

PHẦN I - MỞ ĐẦU	5
PHẦN II- TỔNG QUAN TÀI LIỆU	8
2.1. Giới thiệu chung về thanh long	8
2.1.1. Cây thanh long	8
2.1.2. Đặc điểm và giá trị của quả thanh long	8
2.1.2.1. Đặc điểm của quả thanh long	8
2.1.2.2. Thu hoạch thanh long	8
2.1.2.3. Giá trị dinh dưỡng của quả thanh long	9
2.1.2.4. Một số bệnh thường gặp ảnh hưởng đến chất lượng quả thanh long sau thu hoạch [13]	9
2.1.3. Tình hình sản xuất và tiêu thụ thanh long ở nước ta	10
2.1.4. Sự biến đổi của quả thanh long sau thu hoạch	11
2.1.4.1. Biến đổi vật lý	11
2.1.4.2. Biến đổi sinh lý - sinh hóa	12
2.1.5. Một số phương pháp bảo quản quả thanh long	14
2.1.5.1. Xử lý nhiệt trước khi bảo quản	14
2.1.5.2. Bảo quản ở nhiệt độ thấp	14
2.2. Bảo quản rau quả bằng phương pháp phủ màng	15
2.2.1. Khái niệm chung	15
2.2.2. Đặc tính lý hóa và vai trò của màng bao	15
2.2.2.1. Đặc tính lý hóa	15
2.2.2.2. Vai trò của chất tạo màng	16
2.2.3. Một số chất tạo màng	17
2.2.3.1. Màng polychacaride	17
2.2.3.2. Màng protein	17
2.2.3.3. Màng lipit	18
2.2.3.4. Màng composit	18

2.3. bảo quản rau quả tươi bằng vi sinh vật đối kháng	19
2.3.1. Vi sinh vật đối kháng	19
2.3.2. Các nghiên cứu sử dụng vi sinh vật đối kháng trong bảo quản rau quả	20
PHẦN III- VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
3.1. Vật liệu nghiên cứu	24
3.1.1. Đối tượng nghiên cứu	24
3.1.4. Các thiết bị nghiên cứu.....	25
3.2. Nội dung nghiên cứu (theo thuyết minh đã phê duyệt)	26
3.3. Phương pháp nghiên cứu	26
3.3.1. Phương pháp phân lập nấm mốc gây thối hỏng quả thanh long	26
3.3.2. Phương pháp phân lập nấm men đối kháng	27
3.3.3. Phương pháp tuyển chọn chủng nấm men đối kháng nấm mốc gây thối hỏng thanh long	27
3.3.4. Phương pháp định loại các chủng nấm men <i>Candida sake</i> đối kháng dùng trong bảo quản thanh long	28
3.3.5. Nghiên cứu công nghệ sản xuất nấm men <i>Candida sake</i> quy mô phòng thí nghiệm	28
3.3.6. Phương pháp nuôi cấy chìm sục khí chủng nấm men <i>Candida sake</i> TL1 quy mô 100lít/m ³	32
3.3.7. Phương pháp thử khả năng đối kháng nấm mốc của nấm men <i>Candida</i> trên quả thanh long.....	33
3.3.8. Phương pháp tạo màng bao ăn được	30
3.3.9. Phương pháp bố trí thí nghiệm kiểm tra hiệu quả của các công thức màng bao	34
3.3.10. Phương pháp xử lý quả sơ bộ bằng một số chất sát trùng thông thường trước khi áp dụng chế phẩm.....	35
3.3.11. Phương pháp nghiên cứu tác dụng của chitosan tới sự phát triển của vi sinh vật gây hỏng quả thanh long	35
3.3.12. Nghiên cứu tác dụng của chitosan tới sự phát triển của nấm men	36
3.3.13. Nghiên cứu tác dụng của chitosan và nấm men đối kháng có bổ sung CaCl ₂ đến sự phát triển nấm gây thối hỏng trên quả thanh long.....	37

3.3.14. Phương pháp phân tích chất lượng.....	37
3.3.15. Phương pháp thử nghiệm tính an toàn sinh học của chế phẩm nấm men đối kháng TL01	36
3.3.16. Phương pháp bố trí thí nghiệm bảo quản quả thanh long bằng chế phẩm TL01 ở quy mô lớn tại công ty TNHH TM Hưng Loan Bình Thuận	37
PHẦN IV: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	39
4.1. Kết quả khảo sát thực trạng sản xuất trước và sau thu hoạch Thanh long Bình Thuận	39
4.1.1. Thực trạng sản xuất trước thu hoạch thanh long Bình Thuận	39
4.1.2. Thực trạng sơ chế bảo, bảo quản thanh long sau thu hoạch	40
4.2. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm (Nấm men đối kháng và màng bao ăn được) dùng trong bảo quản thanh long	42
4.2.1. Xác định các chủng nấm mốc gây thối hỏng thanh long điển hình.....	44
4.2.2. Phân lập, tuyển chọn các chủng nấm men <i>Candida.spp</i> đối kháng	44
4.2.3. Nghiên cứu lựa chọn màng bao ăn được để bảo quản thanh long.....	52
4.3. Nghiên cứu tạo chế phẩm tạo màng chitosan kết hợp với nấm men đối kháng.	54
4.4. Kết quả nghiên cứu công nghệ nhân nuôi chủng nấm men <i>Candida sake</i> TL01	59
4.4.1. Nghiên cứu công nghệ nhân nuôi ở quy mô phòng thí nghiệm.....	59
4.4.2. Nghiên cứu công nghệ nhân nuôi ở quy mô Pilot 100lit/mẻ	62
4.4.3. Quy trình công nghệ nhân nuôi và tạo chế phẩm tạo màng chitosan kết hợp với nấm men đối kháng <i>Candida sake</i> TL01	66
4.4.4.Thuyết minh quy trình	67
4.5. Nghiên cứu tính ổn định và an toàn sinh học của chế phẩm <i>Candida sake</i> TL01.....	67
4.6. Xây dựng quy trình bảo quản thanh long thương phẩm bằng chế phẩm TL01	70
4.6.1. Nghiên cứu xử lý quả thanh long trước bảo quản.....	69
4.6.2. Thử nghiệm bảo quản quả thanh long thương phẩm bằng chế phẩm TL01.....	70
4.6.3. Quy trình bảo quản thanh long bằng chế phẩm tạo màng TL01	81
4.7. Xây dựng mô hình bảo quản thanh long bình thuận	83

4.7.1. Quy mô xây dựng mô hình bảo quản.....	83
4.7.2. Đánh giá hiệu quả kỹ thuật của mô hình.....	83
4.7.3. Đánh giá hiệu quả kinh tế của mô hình.....	86
PHẦN V. KẾT LUẬN	87
PHẦN VI- TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	89

PHẦN I - MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Thanh long là một trong những trái cây nhiệt đới được đánh giá cao, một loại thức ăn tráng miệng hấp dẫn và đẹp mắt. Nó không chỉ đem lại cho chúng ta sự ngon miệng, nó còn có nhiều tác dụng khác rất tốt cho sức khỏe. Nó cung cấp cho cơ thể chúng ta rất nhiều vitamin, khoáng chất cần thiết, ngoài ra còn giúp tăng cường sức đề kháng, chống lại một số bệnh. Việc phát triển cây thanh long là nhiệm vụ quan trọng của ngành nông nghiệp, nó có những đóng góp không nhỏ cho sự tăng trưởng của nền kinh tế đất nước, phục vụ tiêu dùng nội địa và xuất khẩu.

Ở Việt Nam hướng nghiên cứu về bảo quản thanh long chủ yếu tập trung vào bảo quản nhiệt và hoá chất. Trong khi đó, vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm và ô nhiễm môi trường đang trở thành mối quan tâm lớn do việc sử dụng quá mức các hoá chất không rõ nguồn gốc trong bảo quản thanh long. Vì vậy, việc nghiên cứu và ứng dụng các chế phẩm sinh học an toàn trong bảo quản thanh long là rất cần thiết.

Việc sử dụng chế phẩm tạo màng sinh học kết hợp với nấm men *Candida sake* đối kháng trong bảo quản rau quả đã được Bộ nông nghiệp Mỹ, cộng đồng Châu Âu và các nước như Nhật, Canada ... nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi

Trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ Nông nghiệp và PTNT “Nghiên cứu sản xuất một số chế phẩm sinh học, hóa học sử dụng trong bảo quản rau, quả, hoa tươi” Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch cũng đã nghiên cứu sản xuất chế phẩm nấm men đối kháng dùng để bảo quản một số rau, hoa quả. Chế phẩm này đã được thử nghiệm với thanh long của tỉnh Bình Thuận ở quy mô nhỏ và đã được chứng minh có khả năng kéo dài thời gian bảo quản, tăng chất lượng cảm quan. Tuy nhiên, để áp dụng chế phẩm này cho thanh long ở quy mô sản xuất lớn, cần tiếp tục nghiên cứu và hoàn thiện về chủng giống, công nghệ sản xuất, kỹ thuật tạo màng.... để đưa ra một quy trình bảo quản thanh long có hiệu quả, an toàn cho người sản xuất. Vì vậy, trong khuôn khổ Dự án Khoa học công nghệ nông nghiệp vốn vay ADB chúng tôi tiến hành đề tài “*Nghiên cứu ứng dụng một số chế phẩm sinh học nhằm nâng cao chất lượng và kéo dài thời gian bảo quản thanh long*”

2. Mục tiêu của đề tài

Mục tiêu chung

Xây dựng được quy trình sản xuất và ứng dụng một số chế phẩm sinh học có hiệu quả cao và an toàn để nâng cao chất lượng, kéo dài thời gian bảo quản quả thanh long phục vụ nội tiêu và đẩy mạnh xuất khẩu.

Mục tiêu cụ thể

1/ Thiết lập được quy trình ứng dụng chế phẩm nấm men đối kháng *Candida.spp* kết hợp với màng bao ăn được bảo quản thanh long. Khi áp dụng quy trình thời gian bảo quản đạt 37-42 ngày ở điều kiện lạnh 5-10⁰C theo khuyến cáo của “VietGap thanh long”, giảm tổn thất sau thu hoạch xuống dưới 10%, đạt tiêu chuẩn xuất khẩu.

2/ Xây dựng mô hình ứng dụng chế phẩm nấm men đối kháng *Candida.spp* kết hợp với màng bao ăn được bảo quản thanh long.

3. Cách tiếp cận

Sản xuất và tiêu thụ thanh long ở nước ta hiện nay chủ yếu dựa vào sử dụng các hóa chất độc hại để sơ chế và bảo quản, đặc biệt là ở những vùng sản xuất thanh long chuyên canh, quy mô lớn như ở Bình Thuận. Làm thế nào để giảm thiểu lượng hóa chất bảo quản đang sử dụng mà vẫn đảm bảo hình thức, chất lượng quả cho tiêu thụ nội địa và xuất khẩu là vấn đề mà đề tài cần giải quyết.

Để làm được điều đó, cách tiếp cận của đề tài là:

1. Trên cơ sở tiếp cận với các tài liệu, thông tin, các công trình nghiên cứu, các bài báo đã được công bố trên các tạp trí trong và ngoài nước và trên mạng internet về nghiên cứu công nghệ sản xuất các chế phẩm sinh học không độc hại làm cơ sở lý luận cho các phương pháp nghiên cứu của đề tài.

2. Phối hợp với Sở Nông nghiệp và PTNT tỉnh Bình Thuận, Trung tâm Nghiên cứu phát triển cây thanh long Bình Thuận và Trung tâm Khuyến nông tiếp cận trực tiếp với các hộ sản xuất, các doanh nghiệp trồng, bảo quản và xuất khẩu thanh long ở Bình Thuận để điều tra thực trạng sản xuất trước thu hoạch và thực trạng xử lý, bảo quản quả sau thu hoạch. Với cách tiếp cận như vậy đề tài sẽ có được cơ sở lý luận khoa học, kiến thức thực tế để từ đó có thể xây dựng được quy trình sản xuất, ứng dụng các chế phẩm sinh học an toàn phù hợp hơn với điều kiện Việt Nam

3. Đề tài có giải pháp tổng thể, định hướng phát triển công nghệ bảo quản quả thanh long có tính đến tác động của nhiều khâu: từ khâu sơ chế, xử lý vệ sinh quả trước bảo quản đến sử dụng chế phẩm sinh học kéo dài thời gian bảo quản thanh long mà vẫn đảm bảo chất lượng để xuất khẩu sang một số thị trường xa và khó tính như Mỹ, Châu Âu... Tính tổng thể của công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học bảo quản thanh long biểu hiện ở chỗ sẽ thực hiện cả 2 công đoạn: 1) tạo ra được quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học bảo quản ở quy mô lớn; 2) Triển khai ứng dụng ngay chế phẩm vào thực tế sản xuất.

4. Kế thừa những kết quả nghiên cứu và ứng dụng trước đây trong nước và ngay trong Viện về công nghệ và kinh nghiệm trong cùng lĩnh vực theo hướng dễ sử dụng và chuyển giao vào thực tế sản xuất.

5. Viện Cơ điện Nông nghiệp và CNSTH có phòng thí nghiệm đầy đủ thiết bị phục vụ nghiên cứu sinh học, có hệ thống thiết bị nhà xưởng phục vụ cho sản xuất các thiết bị cơ giới hóa phục vụ đề tài. Đặc biệt Viện có hệ thống lên men chìm sục khí quy mô 100lít và 1.000lít/m³ hiện đại để sản xuất các chế phẩm sinh học ở quy mô pilot. Bên cạnh đó, đề tài hợp tác với một số đơn vị, cá nhân có chuyên môn sâu liên quan để sử dụng các phương tiện nghiên cứu và triển khai các nội dung của đề tài. Cơ quan, doanh nghiệp phối hợp chủ yếu để cùng triển khai ứng dụng.

6. Đề tài sẽ lấy ý kiến chuyên gia, tổ chức hội thảo, viết báo cáo chuyên đề

7. Trên cơ sở những kết quả đạt được, đề tài sẽ xây dựng mô hình trình diễn, tập huấn chuyển giao quy trình công nghệ.

8. Sử dụng phương pháp tiếp cận cùng tham gia, trong đó người dân, cán bộ, doanh nghiệp sẽ cùng tham gia trong quá trình điều tra, nghiên cứu, xây dựng mô hình.

9. Tổ chức tập huấn theo phương pháp lớp học đồng ruộng, lấy các mô hình thực tế trong đề tài làm hiện trường để tập huấn.

PHẦN II- TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu chung về thanh long

2.1.1. Cây thanh long

Cây thanh long thuộc họ xương rồng (*Cactaceae*), chi *hylocereus* có nguồn gốc ở vùng sa mạc Mehico, Trung và nam Mỹ (Benzing, 1990) và (Hanber, 1983) và được trồng ở Việt Nam cách đây khoảng 100 năm (Mizrahi, Nerd và Nobel, 1997) ban đầu nó được dùng với mục đích làm cảnh. Từ những năm 1990 thanh long được trồng rất phổ biến ở Việt Nam, Đài Loan, phía nam Trung Quốc, Israel gần đây được trồng ở Thái Lan, Úc, Mỹ và Malaysia [26].

2.1.2. Đặc điểm và giá trị của quả thanh long

2.1.2.1. Đặc điểm của quả thanh long

Thanh long trồng chủ yếu ở nước ta là giống thanh long ruột trắng, vỏ đỏ (thanh long Bình Thuận hay thanh long Chợ Gạo *Hylocereus undatus*). Quả có màu đỏ nhạt đến đỏ đậm, ngoài vỏ có lớp sáp khá bóng, trên vỏ có tai (lá bắc của hoa). Thịt quả màu trắng trong có nhiều hạt nhỏ màu đen, mềm.

Cường độ hô hấp của thanh long thấp (70-100mg CO₂/Kg/giờ) khi chín. Cường độ hô hấp của thanh long cao khi quả còn xanh và giảm dần khi chín. Ngoài ra thanh long là loại quả không có đỉnh hô hấp khi chín nên phải thu hoạch đúng lúc quả chín thì chất lượng sẽ tốt hơn.

Sự phát triển của quả được tính từ ngày sau khi nở hoa đến khi màu đỏ đầu tiên bắt đầu xuất hiện, Sự thay đổi màu của vỏ quả bắt đầu từ ngày thứ 24-25 ngày sau khi nở hoa đối với *Hylocereus undatus*, ngày thứ 26-27 đối với *Hylocereus Polyrhizus*. Sau đó khoảng 4-5 ngày nữa thì quả đỏ hoàn toàn. Giai đoạn quả phát triển chậm được đặc trưng bởi giảm tỷ lệ vỏ quả đồng thời tăng tỷ lệ thịt quả, tăng nồng độ chất rắn hòa tan, đường hòa tan và giảm độ cứng, hàm lượng tinh bột và chất keo [30].

2.1.2.2. Thu hoạch thanh long

Từ những biến đổi về sinh lý sinh hóa trong quá trình chín, quả thanh long nên thu hoạch trong thời gian 28-31 ngày sau khi nở hoa để quả có chất lượng ngon nhất và bảo quản được lâu hơn.

Nên thu hoạch vào lúc sáng sớm hoặc chiều mát tránh ánh nắng gay gắt chiếu trực tiếp vào quả làm tăng nhiệt độ phía bên trong quả, tránh mất nước nhanh ảnh hưởng đến chất lượng quả và thời gian bảo quản.

Sau khi thu hái nên để quả thanh long trong râm mát, vận chuyển ngay về phòng đóng gói càng sớm càng tốt. Dụng cụ thu hái sắc bén, khi hái xong phải bỏ ngay vào rổ chứa, không để quả xuống đất khi thu hái tránh nhiễm nấm bệnh.

Khi vận chuyển không xếp đầy giỏ, kê lót cẩn thận tránh va đập và ánh nắng trực tiếp chiếu vào quả [13].

2.1.2.3. Giá trị dinh dưỡng của quả thanh long

Thanh long vỏ đỏ ruột trắng, vỏ quả có màu đỏ hấp dẫn, thịt quả có nhiều Vitamin C và nguyên tố khoáng như sắt, phospho, kali... Có chứa phytoalbumin mà giá trị cao là tính chất chống oxi hóa. Hàm lượng đường của thanh long thì thấp hơn các loại quả nhiệt đới khác và như vậy lại rất phù hợp với những người bị bệnh tiểu đường và huyết áp cao. Ngoài ra, quả thanh long còn có hàm lượng sorbitol cao, năng lượng thấp hơn các loại quả khác vì vậy rất tốt cho người lớn tuổi [26].

Phần thịt quả chiếm 70%, hạt 4%, vỏ chiếm 26% trọng lượng quả tươi.

Bảng 2.1: Thành phần dinh dưỡng của quả thanh long trên 100gr thịt quả

Thành phần	gr/100gr thịt quả	Thành phần	mg/100gr thịt quả
Nước	85,3	Vitamin C	3
Protit	1,1	Niacin	2,8
Glucose	0,57	Vitamin A	0,0111
Fructose	3,2	Calcium	10,2
Sorbitol	32,7	Sắt	6,07
Carbohydrat	11,2	Magie	38,9
Chất xơ	1,34	Phospho	27,5
Tro	0,56	Kali	27,2
Năng lượng (Kcal)	67,7	Natri	2,9

Nguồn: Sở khoa học công nghệ & môi trường tỉnh Bình Thuận

2.1.2.4. Một số nấm bệnh thường gặp ảnh hưởng đến chất lượng quả thanh long sau thu hoạch [13]

Sau khi thu hoạch thanh long các loại nấm sau thường xuất hiện: *Aspergillus avenaceus*, *A. awamori*, *A. clavalus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium semitectum*, *F. lateritium*, *Penicillium charlesi*.

*) Biện pháp phòng trừ:

Nhúng trái trong dung dịch benomyl 500 phần triệu (ppm) trong 1 phút. Cách pha: lấy 5 gram benomyl pha trong 1 lít nước, khuấy đều.

Sử dụng các chất kích thích để giữ trái tươi lâu hơn như phun GA3 (axit giberrellic) với liều lượng 30-50 ppm hoặc nhúng trong dung dịch KMnO₄ nồng độ 0,2%.

2.1.3. Tình hình sản xuất và tiêu thụ thanh long ở nước ta

Thanh long là loại cây ăn quả được trồng phổ biến ở các tỉnh thuộc miền Nam nước ta. Theo báo cáo của tổng công ty rau quả thanh long nước ta bắt đầu xuất khẩu vào năm 1990 với 2 thị trường là Đài Loan và Úc. Những năm gần đây diện tích trồng thanh long đặc biệt tăng cao, kim ngạch xuất khẩu do thanh long mang lại rất lớn. Năm 2006, Bình Thuận có 7000 ha trong đó có 5000 ha cho trái, Tiền Giang có 2000 ha trong đó diện tích trồng ở Chợ Gạo chiếm 1700 ha, Long An trồng khoảng 1200 ha tuy nhiên những năm gần đây diện tích trồng thanh long ngày càng tăng cao.

Theo báo cáo thống kê của UBND tỉnh Bình Thuận diện tích trồng thanh long của tỉnh từ năm 2001-2004 được nêu trong bảng 2.2.

Bảng 2.2: Diện tích, sản lượng thanh long Bình Thuận (2001-2004)

Năm	Diện tích (ha)	Sản lượng (Tấn)	Xuất khẩu (Tấn)	lượng xuất khẩu / Sản lượng thanh long toàn tỉnh (%)
2001	4 485	57 744	3 494	6,05
2002	4 773	65 102	7 828	12,02
2003	5 074	86 973	16 682	19,18
2004	5 021	94 760	25 000	26,38

Tính đến nay toàn tỉnh Bình Thuận đã có gần 13000 ha diện tích trồng thanh long tập trung nhiều nhất là hai huyện Hàm Thuận Nam và Hàm Thuận Bắc khoảng hơn 10 000 ha còn lại là ở các xã, thị trấn trong tỉnh. Trong năm 2009-2010 tỉnh Bình Thuận đã tiến hành kiểm tra, đánh giá và cấp giấy chứng nhận cho 3.700 ha, và 10 cơ sở thu mua, đóng gói, sơ chế thanh long theo tiêu chuẩn VietGap (tiêu chuẩn thực hành sản xuất nông nghiệp tốt ở Việt Nam).

Theo thống kê của Bộ NN&PTNT và Bộ Công thương, thanh long là trái cây chủ lực với kim ngạch xuất khẩu vào năm 2005 đạt 10,43 triệu USD, năm 2006 đạt

13,58 triệu USD, năm 2007 đạt 17,177 triệu USD, năm 2008 đạt 16,630 triệu USD, năm 2009 đạt 15,286 triệu USD. Thị trường quan trọng đối với việc xuất khẩu thanh long là các nước Đông Nam Á và Trung Quốc, chiếm hơn 90% sản lượng. Tuy nhiên sản lượng thanh long xuất khẩu vẫn còn rất nhỏ so với tổng sản lượng thu hoạch thanh long của cả nước [38].

Trong quá trình sơ chế, bảo quản và tiêu thụ thanh long còn nhiều vấn đề hạn chế như: Thanh long xuất khẩu thường được vận chuyển đường bộ và bằng đường biển. Khi đến nơi quả thường bị hư hỏng do nấm bệnh gây thối cuống, héo quả do bị mất nước, tai quả chuyển màu vàng.... làm mất giá trị thương phẩm và cảm quan. Vì vậy, thanh long Bình Thuận cần có công nghệ bảo quản thích hợp để đủ thời gian đáp ứng cho vận chuyển bằng đường thủy và xử lý kiểm dịch thực vật (đặc biệt bằng công nghệ chiếu xạ). Có như vậy mới có thể mở rộng thị trường tiêu thụ sang các nước ngoài khu vực Châu Á mà chi phí vận chuyển không quá cao như phải vận chuyển bằng đường hàng không hiện nay.

2.1.4. Sự biến đổi của quả thanh long sau thu hoạch

2.1.4.1. Biến đổi vật lý

Rau quả tươi sau khi thu hái để trong môi trường bảo quản có thể xảy ra một số biến đổi vật lý dẫn đến làm giảm chất lượng cũng như khối lượng của rau quả như: sự bay hơi nước, giảm khối lượng tự nhiên, sự sinh nhiệt v.v...

a) Sự bay hơi nước

Sự bay hơi nước là hiện tượng mất nước tự do từ quả ra môi trường xung quanh. Sự mất nước của quả dẫn đến hiện tượng khô héo, giảm trọng lượng quả, gây rối loạn sinh lý, giảm khả năng kháng khuẩn ... làm quả nhanh chóng bị hư hỏng. Thanh long là loại quả có hàm lượng nước cao (85,3%) nên hiện tượng mất nước càng dễ xảy ra nếu không có chế độ bảo quản phù hợp. Sự bay hơi nước xảy ra nhanh sau thu hái, sau đó giảm dần, rồi lại tăng nhanh khi quả hỏng. Sự bay hơi nước phụ thuộc vào cấu trúc của vỏ quả và bề mặt tiếp xúc với không khí, đặc biệt là sự chênh lệch giữa nhiệt độ, độ ẩm và tốc độ chuyển động của không khí trong môi trường bảo quản. Thực tế, muốn giảm sự mất nước của rau quả ta phải giảm nhiệt độ, tăng độ ẩm và giảm tốc độ của không khí trong kho bảo quản. Theo Nerd và cộng sự thanh long bảo quản ở 20⁰C giữ được giá trị thương phẩm trong vòng 1 tuần, 14⁰C giữ được 2 tuần, 6⁰C giữ được 3 tuần [30].

b) Sự giảm khối lượng tự nhiên

Sự giảm khối lượng của quả thực chất là sự giảm khối lượng do bay hơi nước tự do của quả và do hao hụt các chất hữu cơ xảy ra trong quá trình hô hấp. Khối lượng rau quả giảm phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giống, khí hậu, kỹ thuật canh tác, công nghệ bảo quản, thời điểm thu hoạch. Trong bất cứ điều kiện bảo quản nào cũng không tránh khỏi sự giảm khối lượng, tuy nhiên khi tạo điều kiện bảo quản tối ưu thì có thể hạn chế tới mức tối thiểu sự giảm khối lượng. Theo Nerd và cộng sự, 1999 bảo quản thanh long 1 tuần ở 6⁰C giảm 1,8%, ở 14⁰C giảm 2,7% và ở 20⁰C giảm 4,2% trọng lượng [30].

c) Sự sinh nhiệt

Lượng nhiệt sinh ra trong quá trình bảo quản quả là do sự hô hấp. Nhiệt độ càng tăng càng kích thích quá trình hô hấp của quả càng mạnh. Khi nhiệt độ và độ ẩm tăng phù hợp với sự phát triển của vi sinh vật thì nhiệt độ môi trường càng tăng hơn nữa (do quả hô hấp và vi sinh vật phát triển) khi đó quả càng nhanh hỏng. Hai phần ba lượng nhiệt sinh ra sẽ tỏa ra môi trường xung quanh, một phần ba sẽ được dùng vào quá trình trao đổi chất bên trong tế bào, quá trình bay hơi và một phần ở dạng liên kết cao năng adenosin triphosphat (ATP) [15].



Do đó, trong quá trình bảo quản cần phải duy trì các thông số nhiệt độ, độ ẩm tối ưu trong kho bảo quản.

2.1.4.2. Biến đổi sinh lý - sinh hóa

a) Sự hô hấp

Sau khi thu hoạch quả không còn nhận chất dinh dưỡng trên cây mẹ nữa mà phải tự tiêu hao các chất dinh dưỡng dự trữ được để thực hiện quá trình hô hấp và kiến tạo năng lượng. Thực chất quá trình hô hấp là quá trình oxy hóa chậm các chất hữu cơ phức tạp dưới tác dụng của các enzym có trong nội tại quả thành các chất đơn giản hơn và giải phóng năng lượng. Mức độ hô hấp được đánh giá qua cường độ hô hấp. Cường độ hô hấp càng cao thì thời gian tàng trữ càng ngắn. Thanh long là loại quả không đỉnh hô hấp khi chín và cường độ hô hấp thấp (70-100 mg CO₂/kg/giờ). Với đặc điểm về cường độ hô hấp như vậy thì trong điều kiện bảo quản thích hợp về nhiệt độ, độ ẩm, và phòng trừ nấm bệnh sau thu hoạch tốt thanh long có thể bảo quản được 40 ngày.

b) Sự sản sinh ethylene

Ethylene có tác dụng như một hormon thực vật, làm tăng hô hấp, thúc đẩy quá trình chín của quả. Quả có đỉnh hô hấp sinh khí ethylene nhiều hơn quả không có đỉnh hô hấp. Trong quá trình chín của quả khí ethylene sinh ra lại có tác dụng kích thích làm tăng quá trình chín của quả dẫn đến làm nhanh hư hỏng rau quả. Vì vậy để làm chậm quá trình chín của quả, kéo dài thời gian bảo quản người ta tìm cách hạn chế ethylene sinh ra.

Quả thanh long sản sinh ethylene rất thấp 0,025-0,091 $\mu\text{l/kg/h}$ ở 20°C (Nerd và cộng sự, 1999) [30].

c) Sự biến đổi về màu sắc

Sự thay đổi về màu sắc là sự phát triển tự nhiên của các sản phẩm nông nghiệp và một phần của sự chín già của quả (Funamoto, 2002). Sự xuất hiện của các sắc tố carotenoid (đỏ) và anthocyanins (tím) làm mất dần màu xanh của diệp lục tố.

Từ ngày thứ 24-25 sau khi nở hoa đối với *Hylocereus undatus*, ngày thứ 26-27 đối với *Hylocereus Polyrhizus* xuất hiện màu đỏ đầu tiên trên vỏ quả. Sau đó khoảng 4-5 ngày nữa thì quả đỏ hoàn toàn. Trong thời gian bảo quản thanh long cần giữ màu đỏ này, đảm bảo giá trị thương mại của quả. Ở điều kiện bảo quản không tốt (nhiệt độ cao) làm mất dần màu đỏ xuất hiện các đốm nâu trên vỏ quả [30].

d) Sự biến đổi về thành phần hóa học

Trong thời gian bảo quản, hầu hết các thành phần hóa học của quả đều bị biến đổi do tham gia vào quá trình hô hấp và do hoạt động của enzym có trong nội tại quả.

****) Đường hòa tan***

Đường hòa tan là thành phần chủ yếu tham gia vào quá trình hô hấp nên hàm lượng giảm đáng kể. Theo Nerd và cộng sự, 1999, hàm lượng đường hòa tan thay đổi theo nhiệt độ và thời gian bảo quản: bảo quản ở nhiệt độ 6°C sau 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần bảo quản hàm lượng đường hòa tan thay đổi không nhiều 6,6-6,7%, nhưng ở nhiệt độ bảo quản 14°C sau 1 tuần bảo quản hàm lượng đường hòa tan giảm xuống còn 6,0%, sau 2 tuần bảo quản còn 5,4% [30].

****) Độ axit***

Trong quá trình bảo quản axit hữu cơ cũng bị giảm xuống, và thường tồn tại nhiều hơn đường do chúng cũng tham gia vào quá trình hô hấp, tạo este.

Quả thanh long sau khi thu hoạch đúng độ chín độ axit đạt 93 mmol H⁺/kg quả, bảo quản sau 1 tuần ở 6°C độ axit giảm xuống còn 62 mmol H⁺/kg, 14°C là 37 mmol

H^+/kg , $20^{\circ}C$ là $16 \text{ mmol } H^+/kg$. Như vậy nhiệt độ bảo quản càng cao độ axit thay đổi càng lớn [30].

**) Mùi vị*

Mùi vị của quả trong quá trình bảo quản cũng có sự thay đổi do có sự biến đổi về hàm lượng axit có trong quả. Theo Nerd và cộng sự, 1999 bảo quản thanh long ở nhiệt độ cao không những làm giảm độ cứng, hàm lượng nước, độ axit mà còn làm giảm cả hương vị của quả :

- Sau 1 tuần bảo quản ngưỡng cảm nhận về mùi vị ở $6^{\circ}C$ là 5,2 ; ở $14^{\circ}C$ là 5,9 ; ở $20^{\circ}C$ là 2,6 ;

- Sau 2 tuần bảo quản ngưỡng cảm nhận về mùi vị ở $6^{\circ}C$ là 5,9 ; ở $14^{\circ}C$ là 2,8 [30]

2.1.5. Một số phương pháp bảo quản quả thanh long

2.1.5.1. Xử lý nhiệt trước khi bảo quản

Xử lý quả bằng hơi nước nóng được ứng dụng đầu tiên ở Floridanawm 1992 để trừ ruồi Địa Trung Hải trên quả cam [29].

Xử lý nhiệt trước khi bảo quản nhằm loại bỏ các mầm bệnh trên bề mặt hoặc trong một vài lớp tế bào biểu bì của rau quả thường tiến hành trong thời gian ngắn (vài phút). Nhiệt được cung cấp cho rau quả theo một vài cách: Nhúng trong nước nóng, bằng hơi nước nóng hoặc bằng không khí khô nóng. Xử lý nhiệt bằng hơi nóng chủ yếu hiệu quả trong việc diệt côn trùng nhưng khó để diệt trừ được nấm mốc; Xử lý nhiệt bằng không khí khô nóng có khả năng diệt cả côn trùng và nấm mốc nhưng có thể làm hỏng vỏ quả đối với những quả có vỏ mỏng; Xử lý nhiệt bằng nước nóng thường được sử dụng nhiều nhất vì nó là môi trường truyền nhiệt hiệu quả hơn không khí.

Xử lý nhiệt cũng được sử dụng để ức chế quá trình chín hoặc tạo ra sức đề kháng với tổn thương lạnh và tổn thương trong vỏ trong suốt thời gian bảo quản, vì thế có thể kéo dài thời gian bảo quản và thời gian tiêu thụ trên thị trường [29].

Xử lý quả thanh long trước khi bảo quản để đảm bảo an toàn sinh học của các nước nhập khẩu, và hệ thống các siêu thị. Xử lý ở mức độ thấp nhiệt độ ở tâm quả $46,5^{\circ}C$ trong thời gian 20 phút thì chất lượng quả được duy trì [33].

2.1.5.2. Bảo quản ở nhiệt độ thấp

Bảo quản ở nhiệt độ thấp là biện pháp hữu hiệu nhất trong việc hạn chế quá trình hô hấp, hạn chế sự chín của quả và ngăn cản sự phát triển của vi sinh vật, đảm

bảo kéo dài thời gian bảo quản của rau quả tươi. Đây là phương pháp bảo quản dựa theo nguyên lý tiềm sinh nghĩa là làm chậm, ức chế hoạt động sống của rau quả và vi sinh vật nhờ đó làm chậm thời gian hư hỏng thối rữa của rau quả. Như ta đã biết nhiệt độ môi trường bảo quản càng thấp thì càng có tác dụng ức chế các quá trình sinh lý sinh hóa xảy ra trong rau quả và hoạt động của vi sinh vật. Tuy nhiên, nhiệt độ môi trường bảo quản lạnh phải từ 20⁰C đến nhiệt độ gần điểm đóng băng của dịch bào để tránh hiện tượng tổn thương lạnh [15].

Quả thanh long có thể giữ được chất lượng thương mại trong khoảng 7 ngày ở 20⁰C, 14 ngày ở 14⁰C, nhưng ở nhiệt độ thấp hơn 6⁰C xuất hiện hiện tượng tổn thương lạnh với những đốm nâu trên bề mặt quả [30].

2.2. Bảo quản rau quả bằng phương pháp phủ màng

2.2.1. Khái niệm chung

Màng bán thấm là một loại màng mỏng bao quanh bề mặt thực phẩm có khả năng hạn chế sự thoát hơi nước và làm giảm sự trao đổi chất trong rau quả. Nhờ lớp màng này tạo ra sự khác biệt khí quyển giữa bên ngoài (môi trường bảo quản) với phần tiếp xúc trực tiếp của quả làm giảm lượng oxi bên trong quả và điều chỉnh quá trình trao đổi khí của quả, do đó làm chậm quá trình chín. Mặt khác màng bọc còn có chức năng bảo vệ làm giảm hư hỏng trong quá trình vận chuyển cũng như sự thâm nhập của vi sinh vật từ môi trường xung quanh [32].

Kỹ thuật tạo màng phủ là phương pháp tạo ra một dịch lỏng dạng composit, colloid hoặc nhũ tương rồi phủ lên bề mặt từng quả riêng rẽ bằng cách phun, nhúng, quét hoặc xoa. Khi dịch lỏng khô sẽ tạo ra một lớp màng mỏng gần như trong suốt trên bề mặt quả. Nhờ tính bán thấm điều chỉnh sự trao đổi khí và hơi nước của màng mà quả được giữ tươi lâu hơn. Quả sử dụng màng phủ lên bề mặt sẽ hạn chế hao hụt khối lượng tự nhiên và giảm quá trình thoát hơi nước. Do màng phủ tạo ra vùng vi khí quyển điều chỉnh xung quanh quả do đó làm thay đổi sự trao đổi khí với môi trường xung quanh. Như vậy, về bản chất kỹ thuật màng bán thấm cũng là một dạng cải tiến của phương pháp MAP.

2.2.2. Đặc tính lý hóa và vai trò của màng bao

2.2.2.1. Đặc tính lý hóa

Màng bao dùng trong bảo quản có thể được tạo ra từ một loại polyme (nhựa cây, sáp thực vật, sáp động vật, polysaccharite, protein và một số ít polyme tổng hợp)

hay hỗn hợp các polyme khác nhau và bản chất hóa học của polyme quyết định tính chất của màng bao. Chế phẩm tạo màng được làm từ các vật liệu có nguồn gốc tự nhiên, không độc hại, trong nhiều trường hợp là những chất dinh dưỡng cho sản phẩm. Khi pha chế, tùy theo loại quả mà chúng ta sẽ chọn loại nguyên liệu khác nhau để đảm bảo hiệu quả bảo quản và an toàn thực phẩm.

Mỗi một loại màng có tính chất cơ lý hóa nhất định và được đặc trưng bởi:

- Độ nhớt của dung dịch màng bao: Do sự có mặt của các chất tạo nhũ tương và các chất tăng độ dẻo.
- Sức căng của màng: Tính chất này có ảnh hưởng đến sự va chạm cơ học của quả khi vận chuyển.
- Tính thấm thấu hơi nước và khí CO₂, O₂.
- Tính kháng vi sinh vật: màng thường có các tác nhân chống vi sinh vật như chất diệt nấm, chất chống lão hóa...
- Độ bền của màng: màng thường có độ bền cao, có thể không hòa tan đối với các loại quả bỏ vỏ, và màng hòa tan với các loại quả ăn vỏ [9].

2.2.2.2. Vai trò của chất tạo màng

Thành phần của màng bao gồm các chất tạo nhũ tương như Lecithin, sáp động vật, sáp thực vật, tinh bột, whey protein, Cacboxyl Methyl Cellulo (CMC), Chitosan... các axit không độc hoặc muối của chúng.

Màng bọc sẽ phát huy được khả năng điều khiển quá trình phân hủy nếu trong quá trình tạo màng ta cho thêm vào đó các chất phụ gia như: Chất diệt nấm, chất điều hòa sinh trưởng, chất chống lão hóa, chất chống tổn thương do nhiệt, thậm chí cả các tác nhân tạo màu cho thực phẩm – một yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến giá trị cảm quan của rau quả [32].

Vai trò của màng bao:

- Làm giảm tổn thất khối lượng và giảm biến dạng quả do mất nước.
- Thay thế và tăng cường cho màng sáp tự nhiên vốn có trên mặt quả.
- Làm giảm trao đổi khí (giảm O₂, tăng CO₂) dẫn tới làm chậm quá trình hô hấp, quá trình chín hay già hoá của quả, làm tăng độ tươi của quả.
- Cải thiện hình thức của quả nhờ lớp màng bóng láng.
- Ưc chế sự phát triển của vi sinh vật trên bề mặt rau quả.
- Phòng ngừa tổn thương cơ học và nhiễm bệnh trong quá trình vận chuyển.

- Duy trì chất lượng của rau quả.

2.2.3. Một số chất tạo màng

2.2.3.1. Màng polychacaride

Màng bán thấm có thể được làm từ nhiều loại polysaccharit như tinh bột, pectin, cellulose, chitosan, alginat... Các loại màng này có khả năng ngăn cản oxy, mùi và dầu rất tốt nhưng không hiệu quả trong việc ngăn cản hơi ẩm do khả năng hút nước tự nhiên của chúng. Khả năng ngăn cản oxy là do cấu tạo chặt của chúng, sự sắp xếp các liên kết hydro trong hệ thống cấu tạo và sự hòa tan thấp. Loại màng này có thể hạn chế sự chín và tăng thời gian bảo quản của rau quả, không tạo ra điều kiện lên men [22].

Màng polysaccharit được sử dụng để làm giảm sự mất nước trong quá trình bảo quản quả. Tuy nhiên, chúng cũng là những chất ưa nước nên chúng không có chức năng ngăn cản sự mất nước. Có thể nói màng polysaccharit được quan tâm là thành phần màng bao có tiềm năng bởi tính chất tạo keo đặc biệt của nó, tính chất tạo gel đòi hỏi khả năng định hình gel bền hoặc tạo thành polyme không hòa tan dưới sự có mặt của cation kim loại đa hóa trị như Caxi.

Polysaccharit được mong đợi như một hàng rào ngăn cản oxy tốt nhất nhờ sự bao gói chặt của chúng, sự sắp xếp của mạng lưới cấu trúc liên kết hydro mặc dù chúng không có tác dụng ngăn cản sự thoát ẩm bởi tính chất hút nước của chúng [22].

Alginate là một polysaccharide có nguồn gốc từ tảo biển màu nâu làm màng bao ăn được có ưu điểm vượt trội do tính chất tạo keo đặc biệt và khả năng tạo gel mạnh hoặc polyme không hòa tan khi phản ứng với các cation kim loại đa hóa trị như caxi [34].

2.2.3.2. Màng protein

Màng bán thấm ăn được có thể được làm từ nhiều nguồn protein khác nhau. Protein để làm màng thực phẩm có thể tách chiết từ ngô (zein), lúa mì (gluten), đậu tương, collagen (gelatin), hoặc từ sữa (casein). Cũng như polysaccharit, protein không có khả năng chống mất nước cao như màng lipid, nhưng sự trao đổi khí lại rất thuận lợi cho việc làm chậm quá trình chín mà không gây ra hiện tượng hô hấp yếm khí. Màng protein giúp tăng độ láng bóng bề mặt, chống lại sự oxy hóa và sự phát triển của mùi không mong muốn. Hiện nay, màng bán thấm từ protein thuần túy không được sử dụng do khả năng chống mất nước của chúng bị hạn chế. Do vậy người ta thường dùng kết hợp các thành phần nhựa với protein hay polysaccharit [23].

2.2.3.3. Màng lipit

Một số chất béo được sử dụng hiệu quả trong việc tạo màng là sáp ong, dầu khoáng, dầu thực vật, sáp carnauba từ lá cọ ở Brazil, sáp cám gạo và có thể là sáp tổng hợp như parafin và polyethylen là những sản phẩm tinh luyện dầu mỏ, chất nhựa tự nhiên như cánh kiến, nhựa cây. Chất béo thường có khả năng hòa tan oxy có giới hạn do có sự có mặt của các lỗ cực nhỏ và khả năng hòa tan cao. Màng chất béo có ưu điểm là làm giảm mất nước tốt do tính phân cực của chúng thấp, ngoài ra màng chất béo còn làm giảm quá trình hô hấp nhờ đó kéo dài thời gian bảo quản và cải thiện chất lượng cảm quan bên ngoài cho rau quả bằng cách tạo lớp vỏ láng bóng [23].

2.2.3.4. Màng composit

Màng composit là màng được pha chế từ nhiều nguyên liệu khác nhau gồm nhựa cây, sáp thực vật, sáp động vật, polysaccharit, protein và một số polyme tổng hợp. Thực tế, đa số các chế phẩm composit gồm hai thành phần tạo màng trở lên có bổ sung thêm các chất phụ gia như chất hóa dẻo, chất hoạt động bề mặt, chất chống bọt, chất nhũ hóa để dễ pha chế và chất bảo quản để giữ chế phẩm được lâu.

Phương pháp kỹ thuật phủ màng là tạo ra một dịch lỏng dạng composit ở dạng colloid hoặc nhũ tương rồi phủ lên bề mặt từng quả riêng rẽ bằng cách phun, nhúng, xoa, lăn. Khi dịch lỏng khô đi tạo ra một lớp màng mỏng gần như trong suốt trên quả. Nhờ tính chất bán thấm điều chỉnh khí và hơi nước của màng mà quả được giữ tươi lâu hơn. Màng phủ làm giảm tổn thất khối lượng và làm chậm sự nhăn nheo của quả do hạn chế quá trình mất nước. Màng phủ có thể tạo ra vùng vi khí quyển điều chỉnh xung quanh quả do đó làm thay đổi sự trao đổi khí với không khí xung quanh.

2.2.4. Màng chitosan

1.2.4.1. Cấu trúc, tính chất của chitosan

Chitosan là polysaccharide β -1-4-glucosamin, thu được bởi quá trình deacetyl hóa chitin, là hợp chất có nguồn gốc tự nhiên, không độc, giá thành rẻ. Nhờ tính chất an toàn sinh học và kháng nấm chitosan được ứng dụng nhiều trong công nghệ thực phẩm [14].

Trong thực tế chitosan thường được chế biến ở dạng vảy mịn, trong môi trường thích hợp chitosan sẽ hòa tan tạo ra dung dịch có độ nhớt, độ dính cao có khả năng đông tụ các hạt vô cơ cũng như các thành phần hữu cơ khác. Tùy theo nhu cầu người ta có thể tạo ra các dẫn xuất khác nhau của chitosan, các dẫn xuất này có khả năng tạo

ra các màng mỏng trong suốt, bền vững có tính kháng nấm, tính bán thấm và vô hại với con người và môi trường [14].

Chitosan không tan trong nước, có độ pH>6,6 do có nhóm amino (NH₂) tự do, nhưng tan tốt trong dung dịch acid như acid formic, acid axetic... độ nhớt của dung dịch chitosan có mối quan hệ tỷ lệ thuận với khối lượng phân tử chitosan, nồng độ dung dịch và ngược lại [7].

2.2.4.2. Tác dụng kháng vi sinh vật của chitosan

Gần đây một số nghiên cứu cho rằng chitosan có 2 hoạt tính sinh học: Một là chitosan như một chất diệt khuẩn polycation, do có tính kháng nấm hoặc nó có tác dụng làm thay đổi hình thái, cấu trúc và phá hoại các tổ chức phân tử của tế bào nấm. Hai là chitosan như là một elicitor sinh học, chitosan có thể bảo vệ quả như sự tích lũy chitinase, β -1,3- glucanase và hợp chất phenol, sự hóa gỗ, sự tổng hợp phytoalexins, và ngăn chặn enzym phân cắt mô tế bào giúp cho quả có sức đề kháng tốt hơn dưới tác động của mầm bệnh [34].

Mức độ deacetyl hóa ảnh hưởng đến khả năng kháng vi sinh vật của chitosan. Mức độ deacetyl hóa càng cao thì khả năng kháng vi sinh vật của chế phẩm chitosan càng lớn [7].

2.2.4.3. Tác dụng của màng chitosan trong bảo quản rau quả tươi

Chitosan với tính chất an toàn sinh học và tính kháng nấm đã được nghiên cứu rộng rãi để ứng dụng vào nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm. Chitosan và dẫn xuất của nó có thể làm màng bán thấm trên bề mặt quả, giúp điều chỉnh không khí trong nội bộ quả, làm giảm sự thoát hơi nước và cải tiến chất lượng quả. Màng chitosan có tác dụng như một màng chắn cơ học giúp bảo vệ quả khỏi tác nhân gây bệnh [35].

2.3. Bảo quản rau quả tươi bằng vi sinh vật đối kháng

2.3.1. Vi sinh vật đối kháng

Trong tự nhiên, nhiều loài vi sinh vật có khả năng ức chế sinh trưởng và phát triển của các loài vi sinh vật khác và chúng thường được gọi là vi sinh vật đối kháng. Hiện tượng đối kháng được quan sát ở nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau bao gồm nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn... [31]

Trong quần thể vi sinh vật, mỗi loài đều phải đấu tranh sinh tồn suốt cả quá trình tiến hóa dưới các hình thức khác nhau và rất linh hoạt. Vi sinh vật có thể thay thế

các tác nhân cạnh tranh của chúng bằng cách nhân lên với số lượng lớn bằng cạnh tranh về môi trường dinh dưỡng và không gian sống, hoặc có thể hình thành các chất đặc hiệu hay không đặc hiệu trong quá trình chuyển hoá vật chất, nhằm ức chế sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật khác. Các chất không đặc hiệu có thể là các axit hữu cơ, rượu, enzym, kháng sinh hoặc các hợp chất khác [31].

2.3.2. Các nghiên cứu sử dụng vi sinh vật đối kháng trong bảo quản rau quả tươi

Bảo quản rau quả tươi bằng sử dụng các vi sinh vật đối kháng là một trong những phương pháp sinh học rất có hiệu quả, tránh được ngộ độc hoá chất và ô nhiễm môi trường. Đặc biệt ở một số loài nấm men, cạnh tranh môi trường dinh dưỡng là cơ chế được sử dụng để loại trừ các tác nhân gây bệnh do vi sinh vật mà chủ yếu là nấm mốc. Những nghiên cứu của các nhà khoa học Mỹ (Wilson và cộng sự) đã cho thấy nấm men *Candida oleophila* có tác dụng ức chế một số loài nấm mốc gây thối hỏng trên quả như *Aspergillus niger*, *A. flavus*.. *Penicillium digitatum*, *P.expansum*... Nấm *Candida oleophila* là loài nấm men thường tồn tại tự nhiên trên nhiều loại quả cam, lê, táo, đào, cà chua... có khả năng ức chế các loài nấm mốc gây thối hỏng các loại quả tươi bằng cơ chế cạnh tranh về nơi cư trú và dinh dưỡng [21].

Cơ sở của phương pháp là căn cứ vào sự cạnh tranh có trong tự nhiên của giới sinh vật, cụ thể là các vi sinh vật cùng chung sống trong cùng một môi trường, xét trên diện hẹp thì đó là các vi sinh vật sống trên bề mặt của quả. Để giảm sự thối hỏng và hạn chế các tác dụng có hại cho sức khoẻ của con người, việc sử dụng các chế phẩm vi sinh vật đối kháng có khả năng ức chế các vi khuẩn và nấm mốc gây bệnh đã được bộ nông nghiệp Mỹ, cộng đồng Châu Âu và các nước như Nhật Bản, Canada... nghiên cứu và ứng dụng.

Sự cạnh tranh về nguồn dinh dưỡng và không gian sống của vi sinh vật đối kháng và vi sinh vật gây bệnh có thể xem như là một phương thức tác động để vi sinh vật đối kháng ngăn chặn sự phá hủy của mầm bệnh đối với rau quả. Để hoàn toàn đạt được yêu cầu đối kháng thì vi sinh vật đối kháng phải thích nghi tốt với các môi trường dinh dưỡng và điều kiện sống khác nhau và phát triển với tốc độ nhanh hơn vi sinh vật gây bệnh. Nghĩa là vi sinh vật đối kháng có thể tồn tại và phát triển dưới điều kiện bất lợi với vi sinh vật gây hỏng [31].

Mức độ kiểm soát bởi vi sinh vật đối kháng phụ thuộc rất lớn vào mật độ vi sinh vật đối kháng ban đầu và khả năng chiếm chỗ của vi sinh vật đối kháng ở chỗ bị

tổn thương. Nhìn chung vi sinh vật đối kháng đạt hiệu quả kiểm soát cao sau thu hoạch khi mật độ tế bào đạt $10^7 - 10^8$ CFU/ml và tốc độ, nồng độ cao hơn nếu có thể.

Khả năng sản sinh các chất kháng sinh cũng là cơ chế quan trọng để vi sinh vật đối kháng ngăn chặn các tác nhân gây bệnh. Ví dụ, Vi khuẩn đối kháng *Bacillus subtilis* sản sinh chất kháng sinh inturin hiệu quả trong kiểm soát nấm mốc gây hỏng quả có múi, tuy nhiên những nghiên cứu về vấn đề này đang còn ít được quan tâm [30].

Sự ký sinh trực tiếp của vi sinh vật đối kháng là một nhân tố kiểm soát sự phát triển của mầm bệnh rau quả sau thu hoạch. Wisniewski và cộng sự đã quan sát thấy các tế bào *Pichia guilliermondii* có khả năng gắn và các sợi nấm *Botrytis cinerea* và *Penicillium*. Sau khi nấm men gắn vào sợi nấm, trên tế bào sợi nấm xuất hiện những vết lõm và có sự thoái hóa của thành tế bào nấm tại điểm gắn kết [31].

Ngoài ra, Vi sinh vật đối kháng còn sản sinh ra các enzym như gluconaza, chitinaza và proteinaza giúp làm giảm thành tế bào nấm bệnh. Như vậy kèm theo tác động mạnh của các chất đối kháng kết hợp với hoạt động của enzym phân hủy thành tế bào làm tăng hiệu lực kiểm soát mầm bệnh sau thu hoạch rau quả [31].

Sự đề kháng cảm ứng là phản ứng phòng thủ của rau quả sau thu hoạch. Khi vi sinh vật đối kháng được đưa vào chúng hình thành hàng rào cấu trúc trên thành tế bào chủ để chống lại tác động của nấm bệnh. Ví dụ, *Cryptococcus saitoana* sản sinh hoạt động của enzym chitinase hình thành hàng rào cấu trúc trên thành tế bào quả táo để chống lại tác động của *Penicilin expansum* [31].

Tóm lại, hiệu quả bảo quản của vi sinh vật đối kháng đối với rau quả phụ thuộc vào: Khả năng cạnh tranh về nguồn dinh và không gian sống của vi sinh vật đối kháng và vi sinh vật gây bệnh trên quả; Mật độ tế bào vi sinh vật đối kháng ban đầu và khả năng chiếm chỗ của vi sinh vật đối kháng ở chỗ bị tổn thương; Khả năng sản sinh các chất kháng sinh để ngăn chặn mầm bệnh; Sự ký sinh trực tiếp của vi sinh vật đối kháng lên thành tế bào của vi sinh vật gây bệnh; Khả năng sản sinh các enzym phân hủy thành tế bào của vi sinh vật gây bệnh; Hỗ trợ hình thành hàng rào cấu trúc trên thành quả giúp khả năng tự lành vết thương chống lại tác động của vi sinh vật gây bệnh.

2.4. Bảo quản rau quả tươi bằng phủ màng kết hợp với vi sinh vật đối kháng

Màng bao ăn được có thể được dùng để bảo quản thực phẩm khỏi bị hư hỏng bằng cách làm chậm quá trình mất nước, tạo màng chắn hơi nước, oxy và CO₂, giảm sự hô hấp, cải thiện kết cấu của quả, giúp duy trì hương thơm và ngăn cản sự phát triển của vi sinh vật [27].

Kiểm soát sinh học sau thu hoạch có thể thực hiện để hạn chế mầm bệnh cho quả bằng việc bổ sung vi sinh vật đối kháng: *Cryptococcus laurentii* được sử dụng để kiểm soát nấm mốc xám trên táo (Roberts, 1990), nấm mốc xám và mốc xanh trên lê (Zhang và cộng sự, 2003). *Candida saitoana* kiểm soát nấm mốc *Penicillium expansum* trên táo hiệu quả ở mật độ tế bào 10⁷CFU/ml (McLaughlin và cộng sự, 1990).

Màng bao ăn được và vi sinh vật đối kháng đều có tác dụng riêng rẽ trong bảo quản rau quả. Sự kết hợp của vi sinh vật đối kháng và màng bao sinh học làm tăng hiệu quả bảo quản. Nấm men đối kháng có khả năng sống sót trên màng bao sinh học trong suốt quá trình bảo quản. Đồng thời kết hợp với màng bao sinh học chống lại sự phát triển của nấm mốc gây thối, duy trì chất lượng của quả trong thời gian bảo quản. Wilson, Charles L. và cộng sự đã nghiên cứu tạo chế phẩm bảo quản quả gồm màng bao ăn được và nấm men *Candida oleophila* nhằm tạo ra chế phẩm sinh học không độc hại cho bảo quản một số loại quả tươi như lê, đào, táo... Yan Fan và cộng sự, 2009 đã nghiên cứu chế phẩm tạo màng gồm alginate và nấm men đối kháng để bảo quản quả dâu tây.

Để sự kết hợp của vi sinh vật đối kháng và màng bao sinh học có hiệu quả cần phải tối ưu hóa cả 2 vấn đề là kéo dài khả năng sống và sự phân bố của vi sinh vật đối kháng trên màng bao, giúp tăng hiệu suất bảo quản màng bao, ngăn chặn sự phát triển của nấm mốc trong suốt quá trình bảo quản. Màng bao sinh học kết hợp với vi sinh vật đối kháng giúp giảm hao hụt về trọng lượng, duy trì độ bóng, màu sắc cho quả cải thiện giá trị thương mại cho quả và kéo dài thời gian bảo quản [36].

Sự kết hợp giữa vi sinh vật đối kháng và màng bao ăn được có thể tiến hành theo phương pháp khác nhau:

Phương pháp 1: có thể tiến hành phun chế phẩm chứa vi sinh vật đối kháng lên quả trước khi thu hoạch (khoảng 10 ngày), sau khi thu hoạch xong tiếp tục tiến hành xử lý với màng bao. Mục đích của phương pháp này là tiến hành phun vi sinh vật đối kháng trước để các vết thương xảy ra trong quá trình thu hoạch, vận chuyển vi sinh vật

đôi kháng chiếm chỗ trước khi vi sinh vật gây hỏng xuất hiện. Tuy nhiên phương pháp này ít được áp dụng rộng rãi vì môi trường cho vi sinh vật đôi kháng nghèo [35].

Phương pháp thứ 2: tiến hành đồng thời nghĩa là quả sau khi thu hoạch được rửa sạch rồi tiến hành xoa, nhúng hoặc quét hỗn hợp vi sinh vật đôi kháng và dung dịch màng bao có thể bổ sung nguồn dinh dưỡng cacbon. Sau đó đem bảo quản ở điều kiện nhiệt độ, độ ẩm môi trường. Đây là phương pháp thiết thực và hữu ích, đa số các nghiên cứu về sự kết hợp giữa vi sinh vật đôi kháng và màng bao sinh học áp dụng theo phương pháp này [36].

PHẦN III - VẬT LIỆU VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Vật liệu nghiên cứu

3.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là giống thanh long vỏ đỏ ruột trắng được trồng ở Bình Thuận. Thanh long thu hái ở độ chín hoàn toàn 31-32 ngày sau khi nở hoa, đồng đều về kích thước, không dị dạng, bệnh tật, loại bỏ quả bị tổn thương do quá trình vận chuyển. Rửa sạch quả bằng nước, để khô ở nhiệt độ thường và phân lô thí nghiệm.

Các chủng nấm men *candida spp.* đối kháng được phân lập và tuyển chọn từ bộ sưu tập giống của Bộ môn Nghiên cứu Công nghệ Sinh học sau thu hoạch. Các chủng này đã được phân loại, định tên và xác định tính an toàn sinh học trên chuột bạch.

Chitosan do công ty TNHH sản xuất kinh doanh Chitosan Việt nam sản xuất có trọng lượng phân tử 100.000 dalton, độ đề axetil hóa 90%.

3.1.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Hoạt động khảo sát thực trạng sản xuất trước thu hoạch và sau thu hoạch quả thanh long Bình Thuận được tiến hành tại huyện Hàm Thuận Nam và Hàm Thuận Bắc tỉnh Bình Thuận.

Các thực nghiệm bảo quản, phân tích chất lượng, nghiên cứu sản xuất chế phẩm tạo màng và xử lý quả trước bảo quản được thực hiện tại Bộ môn Nghiên cứu Công nghệ Sinh học Sau thu hoạch thuộc Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch (Hà Nội) và một phần tại Phòng Kiểm nghiệm Dược lý thuộc Viện Kiểm nghiệm - Bộ Y Tế (Hà Nội) từ 1/2010 đến 12/2010

Các Thực nghiệm xây dựng mô hình bảo quản, lớp tập huấn và hội nghị đầu bờ được tổ chức tại huyện Hàm Thuận Nam và Hàm Thuận Bắc của tỉnh Bình Thuận từ 1/2011 đến 12/2011

Thời gian thực hiện đề tài là 26 tháng từ 1/2010 đến 2/2012.

3.1.3. Các môi trường nghiên cứu

a, Môi trường PDA (g/l)

Dịch chiết khoai tây	: 1000ml
Glucose	: 20g
Agar	: 15-20g/l

pH điều chỉnh đến 5,5 - 6. Khử trùng ở 0,8 at trong 30 phút.

b, Môi trường canh thang khoai tây PD(g/l)

Dịch chiết khoai tây : 1000ml

Glucose : 20g

pH điều chỉnh đến 5,5 - 6. Khử trùng ở 0,8 at trong 30 phút.

* Chuẩn bị nước chiết khoai tây: cân 100g khoai tây đã gọt vỏ, rửa sạch và thái nhỏ, thêm 300ml nước, hấp ở áp lực 1at trong 1 giờ sau đó bổ sung nước cho đủ 1000ml.

c, Môi trường malt- thạch

Dịch chiết malt : 1000ml

Agar : 20g

pH điều chỉnh đến 5,5-6. Khử trùng ở 1 at trong 30 phút

*** Chuẩn bị nước malt**

Nước malt là thành phần không thể thiếu khi nuôi cấy nấm men, vì vậy chuẩn bị nước malt cũng là công đoạn quan trọng.

- Nước máy có pH: 5,8
- Trộn malt với nước theo tỉ lệ 1:3
- Nâng nhiệt độ hỗn hợp lên 52°C trong 30 phút
- Nâng nhiệt độ lên 62°C trong 15 phút
- Nâng nhiệt độ lên 65°C trong 30 phút
- Nâng nhiệt độ lên 70°C trong 30 phút
- Nâng nhiệt độ lên 75°C trong 15 phút
- Lọc nước malt bằng vải dày, rửa bã malt bằng nước sôi rồi thu dịch đem trộn với nước malt.
- Đun sôi hỗn hợp trong 10 phút

Dùng chiết quang kế xác định độ Bx (khoảng 10° Bx). Điều chỉnh pH đến 5,5-6, hấp khử trùng ở 1 at trong 30 phút.

d, Môi trường nước malt:

Thành phần giống như môi trường malt thạch ở trên trừ agar. Đây là môi trường dùng để nhân nuôi nấm men.

3.1.4. Các thiết bị nghiên cứu

- Nồi hấp thanh trùng (Trung Quốc)

- Tủ sấy (Việt Nam)
- Tủ cấy vô trùng tự động Ehret (Đức)
- Tủ nuôi cấy điều chỉnh nhiệt độ Sanyo (Nhật Bản)
- Tủ lạnh (Nhật Bản)
- Cân phân tích Ohaus(Thụy Điển)
- Máy lắc ổn nhiệt (Đức)
- Kính hiển vi Olympus (Nhật Bản)
- Thiết bị đo độ oxy hòa tan (hãng Aqualytic Đức)

Các dụng cụ dùng trong phòng thí nghiệm: hộp petri, ống nghiệm, pipet, que cấy, que trang, đèn cồn, bình tam giác, ống đong, chiết quang kế, micropipet các loại từ 100 µl đến 1000µl, giấy bán thấm, giấy lọc, hộp carton,...

3.2. Nội dung nghiên cứu (theo thuyết minh đã phê duyệt)

Nội dung 1: Điều tra thực trạng sản xuất trước thu hoạch và sau thu hoạch quả thanh long Bình Thuận

Nội dung 2: Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất một số chế phẩm (nấm men đối kháng và màng bao ăn được) dùng trong bảo quản thanh long

- + Nghiên cứu hoàn thiện chủng giống
- + Nghiên cứu hoàn thiện chế phẩm vi sinh đối kháng
- + Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất nấm men đối kháng
- + Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất màng bao ăn được bảo quản thanh long
- + Nghiên cứu sản xuất chế phẩm tổng hợp (bao gồm nấm men đối kháng kết hợp với màng bao ăn được) cho bảo quản thanh long

Nội dung 3: Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm trong quản quả thanh long

Nội dung 4: Xây dựng mô hình thử nghiệm bảo quản quả thanh long

3.3. Phương pháp nghiên cứu

3.3.1. Phương pháp phân lập nấm mốc gây thối hỏng quả thanh long

Chọn những quả lành lặn, không sâu sát, không sâu bệnh. Các mẫu quả sau thu hoạch để nơi thoáng mát, không xử lý hoá chất hay chất bảo quản.

Cân 1 g mẫu vỏ quả thanh long cắt nhỏ cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất vô trùng. Lắc trong 30 phút trên máy minishaker, để lắng ở nhiệt độ phòng. Hút 30-40µl

dịch mẫu trải đều bằng que trang trên đĩa thạch chứa môi trường PDA. Nuôi cấy ở 30°C sau 3-5 ngày. Khi các khuẩn lạc xuất hiện, tách riêng từng khuẩn lạc và đưa vào các ống nghiệm chứa môi trường giữ giống đã được thanh trùng.

Định loại các loài nấm mốc gây thối hỏng quả thanh long theo các khóa phân loại sau: 1/ Barnett.H.L: Illustrated genera of imperfect fungi , Commonwealth Agricultural Bureaux 1971, 2/Raper and Fennel: 2/the genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins, Baltimore 1965, 3/ Kenneth.B.Rapper: A manual of the *Penicillia*, Baltimore, 1972

3.3.2. Phương pháp phân lập nấm men đối kháng

Cân 1g mẫu vỏ quả thanh long hoặc lê, cắt nhỏ giã nát cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất đã được thanh trùng. Lắc đều trong 30 phút trên máy minishaker, để lắng. Pha loãng dịch trên đến nồng độ 10^{-6} hút 200 μ l dịch pha loãng ở 2 nồng độ 10^{-5} , 10^{-6} ra hộp Petri có môi trường malt - thạch, trang đều sao cho các bào tử tách đều nhau. Nuôi cấy ở 30°C trong 2-3 ngày. Cấy chuyển các khuẩn lạc nấm men điển hình sang môi trường malt thạch nghiêng nuôi ở 30°C trong 2 -3 ngày và tiến hành bảo quản giữ giống.

3.3.3. Phương pháp tuyển chọn chủng nấm men đối kháng nấm mốc gây thối hỏng thanh long.

Việc xác định và tuyển chọn các chủng nấm men đã phân lập được có khả năng ức chế các nấm mốc gây thối hỏng quả được tiến hành theo phương pháp sau:

Môi trường malt thạch được phân phối ra các hộp Petri vô trùng. Lấy 1 đầu que cấy sinh khối loài nấm mốc gây thối hỏng quả thanh long từ ống thạch nghiêng giữ giống, cấy chấm điểm vào giữa hộp Petri. Sau đó lấy 1 đầu que cấy sinh khối nấm men cần thử khả năng đối kháng trong ống thạch nghiêng, cấy trùm lên trên nấm mốc vừa cấy trước đó. Các hộp thạch chứa các vi sinh vật trên được nuôi ở 30°C , theo dõi sự phát triển của các nấm mốc , nấm men được nuôi cấy từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7-8, nếu nấm mốc không mọc được ở các hộp Petri sau 3- 7 ngày thì được coi là chủng nấm men có khả năng ức chế nấm mốc gây thối hỏng quả từ mức độ yếu, trung bình và mạnh.

3.3.4. Phương pháp định loại các chủng nấm men *Candida sake* đối kháng dùng trong bảo quản thanh long

Để định loại các chủng nấm men *Candida sake* đối kháng dùng trong bảo quản thanh long chúng tôi đã tiến hành giải trình tự đoạn gen ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 và 26S rRNA của các chủng nấm men phân lập được và sử dụng phần mềm FASTA để so sánh với trình tự các đoạn gen này của chủng nấm men trong ngân hàng gen thế giới.

Thiết kế cặp mồi theo trình tự của đoạn gen ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 và 26S rRNA của chủng *Candida sake* đã công bố trong ngân hàng gen quốc tế

Cặp mồi để tách dòng đoạn gen ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 và 26S rRNA của chủng *Candida sake* có trình tự như sau:

ITSP1: TCCTGGTCATTTAGAGGAAGTAAA

ITSP2: TAGAGCTGCATTCCCAAACAAC

Phương pháp tách chiết ADN tổng số của các chủng nấm men phân lập được theo Molecular cloning của Sambrook và cs.

- Tách chiết ADN
- Định lượng ADN bằng quang phổ kế
- Điện di kiểm tra ADN hệ gen trên gel agarosa 1%
- Tiến hành phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để nhân bản đoạn gen ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 và 26S rRNA của chủng *Candida sake* phân lập được

Giải trình tự đoạn gen ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 và 26S rRNA của chủng nấm men phân lập được và Xử lý kết quả bằng phần mềm PC/GENE: Sử dụng phần mềm Fasta để so sánh trình tự gen đã tách dòng được với các trình tự đã công bố trong Ngân hàng Gen Quốc tế.

3.3.5. Nghiên cứu công nghệ sản xuất nấm men *Candida sake* quy mô phòng thí nghiệm

3.3.5.1. Lựa chọn môi trường thích hợp cho nhân nuôi *Candida sake*

Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng không nhỏ đến khả năng phát triển cũng như khả năng tạo sinh khối của nấm men. Vì vậy, lựa chọn một môi trường thích hợp cho

nhân nuôi *C. sake* là một trong những công việc quan trọng trong nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm nấm men đối kháng. Chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy nấm men đối kháng trên 3 môi trường khác nhau: môi trường nước chiết malt, môi trường rỉ đường và môi trường rỉ đường có bổ sung các muối khoáng vi lượng.

3.3.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Để xác định nhiệt độ tốt nhất cho hiệu quả tạo sinh khối nấm men, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng *C. sake* TL1 trên môi trường nước chiết malt ở các khoảng nhiệt độ 24⁰C, 26⁰C, 28⁰C, 30⁰C và 32⁰C, 34⁰C sau đó đánh giá khả năng tạo sinh khối của nấm men bằng phương pháp pha loãng.

3.3.5.3. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy

Để xác định ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng phát triển của chủng nấm men TL₁, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng TL₁ trên môi trường malt, ở nhiệt độ 28⁰C và xác định mật độ tế bào ở các thời điểm nuôi cấy khác nhau: 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h và 96h.

3.3.5.4. Ảnh hưởng pH môi trường

pH của môi trường có ý nghĩa quyết định đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật nói chung và nấm men nói riêng. Các ion H⁺ và OH⁻ là hai ion hoạt động lớn nhất trong tất cả các ion. Những biến đổi dù rất nhỏ trong nồng độ của chúng cũng có ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự phát triển của nấm men. Do vậy việc xác định pH thích hợp ban đầu và việc duy trì pH cần thiết trong thời gian sinh trưởng của tế bào là rất cần thiết. Để xác định ảnh hưởng của pH môi trường đến quá trình nhân nuôi tạo sinh khối của chủng *Candida sake* TL1, chúng tôi đã nuôi cấy nấm men ở 28⁰C, trên môi trường nước chiết malt có pH từ 5-7,5 (bước nhảy 0,5).

3.3.6. Phương pháp nuôi cấy chìm sục khí chủng nấm men *Candida sake* TL1 quy mô 100 lít/mẻ

- Chủng *Candida sake* TL1 được nhân giống ở ống thạch nghiêng trên môi trường malt thạch. Cấy truyền chủng sang bình tam giác có chứa 200ml môi trường malt lỏng để nhân giống cấp 1. Chủng sau khi cấy truyền được nuôi cấy lắc ở máy lắc tốc độ 200v/ph trong khoảng 48h. Giống cấp 1 được cấy truyền sang tank nuôi cấy chìm sục khí qui mô 150l, có 100l môi trường rỉ đường và khoáng vi lượng lỏng. Nuôi cấy ở

nhệt độ 28⁰C trong thời gian 72 giờ. Tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sản lượng sinh khối của chủng *Candida sake* TL1: tỷ lệ tiếp giống, tốc độ khuấy, nồng độ oxy hòa tan.

3.3.7. Phương pháp thử khả năng đối kháng nấm mốc của nấm men *Candida* trên quả thanh long

Các chủng nấm men được tuyển chọn sơ bộ theo phương pháp 3.3.3 được kiểm tra khả năng đối kháng nấm mốc ngay trên quả theo phương pháp của Willson và cộng sự [37]:

Quả sau khi phân loại, được rửa sạch bằng nước máy. Rửa lại bằng nước cất, để khô tự nhiên. Trong quá trình rửa và lau tránh sây sát hoặc làm tổn thương quả. Sau đó, trên mỗi quả tạo 4 vết thương bằng dụng cụ đục lỗ vô trùng đường kính 5mm, sâu 2-3mm sao cho không chạm đến thịt quả. Quả ở lô thí nghiệm nhiễm 20 μ l nấm mốc gây thối hỏng ở mật độ 1.10⁴ CFU/ml. Sau 2 giờ ở nhiệt độ phòng, nhiễm tiếp 50 μ l nấm men đối kháng mật độ 1.10⁷ CFU/ml vào lỗ ở phía trên. Quả ở lô đối chứng được xử lý tương tự như ở lô thí nghiệm nhưng không nhiễm nấm men đối kháng mà thay bằng 50 μ l nước cất tiệt trùng. Quả được xếp vào các khay nhựa, sau 7 ngày ở nhiệt độ 25⁰C, kiểm tra và tính tỉ lệ các lỗ bị thối trên tổng số các lỗ.

3.3.8. Phương pháp tạo màng bao ăn được

Phương pháp tạo màng bao CT27, CT27_1 và CT27_2:

Trên cơ sở đề tài trọng điểm cấp Bộ nông nghiệp và PTNT giai đoạn 2006-2008. Nguyễn Thùy Châu và các cộng sự đã tìm ra công thức màng bao ăn được CT27 với các thành phần như: CMC, Whey protein, Glycerol, Axit lactic, dầu ăn, Nước ion hóa, Lòng trắng trứng...Phương thức sản xuất chế phẩm màng bao ăn được CT27: Cho CMC vào nước hòa tan đều vào nước ở nhiệt độ 45 ⁰C, bổ sung sữa đánh tan trong dung dịch trên. Nâng nhiệt lên 50-60⁰C, sau đó cho lòng trắng trứng hoặc protein đậu tương hòa tan tránh kết tủa ở 80⁰C sau đó nâng nhiệt lên 85⁰C lắng 30 phút, để ở nhiệt độ phòng 15-20 phút, bổ sung lipid và glycerol lắng 30 phút.

Chúng tôi đã nghiên cứu và cải tiến công thức CT27 trên bằng cách cho thêm vào các thành phần như: KMnO₄, sáp ong... Phương thức sản xuất chế phẩm màng bao ăn được CT27 cải tiến: Cho CMC vào nước và đun nóng đến 45⁰C đánh cho CMC tan hoàn toàn tạo hỗn hợp rồi để nguội. Glycerol, dầu, sáp ong cho vào cốc thủy tinh

và đun cách thủy cho đến khi sáp ong tan hoàn toàn. Bổ sung sữa tách bơ vào hỗn hợp CMC và nước ở trên khuấy đều rồi cho lòng trắng trứng gà vào đánh nhanh tay (để tránh hiện tượng kết tủa), lắc đều hỗn hợp trong vòng 30 phút, rồi bổ sung hỗn hợp sáp ong tan chảy vào và tiếp tục lắc đều trong vòng 30 phút. Sau đó bổ sung thêm axit lactic vào và lắc đều trong vòng 5 phút, để hỗn hợp trên ở bình ổn nhiệt 85°C trong vòng 15 – 20 phút, để nguội và bổ sung thêm KMnO_4 . Màng bao tạo được là hỗn hợp dịch lỏng có màu trắng ngà, và có mùi thơm đặc trưng của sữa

Thành phần màng CMC –sáp ong (màng CT27) gồm:

CMC 5g, Whey protein 3g, glycerol 15g, acid lactic 5g, dầu ăn 4g, lòng trắng trứng gà 19g, sáp ong 4g, nước trao đổi ion 550 ml.

Thành phần màng CMC –sáp carnauba (Màng CT27_1) gồm:

CMC 5g, Whey protein 3g, glycerol 15g, acid lactic 5g, dầu ăn 4g, lòng trắng trứng gà 19g, sáp carnauba 4g, nước trao đổi ion 550 ml. Sáp carnauba thay cho sáp ong trong công thức CT 27 của đề tài trọng điểm cấp Bộ nông nghiệp và PTNT trước đây.

Sáp carnauba đã được nhũ tương hóa do Trung tâm Nghiên cứu và Kiểm tra Chất lượng Nông sản Thực phẩm – Viện Cơ điện NN và Công nghệ sau thu hoạch cung cấp

Thành phần màng HPCMC (Màng CT27_2) gồm:

HPCMC 5g, Whey protein 3g, glycerol 15g, acid lactic 5g, dầu ăn 4g, lòng trắng trứng gà 19g, sáp ong 4g

Pha chế dung dịch tạo màng chitosan:

Pha chế 100ml dung dịch axit acetic 1%, sau đó cho 5g chitosan vào bát cánh khuấy với tốc độ 200 vòng/phút trong 10 giờ. Dung dịch chitosan thô được lọc qua màng lọc, sau đó bổ sung nước cất đến 100ml.

Pha chế dung dịch tạo màng chitosan + CaCl_2 :

Bổ sung 5g CaCl_2 , vào dung dịch chitosan 0,5%, khuấy với tốc độ 150-250 vòng/phút trong 2h. Ta thu được dung dịch chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl_2 .

3.3.9. Phương pháp bố trí thí nghiệm kiểm tra hiệu quả của các công thức màng bao

Quả thanh long Bình Thuận sau 2 ngày vận chuyển, được đưa đến nơi tiến hành thí nghiệm và không xử lý bằng bất kỳ các hoá chất bảo quản nào khác.

Thanh long được chia làm 6 lô thí nghiệm bảo nhiệt độ lạnh 8°C . Sử dụng 50 quả thanh long cho mỗi lô thí nghiệm. Tiến hành thí nghiệm trên 4 loại màng:

- + Màng bao ăn được CT27
- + Màng bao ăn được CT27_1
- + Màng bao ăn được CT27_2
- + Màng chitosan 0,5%
- + Lô đối chứng : Không bảo quản bằng chế phẩm.

Tiến hành theo dõi các chỉ tiêu: độ hao hụt khối lượng, tỷ lệ thối hỏng, chất khô tổng số và độ cứng ruột quả sau 30 ngày bảo quản.

3.3.10. Phương pháp xử lý quả sơ bộ bằng một số chất sát trùng thông thường trước khi áp dụng chế phẩm.

Xây dựng 3 công thức thí nghiệm, mỗi công thức 7 quả thanh long (lắp lại 3 lần). Quả sau khi phân loại, được rửa sạch bằng nước máy. Rửa lại bằng nước cất, để khô tự nhiên. Trong quá trình rửa và lau tránh gây sát hoặc làm tổn thương quả. Sau đó, trên mỗi quả tạo 4 vết thương bằng dụng cụ đục lỗ vô trùng đường kính 5mm, sâu 2-3mm sao cho không chạm đến thịt quả. Quả ở lô thí nghiệm nhiễm $20\mu\text{l}$ nấm mốc gây thối hỏng ở mật độ 1×10^4 CFU/ml.. Tiến hành xử lý quả sau 24 giờ với 3 chế độ khác nhau như sau:

CT1: Nước Clorin nồng độ 0,1% trong 120 giây

CT3: Dung dịch 5% Na_2CO_3 , ở nhiệt độ phòng trong 120 s

ĐC: Nước ở nhiệt độ phòng trong 120 s

Các công thức sau khi xử lý được để khô tự nhiên rồi bao gói PE có đục lỗ, đựng vào trong các thùng carton Đặt các thùng trong điều kiện phòng thí nghiệm (nhiệt độ ban ngày trung bình $23^{\circ}\text{C} \pm 3$). Kiểm tra sự phát triển của nấm mốc tại các vị trí cấy. Tính phần trăm số lỗ bị mốc trên tổng số lỗ đã cấy.

3.3.11. Phương pháp nghiên cứu tác dụng của chitosan tới sự phát triển của vi sinh vật gây hỏng quả thanh long

Thực hiện theo phương pháp nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) như sau:
Chọn 2-3 chủng nấm mốc gây hỏng quả đặc trưng trên thanh long đã được tuyển chọn theo mục 3.3.1 áp dụng theo phương pháp của Ting Yu và cộng sự [33]:

Sử dụng ống nghiệm vô trùng chứa 10ml môi trường PDA lỏng và chitosan với các nồng độ : 0%; 0,1% ; 0,2% ; 0,3% ; 0,4% và 0,5% được hấp khử trùng. Mỗi ống nghiệm sau đó được cho vào 100 μ l hỗn dịch chứa vi sinh vật gây hỏng quả thanh long 10⁷CFU/ ml. Mỗi công thức 9 ống nghiệm, lặp lại 3 lần. Xác định sự nảy mầm của bào tử sau 48h ở nhiệt độ 28-30⁰C trong tủ nuôi. Tính phần trăm số ống nghiệm có nấm mốc mọc để xác định khả năng ức chế nấm mốc của chitosan ở nồng độ khác nhau.

3.3.12. Nghiên cứu tác dụng của chitosan tới sự phát triển của nấm men đối kháng

Các chủng nấm men *Candida spp.* có khả năng đối kháng cao nhất được tuyển chọn theo mục 3.3.3 được nuôi cấy trong môi trường nước malt chứa chitosan (nồng độ chitosan > nồng độ ức chế tối thiểu MIC) có bổ sung và không bổ sung 0,5% CaCl₂ , trên máy lắc 200v/phút, ở 28⁰C. Lấy mẫu sau 12h, 24h, 36h, 48h...trong 5 ngày nuôi cấy. Đo mật độ quang OD (optical density) để xác định sự phát triển nấm men trên máy đo màu Zuzi 4110ED ở bước sóng 660nm.

3.3.13. Nghiên cứu tác dụng của chitosan và nấm men đối kháng có bổ sung CaCl₂ đến sự phát triển nấm gây thối hỏng trên quả thanh long

Nuôi cấy nấm men trong môi trường malt, sau 48h thu hồi bằng ly tâm 10.000v/phút trong 5 phút, hòa tan lại bằng nước tiệt trùng rồi ly tâm lại lần nữa. Nấm men sau ly tâm đem pha với dung dịch 0,5% chitosan và 0,5% CaCl₂ điều chỉnh đến 10⁷CFU/ml. Tạo vết thương trên bề mặt quả bằng dụng cụ đục lỗ vô trùng đường kính 5mm, sâu 2-3mm. Để đánh giá hiệu quả bảo vệ của hỗn hợp (chế phẩm màng sinh học), tiến hành xử lý theo 5 công thức:

Công thức 1 - Dịch tế bào nấm men 10⁷CFU/ml

Công thức 2 - Dung dịch chitosan 0,5% trong axit axetic

Công thức 3 - Dung dịch chitosan 0,5% bổ sung 0,5% CaCl₂

Công thức 4 - Dịch tế bào nấm men 10⁷CFU/ml chứa 0,5% chitosan

Công thức 5 - Dịch tế bào nấm men 10⁷CFU/ml chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl₂.

Đục lỗ trên quả, sau đó cho 20 µl tế bào nấm mốc gây hỏng quả nồng độ 10^4 CFU/ml. Sau 2h nhiễm thêm vào 50 µl dịch chế phẩm theo 5 công thức trên. Quả ở lô đối chứng được xử lý bằng 50 µl nước cất vô trùng. Bảo quản quả ở nhiệt độ thường trên khay hoặc thùng carton hoặc có thể xếp trong túi PE để duy trì độ ẩm cao. Theo dõi và đếm số lỗ bị nhiễm sau 7 ngày.

3.3.14 Phương pháp thử nghiệm bảo quản thanh long thương phẩm bằng màng nấm men đối kháng kết hợp với chitosan và CaCl_2

Thanh long được lấy mẫu theo tiêu chuẩn, để nơi thoáng mát tối thiểu nửa ngày và tối đa 1 ngày mới đem thí nghiệm, để cuống dài tối đa 0,5cm. Rửa sạch và để khô ở nhiệt độ thường.

Lô thí nghiệm được xử lý bằng các công thức màng bao:

Công thức 1 - Dung dịch chitosan bổ sung 0,5% CaCl_2

Công thức 2 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan

Công thức 3 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan và 0.5% CaCl_2 .

Dùng vải mềm thấm chế phẩm theo các công thức xoa đều khắp bề mặt quả, để khô tự nhiên. Lô đối chứng không xử lý chế phẩm. Thanh long được bao gói trong túi PE, bảo quản ở nhiệt độ 5°C và độ ẩm không khí 90-95% theo quy trình VietGap thanh long. Tiến hành lấy mẫu và đánh giá các chỉ tiêu: độ hao hụt khối lượng, biến đổi màu sắc, biến đổi độ cứng, hàm lượng chất khô tổng số và mức độ thối hỏng sau 10, 20, 30 và trên 35 ngày bảo quản.

3.3.15. Phương pháp phân tích chất lượng

3.3.15.1. Phương pháp xác định hao hụt khối lượng tự nhiên

Hao hụt khối lượng tự nhiên được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{M_2}{M_1} \cdot 100$$

Trong đó: $X(\%)$: Hao hụt khối lượng tự nhiên ở mỗi lần phân tích

M_1 (g): Khối lượng quả trước bảo quản

M_2 (g): khối lượng quả ở các lần phân tích.

3.3.15.2. Phương pháp xác định biến đổi màu sắc vỏ quả

Xác định sự biến đổi màu sắc vỏ quả qua từng giai đoạn bằng máy đo màu Color Meter, Mỹ. Kết quả đo thể hiện các chỉ số L, a, b được hiện ra trên máy và đối chiếu với quả cầu màu. Trong đó L biểu thị cho cường độ màu có giá trị từ 0 (đen) đến

100 (trắng); a biểu thị cho dải màu từ xanh lá cây (-60) đến đỏ (+60); b biểu thị cho dải màu từ vàng (-60) đến xanh nước biển (+60).

Chỉ số màu ΔE là mức độ sai khác về mẫu của các mẫu trước và sau thí nghiệm bảo quản, số liệu là giá trị trung bình của 3 điểm (3 lần đo) được xác định theo công thức:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Trong đó

$$\Delta L = L^* - L$$

$$\Delta a = a^* - a$$

$$\Delta b = b^* - b$$

L^* , a^* , b^* là các giá trị màu sắc ban đầu của nguyên liệu trước khi bảo quản.

L , a , b là các giá trị màu sắc của sản phẩm sau khi bảo quản.

3.3.15.3. Phương pháp xác định biến đổi về độ cứng

Xác định bằng dụng cụ đo độ cứng Fruit Pressure Tester, Italia.

Bỏ vỏ quả tại vị trí cần đo. Nhẹ nhàng ấn đầu đâm của dụng cụ đo độ cứng vào chỗ vừa bỏ vỏ cho đến khi vỏ thịt quả chạm đến vạch trên đầu đâm. Đọc kết quả. Độ cứng của quả được xác định bằng công thức:

$$X = \frac{F}{N}$$

Trong đó X : độ cứng của quả (kg/cm^2)

F : Chỉ số của máy đo (kg)

N : Diện tích của mũi kim (cm^2).

3.3.15.4. Phương pháp xác định hàm lượng chất khô hòa tan bằng khúc xạ kế

Xác định theo TCVN 4414-87

Dùng chiết quang kế để xác định hàm lượng chất rắn hoà tan. Nguyên lý: Khi đi từ một môi trường (không khí) vào môi trường khác (chất lỏng), tia sáng sẽ bị lệch đi (bị khúc xạ). Nếu chất lỏng là một dung dịch chất hoà tan (dung dịch muối, đường,...) dựa trên độ lệch của tia sáng ta có thể xác định được nồng độ chất hoà tan.

Cách đo: dùng thìa thuỷ tinh đưa 1-2 giọt dung dịch cần đo vào giữa mặt phẳng của lăng kính trong. Gập lăng kính mờ vào lăng kính trong. Đưa chiết quang kế ra nơi có ánh sáng. Nhìn vào thị kính, đọc số liệu nằm ở đường phân chia giữa khoảng tối và

khoảng sáng của trường quan sát. Nhiệt độ chuẩn khi đo là 20⁰C. Sau mỗi lần đo phải rửa sạch mẫu trên hai lăng kính bằng nước cất.

3.3.16. Phương pháp thử nghiệm tính an toàn sinh học của chế phẩm nấm men đối kháng TL01

(Tiến hành theo phương pháp thử nghiệm của Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương – Bộ Y tế)

Động vật thí nghiệm:

- Loài: chuột nhắt trắng giống Swiss.
- Cân nặng: 18 – 20 g
- Số lượng: 40 con
- Nguồn gốc cung cấp: Viện vệ sinh dịch tễ trung ương.
- Điều kiện chăm sóc: ĐVTN được nuôi trong điều kiện chuồng thoáng mát, đảm bảo vệ sinh, chế độ ăn uống theo nhu cầu của chuột.
- Cân nặng: Tất cả ĐVTN được để ổn định 3 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm và theo dõi cân nặng trong quá trình thử nghiệm.

Các mức liều thử nghiệm:

Mức liều 1: 20ml mẫu thử/ kg chuột x 1 lần uống.

Mức liều 2: 20ml mẫu thử/ kg chuột x 2 lần uống (mỗi lần cách nhau 2 giờ).

Mức liều 3: 20ml mẫu thử/ kg chuột x 3 lần uống (mỗi lần cách nhau 2 giờ).

Tiến hành:

- Chuột được nhịn ăn 15 giờ trước khi thí nghiệm, nước uống theo nhu cầu. Kiểm tra cân nặng trước khi thử nghiệm. Chuột đạt các yêu cầu về cân nặng được đưa vào thử nghiệm.
- Cách dùng: Đưa mẫu thử dưới dạng hỗn dịch theo đường uống. Lấy thể tích mẫu thử theo quy định đưa thẳng vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù.
- Dựa trên kết quả thăm dò trong thử nghiệm sơ bộ, tiến hành thử nghiệm chính thức trên 40 chuột, chia thành 4 nhóm gồm 1 nhóm chứng dùng nước cất và 3 nhóm thử theo mức liều đã dự tính. Các nhóm thử được dùng hỗn dịch thử ở các mức liều và số lần đưa mẫu thử như sau:

Bảng 3.1: Bố trí thí nghiệm thử độc tính cấp mẫu chế phẩm nấm men đối kháng *Candida sake* TL1

Nhóm chuột	Liều dùng (ml mẫu thử/20g chuột)	Liều dùng (ml mẫu thử/kg chuột)	Số chuột thí nghiệm
Nhóm chứng	0,4 ml nước x 3 lần	----	10
Mức liều 1	0,4 ml mẫu thử x 1 lần	20 ml mẫu thử/kg chuột	10
Mức liều 2	0,4 ml mẫu thử x 2 lần	40 ml mẫu thử/kg chuột	10
Mức liều 3	0,4 ml mẫu thử x 3 lần	60 ml mẫu thử/kg chuột	10

- Lịch theo dõi: Theo dõi biểu hiện của chuột sau khi uống, trong 24 giờ đầu và theo dõi hoạt động của ĐVTN trong thời gian 7 ngày sau khi uống.

3.3.17. Phương pháp bố trí thí nghiệm bảo quản quả thanh long bằng chế phẩm TL01 ở quy mô lớn tại công ty TNHH TM Hưng Loan Bình Thuận

Quả thanh long ngay sau khi thu hoạch tại vườn, để nơi thoáng mát tối thiểu ½ ngày, tối đa 1 ngày. Chọn những quả thanh long không bị bệnh, khối lượng khoảng 500g. Sau được rửa bằng nước sạch, để khô và rửa lại bằng dung dịch clorin nồng độ 0,1%. Để ráo quả. Sau đó quả thanh long được chia làm 3 lô với công thức thí nghiệm như sau:

Công thức 1: Dùng Chế phẩm Anolyt theo công thức của công ty TNHH TM Hưng Loan.

Công thức 2: Dùng chế phẩm nấm men đối kháng TL01

Lô đối chứng: Thanh long không được xử lý bằng chế phẩm bảo quản nào

Sau khi xử lý bao gói bằng túi polyetylen có đục lỗ và tiến hành bảo quản thanh long theo quy trình ViệtGap thanh long.

Các chỉ tiêu theo dõi

Quá trình bảo quản theo dõi các chỉ tiêu:

- Tỷ lệ thối hỏng
- Tỷ lệ hao hụt khối lượng
- Độ cứng của ruột quả
- Hàm lượng chất khô tổng số

Tiến hành theo dõi hàng ngày trên mẫu có phủ màng bao và nấm men và mẫu đối chứng. Tiến hành thu thập, phân tích, xử lý số liệu dựa trên các chỉ tiêu đã nêu và chụp ảnh làm cơ sở để đánh giá hiệu quả của mô hình.

3.3.18. Phương pháp điều tra khảo sát

- Tập huấn: Tập huấn cho các thành viên tham gia điều tra nắm được các nội dung, yêu cầu và phương thức tiến hành điều tra phỏng vấn.
- Chọn địa điểm: Địa điểm điều tra phỏng vấn gắn liền với địa điểm lấy mẫu phân tích. Việc lựa chọn được tiến hành theo phương pháp phân tầng và chọn ngẫu nhiên (điều tra tại các thôn của 2 xã).
- Phương pháp điều tra: Phỏng vấn trực tiếp dựa trên nội dung của mẫu phiếu điều tra có sẵn. Việc chọn người phỏng vấn được tiến hành một cách ngẫu nhiên. Có thể phỏng vấn tại nhà, tại vườn hoặc tại các chợ buôn bán.

3.3.19. Phương pháp xử lý số liệu theo phần mềm Microsoft Excel

PHẦN IV: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả khảo sát thực trạng sản xuất trước và sau thu hoạch Thanh long Bình Thuận

4.1.1. Thực trạng sản xuất trước thu hoạch thanh long Bình Thuận

Tuổi cây thanh long

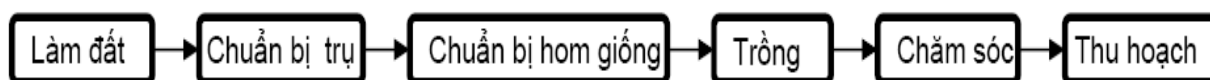
Kết quả điều tra nêu ở Bảng 4.1 cho thấy phần lớn cây thanh long đang ở giai đoạn cho thu hoạch trồng tại Hàm Thuận Nam và Hàm Thuận Bắc đều có tuổi từ 4 đến 7 năm (31,82% ở Hàm Thuận Nam và 45,37% ở Hàm Thuận Bắc). Đa số thanh long được trồng tập trung và đã có quy trình thâm canh tốt. 100% người dân được hỏi đều trồng giống thanh long ruột trắng tại địa phương và tự nhân giống bằng phương pháp đâm cành.

Bảng 4.1. Tỷ lệ trụ thanh long theo độ tuổi tại huyện Hàm Thuận Nam và Hàm Thuận Bắc

Địa điểm khảo sát	Trụ dưới 2 năm tuổi (%)	Trụ 2- 4 năm tuổi (%)	Trụ 4-7 năm tuổi (%)	Trụ 8-14 năm tuổi (%)	Trụ từ 15-20 năm tuổi (%)
H. Hàm Thuận Bắc	23,38	14,43	45,37	14,07	2,75
H. Hàm Thuận Nam	20,68	22,48	31,82	24,38	0,64

Thuận Bắc

Quy trình trồng trọt của các hộ nông dân như sau:



Từ trước đến nay nông dân chủ yếu dựa vào kinh nghiệm trồng trọt là chính, tuy nhiên để đạt thanh long đủ tiêu chuẩn xuất khẩu, họ nhất thiết phải tuân theo một qui trình chuẩn. Hiện nay các nhà trồng thanh long đều thực hiện áp dụng quy trình VietGap trong chăm sóc thanh long (100% số hộ tham gia phỏng vấn đều đang thực hiện quy trình chăm sóc VietGap)

Đối với các loại phân hóa học, các hộ sử dụng phần lớn là đạm, lân và kali (100%), các loại phân vi sinh đặc hiệu có tác dụng chăm sóc cho cây từ giai đoạn ra hoa, tạo quả và chăm sóc cho cây sau thu hoạch đã không được chú ý sử dụng.

Tỷ lệ sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trên thanh long là 100%, đều tuân theo quy trình Vietgap. Tất cả các hộ được hỏi đều cho biết họ chỉ sử dụng thuốc bảo vệ thực vật khi thấy sâu bệnh xuất hiện (chủ yếu là dùng để trị nấm, ruồi đục quả). Tuy nhiên, một vấn đề đáng lo ngại là hầu hết bà con khi mua thuốc BVTV đều không tham khảo ý kiến của cán bộ khuyến nông mà chủ yếu là trị bệnh theo kinh nghiệm và tư vấn của các cửa hàng bán thuốc BVTV. 30% số phiếu không cho biết nguồn gốc thuốc BVTV

Bảng 4.2: Tình hình chăm sóc thanh long theo quy trình VietGap

TT	Địa điểm	Chăm sóc cây theo quy trình Viet Gap (%)	
		Có	Không
1	Hàm Thuận Nam	100	0
2	Hàm Thuận Bắc	100	0

Khi tiến hành điều tra, chúng tôi nhận thấy đa số người dân trồng thanh long tập trung, một số hộ sản xuất theo qui mô hộ trang trại. Việc chăm sóc thanh long thâm canh cao và đã được các cấp chính quyền quan tâm đúng mức.

4.1.2. Thực trạng bảo quản thanh long sau thu hoạch

Thu hoạch, sơ chế và vận chuyển

Khâu thu hoạch, sơ chế của người trồng thanh long rất đơn giản, bao gồm cắt tỉa, làm cho quả thanh long trông đẹp và tươi hơn. Nếu cần vận chuyển trái cây đến cho khách hàng mua nhiều (hộ kinh doanh và thu mua lớn) họ có thể sử dụng thùng carton và không dán nhãn. 100% hộ nông dân đều thực hiện theo phương pháp này.

Bảng 4.3: Tình hình bảo quản thanh long sau thu hoạch

STT	Địa điểm	Bảo quản sau thu hoạch (%)	
		Có	Không
1	Hàm Thuận Nam	10	90
2	Hàm Thuận Bắc	15	85

Có thể thấy rằng phần lớn bà con đều không bảo quản thanh long sau khi thu hoạch. Lý do được đưa ra là hầu hết bà con đã bán cả vườn cho thương lái và cũng không có phương pháp bảo quản hữu hiệu, thời gian bảo quản không lâu và hình thức

quả xấu. Với những hộ có bảo quản thì 100% bà con đều sử dụng hóa chất và dùng nước làm mát. Phần đông vẫn bảo quản trong điều kiện thường, thời gian bảo quản không lâu, chỉ đạt 15-18 ngày.

Bảo quản thanh long là một trong những yếu tố rất quan trọng để nâng cao được giá thành của quả. Việc không có phương pháp bảo quản hữu hiệu đã làm cho người trồng thanh long ngày càng phụ thuộc vào các thương lái và thường xuyên bị họ ép giá, nhất là vào chính vụ. (giá chính vụ thường chỉ bằng $\frac{1}{2}$ hoặc $\frac{2}{3}$ thời điểm nghịch vụ)

Bảng 4.4. Nhu cầu bảo quản thanh long sau thu hoạch

TT	Địa điểm	Bảo quản sau thu hoạch (%)	
		Có	Không
1	Hàm Thuận Nam	95	5
2	Hàm Thuận Bắc	100	0

Thanh long là quả có giá trị kinh tế cao, nên hầu hết các hộ nông dân đều có nhu cầu bảo quản thanh long sau thu hoạch. Điều quan trọng mà bà con quan tâm là hình thức và chất lượng của thanh long sau khi bảo quản và có quy trình bảo quản đơn giản, dễ sử dụng.

4.1.3. Kết luận

Qua đó cho thấy, người dân trồng thanh long ở hai huyện Hàm Thuận Nam và Hàm Thuận Bắc vẫn còn những thuận lợi, khó khăn sau:

Thuận lợi:

- Việc trồng thanh long diễn ra ở quy mô tập trung, đã hình thành những trang trại, hiệp hội chuyên canh thanh long. Năng suất và chất lượng quả thanh long ổn định
- Được sự quan tâm của các cấp chính quyền, sở NN và PTNT, trung tâm khuyến nông hiệp hội thanh long Bình Thuận đã xây dựng quy trình chăm sóc cụ thể. Người dân có kinh nghiệm lâu năm trong việc chăm sóc thanh long, đặc biệt chăm sóc cho thanh long ra trái nghịch vụ.

Khó khăn:

- Nhu cầu bảo quản thanh long sau khi thu hoạch là khá cao nhưng hiện tại bà con chưa có quy trình bảo quản hợp lý nên không chủ động được nguồn cung cấp cho thị trường.
- Quá trình tiêu thụ phụ thuộc quá nhiều vào thương lái, bà con thường không chủ động trong việc tìm kiếm thị trường tiêu thụ nên thường bị thương lái ép giá.

4.2. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm (Nấm men đối kháng và màng bao ăn được) dùng trong bảo quản thanh long

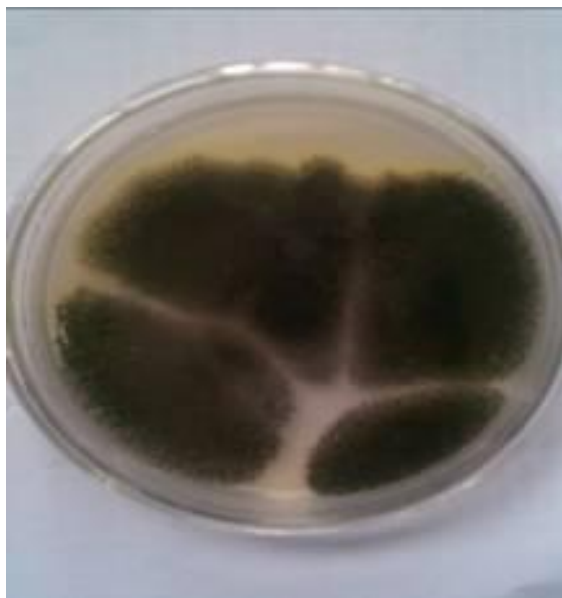
4.2.1. Xác định các chủng nấm mốc gây thối hỏng quả thanh long điển hình

Một trong những nguyên nhân chính gây thối hỏng quả là do tác động của hệ vi sinh vật trong đó chủ yếu là do nấm mốc gây nên. Đề tài đã tiến hành phân lập các chủng nấm mốc gây thối hỏng quả thanh long điển hình.

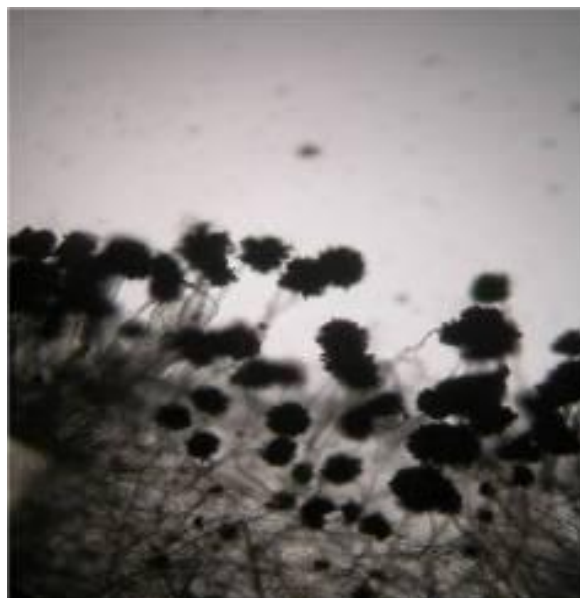
Bảng 4.5: Kết quả phân lập các chủng nấm mốc gây thối hỏng thanh long trong quá trình bảo quản

Tên mẫu	Số lượng mẫu	Tỷ lệ chủng <i>A.niger</i> phân lập được/số mẫu (%)	Tỷ lệ chủng <i>A.flavus</i> phân lập được/số mẫu (%)	Tỷ lệ chủng <i>Penicillium</i> phân lập được/số mẫu (%)
Thanh long	50	70,89	52,36	69,47

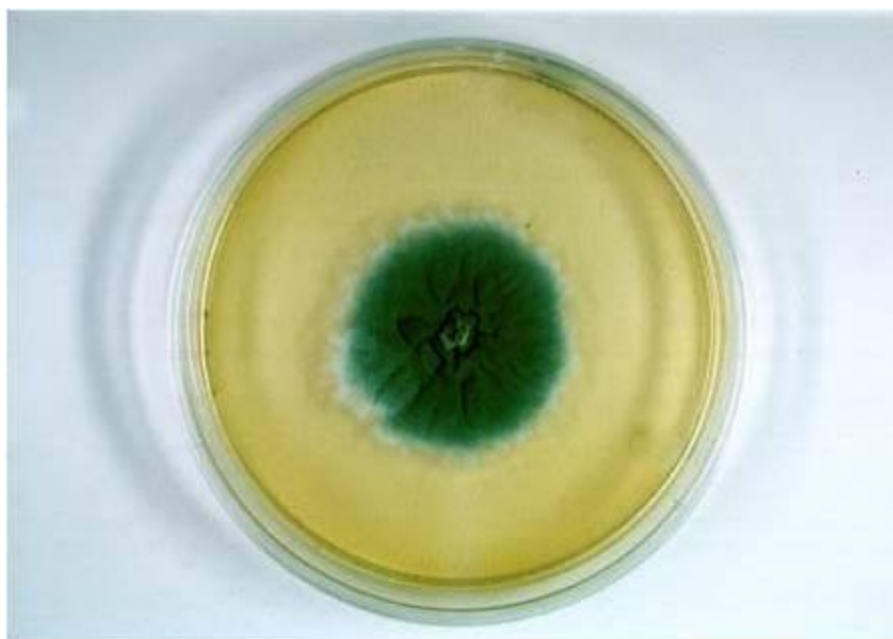
Kết quả đã phân lập được các loài nấm *Aspergillus niger* và *Penicillium* là những nấm mốc gây thối hỏng phổ biến trên thanh long. Do vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo chúng tôi chỉ sử dụng các loài nấm *Aspergillus* và *Penicillium* đã phân lập được để đánh giá hiệu quả của nấm men đối kháng.



Hình 4.1: Khuẩn lạc *A.niger*



Hình 4.2: Ảnh chụp kính hiển vi điện tử chủng *A.niger*



Hình 4.3: Khuẩn lạc *Penicillium sp.*

4.2.2. Phân lập, tuyển chọn các chủng nấm men *Candida.spp* đối kháng

4.2.2.1. Phân lập các chủng nấm men *Candida.spp* đối kháng

Chúng tôi đã tiến hành thu thập 100 mẫu lê và thanh long từ các nguồn trong nước và tiến hành phân lập các chủng nấm men *Candida sake* đối kháng. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.6.

Bảng 4.6: Kết quả phân lập các chủng nấm men

Nguồn phân lập	Số mẫu	Số chủng nấm men phân lập được	Tỷ lệ chủng nấm men / số mẫu thu thập (%)
Lê	50	3	6
Thanh long	50	4	8
Tổng số	100	7	7

Kết quả ở bảng 4.6 cho thấy tổng số chủng nấm men đối kháng phân lập được là 7 chủng trên tổng số 100 mẫu quả, chiếm tỉ lệ 7%. Trong đó, tỉ lệ chủng nấm men đối kháng phân lập trên lê là 6%, trên thanh long là 8%.

4.2.2.2. Đánh giá khả năng ức chế nấm mốc gây thối hỏng quả thanh long của các chủng nấm men đối kháng phân lập được

Từ 07 chủng nấm men phân lập được kết hợp với 03 chủng nấm men *Candida.spp* sẵn có từ bộ sưu tập giống của Bộ môn nghiên cứu Công nghệ Sinh học sau thu hoạch, đề tài có 10 chủng nấm men phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Việc xác định các chủng nấm men đã phân lập được có khả năng ức chế các nấm mốc và *A.niger* gây thối hỏng quả thanh long được tiến hành theo phương pháp Kết quả được thể hiện trên bảng 4.7.

Bảng 4.7: Khả năng ức chế nấm mốc *A.niger* và *Penicillium* gây thối hồng trên thanh long của các chủng nấm men *Candida. spp*

Ký hiệu chủng nấm men <i>Candida</i>	Khả năng ức chế nấm mốc <i>A.niger</i> ở các mức độ			Khả năng ức chế nấm mốc <i>Penicillium</i> ở các mức độ		
	Ức chế ở mức độ yếu	Ức chế ở mức độ trung bình	Ức chế ở mức độ mạnh	Ức chế ở mức độ yếu	Ức chế ở mức độ trung bình	Ức chế ở mức độ mạnh
LM3	x			x		
LM5		x				x
CA1		x		x		
TL1			x			x
TL2	x				x	
TL3		x				x
TA1	x			x		
TA2	x				x	
TA3		x			x	
TA4	x				x	

Chú thích:

Mức độ yếu: chỉ ức chế nấm mốc sau 3 ngày nuôi cấy sau đó nấm mọc lại

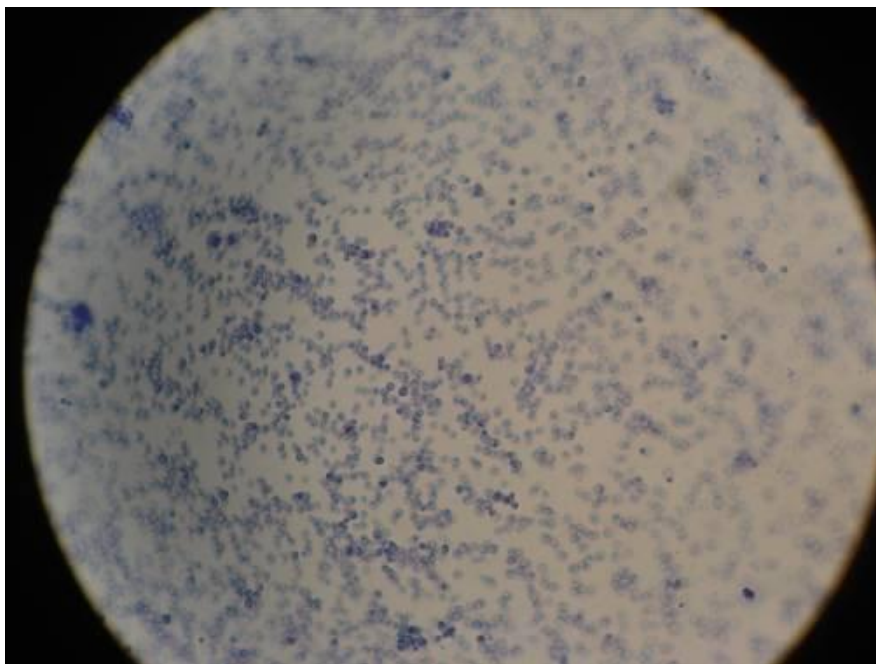
Mức độ trung bình: chỉ ức chế nấm mốc sau 6 ngày nuôi cấy sau đó nấm mọc lại

Mức độ mạnh: ức chế hoàn toàn nấm mốc sau 7-8 ngày nuôi cấy

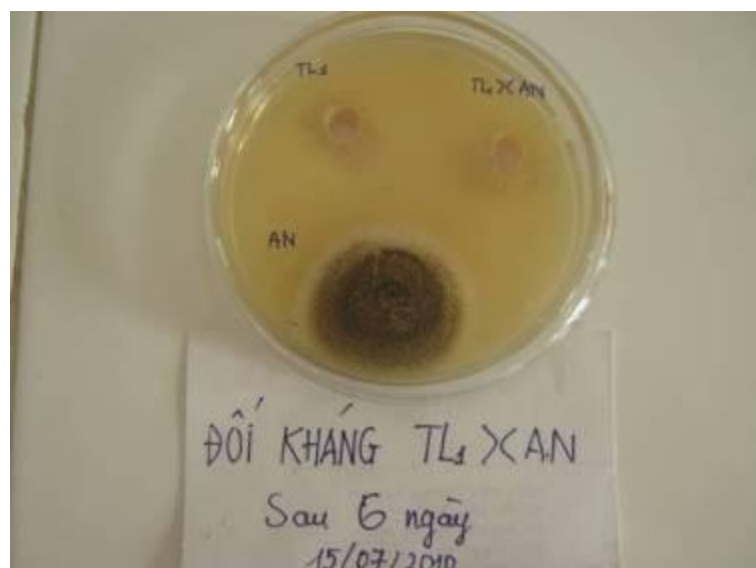
Từ 10 chủng nấm men đem thử khả năng ức chế nấm mốc *A. niger* và *Penicillium* chúng ta thấy có 5 chủng có khả năng ức chế nấm mốc *A. Niger* ở mức độ yếu, 4 chủng ức chế ở mức độ trung bình, 1 chủng ức chế ở mức độ mạnh. 3 chủng ức chế *Penicillium* ở mức độ yếu, 4 chủng ức chế ở mức độ trung bình và 3 chủng ức chế ở mức độ mạnh. Tuy nhiên, chỉ có 01 chủng nấm men ức chế cả 2 loài nấm mốc trên ở mức độ mạnh là chủng *Candida. spp* TL1. Do đó chúng tôi lựa chọn chủng nấm men này cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4.4: Khuẩn lạc chủng nấm men *Candida* spp TL1



Hình 4.5: Ảnh chụp kính hiển vi chủng nấm men nấm men *Candida* spp TL1



Hình 4.6: Khả năng ức chế nấm mốc *A.niger* của nấm men *Candida spp TL1*

Hình 4.6 cũng cho thấy rằng trên môi trường PDA nấm men *Candida sake TL1* có khả năng ức chế hoàn toàn nấm mốc *Aspergillus niger* sau 6 ngày nuôi cấy.

4.2.2.3. Định loại chủng nấm men đối kháng tuyển chọn được

Chúng tôi tiến hành định loại chủng nấm men TL1 đối kháng phân lập được có khả năng ức chế mạnh với cả 2 loại nấm mốc *Penicillium* và *A.niger* và thu được kết quả như sau:

Tách dòng và đọc trình tự gen ITS và 2,5s ARN để định loại nấm men đối kháng

Cặp mồi dùng để khuếch đại gen ITS và 2,5 S bằng PCR:

ITSP1: TCCTGGTCATTTAGAGGAAGTAAA

ITSP2: TAGAGCTGCATTCCCAAACAAC

Trình tự đoạn gen mã hóa rRNA ITS và 2,5s của chủng nấm men đối kháng đã được xác định thông cả hai chiều. Trình tự này được so sánh với trình tự gen rRNA ITS và 2,5S của các chủng *Candida sake* có sẵn trong Ngân hàng dữ liệu gen Quốc tế. Sử dụng chương trình Fasta để tìm kiếm các trình tự tương đồng đã được các tác giả khác công bố và so sánh với trình tự thu nhận được.

Kết quả phân tích theo phần mềm Fasta trình tự một đoạn gen mã hóa rRNA ITS và 2,5s của chủng nấm men đối kháng L81 có 99,00% nucleotit tương đồng với trình tự gen rRNA ITS và 2,5s của chủng *Candida sake* đăng trên ngân hàng gen Quốc tế.

ID	CsVn_ITS	PRELIMINARY; DNA; 708 BP.			
SQ	SEQUENCE	708 BP;	212 A;	139 C;	156 G; 201 T;
TCCTGGTCAT	TTAGAGGAAG	TAAAAGTCGT	AACAAGGTTT	CCGTAGGTGA	
CCCTGCGGAA	60				
GGATCATTA	AGTTTGCTTA	ATTGCATTAC	ACATGTTTTT	TTAGAGAACT	
TGCTTGCAAG	120				
AACACTAATA	ATTTACTTAG	TCAACAAATA	AAAATATCAA	AACTTTCAAC	
AACGGATCTC	180				
TTGGTTCTCG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA	CGTAATATGA	
ATTGCAGATT	240				
TTCGTGAATC	TTCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCTG	TGGTATTCCA	
CAGGGCATGC	300				
CTGTTTGAGC	GTCATTTCTC	CCTCAAACCT	CTGGTTTGGC	GTTGAGTGAT	
ACTCGGTTTA	360				
CTTGAAAAAC	ATGAAAAGCA	TAAC TATTAG	GTTTTACCAA	CTCGTTATAC	
TAATCTACAA	420				
GTTTGACCTC	AAATCAGGTA	GGACTAACCG	CTGAAC TTAA	G CATATCAAT	
TAGCGGAGGA	480				
AAAGAAACCA	ACCGGGATTG	GCTCAGTAAC	GGCGAGTGAA	GCGGCAAAAG	
CTCAAATTTG	540				
AAATCTGCGT	AAGCCGAGTT	GTAATTTGAA	GATGGCTACT	TTGGTAATGG	
CTCTTGTCCTA	600				
TGTTTCCTTGG	AACAGGACGT	CACAGAGGGT	GAGAATCCCG	TGCGATGAGA	
TGTCCATTAC	660				
CGTGTAAGT	GCTTTCGAAG	AGTCGAGTTG	TTTGCCAATG	CAGCTCTA	
	708				

Hình 4.7: Trình tự nucleotide ITS và 2,5S của chủng *Candida sake* TL1

Kết quả định tên bằng phương pháp sinh học phân tử này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân loại dựa trên các đặc điểm về hình thái sinh lý nêu trên. Sau khi phân loại theo phương pháp xác định trình tự đoạn gen mã hóa rRNA ITS và 2,5S chúng tôi khẳng định rằng chủng nấm men TL1 đối kháng chính xác thuộc loài *Candida sake*.

So sánh với chủng nấm men *Candida sake* ĐN15 mà Nguyễn Thùy Châu và các cộng sự đã phân lập được trước đó, chúng tôi thấy trình tự nucleotide của đoạn gen ITS và 2,5S của chủng nấm men *Candida sake* TL1 có sự tương đồng 99,7% so với chủng nấm men *Candida sake* ĐN15 và chỉ khác biệt ở vị trí nucleotide số 695 và 696 của chủng nấm men *Candida sake* ĐN15 là GG thì ở chủng nấm men *Candida sake* TL1 mà chúng tôi phân lập được là CC.

4.2.2.4. Xác định khả năng ức chế của *Candida sake* TL1 đối với nấm mốc gây thối hỏng trên quả thanh long

Sau khi xác định được chủng nấm men đối kháng có khả năng ức chế nấm mốc gây thối hỏng trên quả thanh long ở mức độ mạnh chúng tôi tiến hành thử khả năng đối kháng của chủng này đối với nấm mốc gây hỏng trên quả thanh long. Thanh long được chia thành 6 lô thí nghiệm, mỗi lô 7 quả, lặp lại 3 lần, mỗi quả đục 4 lỗ bằng dụng cụ đục lỗ vô trùng ở các vị trí khác nhau trên quả theo phương pháp mô tả ở mục 3.3.7. Kết quả được trình bày ở bảng 4.8.

Bảng 4.8: Khả năng ức chế nấm mốc của nấm men *Candida sake* TL1 trên quả thanh long sau 7 ngày

STT	Lô thí nghiệm	Tỷ lệ nhiễm mốc (%)	
		<i>A.niger</i>	<i>Penicillium</i>
1	ĐC	100	100
2	<i>Candida sake</i> TL1	30	34

Bảng 4.8 cho ta thấy ở lô đối chứng các vết thương trên thanh long được nhiễm nấm mốc *Aspergillus niger* và nấm mốc *Penicillium* với lượng tế bào là 10^4 CFU/ml có tỷ lệ bị hỏng là 100%. Ở lô thí nghiệm, với nấm mốc *A.niger* có bổ sung 10^7 CFU/ml tế bào nấm men *Candida sake* TL1 tỷ lệ vết thương bị hỏng là 30%. Ở lô thí nghiệm, với nấm mốc *Penicillium* có bổ sung 10^7 CFU/ml tế bào nấm men *Candida Sake TL1* tỷ lệ vết thương bị hỏng là 34%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Wilson và cộng sự [38] thử khả năng đối kháng của nấm men *Candida saitoana* đối với nấm mốc gây thối trên quả táo. Kết quả chỉ ra rằng, khi bổ sung *Candida saitoana* có tác dụng ức chế nấm mốc *Penicillium* sau 7 ngày ở nhiệt độ 24°C với tỷ lệ vết thương bị hỏng là 47%. Tuy nhiên, theo một số tác

giả thì khả năng ức chế của nấm men đối với nấm mốc phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loại quả, nhiệt độ, độ ẩm bảo quản và kiểu làm tổn thương quả.



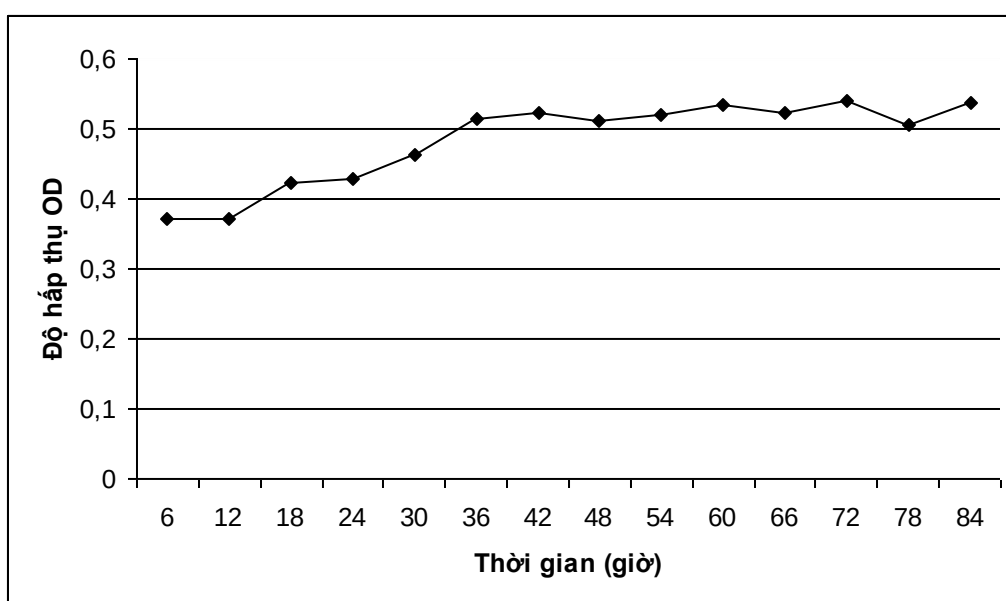
Hình 4.8: Đối chứng nhiễm nấm mốc bị thối hoàn toàn sau 7 ngày thí nghiệm



Hình 4.9: Thanh long xử lý nấm men đối kháng sau 7 ngày bảo quản

4.2.2.5. Xác định khả năng phát triển của *Candida sake* TL1 ở điều kiện nhiệt độ lạnh (5-10°C)

Chủng nấm men *Candida sake* đối kháng ngoài khả năng ức chế mạnh sự phát triển của các nấm mốc gây thối hỏng thanh long cần có khả năng phát triển hoặc tồn tại trong môi trường nhiệt độ thấp phù hợp với nhiệt độ bảo quản lạnh thanh long (5-10°C). Chúng tôi tiến hành nuôi cấy *Candida sake* TL1 trong môi trường nước chiết malt ở nhiệt độ 7°C, lấy mẫu đo OD sau mỗi 6h để xác định sự phát triển của chủng nấm men này. Kết quả nghiên cứu sự tồn tại phát triển của chủng *Candida sake* TL1 ở điều kiện nhiệt độ thấp được trình bày ở đồ thị 4.1.



Đồ thị 4.1: Đường cong sinh trưởng của chủng *Candida sake* TL1 ở nhiệt độ 5°C

Đồ thị 4.1 cho thấy, độ hấp thụ OD của môi trường nuôi cấy tăng dần theo thời gian, đạt cao nhất là 0,541 sau 72h nuôi cấy. Chứng tỏ trong điều kiện nhiệt độ 5°C chủng nấm men *Candida sake* TL1 có khả năng tồn tại và phát triển. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Pilar Gonzalo và cộng sự khi nghiên cứu sự phát triển của nấm men *Candida sake* ở khoảng nhiệt độ 0-30°C.

4.2.3. Nghiên cứu lựa chọn màng bao ăn được để bảo quản thanh long

Chúng tôi đã tiến hành đánh giá hiệu quả bảo quản quả thanh long của 4 công thức màng bao CT27, CT27_1, CT27_2 và màng bao chitosan theo phương pháp đã nêu ở mục 3.3.8 phần vật liệu phương pháp. Kết quả đánh giá được thể hiện ở bảng 4.9.

Bảng 4.9: Hiệu quả bảo quản quả thanh long bằng các màng bao sau 30 ngày

Công thức Màng bao	Hao hụt khối lượng(%)	Tỷ lệ thối hồng (%)	Độ cứng (kg/cm ²)		Hàm lượng đường tổng số (Brix)	
			Nguyên liệu	Sau 30 ngày bảo quản	Nguyên liệu	Sau 30 ngày bảo quản
CMC- trứng sữa - sáp ong	3,55	7,50	2,30	0,76	1,42	11,35
CMC- trứng sữa - sáp carnauba	3,43	7,90	2,30	0,69	1,42	10,84
HPCMC- trứng sữa- sáp ong	3,29	8,70	2,30	0,72	1,42	11,02
Màng chitosan	3,58	7,30	2,30	0,78	1,42	11,46
Đối chứng	6,45	24,50	2,30	0,40	1,42	9,05

Bảng 4.9 cho thấy, sau 30 ngày bảo quản quả thanh long bằng các công thức màng bao. Độ hao hụt khối lượng quả ở lô đối chứng là cao nhất 6,45%, tiếp đến là lô bảo quản bằng màng Chitosan là 3,58%, màng bao CMC - trứng sữa - sáp ong (màng CT27) là 3,55%, màng CMC- trứng sữa - sáp carnauba là 3,43%, màng HPCMC- trứng sữa- sáp ong là 3,29%. Tỷ lệ hao hụt khối lượng của màng chitosan cao hơn 3 công thức màng bao CT27, CT27_1 và CT27_2 do màng chitosan cho phép các phân tử nước khuếch tán qua màng.

Về sự thối hồng sau 30 ngày bảo quản, lô đối chứng thối hồng nhiều nhất lên tới 24,5% số quả bảo quản. Trong khi đó, thanh long bảo quản bằng màng CT27, CT27_1, CT27_2 và màng chitosan tỷ lệ thối hồng lần lượt là 7,5%, 7,9%, 8,7% và 7,3%. Kết quả nghiên cứu về biến đổi độ cứng của quả sau 30 ngày bảo quản cho thấy, ở các công thức thí nghiệm đều sụt giảm độ cứng ở tất cả các công thức. Màng chitosan vẫn giữ được độ cứng cao nhất 0,78 kg/cm². Trong khi đó, ở lô đối chứng độ cứng trung bình là 0,40kg/cm².

Kết quả bảng 4.9 cho thấy, sau 30 ngày bảo quản hàm lượng đường tổng số trong quả ở các công thức CT27, CT27_1, CT27_2 và chitosan đều giảm từ 1,42 brix xuống còn 11,35 brix, 10,84 brix, 11,02 brix và 11,46 brix theo thứ tự. Trong đó công thức bảo quản thanh long bằng màng chitosan cho sự giảm thấp nhất. Chứng tỏ màng phủ bằng chitosan có tác dụng làm chậm quá trình biến đổi sinh lý sinh hóa trong quả.



Hình 4.10: Thanh long ở lô đối chứng



Hình 4.11: Thanh long bảo quản bằng màng bao Chitosan sau 30 ngày

Từ kết quả khảo sát hiệu quả bảo quản của 4 loại màng: CT27, CT27_1, CT27_2 và chitosan cho thấy, Tuy màng chitosan có khả năng ngăn cản sự tổn thất khối lượng không cao nhưng hiệu quả bảo quản của màng chitosan tốt hơn (màng chitosan có khả năng kháng vi sinh vật làm giảm tỷ lệ thối hỏng), giá thành rẻ hơn và

có khả năng ứng dụng cho sản xuất ở qui mô lớn. Do vậy, đề tài chọn màng chitosan để kết hợp với nấm men *C.sake* TL1 đối kháng để nghiên cứu tiếp về phương pháp ứng dụng chế phẩm nấm men đối kháng kết hợp với màng chitosan để bảo quản quả thanh long ở quy mô lớn.

4.3. Nghiên cứu tạo chế phẩm tạo màng chitosan kết hợp với nấm men đối kháng.

4.3.1. Tác dụng của chitosan tới sự phát triển của nấm mốc gây hỏng quả thanh long điển hình

Sau khi xác định được chủng nấm mốc gây hỏng quả thanh long điển hình, chúng tôi tiến hành thử tác dụng của chitosan tới sự phát triển của nấm mốc tương ứng với các nồng độ chitosan khác nhau. Tiến hành thí nghiệm sự phát triển của nấm mốc *penicilium*, *A. niger*, *A. flavus* trên môi trường PDA lỏng có bổ sung chitosan theo các nồng độ khác nhau: 0.1%; 0.2%; 0.3%; 0.4% và 0,5% chitosan (có độ đề acetyl hóa 90% pha trong dung dịch axit acetic 1%). Nuôi cấy ở 28⁰C khoảng 3-5 ngày, sau đó kiểm tra sự phát triển của nấm mốc.

Bảng 4.10: Ảnh hưởng của chitosan tới sự phát triển của nấm mốc gây hỏng quả thanh long sau điển hình

STT	Nồng độ chitosan (%)	Tỷ lệ ống nghiệm có nấm mốc phát triển (%)		
		<i>Penicilium</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.flavus</i>
1	0.1	100	100	100
2	0.2	0	50	80
3	0.3	0	0	0
4	0.4	0	0	0
5	0.5	0	0	0

Từ bảng kết quả 4.10 ta thấy rằng ở nồng độ chitosan 0,2% tất cả các ống nghiệm nuôi cấy *Penicillium* đều không phát triển nhưng 50% ống nghiệm cấy *A. Niger* và 80% ống nghiệm cấy *A. flavus* vẫn có khả năng phát triển. Khi nồng độ chitosan tăng lên 0,3% hoặc lớn hơn thì tất cả các ống nghiệm không có sự phát triển của nấm mốc, chứng tỏ ở nồng độ 0,3% chitosan có khả năng ức chế sự phát triển của nấm mốc hoàn toàn sau 5 ngày gây nhiễm.

Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Duy Lâm và cộng sự [9], nghiên cứu khả năng ức chế hoàn toàn nấm

mốc trong môi trường lỏng của chitosan ở nồng độ 0,15% đối với nấm mốc *A. fumigatus* và 0,2% chitosan với nấm mốc *Fusarium dimerum*. Và cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ting Yu và cộng sự, 2007 [33], đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chitosan đối với nấm mốc gây thối *Penicillium expansum* trên táo, kết quả cho thấy nồng độ chitosan $\geq 0,3\%$ có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm mốc *P. expansum* gây thối trên táo.



Hình 4.12: Ảnh hưởng của chitosan ở các nồng độ khác nhau lên sự phát triển của nấm mốc

4.3.2. Ảnh hưởng của chitosan và chitosan + CaCl_2 tới sự phát triển của nấm men đối kháng

Chủng nấm men *Candida sake TL1* được nuôi cấy trên môi trường nước malt có bổ sung chitosan nồng độ 0,5% có bổ sung và không bổ sung 0,5% CaCl_2 theo

phương pháp 3.3.13. Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút ở 28⁰C. Lấy mẫu đo OD để kiểm tra sự phát triển của nấm men sau mỗi 6h nuôi cấy (lấy mẫu trong 5 ngày).

Bảng 4.11: Ảnh hưởng của chitosan tới sự phát triển của nấm men *C.sake* TL1

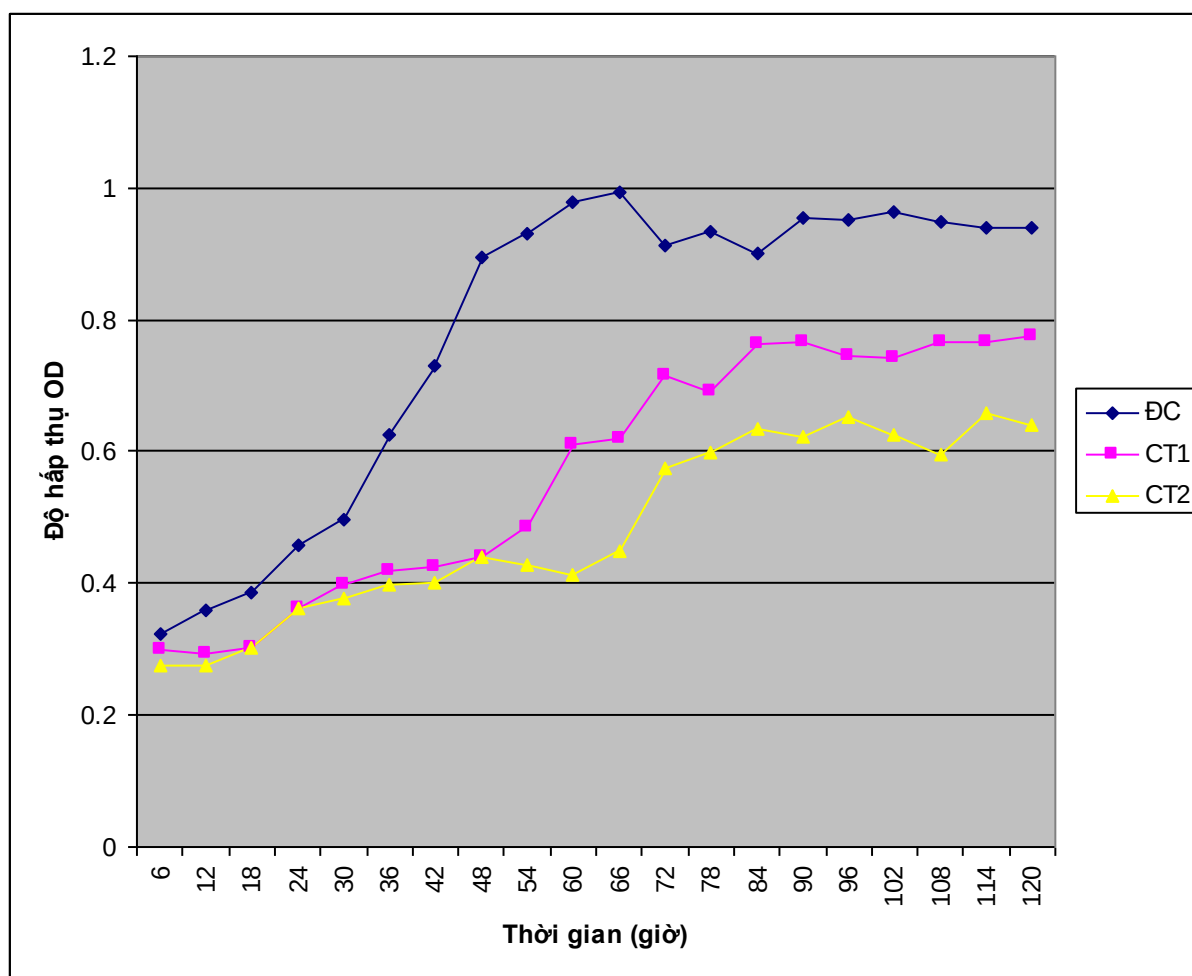
STT	Thời gian lấy mẫu	OD		
		ĐC	CT1	CT2
1	6	0.322	0.300	0.276
2	12	0.358	0.294	0.276
3	18	0.385	0.302	0.302
4	24	0.458	0.363	0.363
5	30	0.498	0.397	0.378
6	36	0.625	0.420	0.399
7	42	0.730	0.424	0.401
8	48	0.895	0.440	0.440
9	54	0.931	0.484	0.427
10	60	0.978	0.610	0.412
11	66	0.995	0.620	0.449
12	72	0.914	0.716	0.575
13	78	0.934	0.692	0.598
14	84	0.900	0.763	0.635
15	90	0.954	0.766	0.622
16	96	0.952	0.746	0.652
17	102	0.965	0.743	0.625
18	108	0.948	0.766	0.595
19	114	0.940	0.766	0.659
20	120	0.940	0.776	0.640

Chú thích:

CT1: Nấm men nuôi cấy trên môi trường nước malt bổ sung chitosan 0,5% và CaCl₂ 0,5%.

CT2: Nấm men nuôi cấy trên môi trường nước malt có bổ sung chitosan 0,5%

ĐC: Nấm men nuôi cấy trên môi trường nước malt



Đồ thị 4.2: Sự phát triển nấm men *Candida sake* TL1 trên các môi trường nuôi cấy có chitosan

Dựa vào bảng 4.11 và đồ thị 4.2 cho thấy, trong môi trường nuôi cấy nước malt chủng nấm men *Candida sake* TL1 phát triển tốt độ hấp thụ tăng dần sau 3 ngày nuôi cấy. Khi bổ sung 0.5% chitosan khả năng phát triển của chúng thấp hơn, mật độ quang thấp hơn (đường cong màu vàng) do chitosan và axit hữu cơ có tính chất kháng nấm đã làm giảm sự phát triển của nấm men. Nhưng khi kết hợp 0,5% chitosan với 0,5% CaCl_2 vào môi trường nước malt thì sự phát triển của nấm men tăng lên (đường cong màu đỏ) tuy không phát triển mạnh bằng khi sống trong môi trường nước malt (đường cong sinh trưởng màu xanh). Chứng tỏ khi bổ sung 0,5% CaCl_2 (chất làm mềm cation hóa trị 2) có tác dụng giúp cho tế bào nấm men có sức đề kháng với tác dụng bất lợi của chitosan giúp cho nấm men phát triển tốt hơn trong môi trường có chitosan.

4.3.3. Tác dụng của chitosan và nấm men đối kháng có bổ sung CaCl_2 đến sự phát triển nấm mốc gây thối hỏng trên thanh long

Sau khi nghiên cứu tác dụng của chitosan tới sự phát triển của nấm men đối kháng trong môi trường nuôi cấy có bổ sung CaCl_2 là môi trường bảo quản có khả

năng thích ứng tốt hơn đối với chủng nấm men đối kháng. Do đó, chúng tôi tiếp tục sử dụng thành phần này kết hợp với nấm men đối kháng để nghiên cứu ảnh hưởng của chúng đối với nấm mốc gây hỏng trên quả thanh long. Phương pháp tiến hành theo mục 2.2.6, kết quả thể hiện ở bảng 4.12.

Bảng 4.12: Ảnh hưởng của chitosan và nấm men *Candida sake* TL1 có bổ sung CaCl_2 0,5% đến sự phát triển của nấm mốc gây hỏng trên quả thanh long

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ nhiễm nấm mốc sau 7 ngày bảo quản (%)	
	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ĐC	100	100
CT1	34	30
CT2	67	78
CT3	60	69
CT4	23	20
CT5	18	16

Chú thích:

Công thức 1 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml.

Công thức 2 - Dung dịch chitosan

Công thức 3 - Dung dịch chitosan bổ sung 0,5% CaCl_2

Công thức 4 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan.

Công thức 5 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl_2 .

- Đối chứng: nước cất tiệt trùng.

Nhìn vào bảng 4.12, ta thấy sau 7 ngày ở lô đối chứng các vết thương trên thanh long được nhiễm nấm mốc *Aspergillus Niger* và nấm mốc *Penicillium* với lượng tế bào là 1×10^4 CFU/ml có tỷ lệ bị hỏng là 100%. Ở lô thí nghiệm công thức CT1 với nấm mốc *A. Niger* có bổ sung 1×10^7 CFU/ml tế bào nấm men *Candida sake* TL1 tỷ lệ vết thương bị hỏng là 30%, với nấm mốc *Penicillium* có bổ sung tế bào nấm men *Candida sake* TL1 tỷ lệ vết thương bị hỏng là 34%. Ở CT2 chỉ sử dụng 0,5% chitosan, với nấm mốc *Penicillium* lệ vết thương bị hỏng là 67%, với nấm mốc *A. Niger* lệ vết thương bị hỏng là 78%. Công thức CT3: thí nghiệm bổ sung 0,5% chitosan và CaCl_2 0,5% thì tỷ lệ vết thương bị hỏng ở những lô có nấm mốc *Penicillium* là 60%, *A. Niger* là 69%. Công thức CT4: có dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml và 0,5% chitosan, tỷ lệ vết thương bị hỏng ở những lô có nấm mốc *Penicillium* là 23%, *A. Niger* là 20%. Ở công thức CT₅: có dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl_2 , tỷ lệ vết thương bị hỏng ở những lô có nấm mốc *Penicillium* là 18%, *A. Niger* là 16%. Như vậy, ở những vết thương được xử lý bằng dịch tế bào nấm men *Candida sake* LT1 và

0,5% chitosan có bổ sung 0,5% CaCl_2 có tỷ lệ vết thương bị hỏng là thấp nhất. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wilson và cộng sự, đã sử dụng 0,1% chitosan + 0,5% CaCl_2 + *Candida saitoana* ức chế sự phát triển của nấm mốc *Penicillium expansum* trên cam và chanh tỷ lệ thời hỏng là 33% [37].

4.4. Kết quả nghiên cứu công nghệ nhân nuôi chủng nấm men *Candida sake* L81

4.4.1. Nghiên cứu công nghệ nhân nuôi ở quy mô phòng thí nghiệm

4.4.4.1. Lựa chọn môi trường thích hợp cho nhân nuôi *Candida sake* TL1

Chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng nấm men trên 3 loại môi trường khác nhau, gồm: môi trường malt, môi trường rỉ đường và môi trường rỉ đường kết hợp với muối khoáng. Kết quả được trình bày trong bảng 4.13.

Bảng 4.13: Mật độ tế bào của chủng nấm men *Candida sake* TL₁ trên các môi trường khác nhau

STT	Môi trường	Mật độ tế bào <i>C. Sake</i> (CFU/ml)
1	Malt	$3,4 \times 10^9$
2	Rỉ đường	$1,5 \times 10^9$
3	Rỉ đường+vi lượng	$2,9 \times 10^9$

Kết quả ở bảng 4.13 cho thấy mật độ tế bào *C.sake* đạt được cao nhất trên môi trường nước chiết malt là $3,4 \times 10^9$ CFU/ml, tiếp theo trên môi trường rỉ đường + vi lượng mật độ tế bào *C. sake* TL1 là $2,9 \times 10^9$ CFU/ml và thấp nhất là $1,5 \times 10^9$ CFU/ml khi nuôi *C. sake* TL1 trên môi trường rỉ đường.

Từ kết quả này chúng tôi nhận thấy rằng, môi trường nước chiết malt là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của nấm men TL1. Nguồn đường trong nước chiết malt chủ yếu là glucoza do đó nấm men dễ tiêu thụ hơn các loại đường khác có trong rỉ đường. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả đã thử khả năng đồng hóa một số loại đường của nấm men TL1. Tuy nhiên, ở quy mô pilot chúng tôi chọn môi trường rỉ đường + vi lượng vì không chỉ là môi trường thu được lượng sinh khối nấm men khá cao mà còn là môi trường rẻ tiền mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn so với môi trường nước chiết malt.

4.4.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Nhiệt độ đóng vai trò chủ yếu trong sự sinh trưởng của vi sinh vật và tác động đến việc nảy chồi của nấm men. Thí nghiệm được tiến hành với các khoảng nhiệt độ thay đổi từ lần lượt là: 24, 26, 28, 30, 32 và 34°C.

Kết quả xác định nhiệt độ tốt nhất cho hiệu quả tạo sinh khối nấm men được trình bày ở bảng 4.14.

Bảng 4.14: Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

STT	Nhiệt độ (°C)	Mật độ tế bào <i>C.sake</i> TL1 (CFU/ml)
1	24	$2,5 \times 10^9$
2	26	$3,0 \times 10^9$
3	28	$3,4 \times 10^9$
4	30	$3,3 \times 10^9$
5	32	$2,4 \times 10^9$
6	34	$2,0 \times 10^9$

Kết quả ở bảng 4.14 cho thấy ở nhiệt độ 28°C mật độ tế bào *C. sake* TL1 thu được cao nhất đạt $3,4 \times 10^9$ CFU/ml, tiếp theo ở nhiệt độ 30°C mật độ tế bào là $3,3 \times 10^9$ CFU/ml. Ở các khoảng nhiệt độ khảo sát còn lại mật độ tế bào *C. sake* đạt thấp hơn. Kết quả này cho thấy nhiệt độ thích hợp nhất để nuôi cấy nấm men *C. sake* TL₁ là 28°C, kết quả nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu của Wilson và cộng sự [8] khi nghiên cứu nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho nấm men *C. sake* phát triển là trong khoảng 22-28°C.

4.4.4.3. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và phát triển của nấm men. Nếu kết thúc quá trình nuôi cấy thì sản lượng sinh khối tế bào chưa đạt đến tối đa, nếu kết thúc muộn thì sẽ ảnh hưởng đến chất lượng giống cũng như tăng chi phí sản xuất.

Kết quả xác định ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng phát triển của chủng nấm men TL₁ được trình bày ở bảng 4.15.

Bảng 4.15: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

STT	Thời gian nuôi cấy (h)	Mật độ tế bào <i>C.sake</i> x10 ⁸ (CFU/ml)
1	6	3,56
2	12	5,70
3	24	10,56
4	36	21,07
5	48	26,70
6	60	28,90
7	72	34,05
8	84	35,66
9	96	36,01
10	102	35,20
11	108	34,20

Từ số liệu thu được có thể thấy rằng: mật độ tế bào nấm men *C.sake* TL₁ tăng dần theo thời gian nuôi cấy và đạt cực đại là 36,01 x 10⁸ CFU/ml tại 96h. Tuy nhiên, mức độ tăng không nhiều so với thời điểm 72h nuôi cấy, ở thời điểm 72h nuôi cấy mật

độ tế bào đã đạt $34,05 \times 10^8$ CFU/ml. Vì vậy, để giảm chi phí sản xuất chúng tôi chọn thời gian lên men chủng nấm men *Candida sake* TL1 là 72h.

4.4.4.4. Ảnh hưởng pH môi trường

Kết quả theo dõi khả năng tạo sinh khối của *Candida sake* TL₁ sau 72 giờ nuôi cấy được trình bày ở bảng 4.16

Bảng 4.16: Mật độ tế bào của chủng nấm men *C.sake* TL₁ nuôi cấy ở pH khác nhau

STT	pH	Mật độ tế bào <i>C.sake</i> $\times 10^9$ (CFU/ml)
1	5,0	1,74
2	5,5	2,32
3	6,0	3,46
4	6,5	3,57
5	7,0	3,11
6	7,5	2,13

Kết quả thu được ở trên cho thấy: tại pH 5; 5,5; 7,5, mật độ tế bào thấp. Mật độ tế bào cao nhất cao nhất tại pH 6,5, đạt $3,57.10^9$ CFU/ml. Như vậy chủng nấm men *Candida sake* TL1 phát triển tốt ở pH trung tính từ 6 đến 7. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Wilson và cộng sự [8], tác giả đã chứng minh nấm men *Candida sake* có khả năng phát triển tốt nhất là ở pH 6,2 - 7,2 và ở 28⁰C.

4.4.2. Nghiên cứu công nghệ nhân nuôi ở quy mô Pilot 100lit/m³

4.4.2.1. Ảnh hưởng tốc độ khuấy

Chủng nấm men *C. sake* được nuôi cấy trong điều kiện có khuấy nên tốc độ khuấy có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình cung cấp oxy cho sự phát triển của tế bào. Để nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến quá trình nhân nuôi nấm men, chúng tôi tiến hành nhân nuôi chủng nấm men *C. sake* ở các tốc độ khuấy khác nhau 100, 150, 200, 250 và 300 vòng/phút; lấy mẫu xác định mật độ tế bào sau 72 giờ nuôi cấy. Kết quả được trình bày ở bảng 4.18

Bảng 4.17: Mật độ tế bào của chủng nấm men *C. sake* TL₁ khi nuôi cấy ở các tốc độ khuấy khác nhau

STT	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	Mật độ tế bào nấm men <i>Candida sake</i> TL1 (x10 ⁹ CFU/ml)
1	100	0,23
2	150	1,52
3	200	2,90
4	250	2,82
5	300	2,17

Kết quả cho thấy khi tốc độ khuấy là 100 và 150 vòng/phút thì mật độ tế bào thấp hơn ở tốc độ khuấy 200 vòng/phút (mật độ tế bào đạt cao nhất), nhưng khi tốc độ khuấy là 250 vòng/phút và 300 vòng/phút thì mật độ lại giảm. Như vậy tốc độ khuấy 200 vòng/phút là tốc độ thích hợp cho sự phát triển của nấm men *Candida sake* TL₁ khi nuôi cấy ở quy mô pilot.

4.4.2.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống

Trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của tỉ lệ giống, chúng tôi nuôi cấy giống nấm men trên môi trường rỉ đường + muối khoáng với tỉ lệ giống bổ sung ở các mức khác nhau là 5%, 7% và 9%. Kết quả xác định mật độ tế bào nấm men sau 72 giờ ở 28°C, pH= 6.5 được trình bày ở bảng 4.18

Bảng 4.18: Mật độ tế bào của chủng nấm men *C. sake* TL₁ ở các tỉ lệ giống khác nhau

STT	Tỷ lệ tiếp giống (%)	Mật độ tế bào (CFU/ml)
1	5	2,92 x 10 ⁹
2	7	3,34 x 10 ⁹
3	9	3,51 x 10 ⁹

Kết quả bảng 4.18 cho thấy khi tỉ lệ giống là 9% thì mật độ tế bào nấm men đạt cao nhất là $3,51.10^9$ /ml, tiếp theo khi tỉ lệ tiếp giống là 7% mật độ tế bào nấm men đạt $3,34.10^9$ /ml và mật độ tế bào đạt thấp nhất khi bổ sung 5% giống. Từ kết quả này chúng tôi nhận thấy khi bổ sung tỉ lệ giống là 7% và 9% thì mật độ tế bào nấm men không chênh nhau nhiều vì vậy để tính hiệu quả kinh tế cho quá trình lên men chúng tôi chọn tỉ lệ giống thích hợp là 7%.

4.4.2.3. Ảnh hưởng của độ oxy hòa tan trong quá trình nuôi cấy đến mật độ tế bào của chủng nấm men *Candida sake* TL1

Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của độ oxy hòa tan đến mật độ tế bào của chủng *C.sake* TL1 trong suốt quá trình nuôi cấy ở quy mô 100lit/mẻ, theo hai thí nghiệm sau:

Thí nghiệm 1: Duy trì độ oxy hòa tan 100% trong suốt quá trình nuôi cấy.

Thí nghiệm 2: Độ oxy hòa tan từ giờ thứ 12 giảm xuống 90% và duy trì đến khi kết thúc quá trình nuôi cấy.

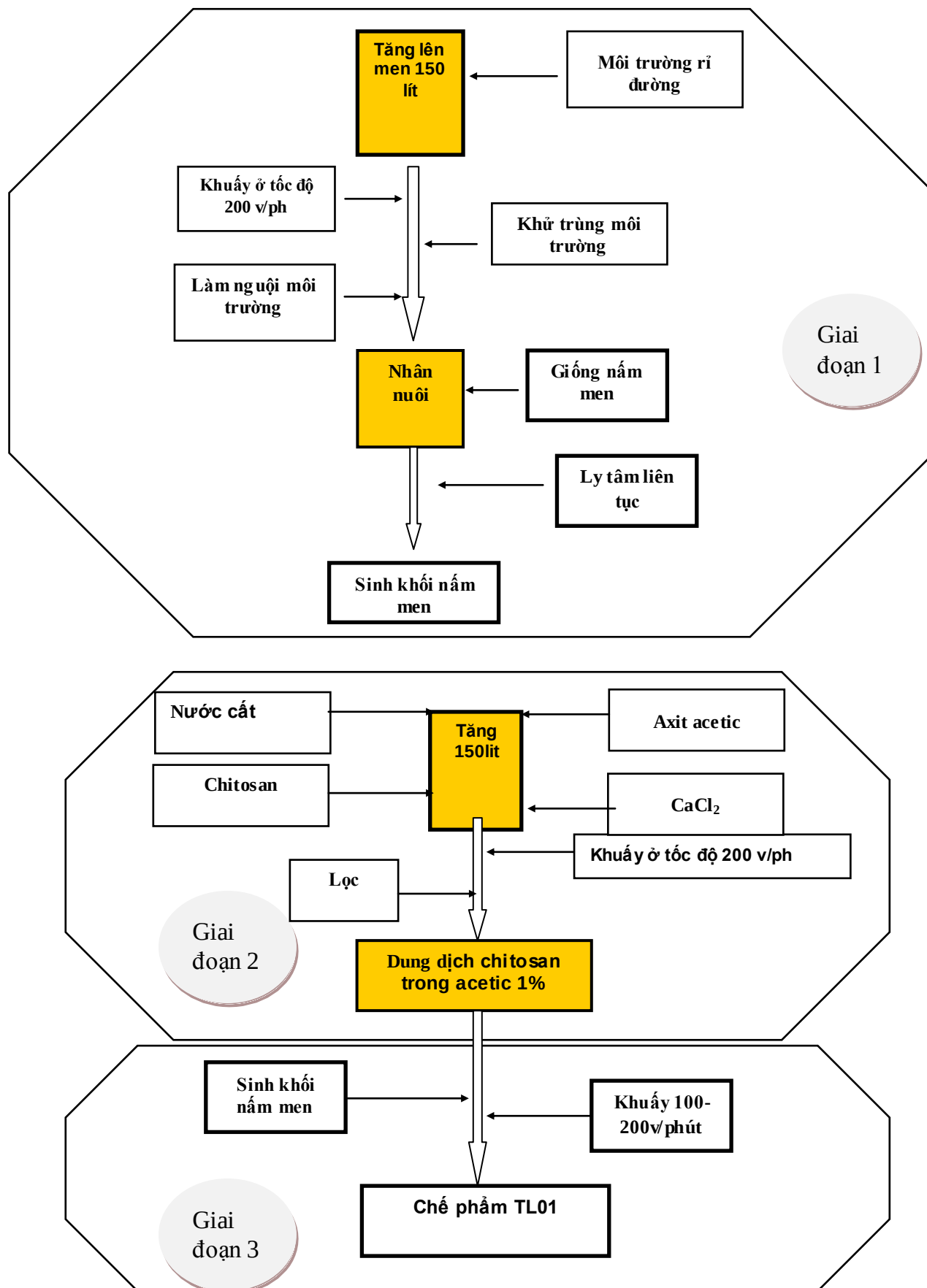
Tiến hành lấy mẫu và xác định mật độ tế bào từ giờ thứ 6 trở đi. Kết quả được trình bày ở bảng 4.20.

Bảng 4.19: Ảnh hưởng của độ oxy hòa tan

Thời gian lên men (h)	Thí nghiệm 1		Thí nghiệm 2	
	Độ oxy hòa tan (%)	Mật độ tế bào nấm men <i>C.sake</i> ($\times 10^8$ CFU/ml)	Độ oxy hòa tan (%)	Mật độ tế bào nấm men <i>C.sake</i> ($\times 10^8$ CFU/ml)
6	100	3,06	100	3,06
12	100	5,30	100	5,30
24	100	11,56	90	8,53
36	100	19,27	90	9,68
48	100	24,76	90	11,42
60	100	26,91	90	17,95
72	100	33,34	90	20,63
84	100	33,97	90	20,63
96	100	34,21	90	22,76
102	100	34,20	90	19,12
108	100	34,00	90	18,87

Kết quả bảng 4.19 cho thấy khi điều khiển độ oxy hòa tan trong suốt quá trình nuôi cấy chìm sục khí là 100%, mật độ tế bào nấm men *C.sake* TL1 cao nhất thu được là $34,21 \times 10^8$ CFU/ml tại thời điểm 96h. Khi độ oxy hòa tan được tác động trong quá trình nuôi cấy, giảm từ giờ thứ 12 xuống còn 90% ở thời gian còn lại của quá trình lên men, mật độ tế bào nấm men *C. sake* TL1 giảm xuống còn $22,76 \times 10^8$ CFU/ml tại thời điểm 96h. Chứng tỏ *C. sake* TL1 là chủng hiếu khí cao và cần oxy trong quá trình lên men tạo sinh khối.

4.4.3. Quy trình công nghệ nhân nuôi và tạo chế phẩm tạo màng chitosan kết hợp với nấm men đối kháng *Candida sake* TL01



Thuyết minh quy trình

Giai đoạn 1: Nhân nuôi, thu hồi sinh khối nấm men đối kháng

Chủng nấm men *Candida sake* được giữ giống bằng phương pháp đông khô hoặc bảo quản trong glyxerol ở tủ lạnh -20°C hoặc -80°C . Hoạt hoá giống và cấy truyền sang ống thạch nghiêng chứa môi trường nước chiết malt, nuôi cấy ở 28°C , trong 48h. Nhân giống *Candida sake* trên môi trường nước malt trong bình tam giác 500ml, thể tích môi trường nước malt là 150ml/bình. Lắc trên máy lắc tốc độ 200v/phút, ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 48 giờ. Tiếp giống với tỷ lệ 7% vào tăng lên men chứa 100 lít môi trường rỉ đường (pH: 6,5) đã được khử trùng ở 1atm trong 30 phút và làm nguội. Nhân nuôi nấm men đối kháng ở nhiệt độ 28°C , khuấy ở tốc độ 200v/phút, độ oxy hòa tan 100%. Sau 72h dừng lên men, ly tâm 16.000v/phút thu hồi sinh khối nấm men.

Giai đoạn 2: Pha chế dung dịch chitosan

Tăng inox (dung tích 150 lít, có cánh khuấy và hệ thống gia nhiệt) cho 99 lit dung dịch axit acetic 1%, sau đó cho chitosan vào bật cánh khuấy với tốc độ 200 vòng/phút trong 10 giờ. Dung dịch chitosan thô được lọc qua màng lọc, sau đó bổ sung nước cất đến 100lít, khuấy với tốc độ 200 vòng/phút trong vòng 2 giờ. Bổ sung 500g CaCl_2 , khuấy với tốc độ 150-250 vòng/phút trong 2h. Ta thu được dung dịch chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl_2

Giai đoạn 3: Phối trộn tạo chế phẩm nấm men đối kháng *Candida sake* TL01

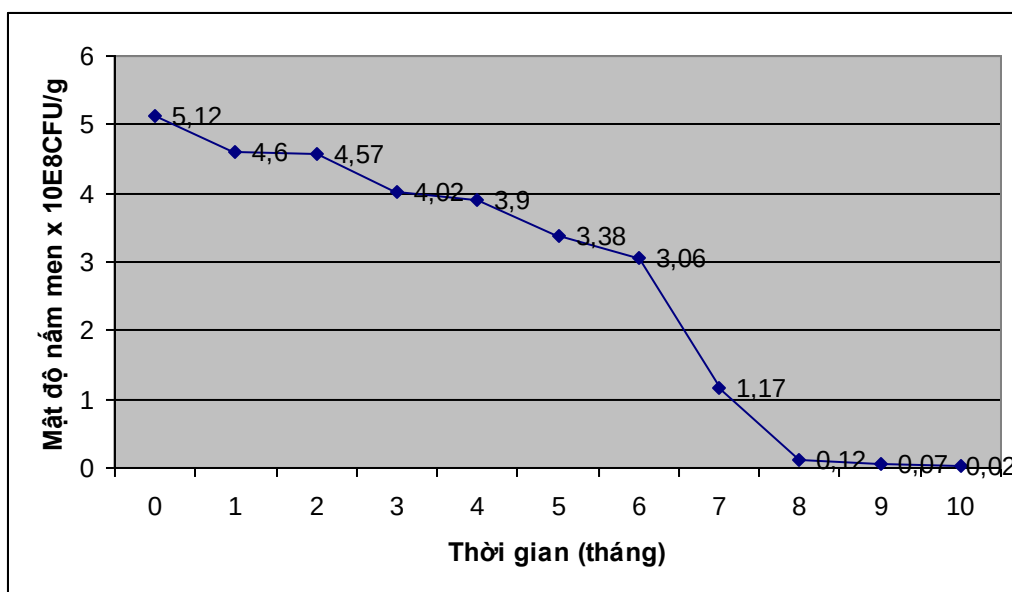
Sinh khối nấm men *Candida sake* sau ly tâm được chuẩn độ (mật độ luôn luôn $> 10^9\text{CFU/g}$) sẽ được bổ sung vào dung dịch chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl_2 với một lượng thích hợp (sao cho 100 lít dịch tạo thành có mật độ nấm men *Candida sake* đạt từ $2-5.10^8\text{CFU}$) rồi khuấy 200 vòng/phút trong 10 phút. Dung dịch tạo thành được rót vào can 5 lít và bảo quản.

4.5. Nghiên cứu tính ổn định và an toàn sinh học của chế phẩm *Candida sake* TL01

4.5.1. Nghiên cứu tính ổn định của chế phẩm *Candida sake* TL01

Chế phẩm *Candida sake* TL01 ngoài khả năng đối kháng cao cần đảm tính ổn định sau thời gian bảo quản, lưu thông phân phối đến tay người sử dụng. Chúng tôi tiến

hành xác định mật độ nấm men *Candida sake* TL01 trong chế phẩm sau các khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6... và 10 tháng bảo quản. Kết quả được trình bày trên đồ thị 4.3



Đồ thị 4.3: Khả năng tồn tại của *Candida sake* TL1 trong chế phẩm TL01

Đồ thị 4.3 cho thấy, mật độ nấm men đối kháng trong chế phẩm giảm dần theo thời gian bảo quản. Mật độ giảm chậm trong khoảng từ 1-6 tháng bảo quản (mật độ nấm men trong chế phẩm ban đầu là $5,12 \times 10^8$ CFU/g giảm xuống còn $3,06 \times 10^8$ CFU/g). Sau 6 tháng mật độ nấm men trong chế phẩm giảm nhanh, sau 10 tháng bảo quản mật độ nấm men trong chế phẩm là 2×10^6 CFU/g. Điều này chứng tỏ các thành phần trong chế phẩm không ảnh hưởng nhiều đến khả năng tồn tại của nấm men *Candida sake* TL01 trong khoảng 6 tháng bảo quản.

4.5.2. Nghiên cứu tính an toàn sinh học của chế phẩm *Candida sake* TL01

Kết quả thăm dò trong thử nghiệm trên chuột tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương sơ bộ cho thấy, chế phẩm TL01 thử nghiệm không có các thành phần gây độc có thể gây độc tính cấp. Kết quả thử nghiệm trên 40 con chuột, chia thành 4 nhóm gồm 1 nhóm đối chứng dùng dung dịch hồ tinh bột 5% và 3 nhóm thử theo mức liều đã xây dựng ở phần vật liệu phương pháp. Kết quả nghiên cứu thử nghiệm tính an toàn của chế phẩm TL01 trên chuột được trình bày ở bảng 4.21.

Bảng 4.20: Bảng theo dõi trọng lượng chuột

STT	Nhóm chứng		STT	Nhóm thử 1	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
1	18.0	25.0	11	18.5	25.5
2	18.5	25.5	12	18.0	24.5
3	18.0	24.0	13	18.0	25.0
4	18.0	25.0	14	18.5	24.0
5	19.0	26.5	15	19.0	25.5
6	18.5	27.0	16	18.0	26.0
7	18.0	25.0	17	19.0	27.0
8	18.0	25.5	18	18.5	25.5
9	18.0	24.0	19	18.0	24.0
10	18.5	26.0	20	18.5	24.5
STT	Nhóm thử 2		STT	Nhóm thử 3	
	Trước TN (g)	Sau TN (g)		Trước TN (g)	Sau TN (g)
21	18.0	24.5	31	18.5	24.5
22	18.5	24.5	32	18.0	26.0
23	18.5	24.0	33	18.5	26.0
24	18.5	25.0	34	18.5	24.5
25	19.0	26.0	35	18.5	25.5
26	18.5	27.0	36	18.0	24.5
27	18.0	25.5	37	18.0	24.0
28	18.5	26.0	38	19.0	26.0
29	18.5	25.5	39	18.5	25.0
30	19.0	26.0	40	18.0	25.5

Chuột ở nhóm chứng và các nhóm thử sau thời gian theo dõi đều tăng trọng lượng cơ thể (g) so với trọng lượng ban đầu.

Tiêu thụ thức ăn và nước uống của chuột:

- Nhóm chứng: Hoạt động và ăn uống bình thường.
- Các nhóm thử: Sau khi uống thuốc và trong 7 ngày theo dõi nhóm thử không nhận thấy có biểu hiện gì khác thường so với nhóm chứng.

Quan sát dấu hiệu ngộ độc:

Không nhận thấy có biểu hiện ngộ độc ở các nhóm thử sau khi uống mẫu thử và trong thời gian theo dõi. Không có chuột chết trong quá trình thử nghiệm

Mẫu Chế phẩm nấm men đối kháng *Candida sake* TL1 do Bộ môn Nghiên cứu Công nghệ sinh học sau thu hoạch – Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ Sau thu hoạch gửi tới yêu cầu thử độc tính cấp trên chuột nhắt trắng có kết quả như sau: Cho chuột uống nguyên mẫu thử với mức liều từ 20 – 60 ml mẫu thử/ kg chuột không nhận thấy biểu hiện gì khác thường không nhận thấy biểu hiện ngộ độc trên chuột thí nghiệm trong thời gian theo dõi. Tất cả chuột đều ăn uống, hoạt động bình thường. Không xác định được liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD50) vì ở mức liều tối đa có thể cho uống không gây chết chuột.

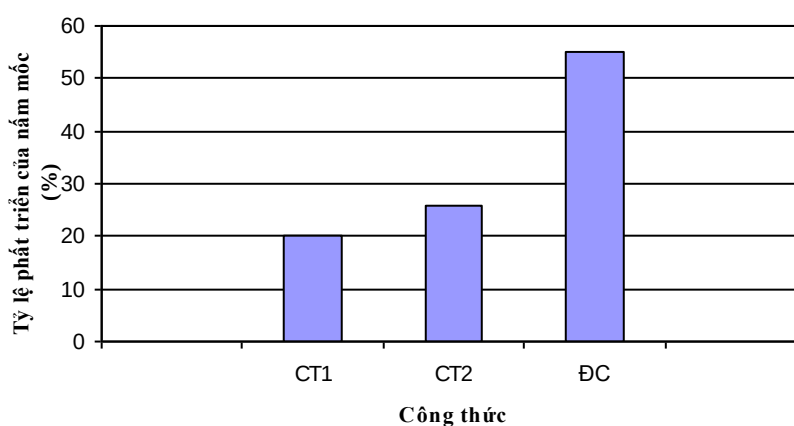
4.6. Xây dựng quy trình bảo quản thanh long thương phẩm bằng chế phẩm TL01

4.6.1. Nghiên cứu xử lý quả thanh long trước bảo quản bằng một số chất sát trùng thông thường

Đề tài tiến hành khảo sát tác dụng của một số chất sát trùng thông thường tới sự phát triển của nấm mốc gây thối hỏng trên quả thanh long Bình Thuận. Đó là nước Clorin và dung dịch 3% Na_2CO_3 . Để so sánh, thực nghiệm được bố trí gồm 3 công thức như sau:

- ĐC: Ngâm trong nước máy ở nhiệt độ phòng trong 120 giây
- CT1: Ngâm trong nước Clorin 0,1% ở nhiệt độ phòng trong 120 giây
- CT2: Ngâm dung dịch 3% Na_2CO_3 ở nhiệt độ phòng trong 120 giây

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở 4.13



Hình 4.13: Hiệu quả sau 5 ngày xử lý nấm mốc gây thối hỏng bằng một số chất sát trùng

(ĐC: Nước thường; CT1: Nước Clorin trong 120 giây; CT2: 3% Na_2CO_3 trong 120 giây)

Từ hình 4.13 cho thấy hiệu quả của một số chất sát trùng thông thường cũng làm giảm được khoảng một nửa tỷ lệ phát triển của nấm mốc gây thối hỏng trên quả thanh long so với đối chứng (ĐC). Kết quả phát triển nấm mốc sau xử lý 5 ngày cho thấy công thức CT1 ngâm dung dịch Clorin trong 120 giây và CT2 ngâm trong dung dịch 3% Na_2CO_3 đều có tác dụng hạn chế nấm mốc phát triển và không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai loại dung dịch này. Chúng tôi không quan sát thấy các biểu hiện tổn thương hình thức bề mặt quả ở các công thức.

Việc chọn Clorin 0,1% vì chất sát trùng này được khuyến cáo sử dụng rộng rãi trong sát trùng nước máy và nhiều loại rau quả tươi.

4.6.2. Thử nghiệm bảo quản thanh long thương phẩm bằng chế phẩm TL-01 (chitosan + nấm men đối kháng + CaCl_2)

Như đã nêu trong phần vật liệu và phương pháp mục 2.2.7 chúng tôi tiến hành bảo quản thanh long thương phẩm với các 3 công thức thí nghiệm tuân theo quy trình bảo quản thanh long VietGAP: Thanh long sau khi xử lý chế phẩm được để khô ở nhiệt độ thường, có thông gió cưỡng bức, sau đó được bao gói trong túi PE có đục lỗ, đặt trong thùng cacton và đưa vào bảo quản ở nhiệt độ 5°C , độ ẩm 85-90%. Định kỳ lấy mẫu kiểm tra các chỉ tiêu: hao hụt khối lượng tự nhiên, biến đổi màu sắc quả, biến đổi độ cứng, hàm lượng chất khô hòa tan và mật độ nấm men đối kháng tồn tại trên quả.

4.6.2.1. Ảnh hưởng của chế phẩm TL-01 đến tỉ lệ hao hụt khối lượng tự nhiên của thanh long trong quá trình bảo quản

Hao hụt khối lượng tự nhiên là sự giảm khối lượng của rau quả trong quá trình bảo quản do sự thoát hơi nước và tổn hao các chất hữu cơ trong khi hô hấp. Hao hụt khối lượng tự nhiên có ảnh hưởng rất lớn tới hiệu quả kinh tế của công tác bảo quản. Nó làm hao hụt khối lượng, giảm giá trị dinh dưỡng cũng như ảnh hưởng lớn tới hình thức bên ngoài của quả. Sự giảm khối lượng tự nhiên là không thể tránh khỏi trong quá trình bảo quản bất kỳ loại rau quả nào, với bất kỳ hình thức tồn trữ bảo quản nào. Tuy nhiên nếu chọn được phương pháp và điều kiện tồn trữ tối ưu có thể làm giảm được sự hao hụt khối lượng tới mức tối thiểu. Kết quả thí nghiệm được mô tả bằng bảng 4.21 và đồ thị 4.3

Bảng 4.21: Tỷ lệ hao hụt khối lượng tự nhiên của quả sau thời gian bảo quản

CT	Tỷ lệ hao hụt (%) sau thời gian bảo quản				
	Sau 10 ngày	Sau 20 ngày	Sau 30 ngày	Sau 35 ngày	Sau 37 ngày
ĐC	1.45 ^a	4.25 ^a	5.14 ^a	6.58 ^a	9.79 ^a
CT1	0.59 ^b	1.88 ^b	3.43 ^b	4.80 ^b	6.15 ^c
CT2	0.49 ^c	1.47 ^c	3.05 ^c	4.15 ^c	7.20 ^b
CT3	0.53 ^{bc}	1.09 ^d	1.9 ^d	2.62 ^d	3.74 ^d

(Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$)

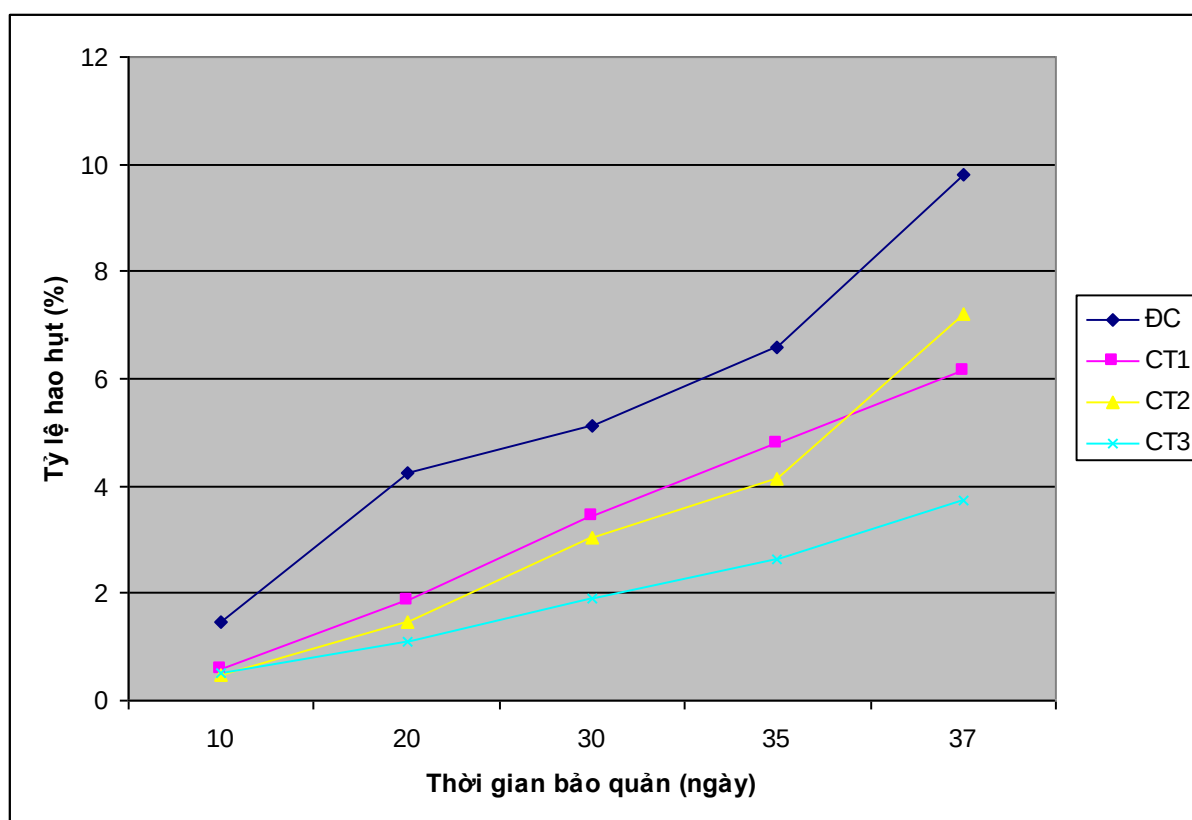
Chú thích:

Đối chứng: Không sử dụng bất kỳ chất bảo quản nào.

Công thức 1 - Dung dịch 0,5% chitosan bổ sung 0,5% CaCl_2 .

Công thức 2 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan.

Công thức 3 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl_2 .



Đồ thị 4.4: Tỷ lệ hao hụt khối lượng tự nhiên (%) của quả thanh long trong quá trình bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng

Qua bảng 4.21 và đồ thị 4.4 chúng tôi nhận thấy, hao hụt khối lượng tự nhiên diễn ra ở tất cả các công thức và đều tăng dần theo thời gian bảo quản. Cụ thể công thức ĐC có tỉ lệ hao hụt khối lượng tự nhiên sau 10 ngày bảo quản là 1.45%, tỉ lệ này tiếp tục tăng mạnh trong các ngày bảo quản tiếp theo và lên tới 4,25% sau 20 ngày bảo quản, sau 37 ngày bảo quản tỉ lệ hao hụt là 9,79%. Hao hụt khối lượng tự nhiên ở công thức ĐC là lớn nhất và khác biệt nhất so với các công thức được phủ màng trong cùng điều kiện bảo quản (ở mức ý nghĩa 0.05). Các công thức được phủ màng tuy sự hao hụt vẫn diễn ra nhưng tỉ lệ hao hụt giảm rõ rệt so với công thức ĐC. Sau 10 ngày bảo quản, hao hụt khối lượng tự nhiên ở CT1 là 0.59%, CT2 là 0.49%, CT3 là 0.53%. Các ngày bảo tiếp theo tỉ lệ hao hụt tiếp tục giảm, sau 20 ngày bảo quản, tỉ lệ này là 1,88% ở CT1, 1,47% ở CT2, 1,09% ở CT3. Trong các công thức có màng phủ thì CT3 có tỉ lệ hao hụt thấp nhất chứng tỏ màng CT₃ có khả năng chống mất nước và hạn chế quá trình hô hấp tốt nhất. Điều này được thể hiện rất rõ trên đồ thị 3.3.

Như vậy, có thể khẳng định chế phẩm màng bao chitosan kết hợp với nấm men đối kháng dùng trong bảo quản thanh long có thể làm giảm tỉ lệ hao hụt khối lượng tự nhiên ở quả.

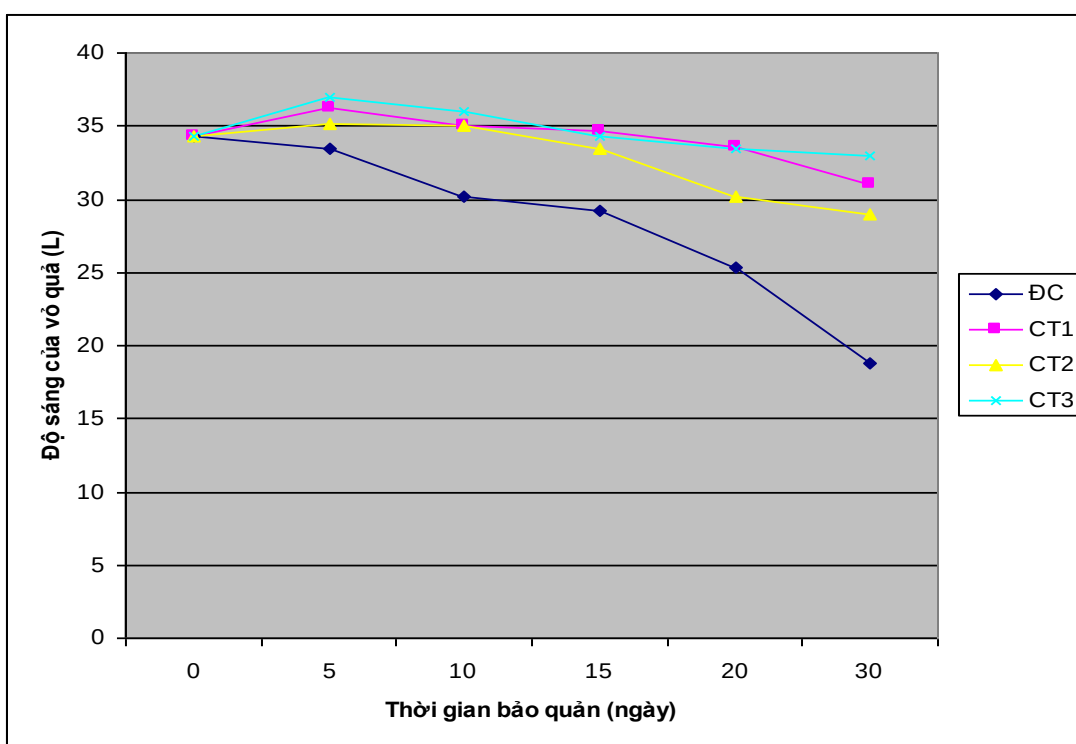
4.6.2.2. Ảnh hưởng của chế phẩm tạo màng tới sự biến đổi màu sắc của vỏ quả

Màu sắc bên ngoài của quả thanh long là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng của quả. Trong quá trình bảo quản các quá trình sinh lý, sinh hóa vẫn diễn ra mạnh mẽ. Quá trình này được biểu hiện ra bên ngoài chính là sự biến đổi màu sắc vỏ quả. Để khảo sát ảnh hưởng của màng phủ tới sự thay đổi màu sắc vỏ quả chúng tôi đã tiến hành đo màu sắc vỏ quả theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.3. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.22.a; đồ thị 4.5.a và bảng 4.22.b; đồ thị 4.5.b.

Bảng 4.22.a. Sự biến đổi độ sáng vỏ quả thanh long(L) được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau

CT	Thời gian bảo quản (ngày)					
	Nguyên liệu	Sau 5 ngày	Sau 10 ngày	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 37 ngày
ĐC	34,36 ^a	33,45 ^c	30,15 ^c	29,17 ^c	25,32 ^d	18,82 ^d
CT1	34,36 ^a	36,25 ^{ab}	35,01 ^b	34,67 ^a	33,58 ^a	30,98 ^b
CT2	34,36 ^a	35,12 ^b	35,01 ^b	33,51 ^b	30,19 ^{bc}	28,96 ^c
CT3	34,36 ^a	36,97 ^a	35,94 ^a	34,28 ^a	33,48 ^a	32,91 ^a

Qua bảng 4.22.a và đồ thị 4.3.a chúng ta thấy độ sự biến đổi độ sáng của vỏ quả (L) ở tất cả các công thức CT1,CT2,CT3 đều tăng nhẹ ở thời kỳ đầu bảo quản (trong khoảng 5 ngày đầu sau khi bảo quản). Độ sáng của vỏ quả ban đầu 34,36, sau 5 ngày bảo quản các độ sáng ở các công thức tăng lên CT1: 36,25; CT2:36,12; CT3: 36,97 còn ở công thức đối chứng độ sáng giảm ngay từ những ngày đầu nguyên nhân là do các công thức màng bao giúp tăng độ láng bóng bề mặt, tăng độ sáng cho vỏ quả. Thời gian bảo quản càng tăng, độ cứng của quả giảm dần, vỏ khó tách ra khỏi thịt quả hơn, tai quả xuất hiện hiện tượng chuyển màu và héo, đốm nâu dần xuất hiện, độ sáng của quả giảm đi. Nhìn vào đồ thị 4.3.a ở công thức đối chứng sự chuyển màu của vỏ quả lớn hơn ở các công thức khác, thời gian bảo quản càng dài thì sự khác biệt càng rõ rệt do vỏ quả biến đổi mạnh, tai quả úa dần, đốm nâu xuất hiện màu vỏ giảm mạnh. Ở CT1, CT2, CT3 độ sáng của vỏ quả khác nhau không nhiều tuy nhiên công thức CT3 có độ sáng của vỏ quả cao hơn các công thức khác, vẫn giữ được độ sáng bóng của vỏ quả sau 37 ngày bảo quản.



Đồ thị 4.5.a. Sự biến đổi độ sáng vỏ quả thanh long (L) được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau

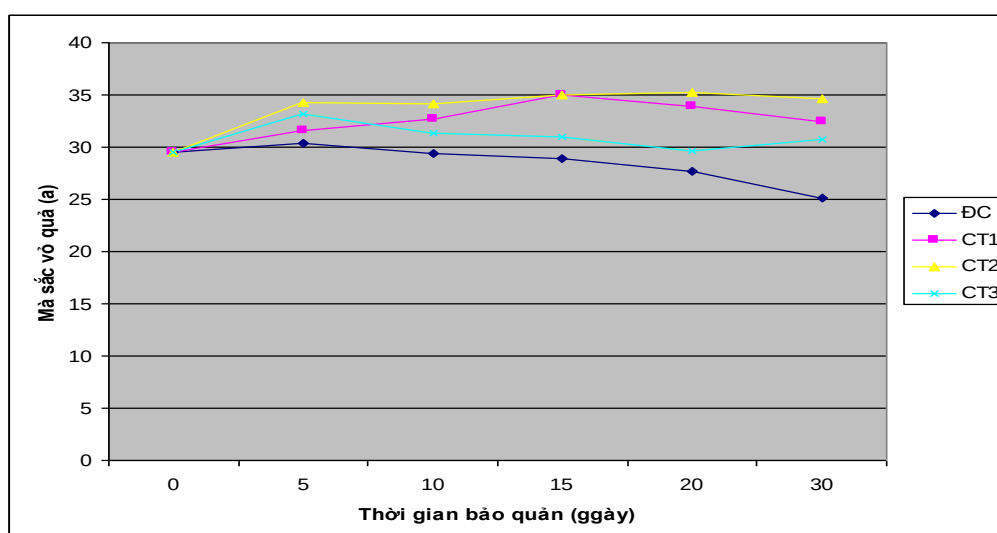
Sự biến đổi màu sắc vỏ quả được thể hiện bằng giá trị a cũng tuân theo quy luật tương tự được thể hiện qua bảng 4.22.b và đồ thị 4.5b.

Giá trị a biểu thị cho dải màu từ xanh lá cây (-60) đến đỏ (+60). Trong những ngày đầu bảo quản màu sắc của vỏ quả đậm hơn do sắc đỏ của quả ban đầu khi mới thu hoạch có độ tươi hơn sau khi bảo quản màu vỏ có sự chuyển hóa của các sắc tố anthocyanin, carotenoid, các chất hòa tan tăng, độ cứng của quả giảm làm cho màu sắc của vỏ quả sẫm hơn được thể hiện rất rõ qua đồ thị 4.5b. Tuy nhiên ở công thức đối chứng, sắc đỏ chỉ tăng ở những ngày đầu bảo quản (5 ngày đầu) còn sau đó thì giảm dần. Ở những công thức màng bao đặc biệt ở công CT2, CT3 giúp tăng màu sắc của vỏ quả và giữ được màu sắc trong suốt thời gian bảo quản.

Bảng 4.22b. Sự biến đổi màu sắc vỏ quả (a) được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau

CT	Thời gian bảo quản (ngày)					
	Nguyên liệu	Sau 5 ngày	Sau 10 ngày	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 37 ngày
ĐC	29,55 ^a	30,38 ^d	29,44 ^d	28,87 ^c	27,63 ^d	25,07 ^d
CT1	29,55 ^a	31,56 ^c	32,64 ^b	35,01 ^a	33,91 ^b	32,43 ^b
CT2	29,55 ^a	34,32 ^a	34,13 ^a	34,97 ^a	35,19 ^a	34,61 ^a
CT3	29,55 ^a	33,17 ^b	31,38 ^c	30,95 ^b	29,67 ^c	30,75 ^c

(Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$)



Đồ thị 4.5b. Sự biến đổi màu sắc vỏ quả (a) được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau

Như vậy thanh long được phủ màng có màu sắc sáng và tươi lâu hơn so với đối chứng không phủ màng và công thức màng bao: bằng 0,5% chitosan kết hợp với nấm

men đối kháng và 0,5% CaCl_2 giữ cho quả có màu sắc đậm hơn, sáng bóng hơn và tươi lâu hơn.

4.6.2.3. Ảnh hưởng của chế phẩm tạo màng tới sự biến đổi độ cứng của ruột quả

Độ cứng của ruột quả là một trong những chỉ tiêu vật lý quan trọng để đánh giá sự thay đổi trạng thái kết cấu của ruột quả. Để khảo sát ảnh hưởng của chế phẩm tạo màng đến sự biến đổi của độ cứng ruột quả trong quá trình bảo quản, chúng tôi đã tiến hành theo dõi và xác định theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.4 Kết quả thu được thể hiện ở bảng 4.23 và đồ thị 4.6

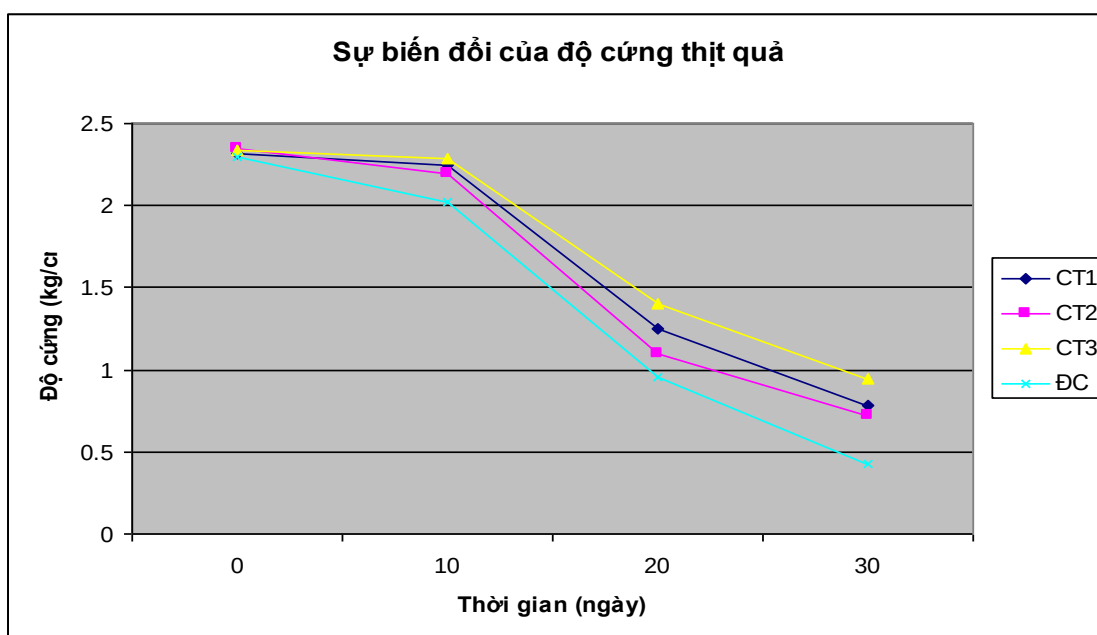
Bảng 4.23: Sự biến đổi độ cứng của ruột quả thanh long được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau (đơn vị kg/cm^2)

Công thức	Thời gian bảo quản			
	Nguyên liệu	Sau 10 ngày	Sau 20 ngày	Sau 37 ngày
CT1	2.32 ^a	2.25 ^a	1.25 ^{ab}	0.78 ^b
CT2	2.35 ^a	2.20 ^a	1.10 ^{ab}	0.72 ^{bc}
CT3	2.34 ^a	2.29 ^a	1.40 ^a	0.95 ^a
ĐC	2.30 ^a	2.02 ^a	0.96 ^c	0.43 ^d

(Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$)

Qua bảng 4.23 và đồ thị 4.6 chúng tôi nhận thấy độ cứng ở tất cả các công thức đều giảm trong suốt quá trình bảo quản. Tuy nhiên ở các công thức khác nhau có tốc độ giảm khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$. Công thức đối chứng, độ cứng giảm nhanh so với các công thức khác và giảm mạnh từ ngày thứ 10 sau khi bảo quản. Sau 37 ngày bảo quản, độ cứng của công thức ĐC chỉ còn 0,43(kg/cm^2). CT1, CT2 và CT3 độ cứng của quả đều giảm sau ngày thứ 10 bảo quản tuy nhiên công thức CT1, CT3 có độ cứng giảm chậm hơn so với các công thức khác. Điều này được thể hiện rất rõ ở trên đồ thị 3.5. Do trong CT1 và CT3 có bổ sung CaCl_2 có tác dụng làm tăng độ cứng cho quả.

Độ cứng có liên quan chặt chẽ tới sự chín của quả, khi chín dưới tác dụng của các enzyme trong quả, tinh bột được chuyển thành đường và pectin không hoà tan sẽ bị biến đổi thành pectin hoà tan làm kết cấu của ruột quả mềm hơn.



Đồ thị 4.6: Sự biến đổi độ cứng của ruột quả thanh long được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau (đơn vị kg/cm²)

Như vậy, màng phủ 0,5% chitosan kết hợp với nấm men đối kháng có bổ sung CaCl₂ có tác dụng giữ độ cứng cho quả.

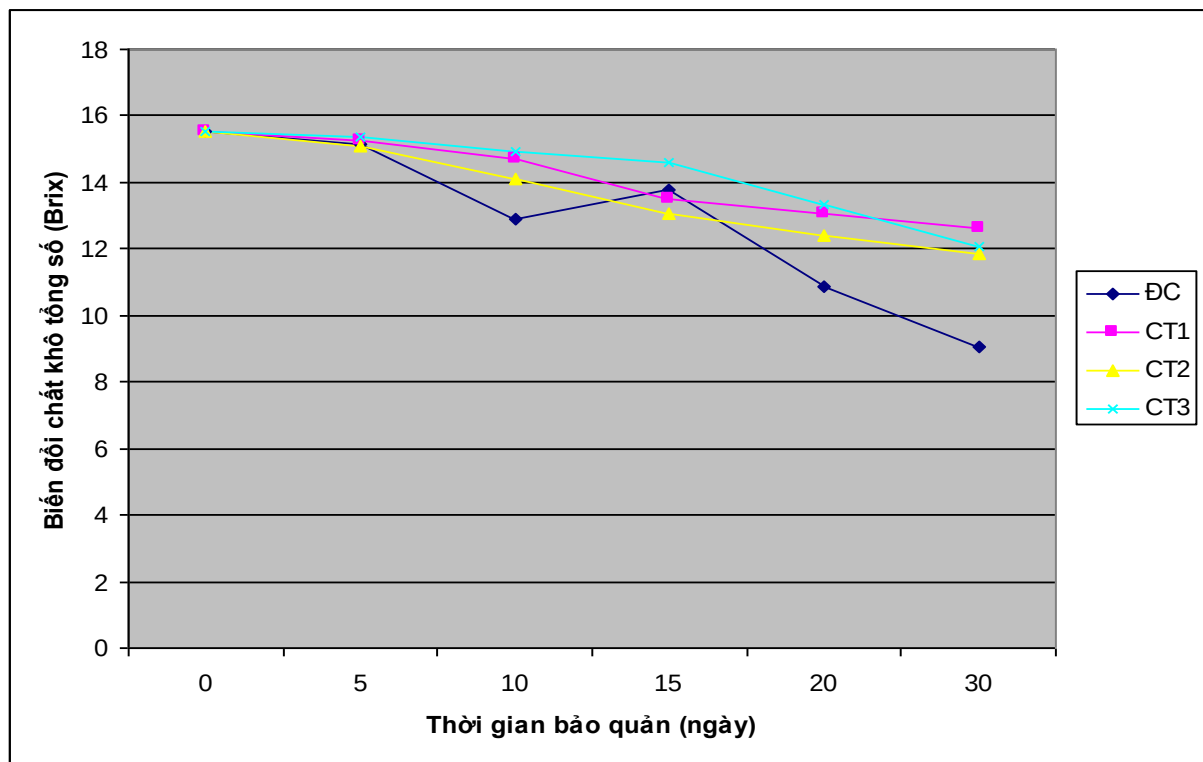
4.6.2.4. Ảnh hưởng của chế phẩm tạo màng tới sự biến đổi hàm lượng chất rắn hoà tan trong quả

Để khảo sát ảnh hưởng của việc phủ màng tới sự biến đổi hàm lượng chất rắn hoà tan trong quá trình bảo quản thanh long chúng tôi đã tiến hành theo dõi và xác định hàm lượng chất rắn hoà tan theo phương pháp mô tả ở mục 2.3.5 và kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 4.24 và đồ thị 4.7

Bảng 4.24: Sự biến đổi hàm lượng chất khô tổng số của quả thanh long được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau

CT	Thời gian bảo quản (ngày)					
	Nguyên liệu	Sau 5 ngày	Sau 10 ngày	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 37 ngày
ĐC	15,55 ^a	15,16 ^b	12,91 ^d	13,79 ^b	10,85 ^d	9,05 ^d
CT1	15,55 ^a	15,27 ^{ab}	14,73 ^b	13,51 ^b	13,06 ^{ab}	12,64 ^a
CT2	15,55 ^a	15,11 ^{bc}	14,13 ^c	13,04 ^c	12,38 ^c	11,85 ^c
CT3	15,55 ^a	15,36 ^a	14,92 ^a	14,58 ^a	13,31 ^a	12,06 ^b

Ghi chú: Các giá trị cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$)



Đồ thị 4.7: Sự biến đổi hàm lượng chất khô tổng số của quả thanh long được bảo quản bằng các chế phẩm tạo màng khác nhau

Qua bảng 4.24 và đồ thị 4.7 chúng tôi nhận thấy hàm lượng chất rắn hoà tan của thanh long ở tất cả các công thức đều có xu hướng giảm đi trong thời gian bảo quản. Tuy nhiên mức độ thay đổi ở các công thức khác nhau là khác nhau (ở mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$). Trong 5 ngày đầu bảo quản, sự sai khác giữa các công thức chưa có ý nghĩa về mặt thống kê. Điều này có thể do trong giai đoạn đầu quá trình bảo quản các quá trình sinh lý diễn ra chưa mạnh. Nhưng bước sang ngày thứ 10, độ Brix của công thức ĐC giảm tương đối nhiều, đạt tới 12,91 trong khi Brix của CT1 là 14,73 và CT2 là 14,13, CT3 là 14,92. Nhìn chung thanh long là loại trái cây không có đỉnh hô hấp do đó sự thay đổi về hàm lượng chất khô tổng số không nhiều sau quá trình bảo quản. Sau 37 ngày bảo quản độ Brix ở công thức đối chứng là 9,05, CT1 là 12,64, CT2 là 11,65; CT3 là 12,06, các phản ứng sinh lý, sinh hoá diễn ra chậm.

Với kết quả trên, có thể khẳng định rằng màng phủ có ảnh hưởng tích cực làm chậm quá trình biến đổi sinh lý, sinh hóa diễn ra trong quá trình bảo quản thanh long.

4.6.2.5. Ảnh hưởng của chế phẩm tạo màng tới sự thối hỏng thanh long trong quá trình bảo quản

Bảng 4.25: Tỷ lệ thối hỏng của thanh long trong thời gian bảo quản ở các công thức khác nhau:

CT	Tỷ lệ thối hỏng (%) sau thời gian bảo quản			
	Sau 10 ngày	Sau 20 ngày	Sau 30 ngày	Sau 37 ngày
ĐC	0	5	25	47
CT1	0	2	7	9
CT2	0	0	5	7
CT3	0	0	2	5

Chú thích:

Công thức 1 - Dung dịch chitosan bổ sung 0,5% CaCl_2

Công thức 2 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan

Công thức 3 - Dịch tế bào nấm men 10^7 CFU/ml chứa 0,5% chitosan và 0.5% CaCl_2 .

Chúng ta thấy sau 20 ngày bảo quản ở lô đối chứng thanh long đã bị hỏng 5% trong khi các lô thí nghiệm với công thức màng bao chưa chỉ có công thức 1 bị thối hỏng 2% các CT2 và CT3 chưa có hiện tượng bị thối hỏng. Tuy nhiên, sau 30 ngày công thức đối chứng hỏng 25% và công thức CT1, CT2, CT3 cũng có hiện tượng bị thối hỏng và tỷ lệ hỏng là 7% , 5% và 2% theo thứ tự. Tỷ lệ thối hỏng ở các công thức tăng nhanh sau 37 ngày bảo quản, tỷ lệ thối hỏng ở công thức đối chứng là 47%, cao hơn nhiều so với các công thức thí nghiệm CT1 là 9%, CT2 là 7% và CT3 là 5%. Kết quả này cho thấy bảo quản thanh long bằng các công thức màng bao đều có kết quả cao hơn đối chứng. Công thức CT3 cho kết quả tốt nhất, tỷ lệ thối hỏng chỉ 5% sau 37 ngày bảo quản. Điều đó chứng tỏ rằng chitosan kết hợp với nấm men đối kháng và CaCl_2 giúp cho quá trình bảo quản quả thanh long tốt hơn.



Hình 3.14: Quả thanh long sau 37 ngày bảo quản



Hình 3.15: Hình cắt quả thanh long sau 37 ngày bảo quản

4.6.3. Quy trình bảo quản thanh long bằng chế phẩm tạo màng TL01



Thuyết minh quy trình bảo quản thanh long bằng chế phẩm TL01

1 - Thu hái

- Chấm dứt phun thuốc bảo vệ thực vật và chất kích thích sinh trưởng trước khi thu hoạch 7 – 10 ngày

- Nên thu hoạch trong khoảng 28 – 32 ngày sau khi nở hoa để quả có chất lượng ngon nhất và bảo quản lâu hơn.

- Thời điểm thu hoạch tốt nhất là vào lúc sáng sớm hoặc chiều mát. Tránh ánh nắng gay gắt chiếu trực tiếp vào quả làm tăng nhiệt độ trong trái, gây mất nước ảnh hưởng đến chất lượng và thời gian bảo quản.

- Dụng cụ thu hoạch trái phải sắc, bén. Quả sau khi cắt được đựng trong giỏ nhựa, để trong mát, phân loại sơ bộ và vận chuyển ngay về nhà đóng gói càng sớm

càng tốt, không để lâu ngoài vườn. Các dụng cụ như dao, kéo, giỏ... được dùng trong thu hoạch nhiều lần phải được chùi rửa, bảo quản cẩn thận.

- Sản phẩm sau khi thu hoạch không được để tiếp xúc trực tiếp với đất và hạn chế để qua đêm.

- Không chất quả quá đầy giỏ khi vận chuyển, giỏ phải được bao lót kỹ, che phủ bằng giấy hoặc lá để tránh ánh nắng chiếu trực tiếp vào quả và tổn thương do va chạm trong khi vận chuyển.

2- Lựa chọn quả trước bảo quản

- Quả sau khi thu hái cần phải lựa chọn trước khi bảo quản, loại bỏ những quả tổn thương, những quả khuyết tật. Nên lựa chọn quả đồng đều về hình thức cũng như về chất lượng và về độ chín.
- Đối với người kinh doanh, để bảo quản dài ngày, nên mua quả tại vườn để biết lý lịch của cây và phân loại quả sơ bộ tại vườn. Chỉ sử dụng quả tốt và đẹp cho bảo quản.

3 - Xử lý trước bảo quản

- Quả sau khi đã lựa chọn kỹ cần phải rửa sạch bề mặt bằng nước clorin 1% bởi vì trên bề mặt có chứa rất nhiều bụi bẩn, ngoài ra có thể chứa các loại phân bón và thuốc BVTV do quá trình chăm sóc để lại. Đối với công đoạn này có thể làm bằng nhiều cách tùy thuộc vào quy mô: đối với quy mô bảo quản vừa và nhỏ có thể dùng giẻ sạch lau bề mặt quả hoặc rửa thủ công. Đối với quy mô bảo quản lớn có thể dùng máy rửa.

4 - Phủ màng chế phẩm bảo quản

Quả sau khi qua công đoạn xử lý nấm mốc, chỉ cần để khô vừa phải (có thể để khô tự nhiên hoặc dùng quạt điện) rồi tiến hành phủ màng lên quả. Phương pháp phủ màng lên quả cũng phụ thuộc vào quy mô bảo quản. Quy mô 5000kg/ngày chỉ nên sử dụng phương pháp thủ công, tức là có thể dùng giẻ sạch hoặc chổi sơn quét đều và mỏng lên bề mặt quả.

5 - Bao gói và xếp thùng

Quả sau khi được phủ màng cần để khô hẳn rồi mới dùng bao polyetylen có đục 20 – 30 lỗ bằng kim đường kính 0,5 mm để bao và hàn kín bao. Kỹ thuật này kết hợp với nhiệt độ lạnh 5⁰C, Quả được đựng trong thùng carton có vách ngăn, vách ngăn không quá chặt để tránh làm gãy tai

6 - Công đoạn bảo quản

- Bảo quản ở điều kiện: nhiệt độ 5⁰C, yêu cầu kho phải thông thoáng.

- Yêu cầu kiểm tra và duy trì độ ẩm trong kho. Tránh để cho độ ẩm giảm quá thấp làm khô quả. Độ ẩm nằm trong khoảng 90% - 95%.

7 - Theo dõi khi bảo quản

- Cần kiểm tra 1 tuần/lần để phát hiện và loại bỏ những quả bị thối hỏng nhằm tránh lây lan sang quả khác.

4.7. Xây dựng mô hình bảo quản thanh long bình thuận

4.7.1. Quy mô xây dựng mô hình bảo quản

Dựa trên quy trình bảo quản đã xác lập, đề tài tiến hành xây dựng mô hình bảo quản thanh long tập trung tại kho lạnh của Công ty TNHH TM Hưng Loan, thôn Xuân Hòa, xã Phong Lãm, Tp Phan Thiết.

Thời gian bắt đầu bảo quản tháng 15/10/2011. Thời điểm này là thu hoạch thanh long nghịch vụ, toàn bộ thanh long thu hoạch được phân loại tại khu vực sơ chế của công ty TNHH TM Hưng Loan, chủ yếu loại bỏ quả nhỏ hoặc quá to, hoặc quả có hình thức xấu.

Quy mô bảo quản tập trung khối lượng 15 tấn. Mô hình sử dụng bao bì tiêu chuẩn theo "VietGap thanh long"

Đơn vị phối hợp chính:

1. Trung tâm Nghiên cứu Phát triển cây thanh long Bình Thuận
2. Công ty TNHH TM Hưng Loan thuộc Hiệp Hội thanh long Bình Thuận

4.7.2. Đánh giá hiệu quả kỹ thuật của mô hình

4.7.2.1. Tổn thất khối lượng tự nhiên và tỷ lệ thối hỏng

Mức độ tổn thất khối lượng và tỷ lệ thối hỏng sau 37 ngày bảo quản được trình bày trong bảng 4.26

Bảng 4.26: Tổn thất khối lượng tự nhiên và tỷ lệ thối hỏng của thanh long trong quá trình bảo quản

TT	Chỉ tiêu đánh giá	Sau 20 ngày bảo quản			Sau 37 ngày bảo quản		
		Đối chứng	TL01	Anolyt	Đối chứng	TL01	Anolyt
1.	Tổn thất khối lượng tự nhiên (A)	4,85%	1,12%	1,34%	11,92%	3,02%	4,71%
2.	Tổn thất do thối hỏng quả (B)	5,71%	0%	0%	46,54%	4,61%	3,78%
3.	Tổn thất chung (A+B)	10,56%	1,12%	1,34%	58,46%	7,63%	8,49%
4.	Hình thức bên ngoài	Khá	Tốt	Tốt	kém	khá	khá

Hình thức bên ngoài: Sau 20 ngày bảo quản lạnh trong kho, ở tất cả các công thức quả còn rất tươi, tại quả cứng có màu vàng xanh đặc trưng, khả năng chấp nhận của người mua về hình thức là 100%.

Sau 37 ngày bảo quản lạnh, ở công thức dùng chế phẩm TL01 và Anolyt tại quả có hiện tượng héo hơi vàng, hình thức quả khá, khả năng chấp nhận của người mua 80%. Trong khi đó công thức đối chứng, tỷ lệ hư hỏng 46,54% quả mất giá trị cảm quan.

4.7.2.2. Sự biến đổi độ cứng và hàm lượng chất khô tổng số

Bảng 4.27: So sánh sự biến đổi độ cứng và hàm lượng chất khô tổng số của thanh long bảo quản lạnh

TT	Chỉ tiêu đánh giá	Nguyên liệu ban đầu	Sau 20 ngày bảo quản			Sau 37 ngày bảo quản		
			Đối chứng	TL01	Anolyt	Đối chứng	TL01	Anolyt
1	Độ cứng của ruột quả (kg/cm ²)	2,35	0,86	1,42	1,25	0,38	0,93	0,85
2	Hàm lượng chất khô tổng số (°Bx)	15,65	11,15	12,87	13,15	9,12	11,36	12,05

Bảng 4.27 trình bày một số chỉ tiêu chất lượng quả thanh long được bảo quản bằng chế phẩm TL01 và Anolyt. Sau 20 ngày bảo quản chất lượng có thay đổi nhưng không lớn. chứng tỏ quả được bảo quản trong điều kiện kỹ thuật phù hợp.

4.7.3. Đánh giá hiệu quả kinh tế của mô hình

Bảng 4.28 nêu kết quả phân tích hiệu quả kinh tế cho phương án bảo quản lạnh thanh long sau 37 ngày phục vụ nhu cầu tiêu dùng nội địa, bán vào thời điểm gần giáng sinh

Bảng 4.28: Kết quả đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình bảo quản thanh long

TT	Hạng mục	Giá thành (VNĐ)			Ghi chú
		Đối chứng	Anolyt	Chế phẩm TL01	
1.	1000kg thanh long x 8.000đ/kg	8.000.000	8.000.000	8.000.000	Mua hoặc thu hái trực tiếp. Giá phổ biến lúc chính vụ năm 2010 và 2011
2.	Chi phí chế phẩm: 3lít x 100.000đ/lít = 300.000 đ	0		300.000	Giá tối đa
3.	Thuê nhân công xử lý bảo quản	240.000	240.000	240.000	3 công x 80.000đ/công
4.	Bao bì (100 thùng x 2000đ/thùng + khác)	200.000	200.000	200.000	
5.	Chi phí kho lạnh (500đ/kg x 1000kg)	500.000	500.000	500.000	
6.	Tổn thất sau bảo quản do thời hỏng	4.696.000	679.000	610.000	TL01: 7,63% tương ứng 76,3kg quả; Anolyt: 8,49% tương ứng 84,9kg quả ĐC: 58,7% tương ứng với 587kg quả
7.	Tổng chi phí	13.636.000		9.850.000	
8.	Tổng thu khi bán	6.608.000		14.779.200	Giá thành khi bán 16.000đ/kg
9.	Lãi từ 1.000 quả	- 1.392.000		4.929.200	

4.8. Tổ chức hội nghị đầu bờ và tập huấn CGCN

Hội nghị đầu bờ và mở lớp tập huấn vào ngày 20/12/2011. Chương trình hội nghị và tập huấn:

Nội dung: 1- Giới thiệu kỹ thuật bảo quản thanh long bằng chế phẩm tạo màng sinh học; 2- Hướng dẫn kỹ thuật áp dụng chế phẩm tạo màng trên quả thanh long; 3- Giới thiệu kết quả bảo quản của mô hình; 4- Trao đổi và giải đáp các câu hỏi.

PHẦN V . KẾT LUẬN

1. Kết quả điều tra tình hình sản xuất, chăm sóc, bảo quản và tiêu thụ thanh long Bình Thuận chỉ ra rằng: i) Người dân đã có quy trình thâm canh thanh long theo tiêu chuẩn VietGap; ii) Năng suất thanh long ổn định và là nguồn thu nhập chính của người dân; iii) Chưa có công nghệ bảo quản thanh long quy mô hộ gia đình vì chi phí bảo quản cao, công nghệ phức tạp. iv) Các hộ trồng thanh long chưa chủ động được trong việc tiêu thụ sản phẩm nên thường bị ép giá vào thời điểm chính vụ, kênh phân phối và tiêu thụ thanh long phần lớn phụ thuộc vào thương lái địa phương.
2. Đề tài đã nghiên cứu phân lập và xác định được chủng nấm mốc gây thối hỏng điển hình trên quả thanh long là *A. niger*, *A. flavus* và *Penicillium*.
3. Từ 50 mẫu quả thanh long vỏ đỏ ruột trắng thu thập từ Bình Thuận đề tài đã phân lập được 7 chủng nấm men *Candida spp* kết hợp với 03 chủng *Candida* từ bộ sưu tập giống nấm men của bộ môn công nghệ sinh học sau thu hoạch – Viện cơ điện nông nghiệp và công nghệ sau thu hoạch. Trong đó, đã tuyển chọn được 01 chủng nấm men có khả năng ức chế sự hoạt động của nấm mốc gây hỏng trên quả thanh long ở mức độ mạnh là chủng *Candida spp TL1*. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử giải trình tự đoạn gen ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 và 26S rRNA đã xác định chủng nấm men đối kháng TL01 phân lập được chính là chủng nấm men *Candida sake*.
4. Đã tìm được các yếu tố công nghệ thích hợp cho nhân nuôi chủng nấm men *Candida sake* TL01 cho sản lượng sinh khối lớn nhất trong điều kiện : môi trường rỉ đường+ vi lượng, pH=6,5; nhiệt độ 28⁰C, độ oxy hòa tan 100%. Thời gian nuôi cấy 72h cho sản lượng sinh khối thu hồi sau 72h nuôi cấy là 3,4x10⁹CFU/g.
5. Đã nghiên cứu lựa chọn màng bao thích hợp cho bảo quản thanh long theo quy trình khuyến cáo của VietGap. Màng Chitosan có thành phần gồm: 0,5% Chitosan và 1% axit lactic và 0,5% CaCl₂. Ở nồng độ chitosan >= 0,3% trong môi trường lỏng có khả năng ức chế các nấm mốc gây hỏng quả thanh long.
6. Đánh giá được khả năng thích ứng tốt của nấm men *Candida sake TL1* đối kháng trên môi trường có 0,5% chitosan và 0,5% CaCl₂. Chế phẩm TL01 vẫn đảm bảo mật độ nấm men *Candida sake* TL01 3,06x10⁷ CFU/g sau 6 tháng bảo quản ở nhiệt độ thường. Chế phẩm TL01 an toàn do không gây ngộ độc cấp, không tìm được liều gây chết LD50 trên động vật thử nghiệm.

7. Đã tiến hành thử nghiệm chế phẩm màng bao chứa 0,5% Chitosan kết hợp với nấm men đối kháng *Candida sake* TL01 trên quả thanh long thương phẩm với quy trình bảo quản của VietGap thanh long, sau đó bao gói PE có đục lỗ và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 5⁰C, độ ẩm 85-90%. Nhận thấy rằng công thức màng bao gồm dịch tế bào nấm men 10⁷CFU/ml chứa 0,5% chitosan và 0,5% CaCl₂ có tỷ lệ hao hụt khối lượng tự nhiên thấp nhất, giữ được màu sắc vỏ quả sau 37 ngày bảo quản, giữ được trạng thái, kết cấu của quả, biến đổi về độ cứng thấp nhất, sự biến đổi về hàm lượng chất khô tổng số không nhiều và tỷ lệ thối hỏng quả 5% sau thời gian bảo quản 37 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. GS. Tôn Thất Bình (2000), *Tìm hiểu về các loại cây ăn trái có triển vọng xuất khẩu*, NXB nông nghiệp TP Hồ Chí Minh.
2. Trần Văn Chương (2000), *Công nghệ bảo quản và chế biến nông sản sau thu hoạch*, NXB Văn hóa dân tộc.
3. Lê Doãn Diên (1995), *Kỹ thuật sử dụng công nghệ sinh học để bảo quản, chế biến nông sản sau thu hoạch*, NXB nông nghiệp, Hà Nội.
4. Quách Đình, Nguyễn văn Tiếp, Nguyễn Văn Thoa (1996), *Công nghệ sau thu hoạch và chế biến rau quả*, NXB Khoa học kỹ thuật.
5. Nguyễn Văn Khôi (2006), *Polysacarit và ứng dụng của các dẫn xuất tan của chúng trong thực phẩm*, NXB Khoa học kỹ thuật.
6. Thái Thị Hòa, Đỗ Minh Hiền, Phạm Hoàng Lâm và Cle'ment, A., 2002. *Nghiên cứu xây dựng quy trình bảo quản thanh long ruột trắng sau thu hoạch*, Báo cáo thu hoạch khu vực các tỉnh phía nam do Bộ NN&PTNN tổ chức tại thành phố Hồ Chí Minh, từ 23-24/8/2002.
7. Nguyễn Duy Lâm (2000), “Nghiên cứu ảnh hưởng của chitosan tới một số ảnh hưởng của vi sinh vật gây thối quả trong bảo quản sau thu hoạch”, *Di truyền học và ứng dụng*, 21-25.
8. Nguyễn Duy Lâm, Trần Băng Diệp (2003), “So sánh hoạt tính kháng nấm mốc của các loại chitosan có nguồn gốc khác nhau trong điều kiện xử lý chiếu xạ và môi trường nuôi cấy khác nhau”, *Tạp chí sinh học* (số 6), 7-12.
9. Nguyễn Duy Lâm (2003), *Nghiên cứu cải tiến tính năng và chế tạo mới vật liệu làm màng bao từ chitosan bằng xử lý chiếu xạ để bảo quản quả tươi và hạt giống*, Báo cáo tổng kết đề tài KHCN cấp bộ - Bộ KH&CN mã số BO/01/04-01.
10. Châu Văn Minh, Phạm Hữu Điền, Đặng Lan Hương, Trịnh Đức Hưng, Hoàng Thanh Hương (1997), “Nghiên cứu sử dụng chitosan trong công nghiệp và bảo quản thực phẩm”, *Tạp chí khoa học* (số 3), 23-26.
11. Nguyễn Văn Phong (2003), “Kết quả bước đầu trong việc pha chế màng bảo quản trên chuối già, thanh long và xoài”, *Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ và rau quả năm 2001-2002*, Viện nghiên cứu cây ăn quả miền Nam, 380-387.

12. Nguyễn Nhật Minh Phương, Hà Thanh Toàn (2006), “Khảo sát các điều kiện thích hợp cho tồn trữ trái thanh long”, *Tạp chí nghiên cứu khoa học* 2006:5, 131-140.
13. Sở nông nghiệp và phát triển nông thôn Bình Thuận, Trung tâm NCPT cây thanh long, 2008, *Quy trình sản xuất thanh long theo Viet GRAP*.
14. Nguyễn Thị Ngọc Tú, Phạm thị Mai (1995), “Nghiên cứu ứng dụng chitosan dùng trong y tế”, *tạp chí dược học* (Số 2) 14-16.
15. Hà Văn Thuyết, Trần Quang Bình (2000), *Bảo quản rau quả tươi và bán chế phẩm*, NXB Nông nghiệp.

TÀI LIỆU NƯỚC NGOÀI

16. A.A. Ariffin, J. Bakar, C.P. Tan, R.A. Rahman, R. Karim and C.C. Loi (2008), “Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil”, *Food Chemistry* 114, pp. 561–564.
17. Baldwin E. A., Baker R. A., (2002), “Use of protein in edible coatings for whole and minimally processed fruits and vegetables”. In: Protein-based Films and Coatings. Gennadios A. (Ed.). CRC Press, Boca Raton. FL. 501-515.
18. Bai J., Alleyne V., Hagenmaier R. D., Mattheis J. P., Baldwin E. A., (2003), “Formulation of zein coatings for apples (*malus domestica* Borkh)”. *Postharvest Biol. Technol.*, 28, 259-268.
19. Britta Leverentz, William S. Conway, Wojciech Janisiewicz, Maribel Abadias, Cletus P. Kurtzman, and Mary J. Camp (2006), “Yeast Antagonists , *Applied and Environmental Microbiology*” pp. 1135-1140.
20. D.H. Benzing, Vascular epiphytes, general biology and related biota, Cambridge University Press, Cambridge (1990).
21. Droby et al, Wilson, Wisniewski (1993), “A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest disease of fruits and vegetables”, *Scientia Horticulturae*, pp. 183-189
22. G, Oms-Oliu, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso, (2008) “Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon”, *LWT - Food Science and Technology* 41, pp. 1862-1870.
23. Hyun Jin Park (1999), “Development of advanced edible coatings for fruits”, *Trends in food Science & Technology* 10, pp. 254-260.

24. Hongyin Zhang, Xiaodong Zheng, Chengxin Fu, Yufang Xi, (2005), "Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*", *Postharvest Biology and Technology* 35, pp. 79–86
25. Jennifer Ann Ball (1999), *Development and effectiveness of three Hydrocolloid-Lipid Emulsion Coating on Preservation of Quality Characteristics in Green Bell Pepper*, PhD thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.
26. Lau, C.Y, Othman, F., and Eng, L., "The effect of heat treatment, different packaging methods storage temperatures on shelf life of Dragon fruits (*Hylocereus* spp.)", P1-16.
27. Lee, J.Y., Park, H.J., Lee, C.Y., Choi, W.Y., (2003), "Extending shelf life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents", *Lebensm. -Wiss. U. –Technol* 36, pp. 323–329.
28. Lurie, S., (1998), "Postharvest heat treatment", *Postharvest Biology Technology* 14, pp 257-269.
29. M. A. Rahman, T. M. M. Mahmud, J. Kadir, R. Abdul Rahman and M. M. Begum, (2009), "Enhancing the Efficacy of Burkholderia cepacia B23 with Calcium Chloride and Chitosan to Control Anthracnose of Papaya During Storage", *Plant Pathol. J.* 25, pp. 361-368.
30. Nerd, A., GUT MAN, F&MiZRAHI, Y., (1999), "Ripening and postharvest behaviour of fruits of two hylocereus species (Cactaceae)", *Postharvest Biology and Technology* 17, pp. 39-45.
31. R.R. Shama, Dinesh Singh, Rajbir Singh (2009), "Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists", *A review Biological Control* 50, pp. 205-221.
32. Roger Daniels (1973), *Edible coatings and soluble package*, Noyes data corporation, Park Ridge, New Jersey London, England.
33. T.T. Hoa, C.J. Clark, B.C. Waddell and A.B. Woolf (2006), "Postharvest quality of Dragon fruit (*Hylocereus undatus*) following disinfesting hot air treatments", *Postharvest Biology and Technology* 41, pp. 62–69.
34. Ting Yu, Hong Ye Li, Xiao Dong Zheng (2007), "Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections", *International Journal of Food Microbiology* 114, pp. 261–266.

35. Xiang-Hong Meng, Guo-Zheng Qin, Shi-Ping Tian (2010), “Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage”, *LWT - Food Science and Technology* 43, pp. 596–601.
36. Yan Fan, Ying Xu, Dongfeng Wang, Li Zhang, Jipeng Sun, Liping Sun, Bin Zhang (2009), “Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria*×*ananassa*) preservation quality”, *Postharvest Biology and Technology* 53, pp. 84–90
37. Wilson et al, (2002), “Biological coating with a protective and curative effect for the control of postharvest decay”, *United States patent*, pat.No: US 6 423 310 B1.