

TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI SINH VẬT TỪ CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

LƯƠNG ĐỨC PHẠM, NGUYỄN THẾ TRANG
NGUYỄN PHƯƠNG NHỤỆ, NGUYỄN VĂN HIẾU
Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm KHTN&CNQG

I. MỞ ĐẦU

Ở nước ta cũng có nhiều sản phẩm lên men truyền thống như nem chua, mắm chua, chao, men thuốc bắc (men rượu), mốc tương, ... Những sản phẩm này gắn liền với hoạt động của vi sinh vật có trong đó. Vi sinh vật từ lâu con người đã biết sử dụng để chế biến thức ăn, biến các nguồn nguyên liệu sẵn có thành những món ăn thức uống có giá trị hơn về mặt dinh dưỡng, hợp khẩu vị và bảo quản được lâu. Nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi sinh vật thuần chủng từ các sản phẩm lên men truyền thống này nhằm mục đích chọn ra được những chủng vi sinh vật có tính đặc trưng cao cho những sản phẩm nhất định để cải tiến các quy trình chế biến và nâng cao chất lượng sản phẩm [1, 3, 4, 5, 7].

Trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi trình bày nghiên cứu, tuyển chọn các chủng vi sinh vật thuần chủng như *Aspergillus oryzae* từ mốc tương có khả năng sinh tổng hợp proteaza cao, *Aspergillus awamori* và *Endomycopsis fibuliger* từ bánh men truyền thống sinh glucoamylaza và *Lactobacillus* sinh axit lactic từ nem chua.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Nguyên liệu

- Mốc tương từ mốc tương Bản - Hưng Yên.
- Bánh men cổ truyền làng Đại Lâm, Tam Đa - Yên Phong - Bắc Ninh.
- Nem chua Phùng - Hoài Đức - Hà Tây.

2. Phương pháp

a/ Phương pháp phân lập:

- Phân lập nấm mốc sử dụng môi trường Czapek - Dox.
- Phân lập giả nấm men sử dụng môi trường malt-thạch và Hansen + cao nấm men.
- Phân lập vi khuẩn lactic sử dụng môi trường MRS.

b/ Phương pháp xác định:

- Xác định proteaza theo Babakina [2].
- Xác định glucoamylaza theo phương pháp vi lượng của V. Y Rodzevich và O. P. Korenbiakina [6,7].
- Đánh giá khả năng sinh axit lactic trên môi trường chế biến nem chua theo pH môi trường và cảm quan sản phẩm [6, 7, 9, 10].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Chủng *A. oryzae* từ mốc tương và khả năng sinh proteaza của chúng

1.1. Tuyển chọn chủng mốc *A. oryzae*

Với 5 chủng mốc phân lập được từ mốc tương Bản được ký hiệu SH, SH-1, SH-2, TP-98, và TP-1, nuôi trên môi trường Czepek-Dox được thay thế sacaroza bằng casein (nuôi ở hộp petri), nhiệt độ 30°C, thời gian 72 giờ. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Sơ tuyển chọn các chủng *A. oryzae* có vòng phân giải cao

STT	Ký hiệu chủng nấm mốc	D-vòng phân giải (mm)
1	SH	41
2	SH-1	32
3	SH-2	38
4	TP-98	46
5	TP-1	40

Từ bảng 1 nhận thấy chủng TP-98 có đường kính vòng phân giải là 46 mm, lớn hơn cả 4 chủng SH, SH-1, TP-1 và SH-2. Vòng phân giải của chủng TP-98 có độ trong và rõ nhất nên được chọn để nghiên cứu.

1.2. Lên men *A. oryzae* TP-98 sinh tổng hợp proteaza

Chủng *A. oryzae* TP-98 được chọn để lên men tiếp. Môi trường lên men là đậu tương mảnh bổ sung 2% trấu, 70% nước, nuôi ở 28°C có thông khí, giữ độ ẩm 80-100%. Sau 12 giờ lấy mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thời gian tích tụ proteaza của chủng *A. oryzae* TP-98

Thời gian (h)	12	24	36	48	60	72	84
Hoạt lực (đv/g)	2,45	3,96	4,98	7,56	9,54	9,19	6,54

Từ bảng 2 ta thấy sự tích tụ proteaza ở thời điểm 60 giờ đạt 9,54 (đv/g). Đến 72 giờ hoạt lực giảm còn 9,19 (đv/g).

2. Chủng *A. awamori* từ bánh men và khả năng sinh tổng hợp glucoamylaza của chúng

2.1. Sơ tuyển các chủng *A. awamori* sinh tổng hợp glucoamylaza cao

Từ 5 chủng nấm mốc phân lập từ bánh men cổ truyền (Bắc Ninh) được ký hiệu như sau: 99A1, 99A2, 99A7, 99A8 và 99A9. Chúng tôi nuôi trên môi trường Czapek-Dox được thay thế sacaroza bằng tinh bột, nhiệt độ nuôi 30°C, thời gian 72 giờ. Kết quả đo đường kính vòng phân hủy tinh bột được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Sơ bộ tuyển chọn các chủng *A. awamori* có vòng thủy phân tinh bột cao

STT	Ký hiệu chủng	D- Đường kính vòng phân giải (mm)	d- Đường kính khuẩn lạc (mm)	Hiệu số D-d (mm)
1	99A1	28	19	9
2	99A2	26	17	9
3	99A7	7	7	0
4	99A8	22	15	7
5	99A9	24	17	7

Từ bảng 3 ta thấy chủng *A. awamori* 99A7 không sinh enzym thủy phân tinh bột, chủng 99A1 và 99A2 có khả năng thủy phân tinh bột cao hơn so với 2 chủng 99A8 và 99A9, nhưng chủng 99A1 có vòng phân giải rõ nhất và trong nhất nên được chúng tôi chọn để nghiên cứu tiếp.

2.2. Khả năng tính tụ glucoamylaza của chủng *A. awamori* 99A1

Môi trường nuôi mốc 99A1 có thành phần sau: cám gạo 78,7%, bột ngô 15,3%, trấu 6%, NaNO₃ 2,2 g/100 gam môi trường, độ ẩm 55%, tỷ lệ giống 1,5%, nhiệt độ nuôi 30°C, quá trình nuôi được thông khí bằng quạt gió, có bổ sung nước để đảm bảo độ ẩm cần thiết. Sự tích tụ enzym được theo dõi ở các thời điểm khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Thời gian tích tụ glucoamylaza của chủng *A. awamori* 99A1

Thời gian (h)	36	40	44	48	52	56	60
Hoạt lực (đv/g)	724	765	812	842	806	722	685

Kết quả bảng 4 cho thấy hoạt lực glucoamylazacao nhất là 842 (đv/g) ở thời điểm 48 giờ, còn ở thời điểm 44 giờ chỉ đạt hoạt lực 812 (đv/g). Như vậy nếu áp dụng vào thực tế sản xuất ta có thể kết thúc thời gian nuôi nấm mốc sau 48 giờ mà glucoamylaza có hoạt lực tối đa là 842 (đv/g) chế phẩm thô.

3. Chủng *E. fibuliger* và khả năng sinh tổng hợp glucoamylaza của chúng

Từ nguồn bánh men cổ truyền đã phân lập được một số chủng *E. fibuliger* đã kiểm tra sơ bộ khả năng sinh glucoamylaza trên môi trường thạch tinh bột, chọn được chủng *E. fibuliger* 9933 có khả năng sinh glucoamylaza cao và tối ưu được quá trình sinh tổng hợp trên môi trường xốp thành phần: cám gạo 80%; bột ngô: 4,4%;

(NH₄)₂SO₄: 1,6% và trấu 14%, đồng thời đã nghiên cứu đặc điểm về hình thái tế bào và khuẩn lạc trên môi trường malt và Hansen [3].

4. Chủng *Lactobacillus sp* và khả năng sinh axit lactic của chúng

4.1. Sơ chủng *Lactobacillus sp* từ nem chua tự nhiên

Sử dụng môi trường đặc hiệu MRS để phân lập vi khuẩn lactic. Mẫu được phân lập lấy từ nem chua tự nhiên sau 48 giờ lên men. Từ các khuẩn lạc chúng tôi sơ bộ tách được 4 chủng để nghiên cứu là NC 9801, NC 9802, NC 9803 và LAB NC 9804. Qua nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, NaCl, chuyển hoá đường thành axit lactic và khả năng axit hoá môi trường của chúng, đã chọn được chủng *Lactobacillus sp* NC 9801 là chủng thích hợp cho lên men.

4.2. Khả năng lên men sinh tổng hợp axit lactic của chủng *Lactobacillus sp* NC 9801

Chủng *Lactobacillus sp* NC 9801 được nuôi nhân giống trên môi trường nước cà chua sau 15-18 giờ thì được bổ sung vào thịt, tỷ lệ sao cho mật độ tế bào ban đầu trong thịt đạt khoảng 10⁶-10⁷ tế bào/gam, lượng đường ban đầu là 2%, lượng NaCl là 1,5%, nhiệt độ lên men là 30°C. Mẫu nghiên cứu được lấy sau những khoảng thời gian nhất định và được đánh giá bằng các chỉ tiêu: pH và giá trị cảm quan. Kết quả được đánh giá ở bảng 5.

Từ bảng 5 chúng ta nhận thấy khi lên men tự nhiên thì phải sau 36 giờ lên men mới thu được thành phẩm. Do đó, trong thực tế thời gian lên men thường kéo dài hơn (48-60 giờ) là dễ hiểu, vì nhiệt độ lên men không ổn định trong suốt quá trình lên men. Khi có thể ăn được thì nem chua có pH khoảng 4,5-4,6 và nem ăn ngon nhất là khi có pH khoảng 4,3 - 4,4. Trong khi đó quá trình lên men có bổ sung *Lactobacillus sp* NC 9801 vào thịt chỉ sau 18-24 giờ đã có thể thu được thành phẩm. Đồng thời chỉ sau 12 giờ thì mẫu có bổ sung *Lactobacillus sp* NC 9801 đã đạt được pH khá thấp (4,78), trong khi mẫu lên men tự nhiên sau 18 giờ cũng chưa đạt được pH này (4,81). Điều này có ý nghĩa lớn khi trong sản xuất cần phải hạ nhanh pH xuống để ngăn chặn nguy cơ lây nhiễm ở giai đoạn đầu quá trình lên men. Nếu để lên men tiếp thì pH tiếp tục hạ xuống thấp (4,16), lúc đó nem rất chua và hầu như không còn vị ngọt.

Bảng 5. Biến đổi của pH và cảm quan thịt trong quá trình lên men

Thời gian (giờ)	Lên men tự nhiên		Lên men có sử dụng <i>Lactobacillus sp</i> NC 9801	
	pH	Giá trị cảm quan	pH	Giá trị cảm quan
0	6,04	Khối thịt nhão, màu đỏ tươi, tanh	5,98	Khối thịt nhão, màu đỏ tươi, tanh
6	5,84	Khối thịt màu đỏ tái, rời, mặt hơi se, còn mùi thịt sống	5,80	Khối thịt màu đỏ tái, rời, mặt hơi se, còn mùi thịt sống
12	5,15	Khối thịt màu đỏ tái, mặt hơi se, còn mùi thịt sống	4,78	Khối thịt màu đỏ tái, cứng và có độ đàn hồi tốt, mặt se, ăn được, song chỉ thấy vị ngọt
18	4,81	Khối thịt màu đỏ tái, cứng và có độ đàn hồi tốt, không còn mùi tanh nhưng ăn chỉ thấy vị ngọt	4,46	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, ăn ngon có hương thơm đặc trưng, chua, ngọt vừa
24	4,66	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, ăn có hương thơm đặc trưng, hơi chua và ngọt vừa	4,27	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, ăn ngon có hương thơm đặc trưng, chua, ngọt vừa.
30	4,57	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, có hương thơm đặc trưng, hơi chua, ngọt vừa	4,16	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, ăn rất chua, không còn vị ngọt
36	4,47	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, ăn ngon có hương thơm đặc trưng, chua, ngọt vừa.	-	-
42	4,38	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, ăn ngon có hương thơm đặc trưng, chua, ngọt vừa.	-	-
48	4,34	Khối thịt màu đỏ hồng, cứng, mặt se, đàn hồi tốt, ăn ngon có hương thơm đặc trưng, chua, ngọt vừa.	-	-

IV. KẾT LUẬN

Các sản phẩm lên men truyền thống là những nguồn vi sinh vật phong phú và đa dạng. Từ đó đã phân lập được các chủng có hoạt tính cao và có triển vọng để nghiên cứu tiếp theo, áp dụng vào các quy trình chế biến công nghiệp:

1/ Từ các sản phẩm lên men truyền thống đã phân lập được một số chủng nấm men, nấm mốc và vi khuẩn có hoạt tính cao: *A. oryzae* TP-98, *A. awamori* 99A1, *E. fibuliger* 9933 và *Lactobacillus* sp. NC 9801.

2/ Sử dụng chủng nấm mốc *A. oryzae* TP-98 sinh tổng hợp proteaza trên môi trường đậu tương mảnh.

3/ Sử dụng chủng nấm mốc *A. awamori* 99A1 và giả nấm men *E. fibuliger* 9933 sinh tổng hợp glucoamylaza trên môi trường xốp.

4/ Đã sử dụng chủng vi khuẩn lactic *Lactobacillus* sp. NC 9801 để chế biến nem chua. Kết quả cho thấy có thể rút ngắn thời gian lên men ít nhất 2 lần (18 giờ) so với cách làm truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phùng Thị Hà, Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Thị Hiền, Lương Đức Phẩm, 1999. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng lên men của một số chủng nấm men phân lập từ bánh men cổ truyền. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 9-10/12/1999, 374-382.
2. Lê Văn Nhung, Quãn Văn Thịnh, 1968. Kỹ thuật sản xuất tương và nước chấm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 170.
3. Lương Đức Phẩm, Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Nhật Quang, Nguyễn Văn Hiếu, 1999. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm glucoamylaza (GLA) từ nấm mốc và nấm men bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt. Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Hà Nội, 9-10/12/1999, 345-351.
4. Nguyễn Hữu Phúc, 1998. Các phương pháp lên men thực phẩm truyền thống ở Việt Nam và các nước trong vùng. Nhà xuất bản Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.
5. Vũ Hồng Thắng, Lê Thanh Mai, Lương Đức Phẩm, 1999. Sử dụng *Lactobacillus* sp NC 9801 trong quá trình chế biến nem chua. Tạp chí Khoa học và Công nghệ (37), 3.
6. Bùi Thị Nhu Thuận, Phạm Văn Sổ. Kiểm nghiệm lương thực, thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 1975.
7. Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Tô Kim Anh, 1997. Thí nghiệm hoá sinh công nghiệp. Trung tâm công nghệ sinh học - Bộ môn Hoá sinh - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, 87-88.
8. Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Thanh Trà, Lương Đức Phẩm, 1998. Nghiên cứu thu nhận chế phẩm proteaza thô từ *A. oryzae* TP-98 bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt. Tạp chí Khoa học và Công nghệ (36), 6, 17-21.
9. Matrozza M. A., 1985. Fermentation method and Compositions in cluding a *Lactobacillus* species strain United states Patent, US 4 521 434.
10. Matrozza M. A., 1986. Fermentation method using a selected *Lactobacillus*. United states Patent, US 4 579 740.

SUMMARY

THE SELECTION OF SOME PURE MICROBIAL STRAINS FROM TRADITIONAL FERMENTATION PRODUCTS

LUONG DUC PHAM, NGUYEN THE TRANG
 NGUYEN PHUONG NHUE, NGUYEN VAN HIEU
Institute of Biotechnology, NCST

Traditional fermentation products are resources of multiple microbial. Some strains isolated from these products were studied:

1/ Moust strains: A. oryzae TP-98; A. awamori 99A1; yeast strain: E. fibuliger 9933 and bacterial strain Lactobacillus sp. NC 9801 have high enzymatic activities.

2/ Strain A. oryzae TP-98 were used for production of soy sauce.

3/ Strain A. awamori 99A1 and strain E. fibuliger 9933 were used for production of glucoamylase on solid fermentation media.

4/ Using of strains Lactobacillus sp. NC 9801 produced "Nem chua". The fermentation time was reduced to about half of that in the traditional method.