

PHÂN LẬP, LÀM THUẦN VÀ XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN NHANH SINH KHỐI NẤM *RHIZOPUS OLIGOSPORUS* SỬ DỤNG SẢN XUẤT BÁNH ĐẬU TƯƠNG LÊN MEN TEMPEH

Phạm Thị Thanh Bình¹, Mai Thành Luân¹, Nguyễn Thị Mai Anh², Phạm Phương Anh²

TÓM TẮT

Rhizopus oligosporus là loài nấm mốc được sử dụng để làm men tạo thực phẩm Tempeh, một sản phẩm đậu tương lên men giàu dinh dưỡng, tốt cho sức khỏe và đã được sử dụng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Trong nghiên cứu này, chủng nấm *R. oligosporus* đã được phân lập và làm thuần hóa thành công. Đồng thời, các điều kiện tối ưu về giá thể nhân nuôi và nhiệt độ cũng được xác định nhằm mục tiêu nhân nhanh sinh khối tạo nguồn men vi sinh phục vụ cho quá trình sản xuất Tempeh từ đậu tương.

Từ khóa: *Rhizopus oligosporus*, phân lập, Tempeh.

DOI: <https://doi.org/10.70117/hdujs.72.4.2025.650>

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Rhizopus oligosporus* là loài nấm mốc thuộc họ *Mucoraceae* được sử dụng phổ biến để lên men trên đậu tương tạo sản phẩm Tempeh, một loại thực phẩm lên men truyền thống ở Indonesia, có tác dụng tốt cho sức khỏe và được sử dụng rộng rãi trên thế giới [9]. Nấm mốc *R. oligosporus* có khả năng sinh trưởng phát triển nhanh ở nhiệt độ cao (30 - 32°C), không có khả năng lên men đường sucrose, hoạt động phân giải protein và lipid cao, tạo ra các hợp chất chống oxy hóa mạnh [1].

Nấm mốc *R. oligosporus* được thuần hóa từ loài *R. microsporus* nên có kiểu hình khá giống nhau [8]. Khác với loài nấm *R. microsporus*, loài *R. oligosporus* không tạo ra độc tố (rhizoxin và rhizonins) gây hại cho con người và sinh vật trong quá trình lên men [3]. Chính vì vậy, việc nhận dạng phân loại loài nấm *R. oligosporus* bằng phương pháp hình thái và phân tử là thực sự cần thiết để tìm ra nguồn gen tạo men vi sinh vật lên men thực phẩm tempeh an toàn cho người sử dụng.

Túi bào tử của nấm *R. oligosporus* có đường kính từ 40 - 80 μm có thể mang nhiều hơn 100 bào tử. Bào tử nấm *R. oligosporus* có các gờ và rãnh không song song, hình dạng thay đổi không cố định, hình ovan hoặc hình cầu và có đường kính thay đổi từ 6 - 9 μm . Cành bào tử phân sinh của nấm có màu xám nâu, chiều cao từ 1 mm hoặc hơn [4]. Tỷ lệ bào tử có kích thước và hình dạng không đồng nhất của nấm *R. oligosporus* chiếm trên 10% trên tổng số bào tử, đây là một trong những đặc điểm giúp phân biệt giữa loài nấm *R. oligosporus* với các nhóm loài nấm *R. microsporus* [4].

¹ Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức; Email: phamthithanhbinh@hdu.edu.vn

² Sinh viên Lớp K24 Đại học Nông học, Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức

Tempeh là một loại thực phẩm phổ biến được làm từ đậu tương lên men với nấm mốc *Rhizopus oligosporus* của người Indonesia. Quá trình lên men loại bỏ mùi của đậu tương thô, tạo ra mùi thơm dịu, nhẹ nhàng, hấp dẫn. Quá trình chuẩn bị nguyên liệu phục vụ sản xuất khá đơn giản và quá trình lên men tạo sản phẩm diễn ra khá nhanh.

Trong quá trình lên men Tempeh, các enzyme mục tiêu được giải phóng, phá vỡ mùi khó chịu từ đậu tương thô, đồng thời làm tăng thêm hương vị, mùi thơm và các giá trị dinh dưỡng khác như các nhóm vitamin, làm tăng khả năng tiêu hóa, thay đổi tính chất vật lý, cấu tượng của hạt đậu, thay đổi màu sắc của hạt [2]. Lên men đậu tương với nấm *R. oligosporus* giúp cho sản phẩm Tempeh dễ tiêu hóa hơn, giải phóng được nhiều dinh dưỡng dưới dạng dễ tiêu từ đậu tương hơn là so với phương pháp nấu truyền thống [5]. Chính vì vậy, loại thực phẩm lên men này được phổ biến rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới bao gồm Mỹ, Châu Âu, Nhật Bản, Việt Nam... [7].

Tempeh có dạng bánh đặc, màu trắng, vị chua ngọt, mùi dễ chịu, giàu chất dinh dưỡng, trong 1 khẩu phần tempeh 84 g cung cấp 162 kcal, 15 g chất đạm, 9 g chất béo, và rất nhiều chất dinh dưỡng khác như sắt, canxi, riboflavin, niacin, magie, phospho, mangan. Tempeh cũng là một nguồn cung cấp canxi tốt ngoài sữa. Trong 166 g tempeh chứa khoảng 2/3 lượng canxi có trong 1 cốc sữa nguyên chất. Với rất nhiều khả năng như sinh tổng hợp enzyme, sinh tổng hợp các axit béo, tạo ra các axit hữu cơ, tạo điều kiện giải độc, và loại bỏ các yếu tố kháng nguyên...

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và làm thuần nấm mốc từ nguồn men sản xuất bánh đậu tương lên men Tempeh thương mại xuất xứ từ Nhật Bản, sau đó tiến hành đồng thời phương pháp nhận dạng hình thái học và kỹ thuật phân tử để xác định loài nấm phân lập được. Việc phân lập và xác định chính xác được loài nấm mốc giúp chủ động lưu giữ, bảo quản và nhân nhanh sinh khối tạo nguồn men phục vụ cho sản xuất bánh đậu tương lên men tempeh tại địa phương.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, địa điểm, thời gian nghiên cứu

Nấm mốc *Rhizopus oligosporus* được phân lập từ sản phẩm men vi sinh Tempeh Starter (Kawashimaya, Nhật Bản).

Gạo dẻo (gạo Bắc thơm), gạo khô (gạo Q5), đậu tương, lạc

Môi trường PDA dùng để phân lập và nuôi cấy nấm gồm: khoai tây (250 g), đường glucose (20 g), agar (20 g), nước cất (1 lít).

Các dụng cụ thiết bị được sử dụng trong nuôi cấy, quan sát hình thái của nấm.

2.2. Phương pháp phân lập và làm thuần nấm mốc *Rhizopus oligosporus*

Sử dụng 0,1 g men vi sinh Tempeh Starter (Kawashimaya, Nhật Bản) hòa vào 10 ml nước cất khử trùng, lắc đều cho men tan hết. Sử dụng phương pháp tráng vi sinh vật trên môi trường PDA để phân lập nấm mốc *R. Oligosporus*. Đĩa môi trường cấy nấm mốc được

nuôi cấy trong điều kiện 28 - 30°C trong 2 - 3 ngày. Khi các tản nấm và bào tử được xác định hình thái giống nấm *R. oligosporus* thì bắt đầu cấy chuyển và làm thuần trên môi trường PDA. Nấm mốc *R. oligosporus* sau khi làm thuần được bảo quản trong điều kiện 5°C phục vụ cho các thí nghiệm.

2.3. Phương pháp thử nghiệm giá thể nhân nhanh sinh khối nấm *R. oligosporus* tạo men

Công thức	Giá thể
CT1	Đậu tương
CT2	Lạc
CT3	Gạo dẻo (Bắc thơm)
CT4	Gạo khô (gạo Q5)

Các giá thể thử nghiệm được ngâm trong nước 16 giờ, hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, 1 at trong 30 phút. Nhân nuôi sinh khối trong điều kiện nhiệt độ 32°C trong 2 - 3 ngày.

Chi tiêu đánh giá: số lượng bào tử/gam men. Kết quả lựa chọn giá thể nhân nuôi phù hợp sẽ được sử dụng ở các thí nghiệm tiếp theo

2.4. Phương pháp xác định nhiệt độ phù hợp sử dụng trong lên men tạo sinh khối đối với nấm *Rhizopus oligosporus*

Dải nhiệt độ thí nghiệm: 26 - 38 °C

Công thức	Nhiệt độ ủ (°C)
CT1	26
CT2	30
CT3	32
CT4	38

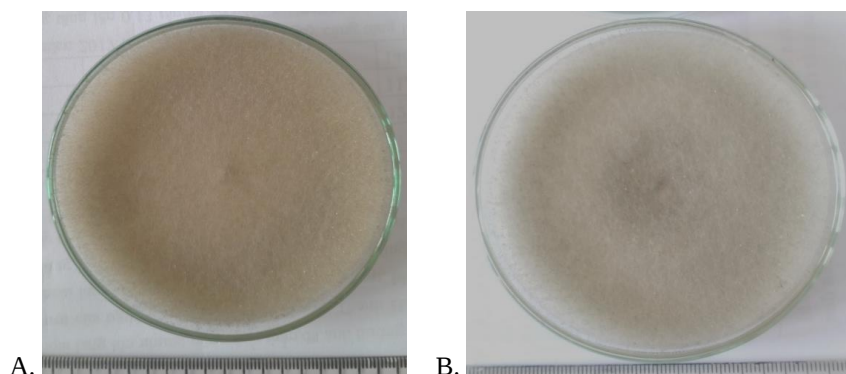
Chi tiêu đánh giá: số lượng bào tử/gam men

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

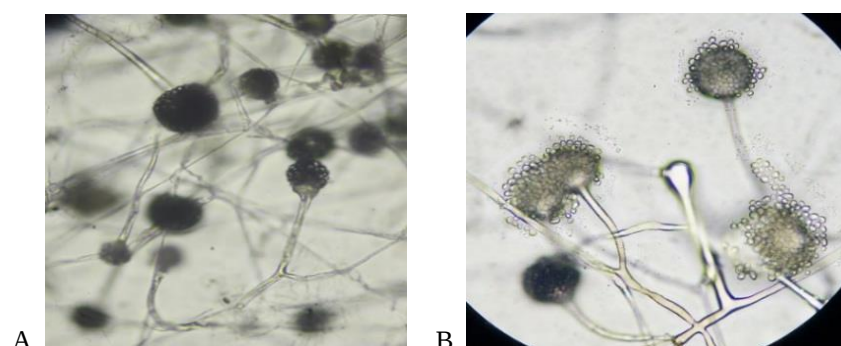
3.1. Đặc điểm hình thái nấm mốc *Rhizopus oligosporus* phân lập được

Nấm phân lập được trên môi trường PDA (hình 1A, 1B) phát triển rất nhanh ở nhiệt độ 30 - 32 °C, sinh trưởng phát triển chậm khi nhiệt độ môi trường dưới 12° C hoặc trên 45° C. Sợi nấm mọc tỏa tròn, bông xốp, dài, ban đầu tản nấm có màu trắng, sau đó chuyển dần thành màu ghi đến màu xám khi bào tử xuất hiện nhiều. Mặt dưới đĩa Petri, tản nấm có màu trắng ngà. Nấm có tốc độ sinh trưởng nhanh, sau 2 - 3 ngày phủ kín đĩa nuôi cấy petri đường kính 90 mm.

Quan sát hình thái sợi nấm dưới kính hiển vi quang học cho thấy, nấm có rễ giả (rhizoids), sợi nấm không có vách ngăn, không phân nhánh mọc từng chùm hoặc đơn lẻ từ thân bò. Cuống sinh bào tử dài mọc thành cụm chứa túi bào tử. Túi bào tử màu sẫm, đường kính có thể lên tới 80 µm chứa nhiều bào tử hình cầu hoặc hình ô van có đường kính từ 7 - 9 µm. Tỷ lệ bào tử không đồng dạng trên 10% tổng số bào tử.



Hình 1. Hình thái tản nấm *R. oligosporus* trên môi trường PDA sau 3 ngày (A) và 15 ngày cấy (B) ở nhiệt độ 30°C



Hình 2. Bộ phận sinh bào tử của nấm *R. oligosporus* Cảnh sinh bào tử trên môi trường nuôi cấy PDA (A). Túi bào tử và bào tử nấm *R. oligosporus* quan sát dưới kính hiển vi quang học (40X) (B)

Các đặc điểm hình thái của nấm phân lập được tương đồng với đặc điểm hình thái đặc trưng của chi *Rhizopus* đã được mô tả bởi các nghiên cứu trước đây [4][6]. Kết quả này đồng thời cũng phù hợp với nguồn gốc loài nấm *Rhizopus oligosporus*, được xác định là thành phần trong men vi sinh Tempeh Starter (Công ty Kawashimaya, Nhật Bản) được sử dụng trong quá trình phân lập, làm thuần.

3.2. Xác định điều kiện phù hợp để nhân nhanh sinh khối chủng nấm *R. oligosporus*

Bảng 1. Xác định giá thể phù hợp giúp nhân nhanh sinh khối chủng nấm *R. oligosporus*

Công thức	Giá thể nhân nuôi	Số lượng bào tử/ g (CFU/ g)
CT1	Đậu tương	-
CT2	Lạc	-
CT3	Gạo dẻo (Bắc Thịnh)	$6,67 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^8$
CT4	Gạo khô (gạo Q5)	$5,08 \times 10^7 \pm 1.4 \times 10^7$

Ghi chú: “-” Không sinh bào tử, thời hỏng sau 1 ngày lên men

Kết quả tại bảng 1 cho thấy, chủng nấm *R. oligosporus* sinh trưởng phát triển mạnh trên môi trường gạo dẻo (gạo Bắc Thịnh) so với gạo khô (gạo Q5) và không thể mọc trên môi trường đậu tương hoặc lạc trong điều kiện phòng thí nghiệm do bị nhiễm vi khuẩn thối hỏng sau 1 ngày nuôi cấy. Vì vậy, gạo dẻo (gạo Bắc Thịnh) được lựa chọn làm giá thể nhân nhanh sinh khối nấm *R. oligosporus* ở các nghiên cứu tiếp theo.

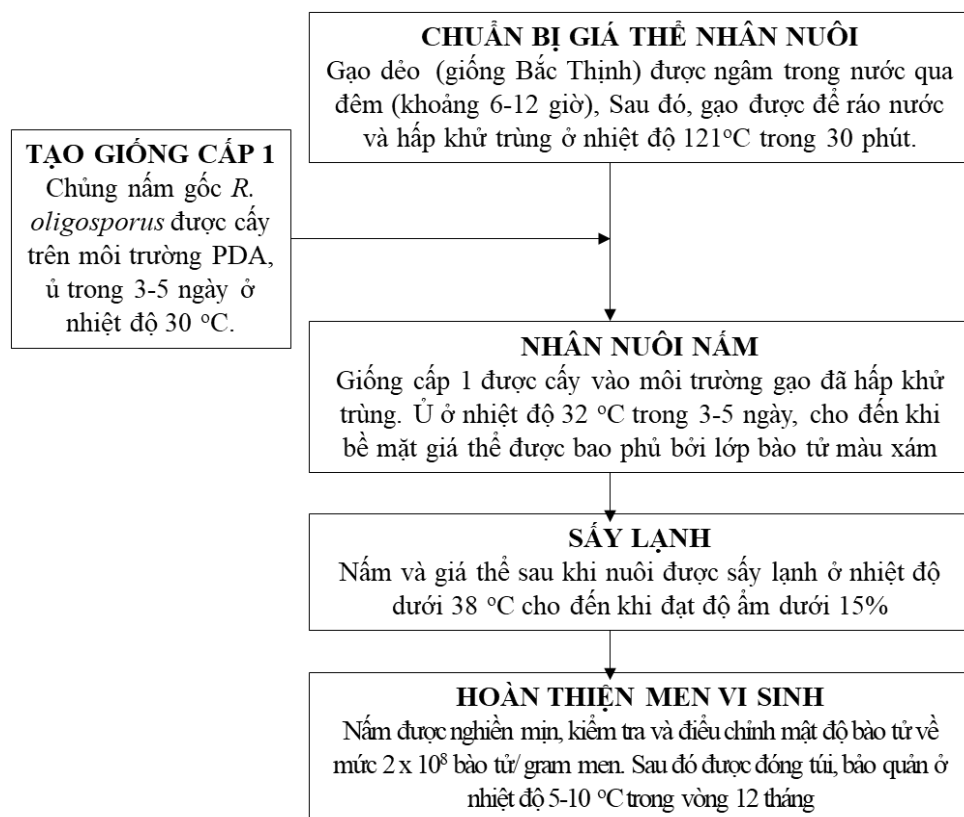
Bảng 2. Xác định nhiệt độ phù hợp để nhân nhanh sinh khối nấm mốc *R. oligosporus*

Công thức	Nhiệt độ ủ (°C)	Số lượng bào tử/ g men khô (CFU/ g)
CT1	26	$4,17 \times 10^6 \pm 0,73 \times 10^6$
CT2	30	$2,14 \times 10^8 \pm 0,34 \times 10^8$
CT3	32	$6,67 \times 10^8 \pm 0,42 \times 10^8$
CT4	38	-

Ghi chú: “-” Không xác định được mật độ bào tử. Không sinh bào tử, thối hỏng

Kết quả tại bảng 2, cho thấy, nhiệt độ phù hợp của nấm *R. oligosporus* trên môi trường gạo dẻo được xác định là 32°C, tại nhiệt độ này, mật độ bào tử đạt cao nhất (CFU/g: $6,67 \times 10^8$) sau 3 ngày nuôi cấy.

3.3. Quy trình nhân nhanh sinh khối chủng nấm *R. oligosporus* tạo nguồn men



Hình 3 . Quy trình nhân nhanh sinh khối chủng nấm *R. oligosporus* tạo nguồn men

Bước 1: Nuôi cấy chủng nấm gốc

Chủng nấm gốc *R. oligosporus* được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 3–5 ngày ở nhiệt độ 30°C, đến khi sợi nấm phát triển phủ kín bề mặt đĩa và hình thành nhiều bào tử màu xám. Đĩa nấm sau khi tạo bào tử được sử dụng làm nguồn giống cấp 1 để nhân nhanh sinh khối, phục vụ cho quá trình sản xuất men vi sinh.

Bước 2: Chuẩn bị giá thể nhân nuôi

Gạo dẻo (giống Bắc Thịnh) được ngâm trong nước từ 6 đến 12 tiếng ở nhiệt độ dưới 15°C. Sau khi ngâm, gạo được rửa sạch và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong vòng 30 phút.

Bước 3: Cấy giống và nhân nuôi nấm

Nguồn giống cấp 1 của nấm mốc *R. oligosporus* được cấy lên môi trường gạo đã hấp khử trùng. Môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 32°C trong khoảng 3 đến 5 ngày, cho đến khi bề mặt giá thể xuất hiện lớp bào tử nấm màu xám.

Bước 4: Sấy lạnh

Nấm thu được sẽ được sấy khô ở nhiệt độ dưới 38°C đến khi độ ẩm giảm còn dưới 15%, nhằm đảm bảo điều kiện bảo quản.

Bước 5: Hoàn thiện men vi sinh

Nấm được nghiền mịn, kiểm tra mật độ bào tử, phối trộn và điều chỉnh mật độ bào tử đạt mức 2×10^8 bào tử/gram men. Cuối cùng, sản phẩm được đóng gói và bảo quản ở nhiệt độ từ 5 đến 10°C trong vòng 12 tháng.

4. KẾT LUẬN

Chủng nấm mốc được phân lập và làm thuần từ nguồn men vi sinh Tempeh Starter (Kawashimaya, Nhật Bản) có đặc điểm hình thái phù hợp với loài nấm *Rhizopus oligosporus*. Chủng nấm này cho thấy khả năng sinh trưởng phát triển tốt trên môi trường gạo dẻo (gạo Bắc Thịnh) ở nhiệt độ 32°C. Nghiên cứu đã xác định được các điều kiện thích hợp để nhân nhanh sinh khối chủng nấm *R. oligosporus*, là cơ sở để xây dựng quy trình kỹ thuật tạo nguồn men vi sinh phục vụ sản xuất Tempeh từ đậu tương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Phương Linh, Ngô Thị Phương Dung (2006), *Tuyển chọn nấm mốc có hoạt tính đường hóa cao từ men rượu Xuân Thạnh*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ (6):162-171.
- [2] Astuti, M., Meliala, A., Dalais, F.S., Wahlqvist, M.L.(2000), *Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia*, Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition (9):322-325.

- [3] Jennessen J, Nielsen KF, Houbraken J, Lyhne EK, Schnurer J, Frisvad JC, Samson RA, (2005), *Secondary metabolite and mycotoxin production by the Rhizopus microsporus group*, Journal of Agricultural and Food Chemistry (53):1833-1840.
- [4] Jennessen J., Schnurer J., Olsson J., Samson. A. R., Duksterhuis J (2008), *Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus Rhizopus oligosporus differentiate it from the other taxa of the R. microsporus group*, Mycological Research, (112):547-563.
- [5] Khasanah, Y., Ratnayani, A.D., Angwar, M., Nuraeni, T. (2015), *In vivo study on albumin and total protein in white rat (Rattus Norvegicus) after feeding of enteral formula from tempe and local food*, Procedia Food Science, (3):274-279.
- [6] Lee A.C. & Fujio Y. (1999), *Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, (15):57-62.
- [7] Noriyuki Okada (1989), *Role of microorganisms in tempeh manufacture*, JARQ 22(4).
- [8] Samson RA (1985), *Taxonomic considerations of harmful and beneficial moulds in food*. In: Arai T (ed), *Filamentous Microorganisms - Biomedical Aspects*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- [9] Sharma, R. & Sarbhoy, A.K (1984), *Tempeh-a fermented food from soybean*, Current Science, (53):325-326.

ISOLATION, PURIFICATION, AND BIOMASS PROPAGATION OF *RHIZOPUS OLIGOSPORUS* FOR TEMPEH FERMENTATION

Pham Thi Thanh Binh, Mai Thanh Luan, Nguyen Thi Mai Anh, Pham Phuong Anh

ABSTRACT

Rhizopus oligosporus is a safe mold fungus for humans to produce tempeh, a healthy fermented soybean product widely used in the world. In this study, a strain of *R. oligosporus* was successfully isolated and purified. Additionally, optimal conditions for substrate composition and incubation temperature were identified to promote rapid biomass production, providing a viable microbial starter for Tempeh fermentation.

Keywords: *Rhizopus oligosporus*, isolation, Tempeh.

* Ngày nộp bài: 1/11/2024; Ngày gửi phản biện: 17/11/2024; Ngày duyệt đăng: 28/4/2025

* Bài báo là kết quả nghiên cứu từ đề tài NCKH cấp cơ sở (Mã số ĐT-2023-10) của Trường Đại học Hồng Đức