

# ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN HOẠT ĐỘ PROTEASE NGOẠI BÀO TRONG CHẾ PHẨM KOJI TƯƠNG SẢN XUẤT TỪ CHỦNG *ASPERGILLUS ORYZAE* N<sub>2</sub> NUÔI CẤY TRÊN MÔI TRƯỜNG BÁN RẮN

- TS. Nguyễn Hiền Trang (\*), KS. Phạm Trần Thùy Hương (\*),  
KS. Nguyễn Thị Thủy Tiên (\*)

## Tóm tắt

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố như: tỉ lệ bột mì, độ ẩm ban đầu của cơ chất, tỉ lệ nấm mốc cấy vào và thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh protease ngoại bào từ chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* N<sub>2</sub> nuôi cấy trên môi trường bán rắn (cám gạo và trấu) để sản xuất chế phẩm koji tương. Kết quả cho thấy, hoạt độ protease đạt 699U/g chất khô khi bổ sung 6% bột mì vào môi trường nuôi cấy, cao gấp 3,2 lần so với môi trường chỉ có cám gạo và trấu (219U/g chất khô). Độ ẩm ban đầu của cơ chất thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp protease là 55%. Chế phẩm koji có hoạt độ protease cao nhất sau 72 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ phòng khi bổ sung 0,3% khối lượng nấm mốc là 772 (U/g chất khô). Chế phẩm sau khi lên men được sấy ở 40°C - 45°C trong vòng 6h xuống độ ẩm cân bằng 6,3% và được bao gói trước khi bảo quản.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae* N<sub>2</sub>, cám gạo, lên men bán rắn, protease.

## 1. Đặt vấn đề

Protease là enzyme thương mại quan trọng được sử dụng trong sản xuất thực phẩm, chất tẩy rửa, công nghiệp sữa và thuộc da [8], [12]. Protease tồn tại đa dạng ở các loài thực vật, động vật, nhưng phần lớn protease thương mại được sản xuất chủ yếu từ vi sinh vật. Các chi nấm mốc như *Aspergillus*, *Penicillium* và *Rhizopus* được ứng dụng phổ biến cho quá trình sản xuất protease, đặc biệt các loài này được xem là an toàn khi ứng dụng trong thực phẩm [13]. Nấm mốc *Aspergillus oryzae* đã được ứng dụng rộng rãi để sản xuất các thực phẩm lên men tại châu Á, do đó enzyme protease từ loài này có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nước tương và các thực phẩm khác.

Enzyme protease ngoại bào có thể được sản xuất theo phương pháp lên men chìm hoặc lên men bán rắn. Phương pháp lên men bán rắn đặc biệt thích hợp cho sự phát triển của nấm

(\*) Khoa Cơ khí Công nghệ - Trường Đại học Nông Lâm Huế.

vì chúng yêu cầu độ ẩm thấp hơn so với vi khuẩn [9]. Ngoài ra, phương pháp lên men này tương đối đơn giản, rẻ tiền và mang lại hiệu suất sinh tổng hợp enzyme cao [17], [15]. Hàm lượng enzyme sinh ra cao hơn so với trong môi trường lỏng. Cơ chất dùng trong phương pháp lên men này có thể tận dụng các phế phụ phẩm rẻ và phổ biến của ngành nông nghiệp. Nhược điểm chính của phương pháp lên men bán rắn đó là quá trình sử dụng cơ chất không triệt để [14].

Mặc dù cám mì được xem là một nguồn cơ chất phù hợp để sản xuất protease từ nấm mốc theo phương pháp lên men bán rắn [2], nhưng nguyên liệu này không phổ biến ở một số vùng. Ví dụ như ở Việt Nam, phần lớn diện tích đất nông nghiệp được sử dụng để trồng lúa nước, do đó cám gạo mới rẻ tiền và có sẵn. Ở các nước châu Á khác, cám gạo cũng rẻ hơn cám mì rất nhiều [13]. Thành phần của cám bao gồm chất béo, xơ thô, carbohydrate và protein. Cám gạo có độ ẩm 7-13% phụ thuộc vào độ ẩm của gạo trước khi xay xát. Hàm lượng carbohydrate trong khoảng 34% và từ 15-19% dầu. Cám gạo chứa từ 13 đến 14% protein trong đó protein albumin chiếm phần lớn [7]. Cũng theo tác giả này, protein cám gạo là cơ chất dễ đồng hóa hơn so với protein có trong cám mì. Ngoài ra, cám gạo còn chứa một lượng đáng kể các loại khoáng như kali, photpho, canxi. Vì vậy, nó được xem là nguồn cơ chất tiềm năng để nuôi cấy mốc thu nhận protease theo phương pháp lên men bán rắn [3]. Kết quả nghiên cứu của Chutmanop và cộng sự (2008) cũng cho thấy nấm mốc *A. oryzae* sinh tổng hợp protease cao hơn khi nuôi trên môi trường cám gạo so với cám mì [6].

Koji tương là chế phẩm nấm mốc *A. oryzae* thuần chủng giàu hoạt lực protease thường được sản xuất bằng cách nuôi cấy mốc trên các cơ chất như đậu nành, ngô mảnh, gạo, hay cám mì có bổ sung trấu để tăng độ thoáng khí [5]. Chế phẩm này được ứng dụng phổ biến trong quá trình sản xuất nước chấm lên men từ đậu nành, cá hoặc từ thịt nhằm thúc đẩy quá trình lên men, tăng chất lượng của sản phẩm và đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm [16], [5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hỗn hợp cám gạo và trấu có bổ sung bột mì để sản xuất chế phẩm koji tương nhằm tận dụng nguồn cơ chất rẻ tiền làm giảm giá thành sản phẩm. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme của chủng *A. oryzae* như tỉ lệ bột mì bổ sung, độ ẩm ban đầu của cơ chất, tỉ lệ mốc cấy, thời gian nuôi cấy đã được nghiên cứu. Đồng thời, chúng tôi cũng khảo sát ảnh hưởng của điều kiện sấy (nhiệt độ sấy, thời gian sấy) sau khi lên men đến tính chất của chế phẩm koji tương.

## 2. Nội dung nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Cám gạo, trấu được mua ở cơ sở xay xát trên địa bàn Thừa Thiên Huế.

Bột mì được mua tại siêu thị Thuận Thành, thành phố Huế.

Chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* N<sub>2</sub> phân lập từ ngô được cung cấp bởi phòng thí nghiệm vi sinh, Khoa Cơ khí - Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm Huế.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Bố trí các thí nghiệm trong nghiên cứu

*a. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần cơ chất đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương*

Môi trường bán rắn ban đầu bao gồm 80% cám gạo và 20% trấu. Thay cám gạo bằng bột mì với các tỉ lệ 3; 6; 9; 12% tổng khối lượng cơ chất. Cơ chất được tiệt trùng và điều chỉnh độ ẩm lên 55% trước khi cấy 0,2% khối lượng nấm mốc *A.oryzae* N<sub>2</sub>. Tiến hành nuôi cấy nấm mốc trên khay ở nhiệt độ phòng. Thu mẫu sau 3 ngày và sấy ở 40°C trong 5h, bao gói và bảo quản lạnh. Xác định hoạt độ protease của chế phẩm để chọn tỉ lệ bột mì bổ sung thích hợp.

*b. Khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất ban đầu đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương*

Tạo môi trường bán rắn gồm cám gạo, bột mì và trấu. Tiệt trùng môi trường và điều chỉnh độ ẩm với các giá trị: 40; 45; 50; 55; 60%. Cấy 0,2% khối lượng nấm mốc *A.oryzae* N<sub>2</sub> và nuôi cấy trên khay ở nhiệt độ phòng trong vòng 3 ngày. Thu mẫu sấy ở 40°C trong 5h, làm nguội, bao gói và bảo quản lạnh đến khi xác định hoạt độ protease của chế phẩm để chọn độ ẩm thích hợp.

*c. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nấm mốc đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương*

Tạo môi trường bán rắn với các thông số về tỉ lệ cơ chất và độ ẩm chọn được ở trên. Cấy nấm mốc *A.oryzae* N<sub>2</sub> với các tỉ lệ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5% khối lượng và nuôi cấy trên khay ở nhiệt độ phòng trong vòng 3 ngày. Thu mẫu sấy ở 40°C trong 5h, làm nguội, bao gói và bảo quản lạnh đến khi xác định hoạt độ protease của chế phẩm để chọn tỉ lệ giống cấy thích hợp.

*d. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương*

Tạo môi trường bán rắn với các thông số về tỉ lệ cơ chất và độ ẩm chọn được ở trên. Cấy nấm mốc *A.oryzae* N<sub>2</sub> với các tỉ lệ thích hợp đã chọn và nuôi cấy trên khay ở nhiệt độ phòng. Tiến hành lấy mẫu sau 12h, sấy ở 40°C trong 5h, làm nguội, bao gói và bảo quản lạnh đến khi xác định hoạt độ protease của chế phẩm để chọn thời gian nuôi cấy thích hợp.

*e. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy đến độ ẩm và hoạt tính protease của chế phẩm koji tương*

Tiến hành nuôi cấy nấm mốc với các điều kiện như tỉ lệ bột mì, độ ẩm cơ chất, tỉ lệ nấm mốc và thời gian thích hợp đã khảo sát ở các thí nghiệm trên. Mẫu sau lên men được sấy ở các chế độ nhiệt độ 40°C, 45°C và 50°C để giảm độ ẩm của chế phẩm tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình bảo quản. Trong thời gian sấy, lấy mẫu sau 2h để kiểm tra độ ẩm và hoạt độ protease của chế phẩm.

### 2.2.2. Phương pháp phân tích

#### a. Xác định độ ẩm

Độ ẩm cơ chất được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi theo AOAC [4]. Mẫu được sấy ở  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 2h, làm nguội trong bình hút ẩm và cân khối lượng. Sấy mẫu thêm 30 phút, làm nguội và cân để kiểm tra khối lượng không đổi.

#### b. Xác định hoạt độ protease

Để xác định hoạt độ protease của chế phẩm, tiến hành cân 1g mẫu và nghiền mịn, thêm vào 50ml nước cất. Hỗn hợp được lắc 180 vòng/phút trong 30 phút ở  $30^{\circ}\text{C}$  để trích ly enzyme. Lọc hỗn hợp qua giấy lọc thu được dịch trích enzyme và bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$  (không quá 5 ngày) đến khi phân tích.

Hoạt độ protease được xác định theo phương pháp của Agrawal và cộng sự (2005) [1]: trộn 1ml dịch trích enzyme và 2ml dung dịch casein 2% (g/100ml, hòa tan trong đệm carbonate  $0,5\text{mol/l}$ , pH 10); hỗn hợp phản ứng thủy phân được ủ ở  $40^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút; ngưng phản ứng và kết tủa protein bằng 5 ml dung dịch tricloacetic acid (TCA) 5,0% sau đó lọc qua giấy lọc để thu dịch sau phản ứng. Hàm lượng Tyrosine thu được từ quá trình thủy phân casein trong dịch phản ứng được xác định theo phương pháp Lowry với thuốc thử Folin và đồ thị đường chuẩn Tyrosine. Thực hiện mẫu kiểm tra bằng cách cho dung dịch TCA vào dịch enzyme trước khi ủ với cơ chất.

Một đơn vị hoạt độ protease (U) được định nghĩa là lượng enzyme mà trong một phút ở  $40^{\circ}\text{C}$  có khả năng phân giải protein tạo thành các sản phẩm hoà tan trong tricloacetic acid, cho phản ứng màu tương đương với  $1,0 \mu\text{g}$  tyrosine. Hoạt độ protease được biểu diễn bằng số đơn vị hoạt độ enzyme có trong 1g chế phẩm.

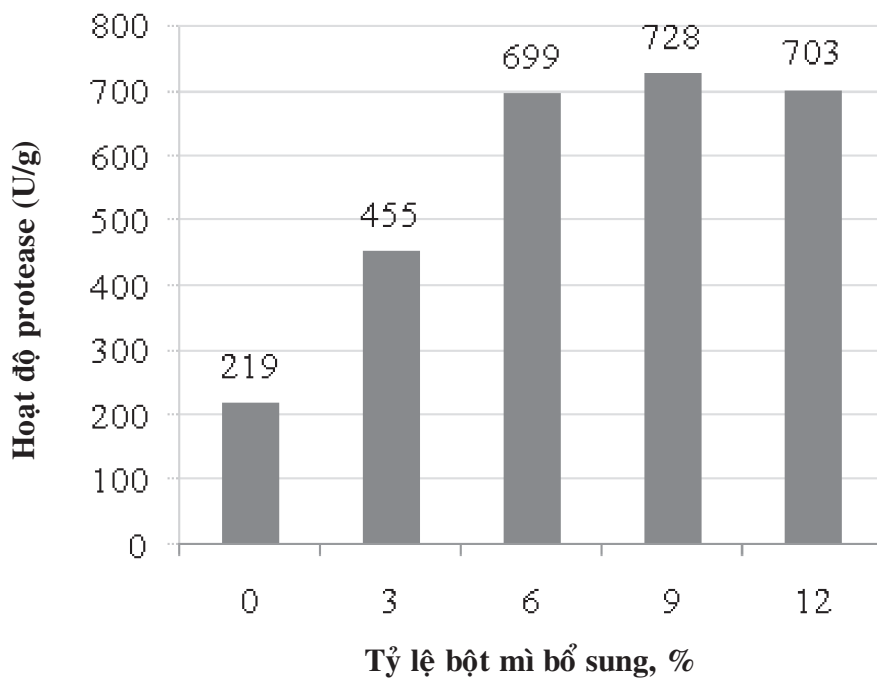
### 2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phân tích phương sai ANOVA để xác định sự sai khác giữa các giá trị trung bình, có ý nghĩa với độ tin cậy  $p < 0,05$ . Sử dụng phần mềm Statgraphics Plus, version 5.1.

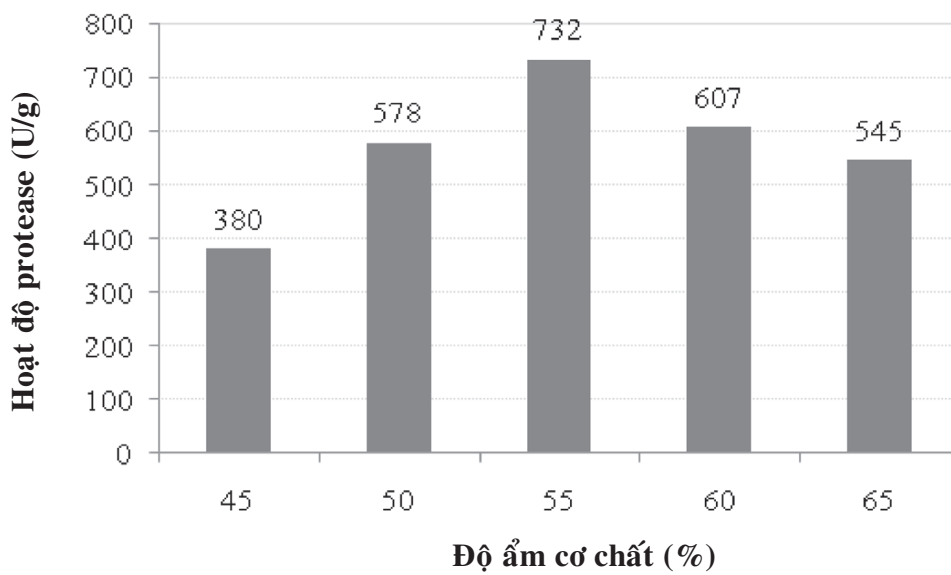
## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ bột mì bổ sung đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương

Kết quả khảo sát ở hình 1 cho thấy việc bổ sung bột mì vào môi trường cám gạo-trấu có ảnh hưởng nhiều đến quá trình sinh tổng hợp protease. Môi trường nuôi cấy có bổ sung 6% bột mì thu được chế phẩm koji có hoạt độ protease là 699 (U/g) gấp 3,12 lần so với môi trường nuôi cấy chỉ có cám gạo và trấu 219 (U/g). Tiếp tục tăng lượng bột mì bổ sung lên 9 và 12% thì hoạt độ protease của koji thu được không có sự thay đổi đáng kể ( $p < 0,05$ ). Điều này có thể là do hàm lượng bột mì cao kéo theo hàm lượng protein trong môi trường cao, dẫn đến cảm ứng tổng hợp nhiều protease để lên men cơ chất.



**Hình 1. Ảnh hưởng tỉ lệ bột mì bổ sung đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji**



**Hình 2. Ảnh hưởng của độ ẩm cơ chất đến hoạt độ enzyme protease của chế phẩm koji**

*Chú thích: Số liệu có số mũ khác nhau biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với  $p < 0,05$ .*

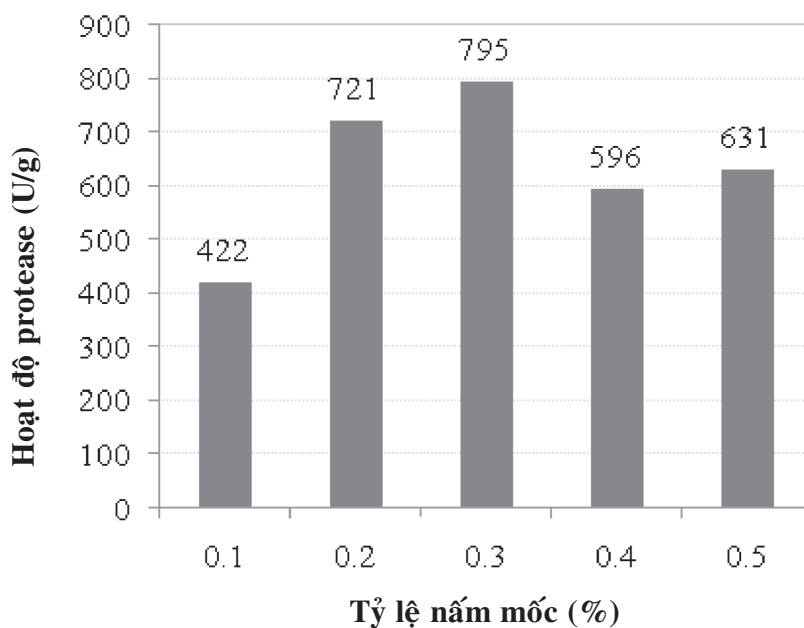
**3.2. Ảnh hưởng của độ ẩm ban đầu cơ chất đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương**

Khi nuôi cấy nấm mốc trên môi trường bán rắn thì độ ẩm cơ chất là một trong những yếu tố có ảnh hưởng rất lớn. Sự có mặt của nước giúp vi sinh vật hấp thu chất dinh dưỡng từ môi

trường dễ dàng hơn do đó ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chúng. Hơn thế, nước còn ảnh hưởng đến tính chất lý hóa của cơ chất dẫn đến ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của nấm mốc [6]. Kết quả ở hình 2 cho thấy khi tăng độ ẩm cơ chất từ 45% đến 55% thì hoạt độ protease của chế phẩm koji tăng và hoạt độ của protease giảm khi độ ẩm cơ chất tiếp tục được tăng lên 65%. Lượng nước có trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình thu nhận chất dinh dưỡng và hoạt động trao đổi chất của nấm mốc. Tuy nhiên, khi hàm ẩm cơ chất quá cao làm giảm độ xốp của môi trường dẫn đến hạn chế sự thông thoáng khí [15].

Chế phẩm koji có hoạt độ protease cao nhất là 732 (U/g) khi nuôi cấy chủng *A. oryzae* N<sub>2</sub> trong môi trường cơ chất 55% ẩm. Kết quả này cao hơn so với độ ẩm là 50% theo nghiên cứu của Chutmanop và cộng sự (2008) [6]. Điều này có thể là do môi trường cám gạo, bột mì, trấu có độ xốp cao hơn so với môi trường chỉ có cám gạo hay cám mì nên đòi hỏi độ ẩm cơ chất cao hơn để quá trình tổng hợp protease của nấm mốc đạt cực đại.

### 3.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ nấm mốc đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương



**Hình 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ nấm mốc nuôi cấy đến hoạt độ protease của chế phẩm koji**

*Chú thích: Số liệu có số mũ khác nhau biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với  $p < 0,05$ .*

Kết quả ở hình 3 cho thấy: khi tăng tỉ lệ nấm mốc nuôi cấy từ 0,1% đến 0,3% hoạt độ protease của chế phẩm tăng gần gấp đôi (1,89 lần) và đạt 795 (U/g). Tuy nhiên, hoạt độ protease của chế phẩm giảm xuống còn 596 (U/g) khi tiếp tục tăng tỉ lệ nấm mốc lên 0,4%.

Oyashik và cộng sự (1989) [10] chọn tỉ lệ nấm mốc bổ sung là 0,2% khi nghiên cứu điều kiện sản xuất koji từ *A. oryzae*. Sự khác nhau này có thể do ảnh hưởng cơ chất và điều kiện nuôi cấy.

### 3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình sinh tổng hợp protease của chế phẩm koji tương

Hoạt độ protease của chế phẩm cũng phụ thuộc vào thời gian nuôi cấy (kết quả ở bảng 1). Trong 12 giờ nuôi cấy đầu tiên là khoảng thời gian để nấm mốc thích nghi với môi trường do đó hoạt độ enzyme của chế phẩm còn rất thấp. Trong 12 giờ tiếp theo hoạt độ protease tăng 75%. Chế phẩm koji có hoạt độ protease đạt giá trị cực đại (772 U/g) sau 72h nuôi cấy. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Paranthaman và cộng sự (2009) [11]. Trong khi đó, Chutmanop và cộng sự (2008) [6] nhận thấy hoạt độ protease đạt cực đại sau 60h khi nuôi cấy *A.oryzae* trên môi trường cám gạo hoặc cám mì. Kéo dài thời gian nuôi cấy đến 120h, hoạt độ enzyme có xu hướng giảm và còn 714 (U/g). Sự giảm hoạt độ enzyme của chế phẩm có thể là do càng về thời gian sau của quá trình nuôi cấy, hàm lượng chất dinh dưỡng trong môi trường giảm và sự gia tăng các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh làm thay đổi điều kiện lên men [17].

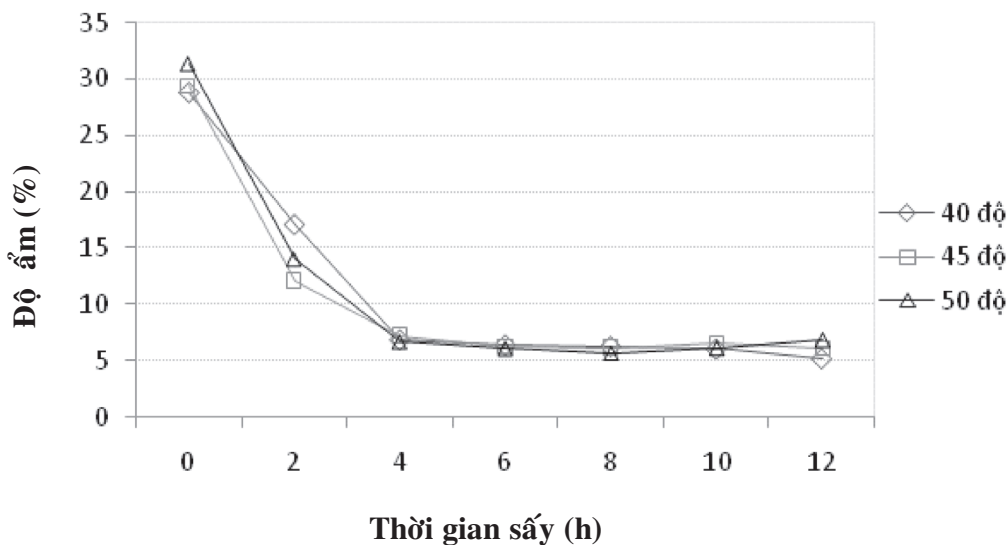
**Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ protease của chế phẩm koji**

Thời gian nuôi cấy (h)	Hoạt độ protease (U/g)
12	114 <sup>a</sup>
24	199 <sup>b</sup>
36	462 <sup>c</sup>
48	600 <sup>d</sup>
60	701 <sup>e</sup>
72	772 <sup>f</sup>
84	766 <sup>f</sup>
96	727 <sup>ef</sup>
108	725 <sup>e</sup>
120	714 <sup>e</sup>

*Chú thích: Số liệu có số mũ khác nhau biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với  $p < 0,05$ , so sánh theo cột.*

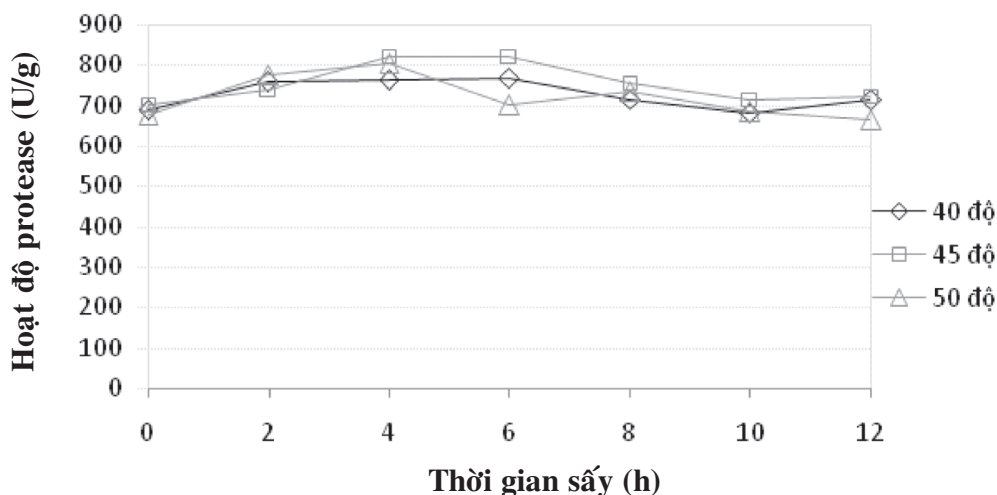
### 3.5. Ảnh hưởng quá trình sấy đến độ ẩm và hoạt độ protease của chế phẩm koji tương

Kết quả khảo sát độ ẩm, hoạt độ protease của chế phẩm theo thời gian sấy với các nhiệt độ sấy 40°C, 45°C và 50°C được trình bày trong hình 4 và hình 5.



**Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến độ ẩm của chế phẩm koji theo thời gian**

Kết quả hình 4 cho thấy, độ ẩm của chế phẩm giảm nhanh sau 2h sấy đầu tiên và đạt độ ẩm 6,3% sau 6h sấy. Kéo dài thời gian sấy dài hơn 6h không làm thay đổi độ ẩm của chế phẩm. Điều này là do độ ẩm 6,3% là độ ẩm cân bằng của chế phẩm trong điều kiện sấy hiện tại. Tăng nhiệt độ sấy từ 40°C đến 50°C không có sự ảnh hưởng đáng kể đến quá trình giảm ẩm của chế phẩm. Có thể giải thích hiện tượng này là do hàm ẩm của chế phẩm còn lại sau quá trình lên men thấp (trung bình khoảng 30%). Ngoài ra cấu trúc tơi xốp của chế phẩm cũng là một trong những điều kiện giúp thoát ẩm dễ dàng trong quá trình sấy.



**Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hoạt độ protease của chế phẩm koji theo thời gian**

Trong 4h đầu của quá trình sấy, hoạt độ protease có sự gia tăng. Ở thời điểm 6h sấy, hoạt độ protease không có sự thay đổi so với thời điểm 4h khi sấy ở 40°C và 45°C nhưng giảm đáng kể từ 802 (U/g) xuống còn 700 (U/g) khi sấy ở 50°C.



Như vậy, chế phẩm được sấy ở khoảng nhiệt độ 40°C đến 45°C trong vòng 6h sẽ đạt được độ ẩm cân bằng 6,3%. Đồng thời hoạt độ protease của chế phẩm có tăng nhẹ so với thời điểm kết thúc lên men.

#### 4. Kết luận

Thành phần môi trường thích hợp để thu nhận chế phẩm koji tương có hoạt độ protease ngoại bào cao từ chủng *A. oryzae* N<sub>2</sub> nuôi cấy trên môi trường bán rắn gồm 74% cám gạo, 6% bột mì và 20% trấu.

Độ ẩm ban đầu của cơ chất là 55% và bổ sung 0,3% nấm mốc trong quá trình lên men sẽ cho hoạt độ protease của chế phẩm cao nhất.

Với các điều kiện trên, thời gian thu nhận chế phẩm thích hợp là sau 72h lên men.

Điều kiện sấy thích hợp để giảm độ ẩm của chế phẩm thích hợp cho quá trình bảo quản đồng thời làm tăng hoạt độ protease của chế phẩm là 40°C đến 45°C trong vòng 6h./.

#### Tài liệu tham khảo

[1]. Agrawal D, Partidar P, Banerjee Tand Patil S (2005), "Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria feline* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis", *Process Biochem*, (40), pp.1131-1136.

[2]. Aikat K and Bhattacharyya BC (2001), "Protease production in solid state fermentation with liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*", *Process Biochem*, (36), pp.1059-1068.

[3]. Amisshah JGN, Ellis WO, Oduro I and Manful JT (2003), "Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana", *Food Control*, (4), pp.21-24.

[4]. AOAC, *Official Methods of Analysis (OMA)*, 14th edn (1984), Association of Official Agricultural Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

[5]. Chuenjit C, Pao-Chuan H, Shyang-Chwen S (2012), "Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji Fermentation", *APCBEE Procedia*, (2), pp. 57 - 61.

[6]. Chutmanop J, Chuichulcherm S, Chisti Y and Rinophakun R (2008), "Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, (83), pp.1012-1018.

[7]. Landers P and Hamaker BR (1994), "Antigenic properties of albumin, globulin, and protein concentrate fraction from rice bran", *Cereal Chem*, (71), pp.409-411.

[8]. Negi S and Benerjee R (2006), "Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique", *Food Technol Biotechnol*, (44), pp.257-261.

[9]. Ogawa A, Yasuhara A, Tanaka T, Sakiyama T and Nakanishi K (1995), "Production

of neutral protease by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* IAM2704", *J Ferment Bioeng*, (80), pp.35-40.

[10]. Oyashiki H, Uchida M, Obayashi A, Oka S (1989), "Evaluation of koji prepared with various molds for Mirin-Making", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, (67), pp. 163-168.

[11]. Paranthaman R, Alagusundaram K, Indhumathi J (2009), "Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation", *World Journal of Agricultural Sciences*, (5), pp. 308-312.

[12]. Rajmalwar S, Dabholkar PS (2009), "Production of protease by *Aspergillus* sp. using solidstate Fermentation", *African Journal of Biotechnology*, (8), pp. 4197-4198.

[13]. Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G and Pandey A (2005), "Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation", *Process Biochem*, (40), pp.2689-2694.

[14]. Sangsurasak P, Mitchell DA (1995), "The investigation of transient multi dimensional heat transfer in solid-state fermentation", *Chem Eng J*, (60), pp.199-204.

[15]. Thanapimmetha A, Luadsongkram<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011004304> - aff0005 A, Titapiwatanakun<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011004304> - aff0015 B, Srinophakun P (2012), "Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology", *Industrial Crops and Products*, (37), pp. 1-5.

[16]. Nguyen Hien Trang, Simada K, Sekikawa M, Ono T, Mikami M (2005), "Fermentation of meat with koji and commercial enzymes, and properties of its extract", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (85), pp. 1829-1837.

[17]. Wang R, Chau Sing Law R and Webb C (2005), *Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation*, *Process Biochem*, (40), pp.217-227.

### Summary

This study examined the effects of such elements as flour ratio, the initial moisture, the ratio of fungi inserted and time needed on the making of extracellular protease *Aspergillus oryzae* N<sub>2</sub> in a semi-solid solution (rice bran and chaff) in order to produce the soy-sauce of koji. Results showed that the protease action reached 699 (U/g dry matter) with an addition of 6% flour into the culture medium, 3.2 times higher compared to that of only rice bran and chaff (219 U/g dry matter). The suitable initial moisture for the production of protease was 55%. The koji had the highest protease action after 72 hours incubation at room temperature when the medium was added 0.3% (w/w) fungi of 772 (U/g dry matter). After being fermented, the koji was dried at 40°C - 45°C within 6 hours to get the equilibrium moisture of 6.3% before packaging.

Key words: *Aspergillus oryzae* N<sub>2</sub>, rice bran, fermentation, semi-solid, protease.

Ngày nhận bài: 07/12/2012; Ngày nhận đăng: 23/6/2013.