

Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật trong tương truyền thống Việt Nam có khả năng sinh amylase và protease cao

Đồ Thị Hoàng Anh¹, Đặng Thị Hoài Thương^{1,2}, Nguyễn Hồng Minh³, Phan Diệp Tú¹, Nguyễn Minh Nam⁴, Lê Thị Hoàng Yến^{1*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Nghiên cứu Nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

⁴Viện Ứng dụng Công nghệ, 25 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 30/7/2024; ngày chuyển phản biện 2/8/2024; ngày nhận phản biện 19/8/2024; ngày chấp nhận đăng 22/8/2024

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá đa dạng vi sinh vật trong tương truyền thống Việt Nam dựa vào số lượng chủng phân lập, từ đó tuyển chọn các chủng có hoạt tính cao nhất làm giống khởi động. Từ 12 mẫu tương thu thập tại Hà Nội, Hưng Yên, Hà Nam và Nghệ An, 85 chủng vi sinh vật (45 chủng vi khuẩn, 30 chủng vi nấm, bốn chủng xạ khuẩn và sáu chủng nấm men) đã được phân lập. Trong khi 54,11% chủng không có khả năng sinh cả hai loại enzyme amylase và protease bằng phương pháp cấy điểm, thì chỉ có 8,23% chủng (bảy chủng) sinh cả hai enzyme ở mức mạnh (D-d >15 mm). Cả bảy chủng này được định danh qua phân tích hình thái học và giải trình tự rDNA vùng ITS đối với nấm và vùng 16S đối với vi khuẩn. Sàng lọc thứ cấp hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên thạch, hai chủng *Aspergillus oryzae* BD3-5 và *Bacillus subtilis* BD3-7 được lựa chọn làm giống khởi động dựa vào hoạt tính amylase và protease cao nhất (20-26 mm) và (16-18 mm). Bổ sung 1% (v/v) BD3-5 vào lên men mốc - giai đoạn koji làm tăng hàm lượng đường tổng số 1,8 lần; bổ sung BD3-7 vào lên men nước đậu tương làm tăng hàm lượng protein tổng số 3,0 lần so với mẫu đối chứng.

Từ khóa: amylase, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, protease, tương.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.10

Study on isolation and selection of high amylase and protease microbes in traditional Vietnamese soy sauce

Thi Hoang Anh Dong¹, Thi Hoai Thuong Dang^{1,2}, Hong Minh Nguyen³, Diep Tu Phan¹, Minh Nam Nguyen⁴, Thi Hoang Yen Le^{1*}

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

³Genetic Resources Research Center, Phenikaa University, Yen Nghia Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

⁴National Center for Technological Progress, 25 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 30 July 2024; revised 19 August 2024; accepted 22 August 2024

Abstract:

The aims of this study were to evaluate the microbial diversity in traditional Vietnamese soy sauce based on the number of isolated strains and to select strains with the highest activity using as starter cultures. From 12 soy sauce samples collected in Hanoi, Hung Yen, Ha Nam, and Nghe An, 85 microbial strains (45 bacteria, 30 fungi, 04 actinomycetes, and 6 yeasts) were isolated. While 54.11% of the strains did not exhibit enzyme production by the spot inoculation method, only 8.23% of the strains (07 strains) produced both enzymes at high levels (D-d >15 mm). These 07 strains were identified through morphological analysis and sequencing of the ITS region for fungi and the 16S region for bacteria, and their enzyme activity was further screened using the agar well diffusion method. *Aspergillus oryzae* BD3-5 and *Bacillus subtilis* BD3-7 were selected as starter cultures due to their safety and highest amylase and protease activity: 20-26 mm and 16-18 mm. Adding 1% (v/v) BD3-5 to rice fermentation during the koji stage increased the total sugar content 1.8 times; adding 1% (v/v) BD3-7 to soybean liquid fermentation increased the total protein content 3.0 times compared to the control sample.

Keywords: amylase, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, protease, soy sauce.

Classification numbers: 1.6, 2.10

*Tác giả liên hệ: Email: yenlthvtcc@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Tương là một loại gia vị truyền thống lên men từ đậu nành được sử dụng trong ẩm thực Việt, cũng như nhiều quốc gia vùng Á Đông. Hương vị của tương là sự kết hợp của các nguyên liệu bao gồm gạo, đậu tương, muối và nước, cùng hoạt động trao đổi chất của hệ vi sinh vật trong quá trình lên men. Trong đó, hoạt động sinh enzyme amylase và protease cao của các vi sinh vật là điều kiện tiên quyết cho một mẻ tương ngon. Hiện nay, sản xuất tương tại các làng nghề chủ yếu dựa trên kinh nghiệm dân gian từ các hộ gia đình. Quá trình lên men chủ yếu dựa vào nguồn vi sinh vật trong tự nhiên, mang tính ngẫu nhiên. Vì vậy, chất lượng các mẻ tương thường không đồng đều, thời gian bảo quản ngắn. Bên cạnh đó, sự có mặt của một số vi sinh vật không mong muốn như *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *Bacillus cereus* trong tương, có thể sản sinh độc tố gây hại cho sức khỏe con người [1]. Chính vì vậy, nghiên cứu này nhằm tuyển chọn các chủng vi sinh vật an toàn, sinh amylase và protease cao làm giống khởi động, định hướng ứng dụng trong sản xuất tương truyền thống an toàn, chất lượng cao.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu thập mẫu và phân lập vi sinh vật

12 mẫu tương được thu thập tại các làng nghề làm tương truyền thống tại các địa điểm Hà Nội, Hưng Yên, Hà Nam và Nghệ An. Vi sinh vật được phân lập từ các mẫu tương bằng phương pháp Koch trên môi trường thạch PDA, NA, MRS, LCA, Czapek (Nissui, Nhật Bản) [2].

2.2. Định danh vi sinh vật

Phương pháp phân tích trình tự gen rDNA: DNA của các chủng vi sinh vật được tách chiết bằng kit của hãng PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Trình tự đoạn gen (rDNA vùng ITS) được khuếch đại với cặp mồi ITS1 và ITS4. Vùng gen 16S rDNA được khuếch đại bằng cặp mồi 27F và 1495R. Trình tự gen của các chủng phân tích được so sánh với các trình tự gen có sẵn trên ngân hàng gen NCBI, sử dụng phương pháp Blast Search và phần mềm Clustal X [3]. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa vào thuật toán NJ [4].

Phương pháp quan sát hình thái học: Quan sát khuẩn lạc và cơ quan sinh sản của nấm, đánh giá, phân tích dựa vào so sánh kết quả quan sát so với các tài liệu tham khảo về phân loại nấm [5].

2.3. Phương pháp sàng lọc và đánh giá hoạt tính amylase và protease

2.3.1. Sàng lọc sơ bộ hoạt tính amylase và protease bằng phương pháp cấy điểm

Các chủng vi sinh vật phân lập được hoạt hóa trên môi trường thạch PDA (Nissui, Nhật Bản) ở 25°C, 3-5 ngày sau đó cấy chấm điểm (hoặc cấy vạch - đối với vi khuẩn) trên đĩa thạch có bổ sung cơ chất 0,1% để ở nhiệt độ phòng trong 2-5 ngày. Nhuộm lugol - đối với hoạt tính amylase và quan sát kích thước vòng phân hủy xung quanh khuẩn lạc. Hoạt tính protease được biểu hiện bằng kích thước vòng trong xung quanh khuẩn lạc.

$$\text{ĐKPG} = D - d \text{ (mm)}$$

trong đó: D: đường kính vòng trong xung quanh (mm), d: đường kính khuẩn lạc (mm).

2.3.2. Xác định hoạt tính amylase và protease bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Các chủng vi sinh vật được nuôi bằng máy lắc với môi trường PDB (Nissui, Nhật Bản) có bổ sung 0,2% cơ chất (tinh bột hoặc casein) nuôi cấy từ 2-5 ngày, tốc độ 150 vòng/phút, nhiệt độ phòng, thu được enzyme thô, nhỏ vào giếng trên thạch đĩa chứa 0,1% tinh bột (đối với amylase) 0,1% casein (đối với protease), để ủ ấm 5-6 giờ. Kiểm tra hoạt tính amylase và protease bằng phương pháp đo đường kính vòng phân giải.

2.4. Phương pháp sử dụng các chủng vi sinh vật hữu ích nhằm nâng cao chất lượng tương

Bổ sung 1% (v/v) giống khởi động vào giai đoạn lên men mốc (koji) và giai đoạn ủ chua (moromi) đối với vi khuẩn. Kiểm tra chất lượng bán thành phẩm sau 3 tuần lên men dựa vào phân tích hàm lượng đường và protein tổng số có trong mẫu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thu thập mẫu và phân lập các chủng vi sinh vật trong sản phẩm tương truyền thống

12 mẫu tương truyền thống đã được thu thập tại các địa điểm khác nhau trên địa bàn Hà Nội, Hà Nam, Hưng Yên và Nghệ An. Sau đó, chúng tôi tiến hành phân lập các chủng vi sinh vật có trong các mẫu tương này bằng phương pháp pha loãng, trên các môi trường NA, MRS, PDA, LCA, Czapek ở các nồng độ pha loãng 10^3 - 10^5 . Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Đa dạng vi sinh vật có trong các mẫu tương truyền thống.

Số lượng khuẩn lạc (CFU/ml)							
Địa điểm	STT	Tên mẫu tương	Vi khuẩn	Nấm mốc	Nấm men	Xạ khuẩn	Tổng
Hà Nội	1	Trung Thành	$9,5 \times 10^4$	0	0	0	$9,5 \times 10^4$
	2	Bình Đà	$8,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	0	0	$1,0 \times 10^5$
	3	Trọng Tinh	$2,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^{+6}$	0	0	$2,6 \times 10^7$
	4	Cự Hồng	$5,0 \times 10^7$	$3,9 \times 10^4$	0	0	$5,0 \times 10^7$
	5	Phụ Khang	$1,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	0	$1,02 \times 10^8$
	6	Móng Phụ	$8,3 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$9,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$
	7	Đường Lâm	$8,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	0	0	$9,2 \times 10^7$
	8	Mẫu nhà dân thường	$1,6 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$	0	0	$1,6 \times 10^8$
	9	Mẫu bán thành phẩm	$1,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^4$	0	0	$1,0 \times 10^8$
Hưng Yên	10	Triệu Sơn	$3,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	0	0	$4,4 \times 10^6$
Hà Nam	11	Mẫu nhà dân thường	$4,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	0	0	$5,5 \times 10^4$
Nghệ An	12	Mẫu nhà dân thường	$5,4 \times 10^8$	0	0	0	$5,4 \times 10^8$

Kết quả bảng 1 cho thấy, khu hệ vi sinh vật trong các mẫu tương truyền thống ở Việt Nam rất đa dạng. Hầu hết các mẫu đều xuất hiện cả 4 loại vi sinh vật thông thường, bao gồm nấm mốc, nấm men, vi khuẩn và xạ khuẩn. Tất cả các mẫu tương đều có sự xuất hiện của vi khuẩn, 10/12 mẫu (83,33%) xuất hiện nấm mốc, 2/12 mẫu (16,67%) phát hiện có nấm men. Xạ khuẩn là loại hiếm gặp nhất, chỉ xuất hiện duy nhất trên một mẫu (8,3%). Trong số 12 mẫu nghiên cứu thì mẫu

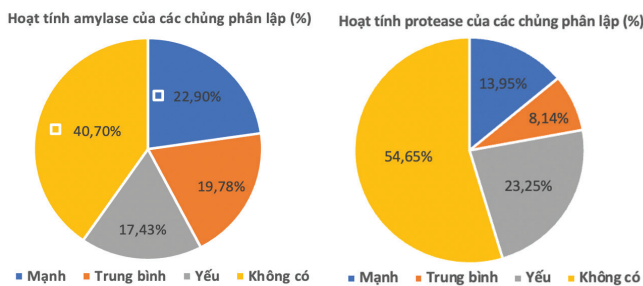
tương Mông Phụ, Hà Nội có hệ vi sinh đa dạng và mật độ khuẩn lạc cao nhất, gồm cả 4 loại vi sinh vật, hàm lượng đạt 10^5 - 10^7 CFU/ml. Mẫu tương Nghệ An và tương Trung Thành chỉ xuất hiện vi khuẩn, với tổng số lượng khuẩn lạc đạt khoảng 10^5 - 10^8 (CFU/ml).

Kết quả này tương đồng với một số kết quả trước đó của N.T. Vu và cs (2016) [6], cho rằng độ đa dạng vi sinh vật trong 14 mẫu tương thu thập từ Bản Yên Nhân, Cự Đà và Nam Đàn đạt 10^6 - 10^8 (CFU/ml). Hoặc trong nghiên cứu của W.Y. Jung và cs (2016) [7], mật độ vi khuẩn trong tương Doenjang là $4,1 \times 10^7$ CFU/g, mật độ nấm mốc đạt $7,9 \times 10^4$ CFU/g.

3.2. Đánh giá hoạt tính amylase và protease dựa vào phương pháp cấy điểm

Dựa vào sự khác nhau về hình thái khuẩn lạc trên từng mẫu, 45 chủng vi khuẩn, 30 chủng vi nấm, 4 chủng xạ khuẩn và 6 chủng nấm men đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Toàn bộ 85 chủng vi sinh vật phân lập được sàng lọc hoạt tính thông qua phương pháp cấy điểm. Kết quả cho thấy, có điểm khác biệt giữa hoạt tính của khu hệ vi sinh vật trong tương Việt Nam và tương Hàn Quốc. Hầu hết các vi sinh vật trong tương Hàn Quốc đều thể hiện hoạt tính amylase và protease (110/112 chủng), nhưng mức độ thể hiện yếu, đường kính vòng phân giải nhỏ hơn 10 mm ($10 \geq D-d > 5$ mm) [8]. Ngược lại, trong tương Việt Nam, chỉ 59, 30 và 45,35% số chủng vi sinh vật biểu hiện hoạt tính amylase và protease, nhưng mức độ biểu hiện mạnh, lần lượt là 22,90 và 13,95%. Đặc biệt, có 8,23% (7 chủng) sinh đồng thời cả 2 loại enzyme mạnh, được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo (hình 1).



Hình 1. Hoạt tính amylase và protease của các chủng phân lập.

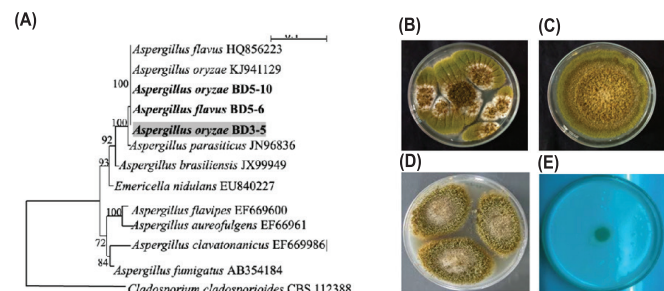
3.3. Định danh chủng vi sinh vật sinh amylase và protease cao

Trong số 7 chủng vi sinh vật đã lựa chọn ở trên, dựa vào quan sát hình thái học, 3 chủng có ký hiệu BD5-10, BD5-6 và BD3-5 là nấm sợi, 4 chủng BD3-7, BD5-3, BD3-3, BD5-5 là vi khuẩn. Các chủng này tiếp tục được phân loại bằng phương pháp phân tích hình học phân tử, dựng cây phát sinh chủng loại dựa vào phân tích trình tự gen rDNA vùng ITS (đối với nấm) và rDNA 16S (đối với vi khuẩn).

3.3.1. Đối với nấm sợi

Nghiên cứu phân tích và xây dựng cây chủng loại phát sinh của các chủng nấm sợi được lựa chọn ở trên dựa vào phân tích hình thái học và phân tích trình tự rDNA vùng ITS. Kết quả cho thấy, BD5-10, BD5-6 và BD3-5 đều nằm trên cùng một nhánh với *A. oryzae/A. flavus* (hình 2). Đây là 2 loài dễ nhầm lẫn khi phân tích bằng rDNA genome và hình thái học. Tuy nhiên, theo A.K. Maren

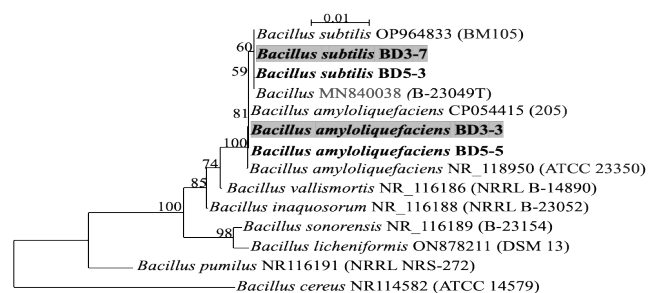
(2002) [5], khi phân loại hình thái học một cách kỹ lưỡng thì việc phân biệt 2 loài này là hoàn toàn có thể. BD5-10, BD5-6, BD3-5 khi được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau: CYA25, MEA, CY20S, CY37 và CZ đều có hình thái khuẩn lạc bông xốp, phát triển nhanh, kích thước đạt 5-7 cm sau 5-7 ngày nuôi cấy, thể bình 1-2 tầng, kích thước 20-50 μ m. Tuy nhiên, bào tử của BD5-6 có hình cầu, đồng đều, kích thước 3-6 μ m. Trong khi bào tử BD3-5, BD5-10 không đồng đều về kích thước, hình cầu đến gần cầu, hình trứng, hình ovan, kích thước 4-8,5 μ m. Trên môi trường CYA, 37°C, BD5-6, có màu xanh ôliu đậm, hình thành hạch nấm màu nâu sẫm dày đặc (hình 2A), chủng BD3-5, BD5-10 có màu vàng cau, khi già ngả sang màu vàng nâu, không sinh hạch nấm (hình 2B, 2C, 2D). So sánh các kết quả này với khóa phân loại của chi *Aspergillus* [5], chúng tôi kết luận BD3-5 và BD5-10 thuộc về loài *A. oryzae*, BD5-6 thuộc về loài *A. flavus*. Kiểm tra khả năng sinh độc tính của BD3-5 và BD5-10 trên môi trường thạch nước dừa đều không phát hiện aflatoxin (hình 2E).



Hình 2. Định danh và đánh giá độ an toàn sinh học đối với các chủng nấm *A. oryzae/A. flavus*. (A) Cây phát sinh chủng loại của BD5-10, BD5-6, BD3-5 và các loài có quan hệ họ hàng gần gũi dựa vào phân tích trình tự gen rDNA vùng ITS, các giá trị bootstrap >40% được thể hiện trên cây, *Cladosporium cladosporioides* được sử dụng làm nhóm ngoài, bar=0,1; (B) Hình thái chủng BD5-6 (CYA37); (C) Hình thái chủng BD3-5 (CYA37); (D) Hình thái chủng BD5-10 (CYA37); (E) Chủng BD3-5 trên môi trường nước cốt dừa sau 5 ngày nuôi cấy.

3.3.2. Đối với vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn lựa chọn được nghiên cứu phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa vào phân tích trình tự rDNA vùng 16S. Kết quả cho thấy, BD3-7 và BD5-3 nằm trên cùng một nhánh với chủng *B. subtilis* OP964833 (BM105); BD3-3 và BD5-5 nằm trên cùng một nhánh với các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* NR-118950 (ATCC 23350) (hình 3).



Hình 3. Cây phát sinh của BD3-7, BD5-3, BD3-3, BD5-5 và các loài có quan hệ họ hàng gần gũi dựa vào phân tích trình tự gen 16S. Các giá trị bootstrap >40% được thể hiện trên cây, *Bacillus cereus* NR 114582 (ATCC 14579) được sử dụng làm nhóm ngoài, bar=0,1.

Theo hướng dẫn số 90/679/EWG ngày 26/11/1990 của Cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học [2], so sánh với danh mục các vi sinh vật an toàn của CHLB Đức và Cộng đồng châu Âu cho thấy, các loài vi khuẩn *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* và *A. oryzae* thuộc nhóm có độ an toàn cao (cấp độ I). Vì vậy, các chủng vi sinh vật lựa chọn trên là những chủng bảo đảm an toàn sinh học, có thể sử dụng trong sản xuất thực phẩm.

3.4. Xác định hoạt tính protease và amylase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

7 chủng vi sinh vật tuyển chọn trên được nuôi cấy bằng máy lắc trên môi trường PDB, bổ sung 0,1% tinh bột và casein. Hoạt tính enzyme protease và amylase được đánh giá dựa trên đường kính vòng phân giải tinh bột và casein. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng phân giải tinh bột và casein của các chủng tuyển chọn.

Thứ tự	Ký hiệu chủng	Phân loại	Đường kính vòng phân giải (mm)	
			Tinh bột	Casein
1	BD5-10	<i>A. oryzae</i>	20±2	19±3
3	BD3-5	<i>A. oryzae</i>	26±3	25±3
4	BD3-7	<i>B. subtilis</i>	16±2	18±2
5	BD5-3	<i>B. subtilis</i>	14±3	12±2
6	BD3-3	<i>B. amyloliquefaciens</i>	8±2	11±3
7	BD5-5	<i>B. amyloliquefaciens</i>	12±2	18±2

Kết quả bảng 2 cho thấy, *A. oryzae* BD3-5 thể hiện hoạt tính cao nhất cho khả năng phân giải tinh bột và casein, đường kính vòng phân giải tinh bột và casein lần lượt là 26 và 25 mm. *B. subtilis* BD3-7 là chủng vi khuẩn có kích thước vòng phân giải lớn nhất trong số 4 chủng lựa chọn D-d = 16-18 mm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của T.V.A. Nguyen (2010) [9] khi phân lập 52 chủng nấm mốc phân lập từ các mẫu koji được thu thập từ Hưng Yên, Hà Nội và Nghệ An. Kết quả nghiên cứu trước đó cũng tìm ra được một chủng *A. oryzae* MT21 có hoạt tính amylase và protease lần lượt đạt là 21 và 26 mm [9]. Tuy nhiên, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá về đa dạng cũng như hoạt tính của các chủng vi khuẩn trong tương.

3.5. Sử dụng các chủng vi sinh vật hữu ích nhằm nâng cao chất lượng tương

2 chủng *A. oryzae* BD3-5 và *B. subtilis* BD3-7 được nuôi cấy ở các điều kiện thích hợp nhất, thu sinh khối tươi và bổ sung 1% (v/v) vào giai đoạn koji và moromi. Kiểm tra chất lượng bán sản phẩm tương này sau 3 tuần ủ men dựa vào phân tích hàm lượng đường tổng số và protein tổng số có trong mẫu (bảng 3).

Như vậy, có sự khác biệt giữa bổ sung giống khởi động và không bổ sung giống khởi động cho mỗi giai đoạn lên men. Trong giai đoạn lên men koji, hàm lượng đường tổng số tăng gấp 1,8 lần trong mẫu có bổ sung *A. oryzae* BD3-5 so với mẫu không bổ sung, hàm lượng protein tổng số cũng tăng lên 6,3 lần. Ở giai đoạn moromi, hàm lượng protein tổng số trong mẫu bổ sung *B. subtilis* BD3-7 tăng 3 lần so với mẫu không bổ sung, đồng thời hàm lượng đường cũng gia tăng từ 0 lên 1,12 mg/ml. Như vậy, trong quá trình

Bảng 3. Hàm lượng protein và đường có trong mẫu lên men koji và moromi.

Mẫu phân tích	Chỉ tiêu phân tích	
	Lượng đường tổng số trong mẫu (mg/ml)	Protein tổng số (µg/ml)
Đối chứng moromi (ủ chua tự nhiên)	0	41,96
<i>B. subtilis</i> BD3-7 được bổ sung vào giai đoạn moromi	1,02	132,64
Đối chứng koji (lên men mốc tự nhiên)	0,6	5,2
<i>A. oryzae</i> BD3-5 được bổ sung vào giai đoạn koji	1,12	33,15

lên men tương, sự có mặt của đường và protein là nguyên liệu chính cho phản ứng sinh hóa từ đó cấu thành hương vị, chất lượng của mẻ tương. *A. oryzae* BD3-5 và *B. subtilis* BD3-7 là 2 giống khởi động hiệu quả cho quá trình sản xuất tương.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 2 chủng *A. oryzae* BD3-5 và *B. subtilis* BD3-7 có khả năng sinh tổng hợp amylase và protease cao từ các mẫu tương truyền thống. Khi bổ sung 1% (v/v) giống khởi động cho mỗi quá trình lên men, hàm lượng đường và protein tổng số có sự gia tăng rõ rệt. Trong đó, ở giai đoạn koji, chủng BD3-5 làm tăng hàm lượng đường lên 1,6 lần và hàm lượng protein lên 1,8 lần so với không bổ sung. Giai đoạn moromi, hàm lượng protein cũng tăng gấp 3 lần so với khi không bổ sung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V.T. Doan, T.X. Dang, T.V.H. Le, et al. (2018), "Fungal and aflatoxin contamination in soybean paste collected from Ban village, Hung Yen province, Vietnam", *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, **5**(2), pp.25-28.
- [2] EUR-Lex Access to European Law (1990), *Council Directive 90/679/EEC of 26 November 1990 on The Protection of Workers From Risks Related to Exposure to Biological Agents at Work (Seventh Individual Directive Within The Meaning of Article 16 (1) of Directive 89/391/EEC)*, <http://data.europa.eu/eli/dir/1990/679/oj>, accessed 15 June 2024.
- [3] M. Kimura (1980), "A simple method for estimating evolution rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences", *Journal of Molecular Evolution*, **16**(2), pp.111-120, DOI: 10.1007/BF01731581.
- [4] N.M. Saitou (1987), "The neighbor joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree", *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), pp.406-425, DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- [5] A.K. Maren (2002), *Identification of Common Aspergillus Species*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 116pp.
- [6] N.T. Vu, T.V.A. Nguyen (2016), "Ethnic fermented foods and beverages of Vietnam", *Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of Asia*, pp.383-409, DOI: 10.1007/978-81-322-2800-4_15.
- [7] W.Y. Jung, J.Y. Jung, H.J. Lee, et al. (2016), "Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of Doenjang: A traditional Korean fermented soybean paste", *Frontiers in Microbiology*, **185**, pp.112-120, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00827.
- [8] J.H. Baek, K.K. So, Y.H. Ko, et al. (2014), "Mycoflora and enzymatic characterization of fungal isolates in commercial Meju, starter for a Korean traditional fermented soybean product", *Mycobiology*, **42**(3), pp.291-295, DOI: 10.5941/MYCO.2014.42.3.291.
- [9] T.V.A. Nguyen (2010), *Research on Technology and Equipment for Producing Microbial Products for Application in Industrial Production of Traditional Fermented Foods*, Code KC.07.12/06-10, State-level project report (in Vietnamese).