

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM VI KHUẨN LACTIC LÊN MỘT SỐ LOẠI VI SINH VẬT GÂY BỆNH VÀ GÂY HỒNG CÁ

NGUYỄN THẾ TRANG, TRẦN ĐÌNH MẮN, PHẠM THANH HÀ
Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Tóm tắt:

Bốn chủng vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02; *Lactobacillus brevis* HN26; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HN11 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34 kết hợp với nhau theo từng cặp và hỗn hợp được bổ sung vào quá trình bảo quản cá ở 25°C, trong 25 ngày. Mật độ cao của vi khuẩn lactic làm pH môi trường giảm nhanh đã giúp ức chế vi sinh vật gây bệnh và gây hồng, nâng cao chất lượng và kéo dài thời gian bảo quản của sản phẩm hơn so với phương pháp lên men truyền thống.

STUDYING THE EFFECTS OF BIO-PRODUCTS OF LACTIC BACTERIA IN SOME MICROORGANISMS DETERIORATING FISH

Abstract:

To preserve, fish were fermented with lactic acid bacteria. *Pediococcus pentosaceus* HN02; *Lactobacillus brevis* HN26; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HN11 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34 were combined together in pair or complex. Rapid growth of lactic acid bacteria, decline pH inhibited the growth of pathogenic and deteriorating microorganisms, maintained the nutritive quality and extended the shelf life of the fermented products compared to the traditional fish fermentation at 25°C until 25 days.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic (VKLT) từ xưa đã được dùng nhiều trong bảo quản thực phẩm. Những sản phẩm như axit lactic, axit acetic, H₂O₂, CO₂ và các bacteriocin sinh ra bởi vi khuẩn này có thể ức chế những vi sinh vật (VSV) gây bệnh, gây hồng, kéo dài thời gian bảo quản và cải thiện sự an toàn của sản phẩm (Larisa &cs., 2000).

Cá chóng hồng và khó bảo quản hơn các thực phẩm khác do hàm lượng nước tương đối cao trong các tổ chức của cá. Sự có mặt của lớp màng nhầy là môi trường tốt cho VSV phát triển.

Bột cá là thành phần quan trọng không thể thiếu trong thức ăn chăn nuôi gia súc và nuôi thủy sản. Sử dụng VKLT lên men cá làm nguyên liệu sản xuất bột cá có chất lượng cao nhằm tận dụng nguồn cá tạp phân tán, tăng khả năng đáp ứng nhu cầu bột cá công nghiệp và hạn chế ô nhiễm môi trường là cần thiết.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Cá tạp nước mặn được mua ở chợ cá Đồ Sơn, Hải Phòng.

- Chất mang tạo chế phẩm: bột ngô 50%, muối 0,5%, đường 2%, axit sorbic 0,1%.

n- Chủng VKLT: *Pediococcus pentosaceus* HN02; *Lactobacillus brevis* HN26; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HN11 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34 trong bộ sưu tập chủng của Viện Công nghệ sinh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy

Các chủng VKLT được nhân giống riêng rẽ trên môi trường MRS ở 30°C trong 48 giờ, được trộn với chất mang (tỉ lệ 2%). Chế phẩm bảo quản ở nhiệt độ phòng. Sau 7 ngày chế phẩm chứa các chủng VKLT mật độ khoảng 10^9 CFU/g được trộn đều vào cá theo các lô thí nghiệm (TN) với tỉ lệ 2%. Đối chứng (ĐC)q: Chi bổ sung chất mang không chứa VKLT. TN1: Bổ sung chế phẩm chứa hỗn hợp 2 chủng HN02 và HN26. TN2: Bổ sung chế phẩm chứa hỗn hợp 2 chủng HN11 và HN34. TN3: Bổ sung chế phẩm chứa hỗn hợp 4 chủng VKLT trên. Thí nghiệm để ở nhiệt độ 25°C trong bình vô trùng. Sau 0, 1, 3, 5, 9 và 25 ngày lấy mẫu phân tích.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

VKLT được xác định trên thạch đĩa MRS bổ sung 1% CaCO₃; *Bacillus cereus* xác định trên thạch đĩa BCM; *Clostridium perfringens* trên thạch ống kỵ khí TSC; *Coliforms* xác định theo phương pháp MPN trên dịch thể CM; *Escherichia coli* xác định trên MacConkey; *Staphylococcus aureus* xác định trên thạch đĩa Baird Parker; *Salmonella* spp. xác định trên thạch đĩa SS; *Vibrio parahaemolyticus* xác định trên thạch đĩa TCBS. Các vi khuẩn gây bệnh được tách và quan sát dưới kính hiển vi.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Biến động pH trong các mẫu cá bảo quản

Bảng 1. Sự thay đổi pH của các mẫu cá theo thời gian bảo quản

Mẫu	Thời gian bảo quản (ngày)				
	1	3	5	9	25
ĐC	6,20	5,20	4,50	4,2	4,35
TN1	6,10	4,12	3,70	3,80	3,85
TN2	6,10	4,25	3,90	3,95	3,95
TN3	6,10	4,10	3,55	3,61	3,72

Sự lên men lactic được đánh giá thông qua sự giảm giá trị pH. Kết quả quan sát (bảng 1) cho thấy: sau 3 ngày có sự lên men xảy ra ở tất cả các mẫu thể hiện bằng pH giảm. Sau 5 ngày, mẫu ĐC pH = 4,5, trong khi các mẫu có bổ sung VKLT pH giảm xuống rất thấp còn 3,55 - 3,9. Tới ngày thứ 9 ở mẫu cá lên men truyền thống, pH giảm thấp nhất còn 4,2; ở các mẫu có bổ sung VKLT quá trình chín sinh học đã kết thúc, pH bắt đầu tăng.

Ở thời điểm kết thúc quá trình ủ chua (25 ngày) pH tăng ở tất cả các mẫu đạt giá trị 4.35 ở mẫu ĐC và 3,72-3,95 ở các mẫu lên men lactic có điều khiển. Mẫu có bổ sung 4 chủng VKLT, trong suốt quá trình bảo quản pH luôn đạt giá trị thấp nhất so với các mẫu khác chứng tỏ axit lactic sinh ra là nhiều nhất ở mẫu này.

Theo Alexander & cs. (2000), pH là yếu tố rất quan trọng, nếu VKLT chiếm ưu thế thì pH là 3-3,5, vì nhiều VSV mẫn cảm với pH thấp nên chúng không có cơ hội cạnh tranh với VKLT. pH 5-6 thích hợp cho vi khuẩn gây thối hoạt động, pH 6-7 là tối ưu cho vi khuẩn đường ruột phát triển.

3.2. Biến động nhóm VKLT trong các mẫu cá bảo quản

Sử dụng VKLT ủ chua cá chính là hình thức bảo quản thực phẩm bằng lên men VSV. Vật liệu dùng làm thức ăn cho gia súc nếu đem phơi khô sẽ làm giảm 50% giá trị dinh dưỡng của chúng, nhưng nếu đem ủ chua chỉ giảm khoảng 10% giá trị. Đặc biệt bằng phương pháp ủ chua sẽ làm tăng nhiều chỉ số dinh dưỡng khác của thực phẩm (Alexander & cs., 2000).

Kết quả biến động của VKLT ở hình 1 cho thấy: VKLT có trong cá tạp rất ít, số lượng VKLT ban đầu ở đối chứng đạt 1 lg cfu/g, trong 3 mẫu cá bảo quản có bổ sung 2% giống khởi động thì lượng VKLT ban đầu đạt trên 6 lg cfu/g.

Mật độ VKLT tăng chứng minh có sinh trường tăng trong tất cả các mẫu lên men lactic có điều khiển cho đến 5 ngày, và trong mẫu lên men lactic truyền thống cho đến 9 ngày. Mật độ tối đa đạt 8,32 - 8,86 lg cfu/g ở các mẫu thí nghiệm và 3,57 lg cfu/g ở mẫu đối chứng.

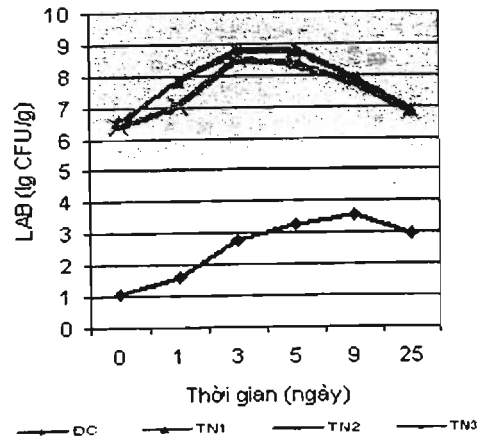
Mật độ cao VKLT ngay ở thời gian đầu của quá trình bảo quản thực phẩm là rất cần thiết. VKLT bổ sung vào sẽ nhanh chóng chiếm ưu thế làm pH môi trường giảm xuống, các VSV khác bị ức chế, chỉ có VKLT phát triển, làm cho sản phẩm chua, tạo hương vị thơm, ngon. Đây là giai đoạn quyết định, nếu VKLT không tạo được ưu thế tuyệt đối thì các VSV khác sẽ phát triển, gây hỏng thực phẩm. VKLT không phá vỡ tế bào cá nên cá chua vẫn có hình dạng gần như không thay đổi.

3.3. Biến động một số nhóm vi khuẩn gây bệnh trong quá trình bảo quản cá

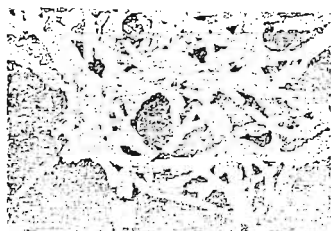
Một số nhóm vi khuẩn gây hỏng cá, gây mất an toàn vệ sinh thực phẩm đã được chúng tôi kiểm tra trong các mẫu cá bảo quản. Hình thái tế bào 3 nhóm vi khuẩn gây bệnh được thể hiện ở hình 2.

Kết quả theo dõi biến động một số nhóm vi khuẩn gây bệnh trong các mẫu cá bảo quản được thể hiện ở bảng 2 và hình 3, 4.

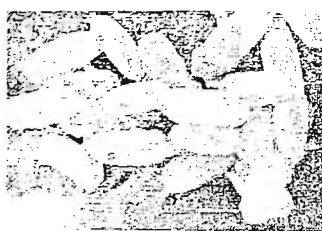
Kết quả thu được cho thấy sự tạp nhiễm vi khuẩn gây bệnh đều quan sát thấy trong tất cả các mẫu trước khi lên men lactic.



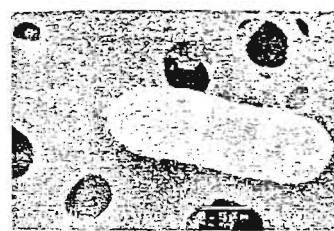
Hình 1. Số lượng VKLT trong các mẫu cá bảo quản



B. cereus (x 5 000)



E. coli (x 15 000)



Salmonella (x 35 000)

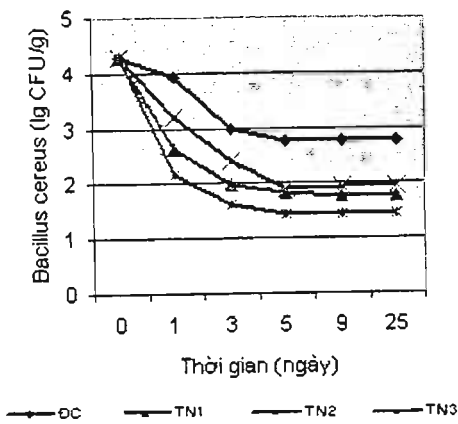
Hình 2. Hình thái tế bào vi khuẩn gây bệnh dưới kính hiển vi điện tử

Bảng 2. Sự biến động của một số nhóm VK gây bệnh ở các mẫu cá bảo quản

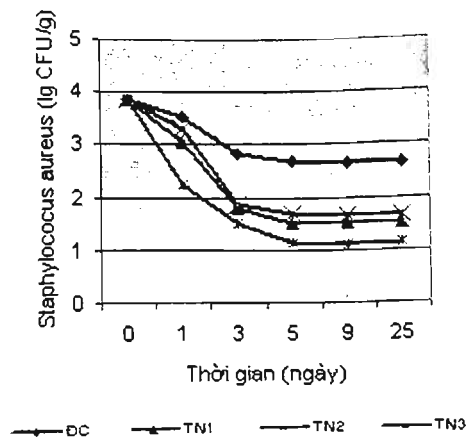
Vi khuẩn gây bệnh	Mẫu	Mật độ tế bào (lg CFU/g) sau thời gian bảo quản (ngày)					
		0	1	3	5	9	25
<i>Cl. perfringens</i>	ĐC	2,15	1,99	1,93	1,77	1,54	1,60
	TN1	2,09	1,83	1,36	-	-	1,11
	TN2	2,10	1,90	1,73	-	-	1,18
	TN3	2,05	1,75	1,32	-	-	-
<i>E. coli</i>	ĐC	3,25	3,06	2,65	1,63	1,36	1,38
	TN1	3,16	2,76	1,12	-	-	-
	TN2	3,22	2,90	1,43	1,39	-	-
	TN3	3,28	2,67	1,24	-	-	-
<i>Coliform</i>	ĐC	3,27	3,09	2,81	1,68	1,42	1,12
	TN1	3,18	2,68	1,34	-	-	-
	TN2	3,21	2,85	1,72	1,38	-	-
	TN3	3,25	2,65	1,38	-	-	-
<i>Salmonella sp.</i>	ĐC	2,03	1,71	1,20	-	-	-
	TN1	1,98	1,57	-	-	-	-
	TN2	2,05	1,53	-	-	-	-
	TN3	2,02	1,43	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	ĐC	1,87	1,51	1,11	-	-	-
	TN1	1,76	1,32	-	-	-	-
	TN2	1,65	1,39	-	-	-	-
	TN3	1,78	1,20	-	-	-	-

• Sự biến động của *B. cereus* và *St. aureus*

Ở mẫu bảo quản theo phương pháp lên men truyền thống số lượng *B. cereus* và *St. aureus* có giảm theo thời gian nhưng rất chậm, ở cuối giai đoạn lên men số lượng 2 loại vi khuẩn gây bệnh này vẫn còn khoảng 2,8 lg CFU/g. Ở các mẫu bảo quản bằng lên men lactic có điều khiển số lượng 2 nhóm vi khuẩn gây bệnh này giảm rõ rệt, đặc biệt ở thí nghiệm bảo quản bởi chế phẩm chứa 4 chủng VKLT sau 5 ngày bảo quản số lượng *B. cereus* giảm xuống còn 1,45 lg CFU/g và số lượng *St. aureus* giảm chỉ còn 1,13 lg CFU/g. Những số lượng này gần như không giảm cho đến cuối thời gian bảo quản.



Hình 3. Số lượng *B. cereus* trong các mẫu cá bảo quản



Hình 4. Số lượng *St. aureus* trong các mẫu cá bảo quản

Sự ức chế *B. cereus* liên quan đến mức độ axit hoá. Trong môi trường pH < 4,5, sinh trưởng của chúng bị dừng lại (Aryanta & cs., 1991).

Theo nghiên cứu của Lyhs (2002), khi bổ sung VKLT, hơn 99% *Staphylococcus* đã bị ức chế sau 2 ngày và bị diệt hoàn toàn sau 7 ngày.

- Sự biến động của *Cl. perfringens*

Cl. perfringens là loại kỵ khí, chúng tồn tại trong ruột cá và có thể lây nhiễm từ môi trường ngoài. Kết quả từ bảng 2 cho thấy, với mẫu không bổ sung chế phẩm, *Cl. perfringens* tồn tại suốt quá trình bảo quản, số lượng của vi khuẩn này có giảm nhờ lên men lactic tự nhiên, tuy nhiên sau 25 ngày số lượng vẫn còn 1,6 lg CFU/g. Đối với các thí nghiệm có bổ sung VKLT thì *Cl. perfringens* giảm rõ rệt, sau 5 ngày không còn phát hiện sự sinh trưởng của vi khuẩn này. Tuy nhiên sau 25 ngày bảo quản chỉ có ở thí nghiệm 3 (có bổ sung 4 chủng VKLT) *Cl. perfringens* bị diệt hoàn toàn, còn ở 2 thí nghiệm khác lại thấy sự xuất hiện trở lại của *Cl. perfringens* nhưng ở mức thấp từ 1,11- 1,18 lg CFU/g. *Cl. perfringens* là vi khuẩn có bào tử nên trong môi trường axit chúng bị ức chế hoạt động, đến cuối thời gian bảo quản lúc này VKLT giảm mật độ, bào tử *Cl. perfringens* lại nảy mầm và vi khuẩn này sinh trưởng yếm khí trong sản phẩm. Vì vậy đối với bảo quản cá bằng sử dụng các cặp chủng VKLT, quá trình nên dừng lại trước 25 ngày.

- Sự biến động của *E. coli* và *Coliform*

E. coli và *Coliform* là 2 nhóm vi khuẩn tạp nhiễm có mật độ trước khi bảo quản khá cao. Tuy nhiên sau 5 ngày bảo quản, 2 nhóm này không còn xuất hiện ở mẫu có bổ sung cả 4 chủng VKLT và mẫu có bổ sung 2 chủng HN02 và HN26. Sau 9 ngày bảo quản ở mẫu bổ sung 2 chủng HN11 và HN34 cũng không phát hiện thấy 2 nhóm vi khuẩn này. Ở mẫu cá không bổ sung VKLT, số lượng 2 nhóm VK này có giảm, tuy nhiên chúng vẫn còn tồn tại lượng nhỏ ở cuối quá trình bảo quản.

- Sự biến động của *Salmonella* sp. và *V. parahaemolyticus*

Trong các mẫu cá, mật độ *Salmonella* sp. và *V. parahaemolyticus* là thấp so với các nhóm vi khuẩn gây bệnh khác. Sau 3 ngày bảo quản ở các mẫu có bổ sung VKLT và sau 5 ngày bảo quản ở mẫu cá lên men lactic truyền thống cả 2 nhóm vi khuẩn gây bệnh này đều

bị tiêu diệt hoàn toàn. Theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế thì 2 nhóm vi khuẩn này không được phép tồn tại trong thực phẩm sạch.

Vibrio là chi gây bệnh bị ức chế bởi VKLT tách từ sản phẩm cá lên men (Ostergaard & cs., 1998).

* Ở thời điểm kết thúc quá trình bảo quản, đánh giá cảm quan cho thấy không có sự thay đổi mùi vị sản phẩm trong các mẫu lên men lactic có điều khiển. Mẫu lên men lactic truyền thống, mùi không thơm và cấu trúc cá không chắc như mẫu có bổ sung VKLT.

IV. KẾT LUẬN

Cá bảo quản bằng chế phẩm chứa cả 4 chủng VKLT là tốt nhất, sau đó đến cá bảo quản bằng chế phẩm chứa hỗn hợp 2 chủng HN02 và HN26. Việc bổ sung VKLT có thể giúp cải thiện đáng kể về chất lượng cũng như an toàn vệ sinh thực phẩm so với phương pháp lên men cá truyền thống. Nhiệt độ bảo quản cá khoảng 25°C và thời gian bảo quản cá kéo dài tới 25 ngày rất có ý nghĩa cho các tàu bè đánh bắt xa bờ có thể chủ động ủ chua cá ngay trên tàu không cần mất thời gian và chi phí bảo quản bằng đông lạnh. Sản phẩm cá sau bảo quản có thể được sử dụng như nguyên liệu để sản xuất bột cá làm thức ăn gia súc và nuôi trồng thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực, thực phẩm, Giới hạn ô nhiễm vi sinh trong thực phẩm, theo QĐ 3742/2001/QĐ-BYT, 31/8/2001 của Bộ Y tế.
2. Alexander Gelman, Vladimir Drabkin, Larisa Glatman (2000), Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from preserved fish products, as starter cultures for new fish-based food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1 (3), 219-226.
3. Bustari Hasan (2003), Fermentation of Fish Silage using *Lactobacillus pentosus*. *Jurnal Natur Indonesia ISSN 1410- 9379*, 6 (1): 11-15.
4. Larisa Glatman, Vladimir Drabkin & Alexander Gelman (2000), Using lactic acid bacteria for developing fish food products. *J Sci Food Agric* 80: 375-380.
5. Lyhs U. (2002), Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. *Academic Dissertation, Departmen of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland.*