BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN THẾ TRANG

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG VI KHUẨN LACTIC TẠO CHẾ PHẨM BẢO QUẢN CÁ

Chuyên ngành: **Vi sinh vật học**
Mã số: **62 42 40 01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2010

Viện Công nghệ sinh học, Viện KH&CN Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. **PGS. TS. Trần Đình Mấn**
   Viện Công nghệ sinh học, Viện KH&CN Việt Nam
2. **PGS. TS. Lê Thanh Bình**
   Viện Công nghệ sinh học, Viện KH&CN Việt Nam

Phản biện 1: **GS. TS. Phạm Văn Ty**
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN

Phản biện 2: **PGS. TS. Khuất Hữu Thanh**
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Phản biện 3: **PGS. TS. Ngô Đình Bính**
Viện Công nghệ sinh học - Viện KH&CN Việt Nam

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sĩ sinh học Phiên chính thức họp tại: Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, vào hồi 8 giờ 30 phút, ngày 16 tháng 11 năm 2010

Có thể tìm hiểu luận án tại: Thư viện Viện Công nghệ sinh học
Thư viện Quốc gia Việt Nam

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Thế Trang**, Trần Đình Mấn, Phạm Việt Cường (2005), Tách dòng, đọc trình tự 16S rRNA và khả năng sinh axit lactic của chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* HN02, *Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc 2005, Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học, Đại học Y Hà Nội 3/11/2005*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1432-1434.
2. **Nguyễn Thế Trang**, Trần Đình Mấn (2007), Sử dụng vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 để sản xuất chế phẩm bảo quản cá. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 45(4): 35-42.
3. Trần Đình Mấn, **Nguyễn Thế Trang**, Trần Thị Hoa (2008), Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp L(+)- axit lactic của 2 chủng *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HN11 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34. *Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ IV hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 346-349.
4. Tran Đinh Man, **Nguyen The Trang** (2008), Using lactic acid bacteria isolated in Viet Nam for aquatic products wastetreatment and lactic acid production for polylactic synthesis. *The 8th general Seminar of the Core University Program. Environmental Science & Technology for the Earth*. November 26-28, 2008. Osaka, Japan, 278-283.
5. **Nguyễn Thế Trang**, Trần Đình Mấn (2008), Đặc điểm sinh học và khả năng lên men sinh lactic axit hiệu suất cao của vi khuẩn *Lactobacillus brevis* HN26 phân lập từ sản phẩm lên men truyền thống Việt Nam. *Hội nghị toàn quốc Khoa học và Công nghệ Hóa Dược lần thứ nhất, Hà Nội*, 19/12/ 2008, 210-216.
6. **Nguyễn Thế Trang**, Trần Đình Mấn (2008), Một số đặc điểm sinh học của hai chủng vi khuẩn lactic HN11 và HN34 sinh tổng hợp L(+)-lactic axit được phân lập tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6(4): 505-511.
7. **Nguyễn Thế Trang,** Trần Đình Mấn, Phạm Thanh Hà (2009), Tối ưu môi trường lên men chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34 sinh tổng hợp L(+)- lactic axit. *Báo cáo khoa học*, *Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc 2009.* NXB Đại học Thái Nguyên, 730-734.
8. **Nguyễn Thế Trang**, Trần Đình Mấn (2009), Đặc điểm sinh học một số chủng vi khuẩn lactic phân lập từ mẫu cá tạp nước mặn Đồ Sơn - Hải Phòng. *Tuyển tập Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh học biển và phát triển bền vững*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 537-544.

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ATCC	American Type Culture Collection (Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ)
ATVSTP	An toàn vệ sinh thực phẩm
Bp	Base pair (Cặp bazơ)
BPA	Baird-Paker Agar (Môi trường chọn lọc cho *Staphylococcus*)
BYT	Bộ Y tế
CFU	Colony Forming Units (Đơn vị hình thành khuẩn lạc)
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Điện di trên gel gradient biến tính)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng cao áp)
KCS	Kiểm tra chất lượng sản phẩm
KPH	Không phát hiện
LAB	Lactic Acid Bacteria (Vi khuẩn lactic)
MRS	De Man, Rogosa, Sharpe Medium
NN	Neomycin-Nagler (Môi trường chọn lọc cho *Clostridium*)
OD	Optical density (Mật độ quang)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi trùng hợp)
TCBSA	TCBS-Agar (Môi trường chọn lọc cho *Vibrio*)
Tm	Temperature melt (Nhiệt độ nóng chẩy)
TN	Thí nghiệm
TSBTNM-NM	Tổng số bào tử nấm men - nấm mốc

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Ở Việt Nam những sản phẩm lên men lactic truyền thống có từ lâu và nhiều loại, hầu hết lên men được thực hiện theo phương pháp sử dụng nguồn lactic sẵn có trong tự nhiên nên hệ vi sinh vật không ổn định, chất lượng không kiểm soát được, đặc biệt là những vi sinh vật gây bệnh. Trong những năm gần đây ở nước ta vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm diễn ra ngày càng trầm trọng cả về quy mô và mức độ, các mẫu thực phẩm được kiểm tra cho các chỉ tiêu về vi sinh vật cao gấp hàng trăm, có mẫu hàng nghìn lần so với tiêu chuẩn Việt Nam.

Đã có một số nghiên cứu sử dụng vi khuẩn lactic để bảo quản cá phục vụ các mục đích khác nhau. Tuy nhiên, chưa có những nghiên cứu một cách đầy đủ về biến động hệ vi sinh vật đặc biệt là các vi sinh vật gây bệnh, từ đó giải thích các cơ chế tác động để tìm ra các điều kiện tối ưu để vi khuẩn lactic phát huy được lợi thế trong quá trình bảo quản nhằm ổn định chất lượng sản phẩm.

Trên cơ sở lý luận khoa học và ý nghĩa thực tiễn được trình bày ở trên, chúng tôi đã thực hiện đề tài: **"Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn lactic tạo chế phẩm bảo quản cá"**, với các mục tiêu và nội dung chính sau đây:

2. Mục tiêu cơ bản của đề tài luận án

Tạo chế phẩm vi khuẩn lactic có hoạt tính ức chế mạnh vi khuẩn gây hỏng cá và ứng dụng trong bảo quản cá. Đánh giá được sự biến động của nhóm vi khuẩn là nguyên nhân chủ yếu gây hỏng cá trong quá trình bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic. Ứng dụng cá bảo quản để sản xuất bột cá nhạt và chế biến thức ăn cho nuôi trồng thủy sản.

3. Nội dung nghiên cứu

- Tuyển chọn và phân loại đến loài các chủng vi khuẩn lactic tại Việt Nam có hoạt tính sinh axit lactic cao, có khả năng ức chế nhiều loại vi sinh vật gây bệnh.

- Xây dựng quy trình sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi khuẩn lactic trong bảo quản cá.

- Đánh giá sự biến động của các vi sinh vật gây hỏng cá dưới tác động của chế phẩm vi khuẩn lactic.

- Sử dụng phương pháp sinh học phân tử xác định bổ sung một số loại vi khuẩn gây hỏng cá chưa phân lập được trong mẫu bảo quản.

- Ứng dụng bảo quản cá tạp làm nguyên liệu cho sản xuất bột cá nhạt và nuôi trồng thủy sản.

4. Ý nghĩa khoa học của đề tài

- Tạo được một chế phẩm sinh học an toàn, ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, đáp ứng vấn đề bức xúc hiện nay về an toàn vệ sinh thực phẩm.

- Đánh giá được sự biến động của vi khuẩn gây hỏng, gây thối cá và vi sinh vật gây bệnh trong nguyên liệu cá trước và trong quá trình bảo quản.

- Xác định bản chất của quá trình bảo quản cá bằng chế phẩm vi khuẩn lactic.

5. Những đóng góp mới của luận án

1. Tạo được chế phẩm vi khuẩn lactic trong bảo quản cá và ứng dụng thành công.

2. Lần đầu tiên nghiên cứu về biến động vi khuẩn gây hỏng, gây thối cá và vi sinh vật gây bệnh trong quá trình bảo quản cá. Sử dụng kỹ thuật DGGE để phát hiện bổ sung một số loại vi khuẩn gây bệnh không phân lập được trong cá bảo quản.

6. Bố cục của luận án

Luận án gồm 132 trang trong đó có 31 bảng và 35 hình;

Mở đầu (3 trang);

Chương 1. Tổng quan tài liệu (29 trang);

Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (12 trang);

Chương 3. Kết quả và thảo luận (69 trang);

Kết luận và kiến nghị (2 trang);

Các công trình khoa học liên quan đến luận án (2 trang);

Tài liệu tham khảo 15 trang, 127 tài liệu (gồm 31 tài liệu tiếng Việt, 96 tiếng nước ngoài);

Phụ lục.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm sinh học của vi khuẩn lactic

1.1.1. Sự phân bố vi khuẩn lactic trong tự nhiên

1.1.2. Đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa của vi khuẩn lactic

1.2. Quá trình gây hỏng cá

1.2.1. Sự biến đổi của cá sau khi chết

1.2.2. Vi sinh vật gây hỏng cá

1.2.3. Sự phân hủy các thành phần cá bởi vi sinh vật tạp nhiễm

1.2.4. Xác định vi sinh gây hỏng cá dựa trên kỹ thuật DGGE

1.3. Ứng dụng của vi khuẩn lactic

1.3.1. Ứng dụng vi khuẩn lactic trong bảo quản cá

1.3.2. Một số ứng dụng khác của vi khuẩn lactic

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Các chủng vi sinh vật và vật liệu nghiên cứu

- Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập tại Việt Nam.

- Chủng vi sinh vật: *B. subtilis* ATCC 6633, *P. stutzeri* DSM13, *S. lutea, E. coli* PA2, *B. cereus*, *S. aureus* và *Salmonella* lấy từ Bộ sưu tập giống Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

- Bột ngô, bột gạo, cám và bột đậu tương loại tốt, không bị mốc. Cá tạp nước mặn mua tại chợ cá Đồ Sơn.

2.1.2. Các hoá chất, thiết bị và môi trường sử dụng trong nghiên cứu

Các dụng cụ và hóa chất dùng trong nghiên cứu vi sinh vật học và sinh học phân tử trong Phòng Công nghệ vật liệu sinh học và Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu vi sinh vật

Phương pháp phân loại vi sinh vật: sinh lý, sinh hóa; Kit chuẩn sinh hóa API 50 CHL và trình tự gen mã hoá 16S rARN

- Xác định thành phần một số vi sinh vật trong các mẫu: Định lượng *B. cereus* theo TCVN 4992:2005; *C. perfringens* theo TCVN 4991:2005; *Coliform* theo TCVN 4883-1993; *E. coli* theo TCVN 6846:2007; *Salmonella* theo TCVN 6402-2007; *S. aureus* theo TCVN 4830-1: 2005; TSTBNM-M theo TCVN 4993:89; *V. parahaemollyticus* theo TCVN 7905-1: 2008.

- Xác định thành phần vi khuẩn trong mẫu bằng kỹ thuật PCR-DGGE.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu hóa sinh

Xác định đường khử theo Bernfeld, xác định axit lactic theo chuẩn độ, xác định axit amin tổng số và axit amin tự do mẫu cá bằng sắc ký …

2.2.3. Phương pháp đánh giá cảm quan

Theo TCVN 1644 -2001.

2.2.4. Phương pháp lên men, tạo chế phẩm và thiết kế thí nghiệm bảo quản cá

TN1: không bổ sung giống vi khuẩn lactic (đối chứng). TN2: 1 chủng: HN02; TN3: 2 chủng HN02 và HN26; TN4: 2 chủng HN11 và HN34; TN5: 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN LACTIC CÓ KHẢ NĂNG SINH AXIT LACTIC

3.1.1. Phân lập chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh axit lactic

Các mẫu từ các nguồn như dưa chua, nước thải nhà máy sữa tại Hà Nội, sử dụng môi trường MRS có bổ sung $CaCO_3$ để phân lập trên đĩa Petri, Chọn 36 khuẩn lạc đặc trưng của vi khuẩn lactic ký hiệu từ HN01 đến HN36. Xác định khả năng sinh axit theo thời gian lên men để chọn các chủng có năng suất cao. Từ đó chọn được các chủng HN02, HN06, HN09, HN11, HN12, HN21, HN26, HN30, HN34 và HN35 sinh axit đạt trên 10 g/l.

3.1.2. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn lactic tạo chế phẩm bảo quản cá

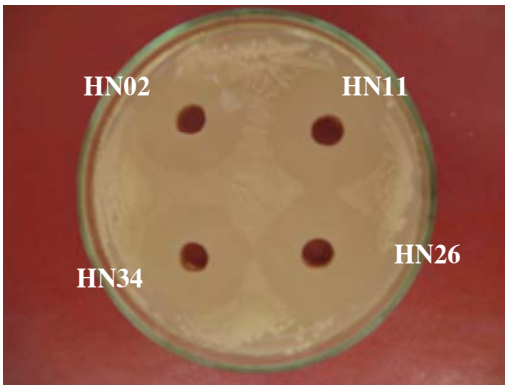
Theo tiêu chí lựa chọn các chủng để tạo chế phẩm các đặc điểm đã được xác định:

3.1.2.1. Khả năng sinh proteaza của 10 chủng vi khuẩn lactic

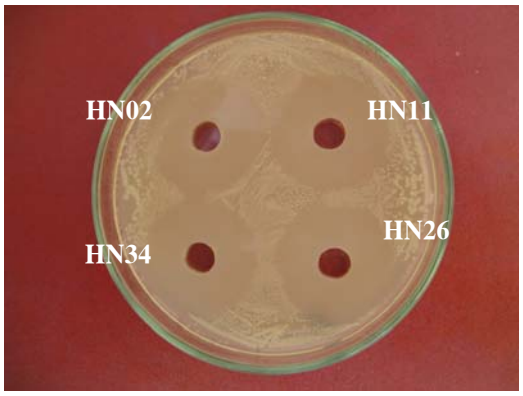
Ngoài việc chọn chủng sinh axit mạnh, để cá không bị nát chủng vi khuẩn lactic đó không có hoạt tính proteaza cao. Kết quả cho thấy 5 chủng vi khuẩn lactic HN02, HN11, HN12, HN26 và HN34 không thể hiện hoạt tính proteaza.

3.1.2.2. Ức chế vi sinh vật của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

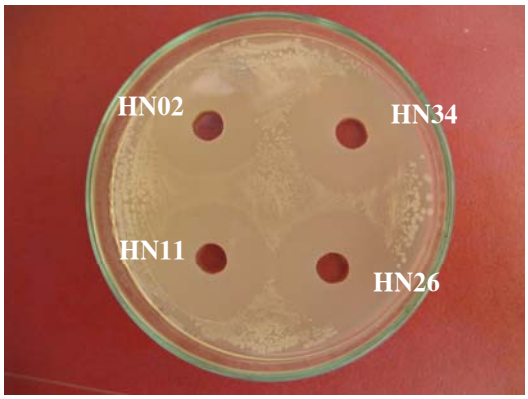
Xác định được cả 4 chủng ức chế được đối với nhiều loại vi sinh vật (thuộc nhóm gây hỏng và gây bệnh) trong cá: *B. cereus, B. subtilis* ATCC 6633, *P. stutzeri* DSM13, *S. lutea, E. coli* PA2, *Salmonella* và *S. aureus*. Đối với *Salmonella* và *S. aureus* hai loài gây ngộ độc thực phẩm quan trọng trong ATVSTP đều bị cả 4 chủng nghiên cứu ức chế ở mức độ tương đối tốt



(A)



(B)



(C)

Hình 3.1. Vòng ức chế một số vi sinh vật kiểm định của 4 chủng HN02; HN11; HN26 và HN34

(A) *B. cereus;* (B) *E. coli* PA2; (C) *Salmonella*

3.1.2.3. Khả năng sinh khí của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Kết quả cho thấy cả 4 chủng lactic HN02, HN11, HN26 và HN34 đều không sinh khí từ lên men glucoza.

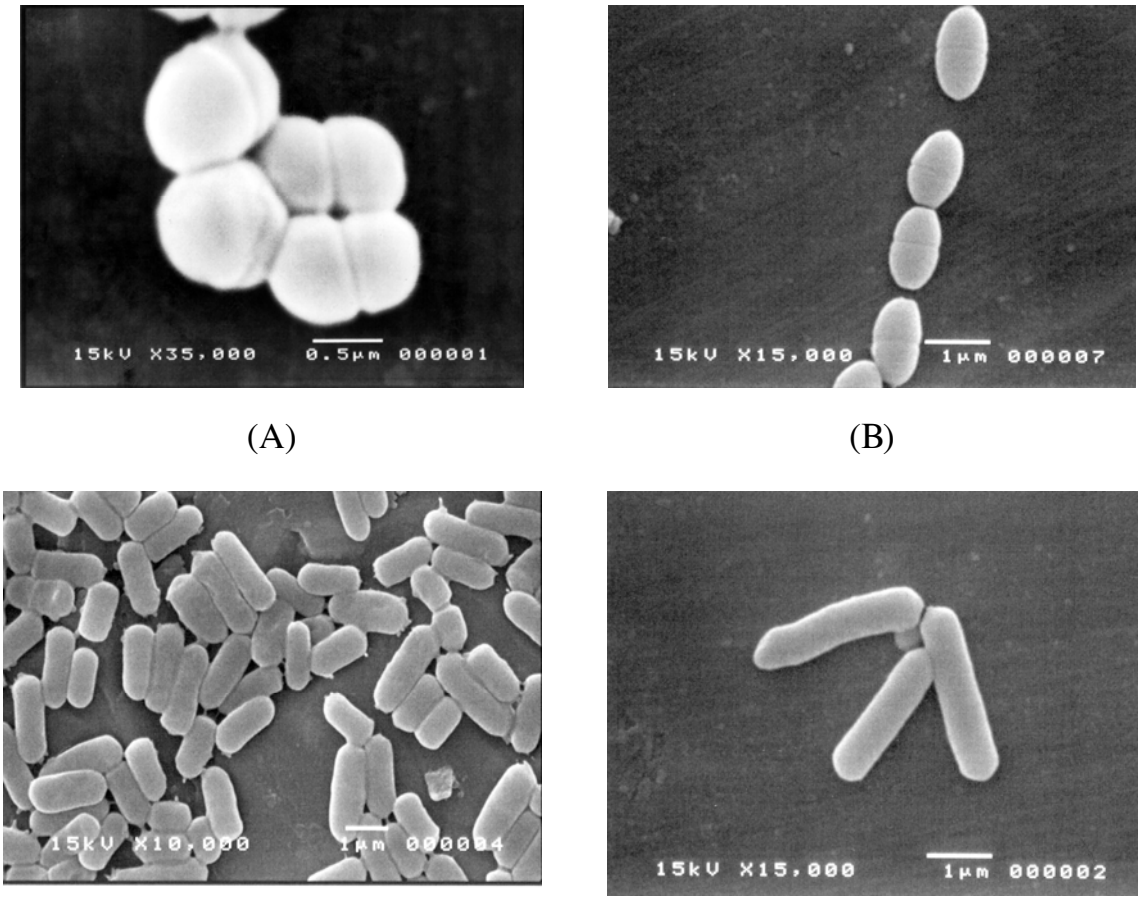
3.1.2.4. Kiểm tra tính đối kháng giữa 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Trong sản xuất chế phẩm, các chủng có khả năng ức chế lẫn nhau thì khả năng tạo chế phẩm gặp khó khăn. Kết quả cho thấy không có sự đối kháng nhau giữa các chủng nên có thể đưa vào cùng một chế phẩm sinh học.

3.2. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC 4 CHỦNG HN02, HN11, HN26 VÀ HN34

3.2.1. Đặc điểm hình thái của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Hình thái tế bào được xác định bằng kính hiển vi điện tử (Hình 3.3.) cho thấy chủng HN02 có dạng hình tròn, ovan, đường kính 0,5 ÷ 1,0 µm, tế bào xếp đôi, bốn tạo búi, chủng HN11 có hình cầu, đường kính 0,5 ÷ 1,0 µm, chủng HN26 tế bào hình que, 1,0 ÷ 2,5 µm, chủng HN34 có tế bào hình que dài, đường kính 1,0 ÷ 3,5 µm.



Hình 3.3. Hình thái tế bào 4 chủng vi khuẩn lactic

(A) Chủng HN02; (B) Chủng HN11; (C) Chủng HN26; (D) Chủng HN34

3.2.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

3.2.2.1. Ảnh hưởng của thời gian đến sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Xác định được thời gian sinh trưởng cao nhất của các chủng HN02, HN11, HN26 và HN34. Chủng vi khuẩn HN02 và HN26 sau 36 ÷ 42 giờ, chủng HN11 và HN34 sau 78 ÷ 84 giờ.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Chủng HN02 và HN26 sinh trưởng ở 30^{o}C, chủng HN11 và HN34 ở 35^{o}C.

3.2.2.3. Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu lên sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Chủng HN02, HN11 và HN26 sinh trưởng ở pH từ 5 ÷ 8, chủng HN34 ở pH từ 6 ÷ 9.

3.2.2.4. Ảnh hưởng của glucoza lên sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Xác định được nồng độ glucoza 2% là thích hợp nhất cho quá trình nhân giống và tạo chế phẩm đối với các chủng lựa chọn.

3.2.2.5. Ảnh hưởng của NaCl lên sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Trong bảo quản cá với nồng độ 1 ÷ 2% NaCl là thích hợp nhất cho tạo chế phẩm cũng như lên men lactic bảo quản cá.

3.2.3. Đặc điểm phân loại 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

3.2.3.1. Phân loại 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

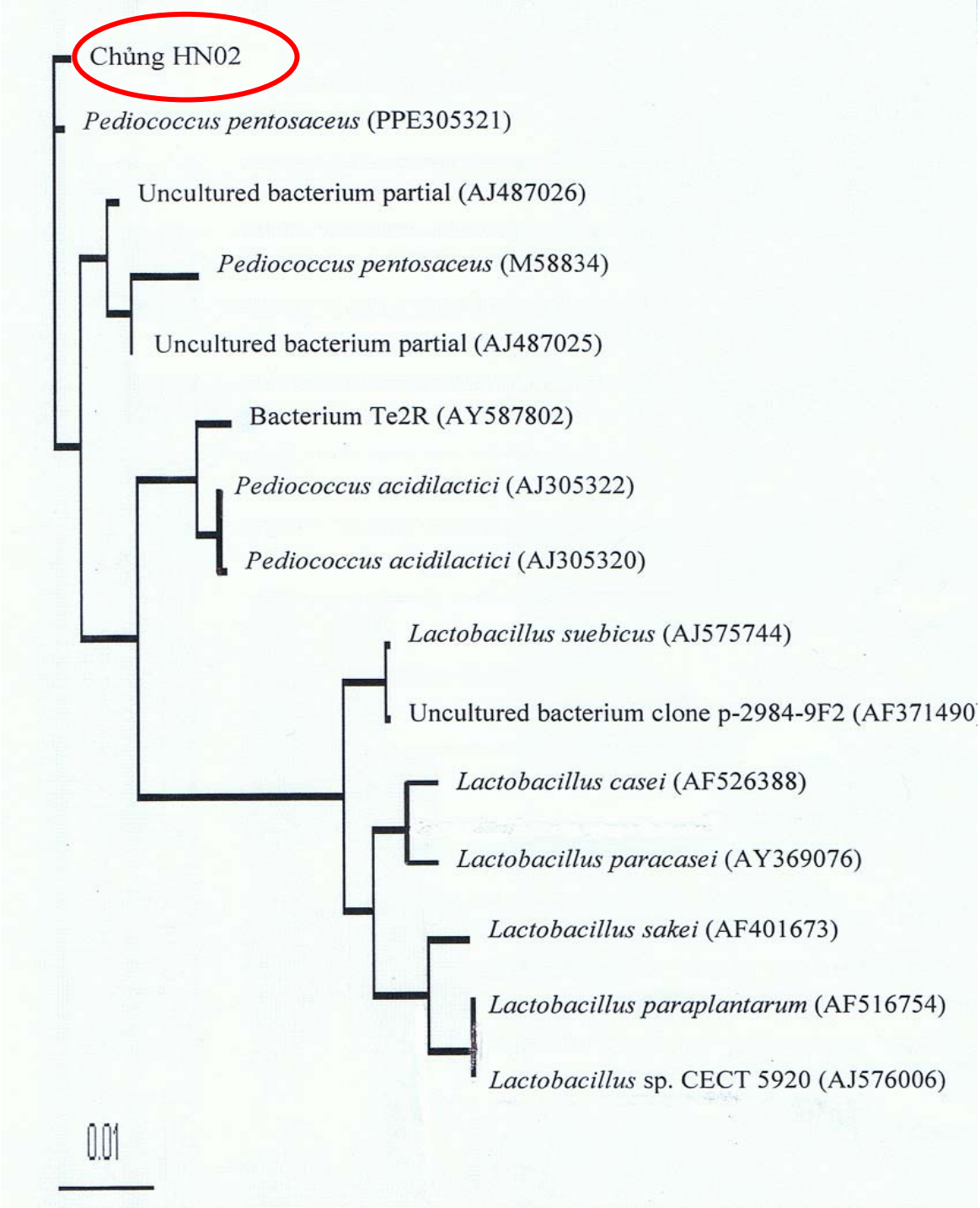
Dựa vào đặc điểm phân loại theo Bergey's chủng HN02 thuộc giống *Pediococcus,* chủng HN11 thuộc giống *Lactococcus*, chủng HN26 và HN34 thuộc giống *Lactobacillus*.

3.2.3.2. Phân loại 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34 theo Kit chuẩn sinh hóa API 50 CHL

Đã xác định chủng HN11 thuộc *L. lactis* subsp. *lactis*, chủng HN26 thuộc *L. brevis* và chủng HN34 thuộc *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ở mức rất cao (% ID = 99,9 và T = 0,58), chủng HN02 thuộc *P. pentosaceus* typ 1 (% ID = 99,0 và T = 0,5).

3.2.3.3. Phân loại chủng HN02 dựa trên so sánh trình tự gen mã hoá 16S rARN

Kết quả cho thấy đoạn gen này có độ tương đồng cao (đạt 99,413%) so với ARN riboxom 16S của chủng vi khuẩn *P. pentosaceus* 16.



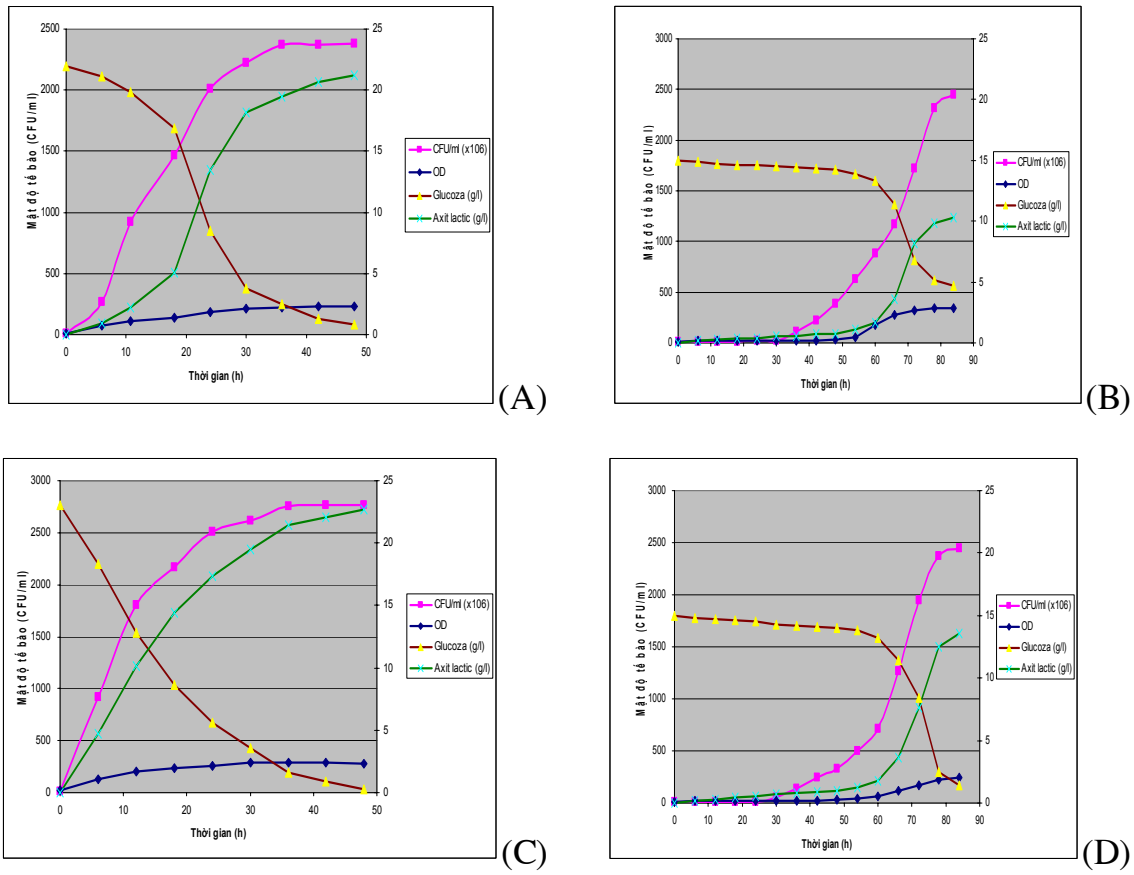
Hình 3.14. Cây phát sinh chủng loại các chủng vi khuẩn lactic dựa trên so sánh trình tự rARN 16S

3.3. TẠO CHẾ PHẨM VI KHUẨN LACTIC BẢO QUẢN CÁ

3.3.1. Động học sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Đã nghiên cứu động học của quá trình lên men 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34. Kết quả ở hình 3.15 cho thấy chủng HN02 sau 24 giờ đạt $1{,}624 \times 10^9$, 36 giờ đạt $2{,}219 \times 10^9$. Chủng HN11 sau 80 giờ đạt

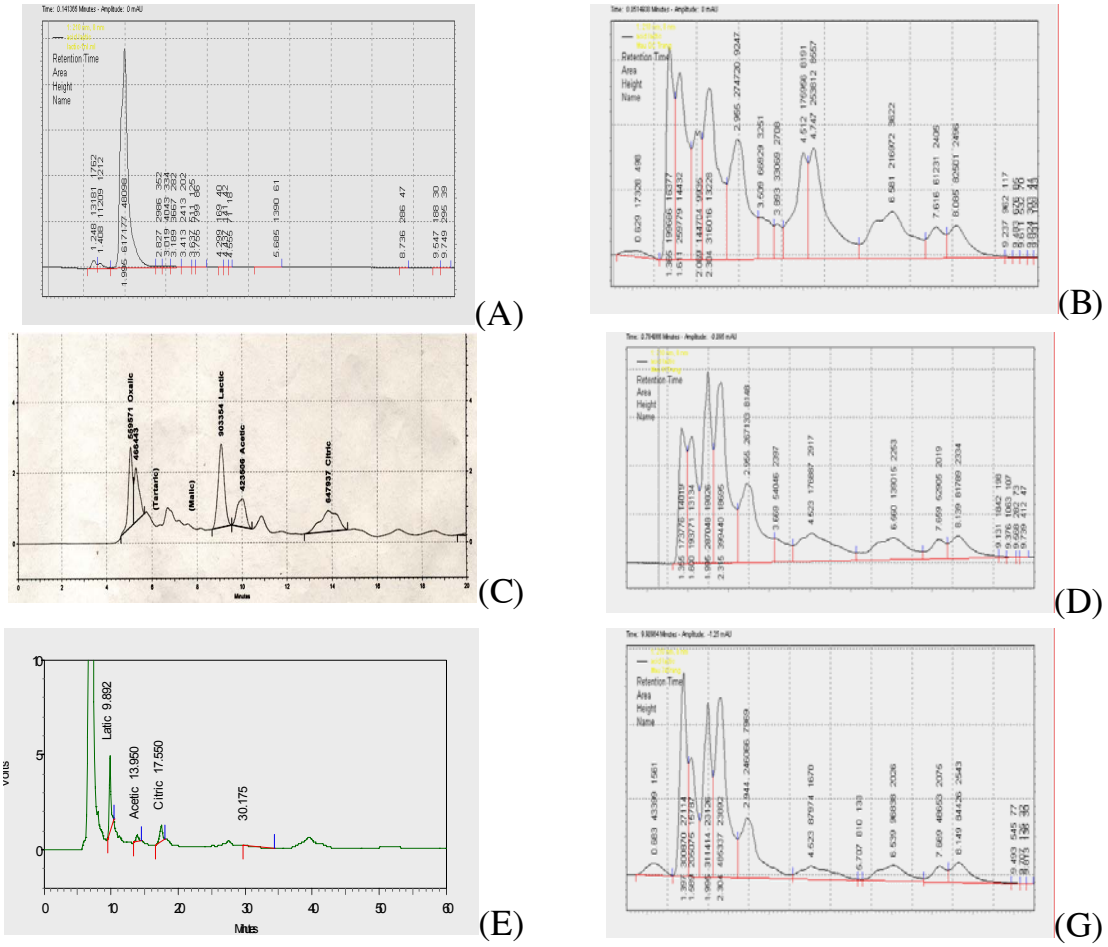
2,5x10^9. Chủng HN26 sau 48 giờ đạt 2,75x10^9. Chủng HN34 sau 80 giờ đạt 2,52x10^9.



Hình 3.15. Động học sinh trưởng của 4 chủng vi khuẩn lactic

(A) Chủng HN02; (B) Chủng HN11; (C) Chủng HN26; (D) Chủng HN34

Sắc ký đồ axit: sản phẩm lên men axit lactic của 4 chủng HN02; HN11; HN26 và HN34 được xác định theo phương pháp HPLC. Kết quả ở hình 3.16 cho thấy, dịch lên men của cả 4 chủng đều xuất hiện pic tương ứng với axit lactic (so với sắc ký đồ của axit lactic chuẩn và so với môi trường lên men ban đầu). Điều đó chứng tỏ, sản phẩm trao đổi chất của các chủng vi khuẩn lựa chọn là axit lactic, Vì vậy có thể khẳng định các chủng vi khuẩn lựa chọn là vi khuẩn lactic.



Hình 3.16. Sắc ký đồ xác định axit lactic của dịch lên men trên môi trường MRS

(A) Axit lactic chuẩn; (B) Môi trường MRS; (C) Chủng HN02; (D) Chủng HN11; (E) Chủng HN26; (G) Chủng HN34

3.3.2. Lựa chọn môi trường lên men để tạo chế phẩm

3.3.2.1. Ảnh hưởng các nguồn dinh dưỡng nitơ đến sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Qua khảo sát chọn được nguồn nitơ hữu cơ duy nhất là pepton thay thế cho 3 thành phần trong môi trường MRS và nguồn nitơ vô cơ thay thế cho Amoni-citrat.

3.3.2.2. Chọn nguồn cơ chất cho sinh trưởng 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Các môi trường nước rau cải, nước bắp cải, nước cà chua, nước mắm, nước chấm và nước cá có thể sử dụng thay thế môi trường MRS cho các chủng vi khuẩn lactic HN02, HN11, HN26 và HN34.

3.3.2.3. Ảnh hưởng của axit sorbic đến sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34

Xác định được ở nồng độ 0,5 ÷ 1‰ các chủng lactic HN02, HN11, HN26 và HN34 không bị ức chế.

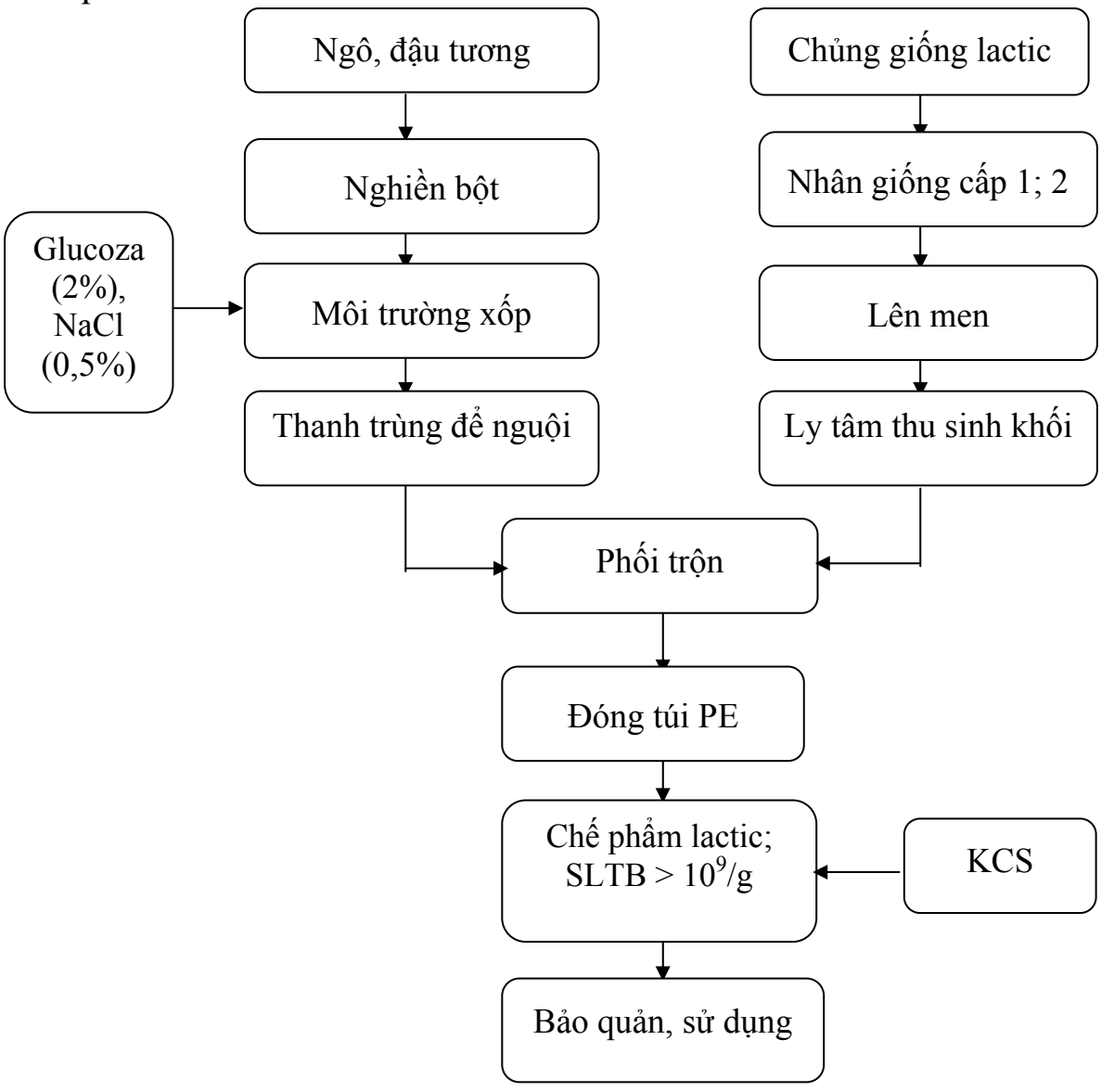
3.3.3. Nghiên cứu chất mang thích hợp để tạo chế phẩm

3.3.3.1. Lựa chọn chất mang thích hợp để tạo chế phẩm

Bột gạo, bột đậu tương, cám gạo, bột ngô và hỗn hợp một số chất đã được sử dụng làm chất mang tạo chế phẩm, chất mang tốt nhất là bột ngô + bột đậu tương (80:20).

3.3.3.2. Nghiên cứu tạo các dạng chế phẩm khác nhau

Đã chọn lựa chế phẩm dạng khô dùng làm giống khởi động trong bảo quản cá.



Hình 3.20. Sơ đồ công nghệ tạo chế phẩm vi khuẩn lactic

Với thời gian bảo quản 3 ÷ 4 tháng số lượng vi khuẩn lactic 10^7 TB/g vẫn đảm bảo quy định theo TCVN về chế phẩm vi sinh.

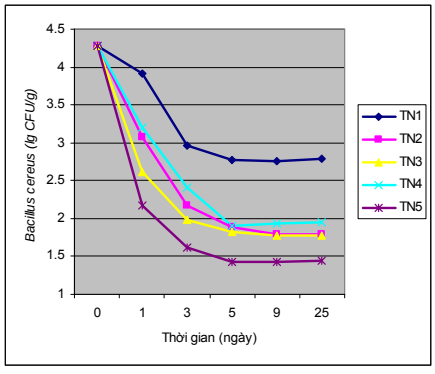
3.4. BIẾN ĐỘNG MỘT SỐ NHÓM VI SINH VẬT TRONG BẢO QUẢN CÁ

3.4.1. Thành phần một số vi sinh vật trong cá nguyên liệu

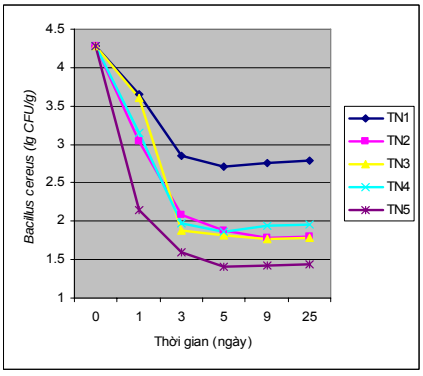
Cá tạp biển Đồ Sơn đã được xác định thành phần một số vi sinh vật. *B. cereus* có số lượng lớn nhất 1,9 x 10^4 (chiếm 64,132%), tiếp đến là *S. aureus* có số lượng 7,5 x 10^3 (25,372%), TSTBNM-M và *V. parahaemolyticus* có số lượng 2,5 x 10^1 (0,70 ÷ 0,75%). Kết quả cho thấy cá tạp biển Đồ Sơn có số lượng vi sinh vật xác định được cao hơn rất nhiều so với tiêu chuẩn quy định về ATVSTP.

3.4.2. Biến động *B. cereus* trong các mẫu cá bảo quản

B. cereus là vi khuẩn nhiễm rất nhiều trong cá. Khi chưa bảo quản số lượng tế bào phân lập được trên 4 lg (CFU/g). Kết quả ở hình 3.22 cho thấy sau 5 ngày trở đi số lượng *B. cereus* ở mẫu TN1 vẫn ở khoảng 2,5 ÷ 3 lg (CFU/g). Còn ở các TN2, TN3, TN4 và TN5 bổ sung vi khuẩn lactic cho thấy số lượng *B. cereus* giảm xuống tương đối nhanh, đặc biệt TN5 sử dụng đa chủng vi khuẩn lactic sau 5 ngày bảo quản lượng *B. cereus* còn từ 1-1,5 lg (CFU/g).



(A)



(B)

Hình 3.22. Biến động *B. cereus* trong các mẫu cá bảo quản
(A) Bảo quản ở 25°C ± 2; (B) Bảo quản ở 35°C ± 2

Bảo quản cá ở nhiệt độ 35°C ± 2 thích hợp cho 2 chủng *L. lactis* subsp *lactis* HN11 và *L. delbrueckii* subsp *delbrueckii* HN34, lượng *B. cereus* giảm nhanh hơn ở nhiệt độ 25°C ± 2. Sau 5 ÷ 25 ngày lượng *B. cereus* ở tất cả các mẫu đều không biến động. Tuy nhiên ở TN1 phương pháp bảo quản truyền thống lượng *B. cereus* tương đối cao và cao hơn mức quy định theo TCVN và ATVSTP.

3.4.3. Biến động *C. perfringens* trong các mẫu cá bảo quản

Bảng 3.17. Biến động *C. perfringens* các mẫu cá bảo quản

STT	Mẫu thí nghiệm ($^oC \pm 2^oC$)		Số lượng tế bào (lg CFU/g) sau thời gian bảo quản, ngày				
			1	3	5	9	25
1	TN1	25	1,99	1,93	1,77	1,54	1,60
		35	1,91	1,86	1,75	1,52	1,61
2	TN2	25	1,88	1,55	-	-	1,08
		35	1,46	-	-	-	1,15
3	TN3	25	1,83	1,36	-	-	1,11
		35	1,49	-	-	-	1,08
4	TN4	25	1,90	1,73	1,48	-	1,18
		35	1,56	1,41	-	-	1,08
5	TN5	25	1,75	1,32	-	-	-
		35	1,36	-	-	-	-

Chú thích: - : Không phát hiện

Kết quả sau 25 ngày bảo quản ở 4 TN ở mức cho phép 1,08 lg (CFU/g) đến 1,6 lg (CFU/g).

3.4.4. Biến động *E. coli* trong các mẫu cá bảo quản

Bảng 3.18. Biến động *E. coli* của các mẫu cá bảo quản

STT	Mẫu thí nghiệm ($^oC \pm 2^oC$)		Số lượng tế bào (lg CFU/g) sau thời gian bảo quản, ngày				
			1	3	5	9	25
1	TN1	25	3,06	2,81	1,63	1,36	1,38
		35	3,00	2,80	1,62	1,34	1,34
2	TN2	25	2,87	1,14	-	-	-
		35	2,46	1,34	-	-	-
3	TN3	25	2,76	1,32	-	-	-
		35	2,49	1,34	-	-	-
4	TN4	25	2,90	1,73	1,39	-	-
		35	2,56	1,41	-	-	-
5	TN5	25	2,67	1,34	-	-	-
		35	2,34	-	-	-	-

Chú thích: - : Không phát hiện

Kết quả bảng 3.18 cho thấy, lượng *E. coli* vẫn còn tồn tại sau 25 ngày, còn ở các TN khác sau 25 ngày không phát hiện *E. coli.* Riêng ở

TN 4 sau 5 ngày, ở nhiệt độ 25 ± 2°C ta vẫn thấy còn 1,39 log (CFU/g) *E. coli* nhưng sau 25 không phát hiện được.

3.4.5. Biến động *Coliform* trong các mẫu cá bảo quản

Bảng 3.19. Biến động *Coliform* của các mẫu cá bảo quản

STT	Mẫu thí nghiệm (°C± 2°C)		Số lượng tế bào (lg CFU/g) sau thời gian bảo quản, ngày				
			1	3	5	9	25
1	TN1	25	3,09	2,81	1,63	1,36	1,38
		35	3,00	2,81	1,63	1,36	1,36
2	TN2	25	2,86	1,39	-	-	-
		35	2,45	1,32	-	-	-
3	TN3	25	2,68	1,34	-	-	-
		35	2,50	1,36	-	-	-
4	TN4	25	2,85	1,72	1,38	-	-
		35	2,56	1,41	-	-	-
5	TN5	25	2,65	1,38	-	-	-
		35	2,32	-	-	-	-

Chú thích: - : Không phát hiện

Coliform ở TN 1 ở 25 ± 2°C còn 1,38 lg (CFU/g), ở 35 ± 2°C còn 1,36 lg (CFU/g), các TN khác sau 25 ngày không phát hiện.

3.4.6. Biến động *Salmonella* trong các mẫu cá bảo quản

Bảng 3.20. Biến động *Salmonella* của các mẫu cá bảo quản

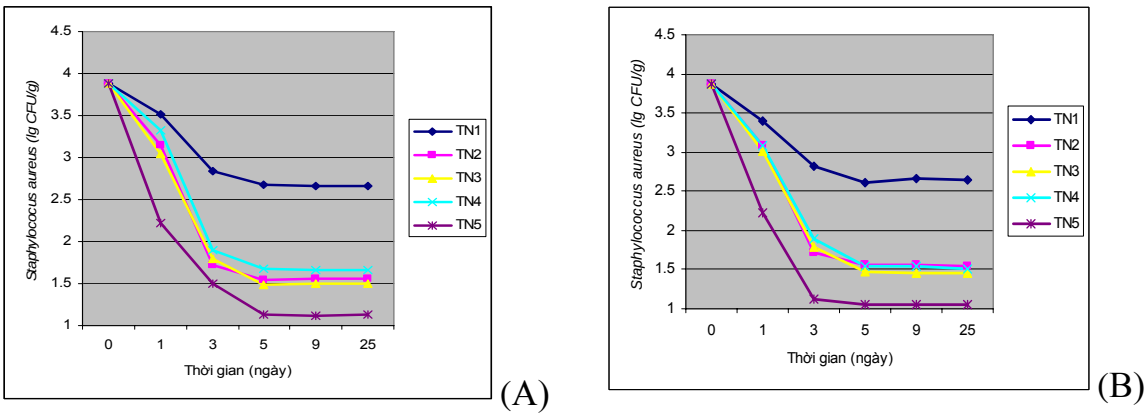
STT	Mẫu thí nghiệm (°C ± 2°C)		Số lượng tế bào (lg CFU/25g) sau thời gian bảo quản, ngày				
			1	3	5	9	25
1	TN1	25	1,71	1,20	-	-	-
		35	1,70	1,14	-	-	-
2	TN2	25	1,61	-	-	-	-
		35	1,59	-	-	-	-
3	TN3	25	1,57	-	-	-	-
		35	1,49	-	-	-	-
4	TN4	25	1,53	-	-	-	-
		35	1,51	-	-	-	-
5	TN5	25	1,43	-	-	-	-
		35	1,32	-	-	-	-

Chú thích: - : Không phát hiện

Từ bảng 3.20 cho thấy các TN bổ sung vi khuẩn lactic lên men sau 3 ngày không phát hiện *Salmonella*, mẫu không bổ sung vi khuẩn lactic còn 1,14 đến 1,2 lg (CFU/g).

3.4.7. Biến động *S. aureus* trong các mẫu cá bảo quản

S. aureus ở thời kỳ đầu là 3,7 lg (CFU/g) chiếm 23,4% số vi sinh vật phân lập được trong mẫu cá, nhiều thứ 2 sau *B. cereus*. Sau 1 ngày lên men *S. aureus* giảm rõ rệt, rõ nhất là TN5 có sử dụng hỗn hợp chủng giảm còn 2,2 lg (CFU/g). TN1 giảm còn 3,5 lg (CFU/g).



Hình 3.23. Biến động *S. aureus* các mẫu cá bảo quản

(A) Bảo quản ở 25°C ± 2; (B) Bảo quản ở 35°C ± 2

3.4.8. Biến động TSTBNM-M trong các mẫu cá bảo quản

Số lượng tổng tế bào nấm men nấm mốc hầu như biến động từ 1,1 x 10^1 đến 1,2 x 10^1.

3.4.9. Biến động *V. parahaemolyticus* trong các mẫu cá bảo quản

Kết quả ở bảng 3.21. cho thấy ở các mẫu TN2 ÷ TN5, *V. parahaemolyticus* giảm nhanh hơn so với mẫu TN1 sau 1 ngày bảo quản và bị loại trừ hoàn toàn sau 3 ngày. Còn ở các mẫu đối chứng (TN1) *V. parahaemolyticus* chỉ được loại trừ sau 5 ngày. Kết quả trên cho thấy, *V. parahaemolyticus* bị loại trừ hoàn toàn trong quá trình bảo quản, đặc điểm này có ý nghĩa quan trọng trong việc sử dụng cá tạp làm thức ăn trực tiếp cho nuôi trồng thủy sản.

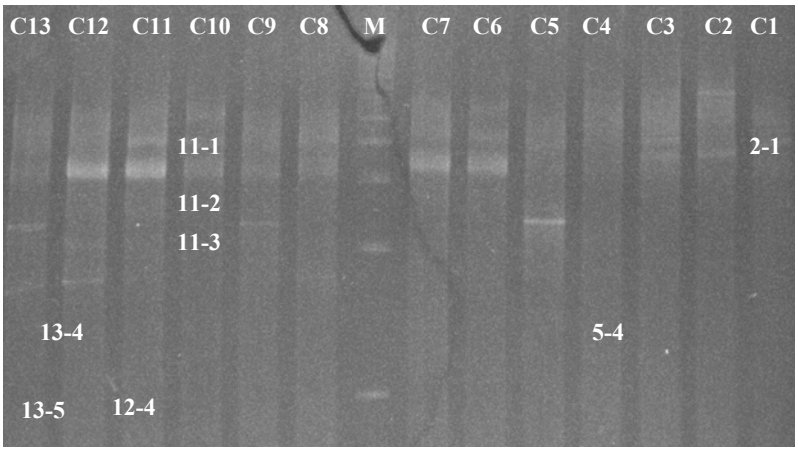
Bảng 3.21. Biến động *V. parahaemolyticus* các mẫu cá bảo quản

STT	Mẫu thí nghiệm ($^oC \pm 2^oC$)		Số lượng tế bào (lg CFU/g) sau thời gian bảo quản, ngày				
			1	3	5	9	25
1	TN1	25	1,51	1,11	-	-	-
		35	1,50	1,07	-	-	-
2	TN2	25	1,34	-	-	-	-
		35	1,39	-	-	-	-
3	TN3	25	1,32	-	-	-	-
		35	1,27	-	-	-	-
4	TN4	25	1,39	-	-	-	-
		35	1,36	-	-	-	-
5	TN5	25	1,20	-	-	-	-
		35	1.04	-	-	-	-

Chú thích: - : Không phát hiện

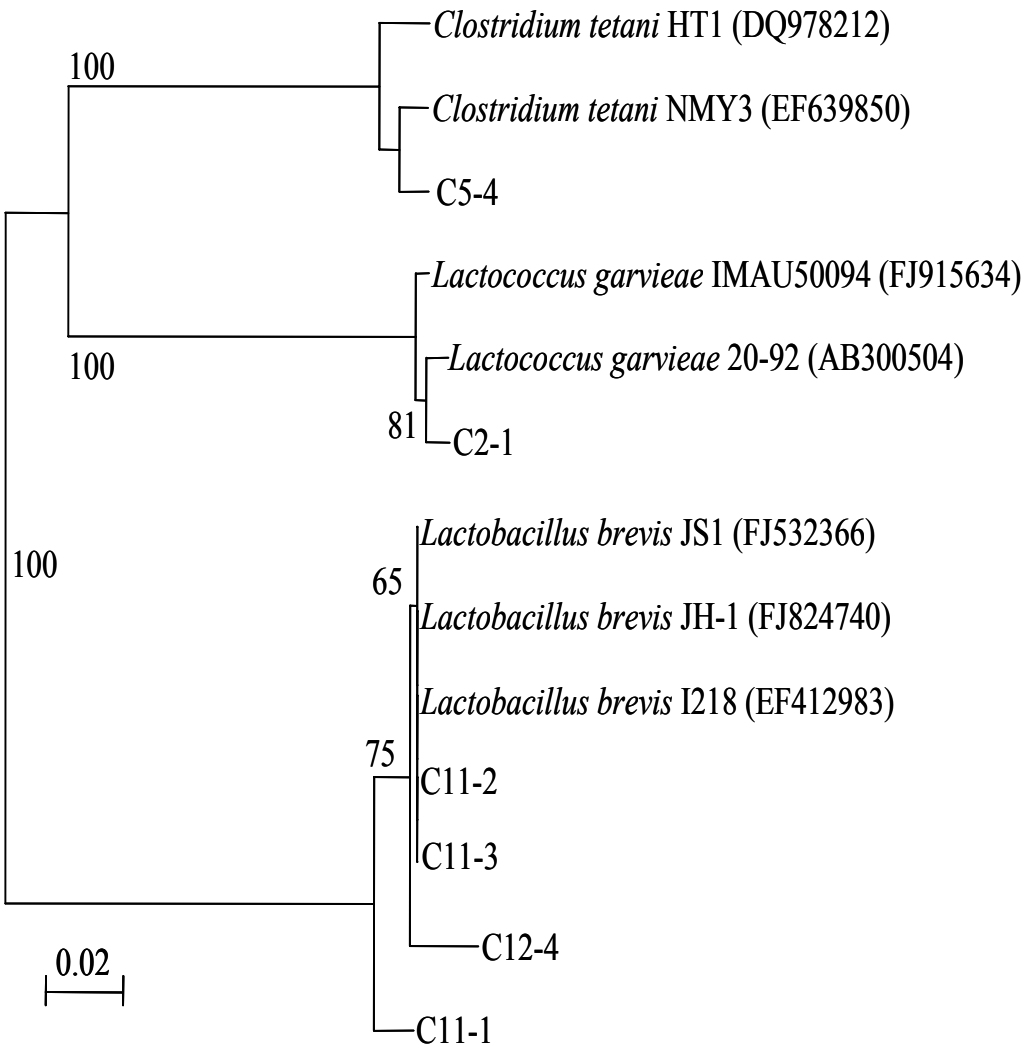
3.4.10. Xác định vi khuẩn trong mẫu cá bảo quản bằng kỹ thuật PCR-DGGE

Kết quả phân tích DGGE ở hình 3.27 cho thấy, có nhiều băng chỉ xuất hiện ở mẫu cá trước khi bảo quản và ngược lại có một số băng chỉ xuất hiện ở mẫu bảo quản bằng vi khuẩn lactic.



Hình 3.27. Điện di đồ DGGE mồi 16S các mẫu cá thí nghiệm

C1: Mẫu cá tươi; C2-C5: Mẫu cá TN1; C6-C9: Mẫu cá TN2;
C10-C13: Mẫu cá TN5



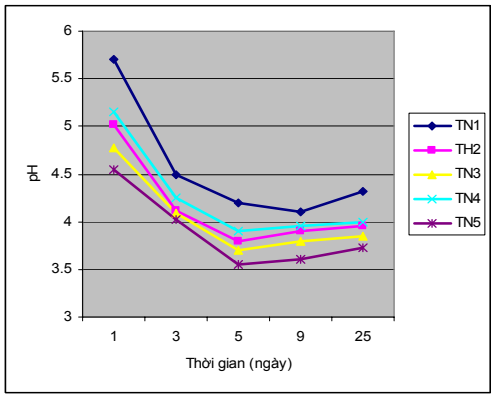
Hình 3.30. Cây phát sinh chủng loài các dòng tách từ gen DGGE và một số vi khuẩn đại diện trên GenBank.

Kết quả ở hình 3.30 cho thấy các vi khuẩn trong mẫu cá bảo quản loài *L. brevis* là chủng vi khuẩn lactic bổ sung cho chế phẩm, còn 2 dòng C2-1 và C5-4 có mức tương đồng cao với *L. garvieae* và *C. tetani*. Các dòng này chỉ xuất hiện ở mẫu cá chưa bảo quản mà không xuất hiện ở các mẫu bảo quản. Như vậy, cá bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic đã loại trừ được các loài trên là dẫn liệu bổ sung về biến động của vi khuẩn trong các mẫu cá trước và sau bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic.

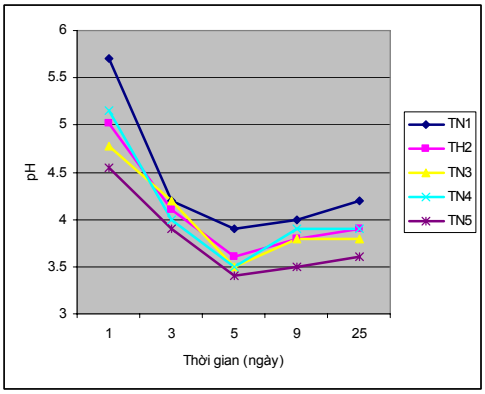
3.5. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CÁ BẢO QUẢN BẰNG CHẾ PHẨM LACTIC

3.5.1. Biến động pH trong mẫu cá bảo quản

Đánh giá biến động pH và cảm quan cá bảo quản ở hình 3.31.



(A)



(B)

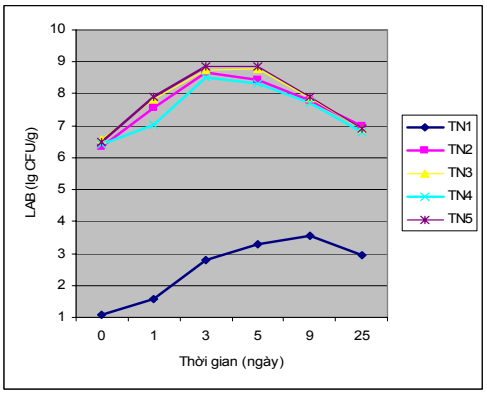
Hình 3.31. Biến động pH trong mẫu cá bảo quản

(A) Bảo quản ở 25 ± 2°C; (B) Bảo quản ở 35 ± 2°C

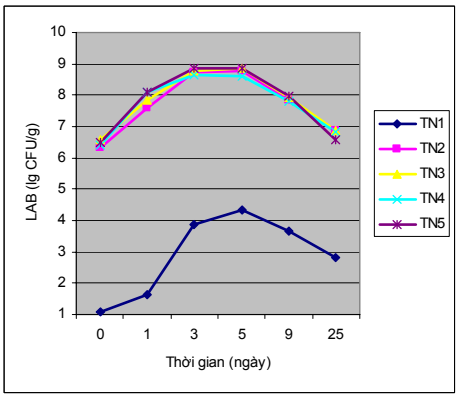
Kết quả pH ở hình 3.31 ở nhiệt độ 35 ± 2°C cá "chín sinh học" nhanh hơn và pH giảm cũng nhanh hơn.

3.5.2. Biến động vi khuẩn lactic (LAB) trong các mẫu cá bảo quản

Sử dụng chế phẩm vi khuẩn lactic bảo quản cá cho thấy trong 5 mẫu cá bảo quản thì TN2 đến TN5 lượng LAB ban đầu đạt trên 6 lg (CFU/g). Kết quả trình bày ở hình 3.32.



(A)



(B)

Hình 3.32. Biến động LAB trong các mẫu cá bảo quản

(A) Bảo quản ở 25°C ± 2; (B) Bảo quản ở 35°C ± 2

Biến động của LAB trong các mẫu cá bảo quản trình bày ở hình 3.32 cho thấy: số lượng LAB ban đầu của các mẫu TN1 hầu như quá ít.

Tuy nhiên ở 25^{o}C (hình 3.32A) cho thấy sau 3 ngày số lượng LAB đạt gần 3 lg (CFU/g) ở TN1, còn ở các TN2, TN3, TN4 và TN5 đạt cao 8 lg (CFU/g). Sau 5 ngày lên men LAB tăng lên đạt xấp xỉ 9 lg (CFU/g). Ở nhiệt độ 35^{o}C (hình 3.32B) cho thấy TN4 bổ sung 2 chủng *L. lactis* subsp. *lactis* HN11 và *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34, nhiệt độ 35^{o}C thích hợp cho sinh trưởng của 2 chủng này nên số lượng tế bào tăng rõ rệt trên đồ thị. TN1 nhiệt độ lên men cao nên LAB tăng rõ rệt, sau 5 ngày đạt 4 lg (CFU/g) so với 3 lg (CFU/g), kết quả lên men này phù hợp với các kết quả đã được công bố của các tác giả khác.

3.5.3. Đánh giá cảm quan các mẫu cá bảo quản

Cá bảo quản có vi khuẩn lactic cho sản phẩm cá nguyên con, mùi chua sản phẩm lên men. Riêng sử dụng hỗn hợp chủng (TN5) sản phẩm có mùi chua đặc trưng.

3.5.4. Đánh giá thành phần axit amin mẫu cá bảo quản

3.5.4.2. Thành phần axit amin tự do của mẫu cá bảo quản

Kết quả cho thấy ở TN cá bảo quản bằng chế phẩm hàm lượng axit amin tự do tổng số lên tới 61,4 % (mg axit amin/100 g mẫu), mẫu cá tươi chỉ có 52,03 % (mg axit amin/100 g mẫu). Đây là ưu điểm của phương pháp bảo quản cá bằng chế phẩm vi khuẩn lactic.

3.6. ỨNG DỤNG NGUYÊN LIỆU CÁ BẢO QUẢN CHO SẢN XUẤT BỘT CÁ NHẠT VÀ NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

3.6.1. Ứng dụng cho sản xuất bột cá nhạt

3.6.1.1. Đánh giá chỉ tiêu cảm quan sản phẩm bột cá nhạt sản xuất từ nguyên liệu cá bảo quản

Cá sau khi được lên men được sấy khô. Các chỉ tiêu cảm quan của bột cá đạt theo TCVN.

3.6.1.2. Đánh giá chỉ tiêu hóa lý sản phẩm bột cá nhạt sản xuất từ nguyên liệu cá bảo quản

Các chỉ tiêu lý hoá của bột cá làm từ cá bảo quản bởi chế phẩm vi khuẩn lactic tương đương tiêu chuẩn của bột cá nhạt.

3.6.2. Ứng dụng cho nuôi trồng thuỷ sản

3.6.2.1. Kết quả cảm quan và vi sinh gây bệnh môi trường nước ao nuôi sử dụng thức ăn cá bảo quản

Chế phẩm vi khuẩn lactic bảo quản cá là chế phẩm chứa tập hợp các chủng vi khuẩn lactic giúp cho cá tăng hiệu suất tiêu hóa thức ăn.

3.6.2.2. Kết quả chất lượng và năng suất cá ao nuôi sử dụng thức ăn cá bảo quản

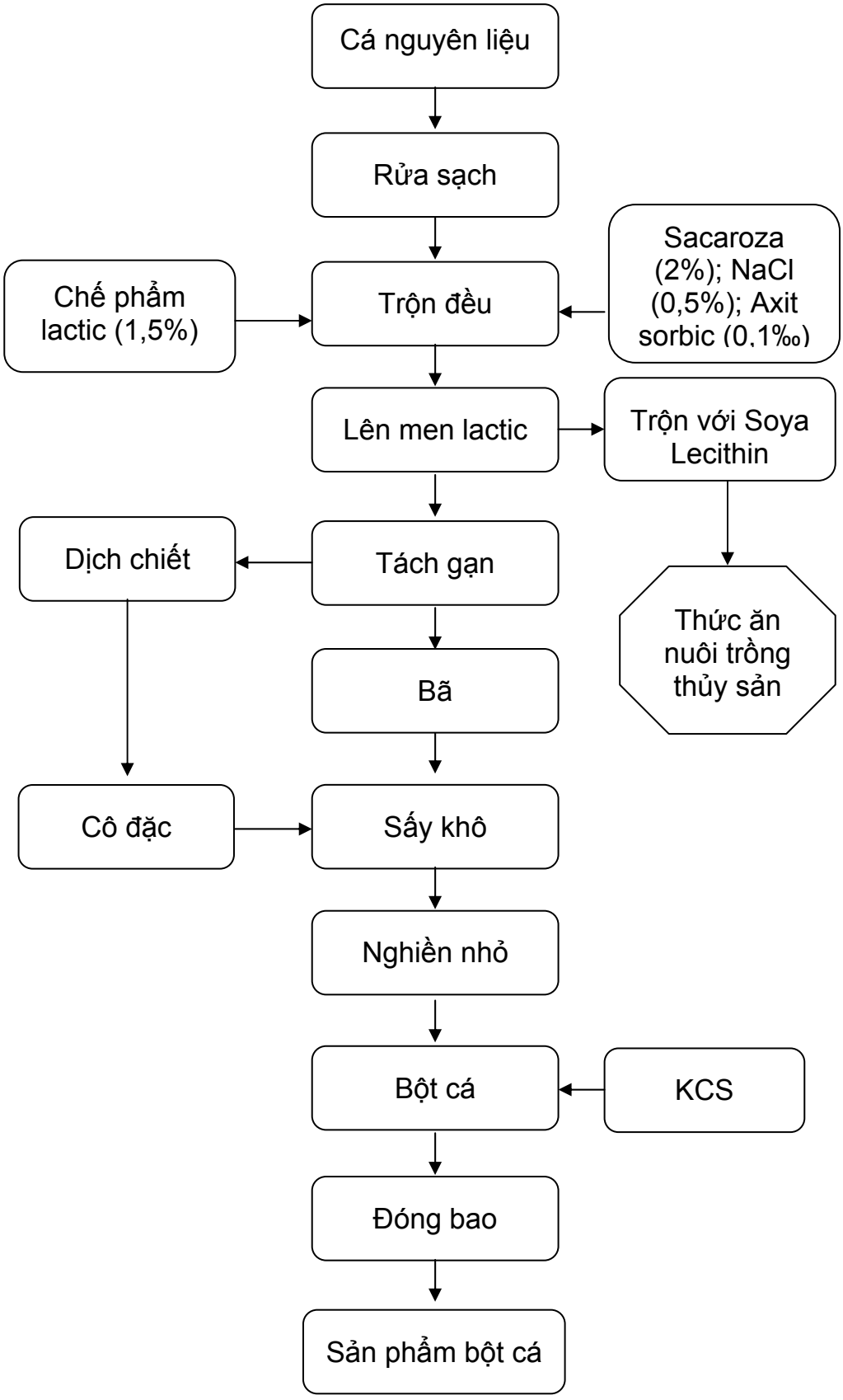
Sau thời gian nuôi 3, 5 và 7 tháng, cá được xác định chiều dài và trọng lượng ghi kết quả về chiều dài và trọng lượng trung bình ở các ao thí nghiệm và đối chứng.

Bảng 3.31. Kết quả theo dõi tăng trưởng trung bình cá ao nuôi

Cá nuôi sau thời gian, tháng	Chiều dài trung bình (cm/con)			Trọng lượng trung bình (g/con)		
	Ao TN	Ao ĐC	Chệnh lệch (cm)	Ao TN	Ao ĐC	Chệnh lệch (%)
3	13	10	3	510 ± 5	460 ± 5	10,8
5	25	20	5	730 ± 5	650 ± 5	12,3
7	40	32	8	880 ± 5	750 ± 5	17,3

Kết quả ở bảng 3.31 cho thấy, dùng cá bảo quản có vi khuẩn lactic làm thức ăn giúp cá lớn nhanh hơn, thịt cá chắc hơn, sau 3 tháng nuôi sự chênh lệch về chiều dài là 3 cm, về trọng lượng trung bình là 10,8%. Sau 7 tháng nuôi sự chênh lệch về chiều dài là 8 cm và về trọng lượng là 17,3%.

Từ những kết quả nghiên cứu trên xây dựng sơ đồ quy trình công nghệ bảo quản cá bằng chế phẩm vi khuẩn lactic cho sản xuất bột cá nhạt và thức ăn nuôi trồng thủy sản (hình 3.35).



Hình 3.35. Sơ đồ quy trình bảo quản cá bằng chế phẩm vi khuẩn lactic cho sản xuất bột cá nhạt và thức ăn nuôi trồng thủy sản

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Trong số 36 chủng vi khuẩn lactic sinh tổng hợp axit lactic cao phân lập ở Việt Nam, chọn 4 chủng ký hiệu: HN02, HN11, HN26 và HN34 có đặc tính phù hợp tạo chế phẩm bảo quản cá, các chủng trên đã được phân loại: Chủng HN02 thuộc loài *Pediococcus pentosaceus*, chủng HN11 thuộc loài *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, chủng HN26 thuộc loài *Lactobacillus brevis* và chủng HN34 thuộc loài *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*.
2. Xác định được thành phần môi trường thích hợp và động thái sinh trưởng của 4 chủng HN02, HN11, HN26 và HN34 thay thế môi trường MRS để sản xuất chế phẩm bảo quản cá
   + Môi trường: nước rau cải, nước bắp cải, nước cà chua, nước chấm và nước mắm sử dụng thay thế MRS cho 4 chủng vi khuẩn lactic.
   + Thời gian lên men: Chủng HN02 và HN26: 36 h ÷ 48 h; Chủng HN11 và HN34: 72 h ÷ 84 h
3. Chọn được chất mang phù hợp để tạo chế phẩm: bột ngô/bột đậu tương: 80/20; thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 4 tháng đối với chế phẩm khô số lượng tế bào vẫn ở mức > 10^7 đáp ứng được yêu cầu sử dụng làm giống khởi động trong quá trình bảo quản cá.
4. Đánh giá sự biến động của một số loại vi sinh vật gây hỏng cá và gây bệnh trong quá trình bảo quản: *B. cereus*, *C. perfringens, Coliform, Salmonella, S. aureus,* nấm men, nấm mốc và *V. parahaemolyticus* cho thấy, khi sử dụng vi khuẩn lactic bảo quản cá số lượng các nhóm vi khuẩn trên giảm nhanh hơn trong ngày đầu và ức chế hoàn toàn sau 3 ÷ 5 ngày so với cá bảo quản không sử dụng vi khuẩn lactic. Một số loại vi khuẩn gây hỏng cá và vi khuẩn gây bệnh được loại trừ hoàn toàn khỏi sản phẩm, giúp cải thiện chất lượng và đảm bảo ATVSTP.
5. Xác định bổ sung 1 số loại vi khuẩn không phân lập được trong cá ban đầu và cá sau bảo quản (25 ngày) bằng kỹ thuật DGGE cho thấy

sự ảnh hưởng của vi khuẩn lactic đã thay đổi về thành phần 1 số loại vi khuẩn trong cá, phát hiện được 2 loài vi khuẩn gây bệnh *L. garvieae* và *C. tetani* trong mẫu cá không bổ sung vi khuẩn lactic. Các loài này đã được loại trừ khi được bảo quản bằng vi khuẩn lactic.

6. Cá bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic có chất lượng cảm quan cao hơn và các chỉ tiêu về vi sinh vật gây bệnh *E. coli, Coliform, B. cereus, C. perfingens* thấp hơn so với cá bảo quản bằng phương pháp lên men truyền thống. Cá bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic đạt tiêu chuẩn quy định của Bộ Y tế về ATVSTP, trong khi đó bảo quản theo phương pháp truyền thống có chỉ tiêu về vi sinh vật khác cao hơn tiêu chuẩn cho phép.

   + Hàm lượng axit amin tổng số trong các mẫu cá trước và sau khi bảo quản tương đương nhau > 3% (g/100 g), trong khi đó hàm lượng axit amin tự do trong các mẫu bảo quản bằng vi khuẩn lactic > 60 (mg/100g) so với cá ban đầu (52,03%)

7. Sử dụng cá bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic làm nguyên liệu sản xuất bột cá nhạt có các chỉ tiêu cảm quan và hóa lý đạt TCVN. Cá bảo quản bằng vi khuẩn lactic sử dụng làm thức ăn trực tiếp cho cá Mú nuôi bán thâm canh tăng năng suất 17,3%, giảm thiểu vi sinh vật gây bệnh cho cá trong ao nuôi, cải thiện được môi trường nuôi.
8. Đã xây dựng quy trình tạo chế phẩm vi khuẩn lactic bảo quản cá và sơ đồ quy trình sử dụng vi khuẩn lactic dùng cho bảo quản cá để sản xuất bột cá nhạt và nuôi trồng thủy sản.

KIẾN NGHỊ

- Hiện nay ngành thủy sản cá đang phát triển. Lượng cá nhỏ, cá tạp chiếm tương đối lớn trong đánh bắt, để nâng cao được giá trị kinh tế của loại cá này cần ứng dụng chế phẩm vi khuẩn lactic vào bảo quản cá để sản xuất bột cá nhạt cũng như chế biến cá tạp và phụ phẩm cá cho nuôi trồng thủy sản đáp ứng nhu cầu về thức ăn chăn nuôi nhằm nâng cao hiệu suất sử dụng trong Ngành thủy sản nói riêng và Ngành nông nghiệp và phát triển nông thôn Việt Nam nói chung.