

MÔ HÌNH HÓA SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ NHIỆT ĐỘ, HOẠT ĐỘ NƯỚC LÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA FUSARIUM NAPIFORME ỨNG DỤNG TRONG BẢO QUẢN NGÔ

● PHAN THỊ KIM LIÊN - NGUYỄN TÀI NGUYÊN - TẠ THỊ QUỲNH DIỄM

TÓM TẮT:

Trong nghiên cứu này, bề mặt đáp ứng của phần mềm Mode 5.0 được sử dụng để mô hình hóa tốc độ tăng trưởng của *Fusarium Napiforme* (*F. napiforme*) với mức ý nghĩa 5% ở nhiệt độ (25, 28, 31°C) và hoạt độ nước (0.98 - 1_{a_w}). Kết quả nghiên cứu cho thấy *F. napiforme* phát triển mạnh nhất ở 28°C ở hoạt độ nước 1_{a_w} (11.4 ± 0.14mm.ngày⁻¹) với phương trình hồi quy $Y=11.3122 + 0.769999x_1 + 0.974116x_2 - 1.33908*x_1x_2 - 0.684752*x_1^2 - 1.71*x_2^2$. Mô hình này có thể được áp dụng để dự đoán sự tăng trưởng của *F. napiforme* trên ngô. Từ đó có thể xác định phương án bảo quản phù hợp đối với ngô sau khi thu hoạch làm tăng chất lượng của ngô và giúp giảm thiểu lượng độc tố con người hay vật nuôi sử dụng các sản phẩm từ ngô.

Từ khóa: Nhiệt độ, hoạt độ nước, *F. napiforme*, môi trường ngô, tốc độ tăng trưởng, mô hình.

1. Giới thiệu

Fusarium spp. là loài nấm mốc phân bố rộng rãi trên thế giới, xuất hiện thường xuyên trên lương thực, thực phẩm, đặc biệt là ngô (Elras and Schneider 1992). Ngô và các sản phẩm từ ngô trên toàn thế giới có tỷ lệ nhiễm độc tố nấm mốc Fumonisin cao (Solovey, Somoza *et al.* 1999, Ates, Mittendorf *et al.* 2013, Peluque, Neres *et al.* 2014). Đây là độc tố ổn định nhiệt và có thể sẽ không bị phá hủy bằng nhiệt (Abbas and Riley 1996), đặc biệt là Fumonisin B1 (FB1) - loại độc tố phổ biến và nguy hiểm nhất trong Fumonisin (Labuda, Tancinova *et al.* 2003). Ở động vật, FB1 có thể gây phù phổi ở lợn, gây độc với gan, thận và hội chứng Leucoencephalomalacia ở ngựa (Coulombe Jr

1993, Marasas 1995, Marasas, Riley *et al.* 2004), đồng thời FB1 còn gây khó thở, các vấn đề về tim, giảm sản xuất sữa, giảm cân và tăng tỷ lệ tử vong (Casteel, Turk *et al.* 1994, Norred, VOSS *et al.* 1998, Whitlow and Hagler 2005). Cơ quan Nghiên cứu Quốc tế về ung thư (IARC) thuộc Tổ chức Y tế Thế giới WHO đã xếp loại FB1 vào nhóm chất gây ung thư 2B - nhóm chất có thể gây ung thư cho con người (Humans, Organization *et al.* 2002). Sự sinh trưởng, phát triển và sinh độc tố FB1 của các chủng nấm mốc *Fusarium spp.* bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như nhiệt độ, độ ẩm, hoạt độ nước, pH,... Trong đó, nhiệt độ và hoạt độ nước là hai yếu tố quyết định đến sự nhiễm nấm mốc trong quá trình bảo quản (da Cruz Cabral, Pinto *et al.* 2013). Những

ngghiên cứu trước đây cho thấy, nhiệt độ tối ưu của *Fusarium spp.* là 20°C - 25°C, hoạt độ nước từ 0.95_{a_w} - 0.99_{a_w} (Cendoya, del Pilar Monge *et al.* 2018, Belizán, Gomez *et al.* 2019). Trước đây, đã có nhiều mô hình được xây dựng để dự đoán ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ và hoạt độ nước lên sự sinh trưởng của nấm mốc như mô hình dự đoán về tốc độ riêng lẻ và kết hợp của hoạt độ nước và nhiệt độ đối với sự phát triển xuyên tâm của *Fusarium verticillioides* và *F. proliferatum* trên ngô (Samapundo, Devlieghere *et al.* 2005), *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* trên ngô (Samapundo, Devlieghere *et al.* 2007). Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu lên các loài *Fusarium spp.* còn rất hạn chế về cả số lượng lẫn quy mô thực hiện. Hơn thế nữa, chưa có nghiên cứu nào được thực hiện để xây dựng mô hình về sự ảnh hưởng của nhiệt độ và hoạt độ nước lên sự sinh trưởng và phát triển của các loài *Fusarium napiforme*. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là đưa ra mô hình dự đoán tốc độ sinh trưởng của *F. napiforme* tại các điều kiện nhiệt độ, hoạt độ nước. Từ đó, có biện pháp thích hợp để điều chỉnh các điều kiện bảo quản ngô để hạn chế sự lây nhiễm và phát triển của *Fusarium spp.*

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chúng nấm mốc và chuẩn bị dịch huyền phù

F. napiforme được phân lập từ ngô của Đắk-Lắk và được xác định khả năng sinh độc tố Fumonisin B1 (FB1) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC MS/MS. Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường Potatose dextrose agar (PDA, Himedia, Ấn Độ) và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C tại phòng thí nghiệm, Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm TP. Hồ Chí Minh. *F. napiforme* được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 30°C trong 7 ngày. Bào tử nấm được thu và pha loãng trong PBS (Biotech, Canada) với 0.01% Tween 80 (Merck, Đức) (v/v) đã được vô trùng và xác định số bào tử bằng buồng đếm hồng và nồng độ cuối cùng là 106 bào tử/ml.

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và hoạt độ nước lên sự tăng trưởng của *F. napiforme* trên môi trường ngô

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (25, 28, 30 và 32°C) và hoạt độ nước 0.94, 0.96, 0.98, 0.99 và 1 lên sự tăng trưởng và phát triển của nấm mốc trong 7 ngày nuôi cấy trên môi trường ngô (bột ngô 2%, agar 2%) (w/v). Glycerol (Xilong, Trung Quốc) được bổ sung vào nước để điều chỉnh môi trường về các hoạt độ nước từ 0.94, 0.96, 0.98, 0.99

(w/v). 10μl dung dịch bào tử ở nồng độ 106 bào tử/ml được nhỏ vào giữa đĩa petri (đường kính 80 mm) (Dinlab, Đức) chứa 15 ml môi trường đã được hấp tiệt trùng ở 121°C/15 phút. Tiến hành đo đường kính phát triển của khuẩn lạc sau mỗi 24 giờ trong 7 ngày và tính tốc độ tăng trưởng theo công thức sau.

Tốc độ tăng trưởng trung bình (mm.ngày⁻¹) của nấm mốc được tính toán theo công thức:

$$A = \frac{\sum_{k=0}^n d_{k+1} - d_k}{n}$$

Trong đó: A là tốc độ tăng trưởng trung bình của nấm (mm.ngày⁻¹); d là đường kính khuẩn lạc (mm); n là số ngày nuôi cấy (n=1,2,3,...).

2.3. Thiết kế thí nghiệm và mô hình hóa ảnh hưởng của nhiệt độ và hoạt độ nước lên sự tăng trưởng của *F. napiforme*

Tiến hành mô hình hóa 2 yếu tố ảnh hưởng: nhiệt độ (25, 28, 31, °C) và hoạt độ nước (0.98, 0.99 và 1) để tìm ra khoảng biến thiên của các thông số hoạt độ nước, nhiệt độ bằng phương pháp thực nghiệm 2 yếu tố. Bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng để xây dựng mô hình dự đoán ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ, hoạt độ nước lên tốc độ tăng trưởng trung bình của *F. napiforme*. Khoảng biến thiên của các biến được xác định dựa trên kết quả khảo sát trước đó. Hàm mục tiêu đại diện cho dự đoán tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme*. Mối quan hệ giữa các biến và hàm mục tiêu là phương trình hồi quy đa biến có dạng tổng quát như sau:

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j$$

Các hệ số của phương trình hồi quy thực nghiệm được ước lượng bằng phương pháp bình phương cực tiểu; tính tương thích chung của mô hình được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA; α = 0.05); ý nghĩa của các hệ số được kiểm tra bằng kiểm định Student (α = 0.05). Điều kiện tối ưu được dự đoán và xác minh lại bằng thực nghiệm.

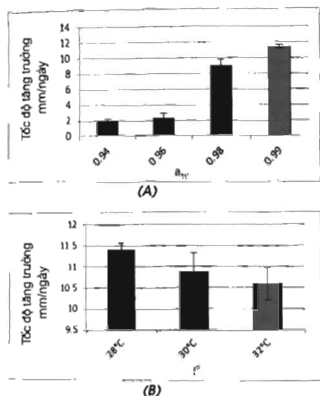
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của hoạt độ nước lên tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme* ở nhiệt độ 30°C

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hoạt độ nước lên sự tăng trưởng của nấm mốc ở nhiệt độ 30°C được trình bày ở Hình 1. Dữ liệu nghiên cứu cho thấy, hoạt độ nước có ảnh hưởng lên tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme* ở 30°C trên môi trường ngô (p<0.05) trong 7 ngày nuôi cấy. Nhìn chung, tốc độ tăng trưởng trung bình tăng khi tăng hoạt độ nước từ 0.94 đến 0.98 a_w. Ở hoạt độ nước 0.99 a_w *F. napiforme* là 11.39±0.2 mm.ngày⁻¹ sau đó giảm dần

khí hoạt độ nước giảm hoặc tăng như ở hoạt độ nước 0.98, 0.96 và 0.94 a_w , sau 7 ngày nuôi cấy, tốc độ tăng trưởng là 9.05 ± 0.722 , 2.24 ± 0.629 và 1.93 ± 0.25 mm.ngày⁻¹. (Hình 1A)

Hình 1: Tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme* ở các hoạt độ nước khác nhau ở 30°C (A) và nhiệt độ khác nhau (B) sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường ngô



3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nhiệt độ lên tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme* ở hoạt độ nước 0.99 a_w trên môi trường ngô

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (25, 28, 30 và 32°C) lên sự tăng trưởng của *F. napiforme* ở hoạt độ nước 0.99 a_w trên môi trường ngô được biểu thị ở Hình 1B. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhiệt độ cũng ảnh hưởng lên tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme* ($p < 0.05$). Xu hướng chung, tốc độ tăng trưởng giảm khi nhiệt độ tăng lên từ 28°C tới 30°C. Cụ thể là ở hoạt độ nước 0.99 a_w , *F. napiforme* tăng trưởng mạnh nhất ở 28°C với tốc độ tăng trưởng sau 7 này là 11.4 ± 0.14 mm.ngày⁻¹, giảm dần ở 30°C (10.89 ± 0.433 mm.ngày⁻¹) và 32°C (10.6 ± 0.382 mm.ngày⁻¹) (Hình 1B).

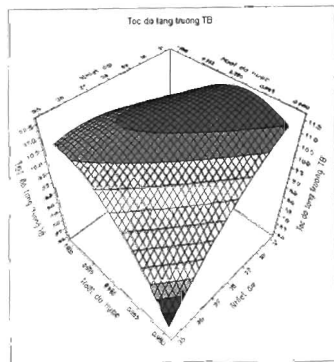
3.3. Mô hình hóa ảnh hưởng của nhiệt độ và hoạt độ nước lên tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme*

Điểm tâm của nhiệt độ là 28°C. Đây là nhiệt độ

F. napiforme phát triển mạnh nhất với tốc độ tăng trưởng 11.429 ± 0 mm.ngày⁻¹ là 28°C và giảm dần ở các nhiệt độ khác với mức ý nghĩa 5% được kiểm chứng bởi Microsoft Excel 2010, nên bước nhảy được chọn là 3 (25°C, 31°C). Tương tự như nhiệt độ, hoạt độ nước được chọn với bước nhảy 0.01 và tâm là 0.99. Bề mặt đáp ứng (RSM) được áp dụng để tối ưu hóa các điều kiện ức chế tốc độ tăng trưởng trung bình của *F. napiforme*. Bên cạnh đó, quy hoạch thực nghiệm gồm 17 thí nghiệm với 4 thí nghiệm ở phương án nhân, 4 thí nghiệm ở điểm sao và 9 thí nghiệm ở điểm tâm. Kết quả thí nghiệm tối ưu hóa được trình bày ở Bảng 1.

Nhiệt độ và hoạt độ nước có ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme*. Cả hai yếu tố được biểu diễn bằng mô hình bậc hai với $R^2 = 0.973$, R^2 điều chỉnh = 0.961 và $RSD = 0.2967$. Hoạt độ nước và nhiệt độ tối ưu cho *F. napiforme* tăng trưởng là $1a_w$, 28°C và 0.98, 0.99 a_w , 31°C (11.429 ± 0 mm.ngày⁻¹). Dựa vào dữ liệu ở Hình 2 cho thấy, trong mô hình tốc độ tăng trưởng trung bình giảm khi hoạt độ nước $1a_w$, 28°C và 0.98, 0.99 a_w , 31°C. Dựa vào Hình 2, cho thấy được tốc độ tăng trưởng trung bình của chủng này có thể dự đoán được khi phát triển ở hoạt độ nước 0.98 đến 1 và nhiệt độ là 25°C đến 31°C.

Hình 2: Mô hình bề mặt đáp ứng dự đoán tốc độ tăng trưởng trung bình (mm.ngày⁻¹) của *F. napiforme* dưới sự tác động của nhiệt độ và hoạt độ nước



Bảng 1. Kết quả thực nghiệm và dự đoán về tốc độ tăng trưởng trung bình của *F. napiforme* dưới ảnh hưởng của nhiệt độ và hoạt độ nước

Thí nghiệm	Hoạt độ nước	Nhiệt độ	Tốc độ tăng trưởng thực tế (%)	Tốc độ tăng trưởng dự đoán (%)	Sai số
1	0.98	25	5.92	5.83258	0.08742
2	1	25	10.39	10.7929	0.4029
3	0.98	31	11.42	11.201	0.219
4	1	31	9.05	9.32135	0.27135
5	0.98	28	8.9	9.20199	0.30199
6	1	28	11.42	10.7423	0.6777
7	0.99	24	9	8.79585	0.20415
8	0.99	32	11.4	11.393	0.007
9	0.99	28	11.39	11.3117	0.0783
10	0.99	28	11.25	11.3117	0.0617
11	0.99	28	11.16	11.3117	0.1517
12	0.99	28	11.39	11.3117	0.0783
13	0.99	28	11.21	11.3117	0.1017
14	0.99	28	11.21	11.3117	0.1017
15	0.99	28	11.36	11.3117	0.0483
16	0.99	28	11.21	11.3117	0.1017
17	0.99	28	11.42	11.3117	0.1083

Xét một cách tổng quát, mô hình hồi quy tương thích với thực nghiệm, với giá trị $R^2 = 0.976$ thì phương trình có thể giải thích được 97.6% những giá trị mà phương trình đưa ra.

Mức độ tác động, ảnh hưởng của các yếu tố (biến khảo sát) lên tốc độ tăng trưởng trung bình (hàm mục tiêu) thông qua hệ số giá trị ước lượng và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê thể hiện thông qua trị số P. Nếu hệ số giá trị ước lượng của một biến mang giá trị dương nghĩa là khi giá trị biến đó tăng sẽ làm tăng giá trị hàm mục tiêu. Nếu hệ số giá trị ước lượng của một biến mang giá trị âm thì khi giá trị biến đó tăng sẽ làm giá trị hàm mục tiêu giảm. Tốc độ tăng trưởng trung bình $Y = 11.3122 + 0.769999x_1 + 0.974116x_2 - 1.33908x_1x_2 - 0.684752x_1^2 - 1.71x_2^2$ (Trong đó: X_1, X_2 lần lượt là nhiệt độ, hoạt độ nước). Kết quả thực nghiệm cũng cho thấy, mức độ ảnh hưởng

của các yếu tố lên tốc độ tăng trưởng của *F. napiforme*. Với mức ý nghĩa 5%, cùng với giá trị thực hiện thí nghiệm của nhiệt độ ở 25°C đến 31°C thì giá trị nhiệt độ và bình phương nhiệt độ có nghĩa về mặt thống kê, được xem là có ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng trung bình của *F. napiforme* ($p < 0.05$). Hoạt độ nước và bình phương hoạt độ nước tác động dương và tác động mạnh đến tốc độ tăng trưởng trung bình của *F. napiforme* ($p < 0.05$).

Trong nghiên cứu này, yếu tố nhiệt độ và hoạt độ nước đều ảnh hưởng lên quá trình sinh trưởng và phát triển của *F. napiforme* ($p < 0.05$).

4. Kết luận

Nhiệt độ và hoạt độ nước đều ảnh hưởng lên quá trình sinh trưởng và phát triển của *F. napiforme* ($p < 0.05$). *F. napiforme* phát triển mạnh nhất ở 28°C, 1 a_w và 31°C, 0.98, 0.99a_w (11.43 ± 0

mm.ngày⁻¹) với phương trình hồi quy $Y = 11.3122 + 0.769999x_1 + 0.974116x_2 - 1.33908x_1x_2 - 0.684752x_1^2 - 1.71x_2^2$. Mô hình này có thể được áp dụng để dự đoán sự tăng trưởng của *F.napiforme*

trên ngô. Từ đó có thể xác định phương án bảo quản phù hợp đối với ngô sau khi thu hoạch làm tăng chất lượng của ngô và giúp giảm thiểu lượng độc tố con người hay vật nuôi sử dụng các sản phẩm từ ngô ■

Lời cảm ơn:

Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm TP. Hồ Chí Minh đã hỗ trợ toàn bộ kinh phí cũng như các dụng cụ, thiết bị để nhóm hoàn thành đề tài nghiên cứu được tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Abbas, H. K. and R. Riley (1996). "The presence and phytotoxicity of fumonisins and AAL-toxin in *Alternaria alternata*." *Toxicon* 34(1): 133-136.
2. Ates, E., et al. (2013). "Determination of *Fusarium* mycotoxins in wheat, maize and animal feed using on-line clean-up with high resolution mass spectrometry." *Food Additives & Contaminants: Part A* 30(1): 156-165.
3. Belcán, M. M., et al. (2019). "Influence of water activity and temperature on growth and production of trichothecenes by *Fusarium graminearum sensu stricto* and related species in maize grains." *International journal of food microbiology* 305: 108242.
4. Casteel, S. W., et al. (1994). "Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine." *Fundamental and Applied Toxicology* 23(4): 518-524.
5. Cendoya, E., et al. (2018). "Influence of water activity and temperature on growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* strains on irradiated wheat grains." *International journal of food microbiology* 266: 158-166.
6. Coulombe Jr, R. A. (1993). "Biological action of mycotoxins." *Journal of dairy science* 76(3): 880-891.
7. da Cruz Cabral, L., et al. (2013). "Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods." *International journal of food microbiology* 166(1): 1-14.
8. Elias, K. S. and R. Schneider (1992). "Genetic diversity within and among races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* as determined by isozyme analysis." *PHYTOPATHOLOGY-NEW YORK AND BALTIMORE THEN ST PAUL*: 82: 1421-1421.
9. Humans, I. W. G. o. t. E. o. C. R. t., et al. (2002). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*, World Health Organization.
10. Labuda, R., et al. (2003). "Identification and enumeration of *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10(1): 61-66.
11. Marasas, W. F. (1995). "Fumonisin: their implications for human and animal health." *Natural toxins* 3(4): 193-198.
12. Marasas, W. F., et al. (2004). "Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize." *The Journal of nutrition* 134(4): 711-716.
13. Norred, W. P., et al. (1998). "Mycotoxins and health hazards: Toxicological aspects and mechanism of action of fumonisins." *The Journal of toxicological sciences* 23(Supplement11): 160-164.
14. Peluque, E., et al. (2014). "Fumonisin B1 in cereal mixtures marketed in Brazil." *Food Additives & Contaminants: Part B* 7(1): 46-48