung ở 5 mức độ: 1; 1,5; 2; 2,5; 3 (%) và 4 thời điểm lấy mẫu 12; 24; 36; 48 (giờ).

Kết quả xác định hiệu suất thủy phân đạm amin khi bổ sung chế phẩm enzyme protease được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3: Hàm lượng đạm amin và hiệu suất thủy phân

| Nghiệm thức | Tổ hợp HL enzyme và thời gian | N _{amin} (mgN/gck) | Hiệu suất (%) |
|-------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 1 | 0 - 12 | 11,53 ^o | 25,74 ^o |
| 2 | 0 - 24 | 16,41 ^j | 36,63 ^j |
| 3 | 0 - 36 | 17,78 ^g | 39,68 ^g |
| 4 | 0 - 48 | 16,71 ⁱ | 37,29 ⁱ |
| 5 | 1,0 - 12 | 12,55 ^m | 28,01 ^m |
| 6 | 1,0 - 24 | 17,71 ^g | 39,55 ^g |
| 7 | 1,0 - 36 | 18,46 ^d | 41,21 ^d |
| 8 | 1,0 - 48 | 18,84 ^c | 42,07 ^c |
| 9 | 1,5 - 12 | 12,32 ⁿ | 27,51 ⁿ |
| 10 | 1,5 - 24 | 19,18 ^b | 42,82 ^b |
| 11 | 1,5 - 36 | 19,33 ^b | 43,15 ^b |
| 12 | 1,5 - 48 | 17,87 ^g | 39,89 ^g |
| 13 | 2,0 - 12 | 13,56 ^l | 30,27 ^l |
| 14 | 2,0 - 24 | 19,95 ^a | 44,53 ^a |
| 15 | 2,0 - 36 | 20,04 ^a | 44,74 ^a |
| 16 | 2,0 - 48 | 19,91 ^a | 44,46 ^a |
| 17 | 2,5 - 12 | 14,48 ^k | 32,33 ^k |
| 18 | 2,5 - 24 | 18,26 ^{ef} | 40,77 ^{ef} |
| 19 | 2,5 - 36 | 18,46 ^{de} | 41,20 ^{de} |
| 20 | 2,5 - 48 | 18,12 ^f | 40,45 ^f |
| 21 | 3,0 - 12 | 12,62 ^m | 28,18 ^m |
| 22 | 3,0 - 24 | 17,33 ^b | 38,69 ^b |
| 23 | 3,0 - 36 | 19,21 ^b | 42,88 ^b |
| 24 | 3,0 - 48 | 18,91 ^c | 42,22 ^c |
| CV(%) | | 0,708 | 0,697 |

*Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (p ≤ 0.05)

Kết quả Bảng 3 cho thấy hàm lượng đạm amin ở các nghiệm thức có bổ sung enzyme protease cho kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% so với mẫu đối chứng không bổ sung enzyme protease. Nghiệm thức 15 với hàm lượng enzyme protease bổ sung 2% sau 36 giờ thủy phân đạt hàm lượng đạm amin cao nhất (20,04 mgN/gck) cao hơn rất nhiều so với mẫu đối chứng không bổ sung enzyme (ở nghiệm thức 1 (11,53 mgN/gck), 2 (16,41 mgN/gck) và 3 (17,78 mgN/gck), tuy nhiên nó không khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức có bổ sung cùng tỉ lệ enzyme 2% (nghiệm thức 14 (19,95 mgN/gck) và 16 (19,91 mgN/gck)). Trong các nghiệm thức có bổ sung enzyme (1; 1,5; 2; 2,5; 3 %) thì các nghiệm thức có cùng tỉ lệ bổ sung enzyme 2% (ở các mức thời gian 24, 36, 48 giờ) cho kết quả đạm amin cao nhất và khác biệt có ý nghĩa với với các nghiệm thức còn lại, đặc biệt là cao hơn cả các nghiệm thức có bổ sung enzyme với tỉ lệ cao hơn (2,5 và 3%). Theo Lê Ngọc Tú (2000) khi bổ sung enzyme với nồng độ quá lớn thì tốc độ phản ứng tăng chậm, do có sự cạnh tranh giữa enzyme và cơ chất trong việc gắn vào vị trí trung tâm hoạt động của enzyme.

Bảng 3 cũng cho thấy hiệu suất thủy phân ở các nghiệm thức có bổ sung enzyme protease cho kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% so với mẫu đối chứng không bổ sung enzyme protease. Kết quả cũng tương tự như hàm lượng đạm amin, hiệu suất thủy phân ở các nghiệm thức có bổ sung enzyme protease 2% (ở các mức thời gian 24, 36, 48 giờ) là cao nhất khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức có bổ sung enzyme protease còn lại, thậm chí còn cao hơn các nghiệm thức có bổ sung enzyme protease với tỉ lệ cao hơn (2,5 và 3%).

Kết quả Bảng 3 cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa của hàm lượng đạm amin cũng như hiệu suất thủy phân đạm amin đối với tỉ lệ enzyme protease bổ sung và thời gian trong suốt quá trình thủy phân koji. Theo Steinkraus (2004) chế phẩm enzyme protease là một

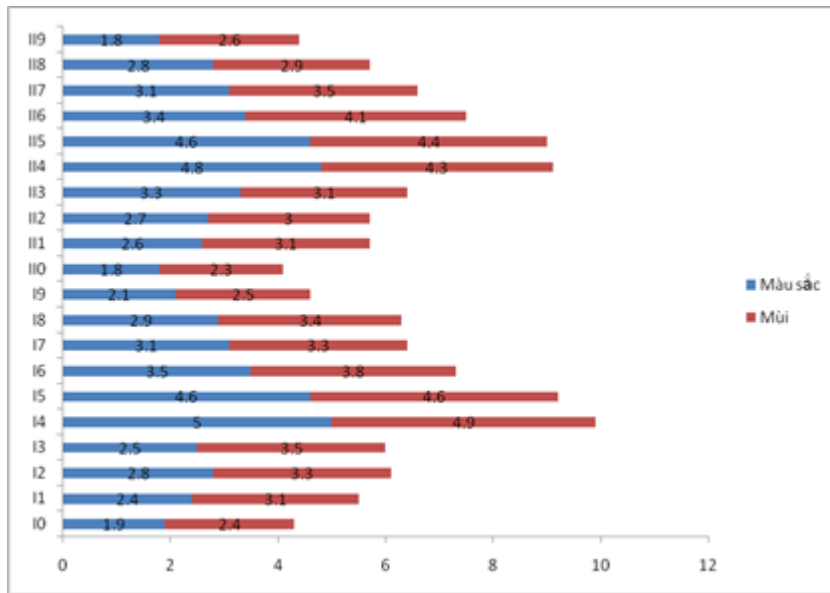
endoprotease cắt nội phân tử cho ra nhiều đoạn peptide ngắn. Đồng thời có sự kết hợp với các exoprotease trong protease koji như carboxypeptidase và aminopeptidase sẽ tiếp tục phân cắt cho ra các acid amin.

Từ kết quả thí nghiệm (Bảng 3) chỉ ra các nghiệm thức với tỉ lệ bổ sung enzyme protease 2% (ở các mức thời gian 24, 36, 48 giờ) cho kết quả đạm amin và hiệu suất thủy phân cao nhất và khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức với các tỉ lệ bổ sung enzyme 1; 1,5; 2,5; 3%. Trong các nghiệm thức có tỉ lệ bổ sung enzyme protease 2%, nghiệm thức 15 (36 giờ thủy phân) cho hàm lượng đạm amin và hiệu suất thủy phân cao nhất (20,04 mgN/gck; 44,74 %), nhưng không khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức nghiệm thức 14 (24 giờ thủy phân) (19,95 mgN/gck; 44,53%) và nghiệm thức 16 (48 giờ thủy phân) (19,91 mgN/gck; 44,46 %). Từ đó có thể đi đến kết luận nghiệm thức 14 bổ sung 2% enzyme protease, thời gian thủy phân 24 giờ là nghiệm thức tốt nhất (thời gian thủy phân ngắn nhất) sẽ được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3 Ảnh hưởng chủng giống vi khuẩn *Pediococcus halophilus* và nấm men *Zygosachromyces rouxii* đến chất lượng và hương vị nước tương

Ngay sau giai đoạn thủy phân bởi enzyme protease bổ sung hoàn tất dịch thủy phân sẽ được chuyển sang giai đoạn lên men nước muối. Ở giai đoạn này có bổ sung chủng vi khuẩn, nấm men chịu mặn để tạo màu sắc và hương vị tự nhiên của nước tương lên men. Sản phẩm thu được của thí nghiệm bổ sung vi khuẩn và nấm men sẽ được đánh giá cảm quan về màu sắc và mùi vị (so với mẫu đối chứng) nhằm mục đích chọn ra nghiệm thức hay sản phẩm tốt nhất để tiến hành bố trí cho thí nghiệm sau.

Kết quả đánh giá cảm quan được trình bày ở Hình 1.



Hình 1: Đánh giá cảm quan sản phẩm nước tương theo các nghiệm thức khác nhau

*Phương thức 1: bổ sung vi khuẩn nấm men cùng lúc. Gồm 9 nghiệm thức: I0: Mẫu đối chứng không bổ sung vi khuẩn, nấm men, I1: bổ sung 10^2 tbvk/g và 10^2 tbmn/g, I2: 10^2 tbvk/g và 10^4 tbmn/g, I3: 10^2 tbvk/g và 10^6 tbmn/g, I4: 10^4 tbvk/g và 10^2 tbmn/g, I5: 10^4 tbvk/g và 10^4 tbmn/g, I6: 10^4 tbvk/g và 10^6 tbmn/g, I7: 10^6 tbvk/g và 10^2 tbmn/g, I8: 10^6 tbvk/g và 10^4 tbmn/g, I9: 10^6 tbvk/g và 10^6 tbmn/g. Phương thức 2: bổ sung vi khuẩn trước sau đó kiểm tra pH khoảng 5,5 rồi bổ sung nấm men. Gồm 9 nghiệm thức: I10: Mẫu đối chứng không bổ sung vi khuẩn, nấm men, I11: 10^2 tbvk/g trước sau đó bổ sung 10^2 tbmn/g, I12: 10^2 tbvk/g trước, sau 10^4 tbmn/g; I13: 10^2 tbvk/g trước, sau 10^6 tbmn/g; I14: 10^4 tbvk/g trước, sau 10^2 tbmn/g; I15: 10^4 tbvk/g trước, sau 10^4 tbmn/g; I16: 10^4 tbvk/g trước, sau 10^6 tbmn/g; I17: 10^6 tbvk/g trước, sau 10^2 tbmn/g; I18: 10^6 tbvk/g trước, sau 10^4 tbmn/g; I19: 10^6 tbvk/g trước, sau 10^6 tbmn/g

Kết quả đánh giá cảm quan (Hình 1) cho thấy nghiệm thức I4 (bổ sung vi khuẩn với mật số 10^4 và nấm men 10^2 tế bào/g dịch lên men) đạt điểm cao nhất và khác biệt có ý nghĩa 5% so với các nghiệm thức còn lại. Theo Jansen *et al.* (2003) việc bổ sung thêm các vi khuẩn như *Pediococcus halophilus* và nấm men *Zygosaccharomyces rouxii* có vai trò quan trọng trong việc tạo hương vị đặc trưng cho sản phẩm nước tương lên men. Các vi khuẩn chịu mặn biến đổi đường thành các acid khác nhau như acid acetic và acid lactic. Các acid này giúp tạo vị chua nhẹ cho nước tương, đồng thời giúp cho việc bảo quản sản phẩm. Còn nấm men sử dụng đường để tạo ra các alcohol như là ethyl, propyl, pentyl...và các acid hữu cơ nhất là acid succinic. Các alcohol giúp tạo mùi còn acid giúp tạo vị cho nước tương. Đồng thời cũng xảy ra các phản ứng tương tác giữa các chất tạo ra do lên men như: acid hữu cơ phản ứng với các alcohol, với acid acetic, với acid béo tự do để tạo ra các ester thơm;

acid amin phản ứng với đường để tạo ra các sắc tố nâu hay đỏ, các sắc tố này sau đó pha trộn với các sắc tố loại flavone có sẵn trong đậu nành và giúp tạo màu của nước tương.

Từ kết quả trên nghiệm thức I4 được chọn để tiến hành sản xuất nước tương cải tiến, đồng thời so sánh với nghiệm thức đối chứng (một không bổ sung chế phẩm enzyme và một có bổ sung chế phẩm enzyme) và nghiệm thức sản xuất nước tương truyền thống.

Kết quả phân tích hàm lượng đạm amin ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng đạm amin tính theo thời gian lên men đạt giá trị cao nhất (9,36 gN/L) ở nghiệm thức 3 (có bổ sung enzyme và vi khuẩn+nấm men) vào ngày thứ 9 và cao hơn nhiều so với các nghiệm thức đối chứng ở cùng thời điểm: (8,3 gN/L) nghiệm thức 1 (không enzyme), (8,5 gN/L) ở nghiệm thức 2 (có enzyme) và (7,8 gN/L) ở nghiệm thức 4 (truyền thống) có hàm lượng đạm amin thấp nhất.

Bảng 4: Hàm lượng đạm amin theo các nghiệm thức trong quá trình lên men

| Thời gian (ngày) | Hàm lượng đạm amin (gN/L) | | | | Trung bình | CV (%) |
|---------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| | NT1 | NT2 | NT3 | NT4 | | |
| 0 | 5,22 | 5,22 | 5,40 | 5,13 | 5,24 ^l | 8,6 |
| 1,5 | 5,77 | 6,63 | 6,87 | 5,63 | 6,22 ^h | |
| 3,0 | 5,50 | 6,67 | 6,77 | 5,30 | 6,05 ⁱ | |
| 4,5 | 6,73 | 6,53 | 6,57 | 5,10 | 6,23 ^h | |
| 6,0 | 7,50 | 7,20 | 7,50 | 5,61 | 6,98 ^g | |
| 7,5 | 7,00 | 7,20 | 7,97 | 6,56 | 7,19 ^f | |
| 9,0 | 8,30 | 8,50 | 9,36 | 7,80 | 8,50 ^a | |
| 10,5 | 7,10 | 8,46 | 9,16 | 7,63 | 8,33 ^b | |
| 12,0 | 7,87 | 8,20 | 8,73 | 7,20 | 8,00 ^c | |
| 13,5 | 7,60 | 8,10 | 8,50 | 7,06 | 7,83 ^d | |
| 15,0 | 7,37 | 7,76 | 8,46 | 6,93 | 7,63 ^e | |
| Trung bình | 6,90 ^c | 7,32 ^b | 7,76 ^a | 6,36 ^d | | |
| CV (%) | | 15,0 | | | | |

* NT1: không enzyme; NT2: có enzyme; NT3: có enzyme & VSV; NT4: truyền thống. Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% ($p \leq 0.05$)

Sau khi đạt giá trị cao nhất ở 9 ngày lên men, lượng đạm amin bắt đầu giảm dần, có thể là do quá trình lên men tiếp tục diễn ra và có sự biến đổi đạm amin thành các chất khác trong suốt quá trình này, hơn nữa một phần là do các nhóm vi sinh vật trong khối lên men sử dụng đạm amin cho hoạt động trao đổi chất của chúng. Vì vậy, giá trị đạm amin vào ngày thứ 15 ở các nghiệm thức như sau: nghiệm thức bổ sung enzyme và vi khuẩn+nấm men-NT3 có hàm lượng đạm amin cao nhất (8,46 gN/L), hàm lượng đạm amin thấp nhất là ở nghiệm thức truyền thống-NT4 (6,93 gN/L), đồng thời cũng cho thấy sự khác biệt rõ ràng về hàm lượng đạm amin đối với nghiệm thức có bổ sung enzyme-NT2 (7,76 gN/L) cao hơn so với nghiệm thức không bổ sung enzyme-NT1 (7,37 gN/L).

Mặc khác, nếu xét về giá trị trung bình hàm lượng đạm amin theo các nghiệm thức thì ở NT3 (có enzyme và VSV) khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% so với các nghiệm thức đối chứng (NT1; NT2, NT4). Kết quả Bảng 4 cho thấy NT3 có giá trị trung bình đạm amin cao nhất (7,76 gN/L) và cao hơn nhiều so với NT4 (6,36 gN/L), NT1 (6,99 gN/L) và NT2 (7,32 gN/L). Điều đó chỉ ra được hiệu quả của việc

bổ sung enzyme trong giai đoạn thủy phân ở NT2 và NT3 cho hàm lượng đạm amin cao hơn so với NT1 và NT4 (không có bổ sung enzyme).

Vì vậy, để tạo ra sản phẩm nước tương lên men có hàm lượng đạm amin cao nên sử dụng nghiệm thức 3 có bổ sung enzyme và vi sinh vật trong quá trình sản xuất.

3.4 Hoàn thiện hóa quy trình sản xuất nước tương lên men và kiểm tra chất lượng sản phẩm

Từ các thông số tối ưu của các thí nghiệm Quy trình sản xuất nước tương cải tiến với 4 công đoạn như sau: (1) tạo koji; (2) thủy phân koji; (3) lên men nước muối; (4) thanh trùng được thiết lập.

Kết quả so sánh ở Bảng 5 cho thấy sản phẩm nước tương theo quy trình cải tiến đạt tiêu chuẩn quy định của Bộ Y Tế. Sản phẩm đạt hàm lượng đạm tổng (15,4 gN/L) cao hơn so với các sản phẩm thị trường (4,0 -11 gN/L) và có giá trị dinh dưỡng cao với hàm lượng đạm amin đạt 8,4 (gN/L). Đồng thời sản phẩm nước tương không có sự hiện diện của 3-MCPD nên an toàn cho người tiêu dùng.

Bảng 5: So sánh các chỉ tiêu chất lượng chủ yếu của sản phẩm quy trình cải tiến và sản phẩm thị trường

| Chỉ tiêu | Tiêu chuẩn quy định | SP quy trình cải tiến | Nước tương Nam Dương | Nước tương CHIN-SU (Nhất Ca) | Soy sauce 501S- Sempio food company |
|--------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Nitơ tổng (g/L) | Theo CBNXS | 15,4 | 8,96 | 4,0 | 10 -11 |
| Nitơ amin (g/L) | ≥ 4 | 8,4 | - | - | 6 -7 |
| NaCl (g/L) | 140 - 220 | 163,8 | 160 | 150 | 155 – 165 |
| Aflatoxin | Âm tính | Âm tính | - | - | - |
| 3-MCPD | ≤1mg/kg | KPH | ≤1mg/kg | ≤1mg/kg | - |
| <i>E. Coli</i> | Không được có | Không có | - | - | - |
| <i>Coliformes fecaux</i> | 10 ² /mL | 0/mL | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | 3/mL | 0/mL | - | - | - |
| <i>Cl. perfringens</i> | 10/mL | 0/mL | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> | Không được có | Không có | - | - | - |

4 KẾT LUẬN

Trong quy trình sản xuất nước tương, việc chủng giống thuần *Aspergillus oryzae* với mật số 10⁶ bào tử/g chất khô đã rút ngắn thời gian ủ koji xuống còn 52 giờ so với quá trình ủ truyền thống khoảng 4 - 5 ngày. Chủng giống thuần kết hợp bổ sung 2% chế phẩm enzyme thương mại vào công đoạn thủy phân koji ở 50°C, 24 giờ trước khi bổ sung muối cho hiệu suất thủy phân đạm amin cao (44,53%). Bổ sung vi khuẩn *Pediococcus halophilus* với mật số 10⁴ tế bào/g và nấm men *Zygosaccharomyces rouxii* 10² tế bào/g dịch trong giai đoạn lên men trong nước muối cho sản phẩm nước tương có hương vị thơm ngon tự nhiên. Sản phẩm nước tương lên men có chất lượng cao, đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm và đặc biệt là không có 3-MCPD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y Tế, 2005. Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực – thực phẩm ban hành kèm theo Quyết định số 11/2005/QĐ-BYT ngày 25 tháng 03 năm 2005 của Bộ trưởng Bộ Y tế, Bộ Y tế, Hà Nội.
- Dương Thị Hương Giang, 2009. Bài giảng hóa học protein. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Đông Thị Thanh Thu, 2003. Sinh hóa ứng dụng. Nxb Đại học Quốc gia, Tp.Hồ Chí Minh.
- Hà Duyên Tư, 2006. Kỹ thuật phân tích cảm quan. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Lâm Thị Kim Châu, Văn Đức Chín, Ngô Đại Nghiệp, 2004. Thực tập Sinh hóa lớn. Nxb Đại học Quốc gia, Tp.Hồ Chí Minh.
- Lê Ngọc Tú, 2000. Hóa sinh công nghiệp. Nxb KH&KT, Hà Nội.
- Lương Đức Phẩm, 1998. Công nghệ vi sinh vật, Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
- Nguyễn Đức Lượng, 2002. Vi sinh vật học công nghiệp, Nxb Đại học Quốc gia TP.Hồ Chí Minh.
- Steinkraus. K. H., 2004. Industrialization of Indigenous Fermented Food, 2nd Edition, CRC Press, USA.
- Jansen. M, J. H. Veurink, Gert – Jan W. Euverink, L. Dijkhuizen, 2003. Growth of the salt – tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plate: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched – chain amino acids. FEMS Yeast Research.
- Wood, J. B. Brian, 1994. Technology transfer and Indigenous fermented foods. Food Research International, 27, pp 269 – 280.