

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỬ NGHIỆM CHẾ BIẾN TẠO SẢN PHẨM NẤM SÒ LÊN MEN

Nguyễn Thanh Huyền<sup>1</sup>, Lê Thị Mai Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Thùy<sup>1</sup>,  
Ngô Xuân Nghiênn<sup>1</sup>, Trần Thị Đào<sup>1</sup>, Phạm Thị Thu Trang<sup>1</sup>, Vũ Thị Ly<sup>1</sup>,  
Nguyễn Hoàng Anh<sup>2</sup>, Hoàng Hải Hà<sup>2</sup>, Đỗ Thị Hạnh<sup>3</sup>, Nguyễn Xuân Cảnh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam  
<sup>2</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam  
<sup>3</sup>Khoa Công nghệ hóa, Đại học Công nghiệp Hà Nội

\*Tác giả liên hệ: [nxcanh@vnua.edu.vn](mailto:nxcanh@vnua.edu.vn)

Ngày nhận bài: 23.06.2020

Ngày chấp nhận đăng: 14.12.2020

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm kiếm các chủng vi khuẩn sinh lactic và ứng dụng trong việc bảo quản nấm sò, cũng như nâng cao giá trị dinh dưỡng của loại nấm này. Các chủng vi khuẩn lactic được phân lập, tuyển chọn trên môi trường MRS lỏng và đánh giá khả năng lên men nấm sò. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, có 06 chủng vi khuẩn (D1.1, D1.2, D1.3, D2.1, D2.2, N2.2) mang các đặc điểm của chi *Lactobacillus* đã được phân lập. Thông qua việc sử dụng phương pháp xác định lượng axit theo độ Therner, vi khuẩn D2.1 và D2.2 được xác định có khả năng sinh axit lactic nhiều nhất với 19,17 mg/ml (D2.1) và 19,38 mg/ml (D2.2) sau 72 giờ nuôi. Hai chủng này đều sinh trưởng, phát triển tốt trên dịch chiết nấm và đạt mật độ cao nhất sau 16-24 giờ nuôi cấy. Chủng vi khuẩn D2.1 và D2.2 được sử dụng để lên men nấm sò. Sản phẩm có màu sắc, mùi vị hấp dẫn và đảm bảo đủ tiêu chí vi sinh về *Salmonella* sp. và *E. coli*. Sản phẩm sau khi lên men được xác định hàm lượng carbohydrate tổng số bằng phương pháp phenol-sulfuric axit và lượng protein thô bằng phương pháp Kjeldahl. Kết quả cho thấy, vi khuẩn tuyển chọn chỉ làm giảm lượng protein của nấm là 2,4% (D2.1) và 5,3% (D2.2); Đối với lượng cacbohydrate có trong nấm, chủng D2.1 làm giảm 7,73%, còn chủng D2.2 làm giảm 9,32%.

Từ khóa: Lên men lactic, nấm sò, vi khuẩn lactic.

### Isolation, Selection and Application of Lactic Acid Bacteria for Testing Process of Producing Fermented Oyster Mushroom

#### ABSTRACT

This study was conducted to isolate lactic acid bacteria and apply them to preserve oyster mushrooms, as well as improve its nutritional value. Lactic acid bacterial strains were isolated, selected in MRS broth medium and tested for fermentation ability of oyster mushroom. The results showed that six bacterial strains potentially belonging to *Lactobacillus* genus were isolated. By using a method of determining acidity in Therner degree, two strains D2.1 and D2.2 were determined with the highest ability to produce lactic acid (19,17 mg/ml and 19,38 mg/ml, respectively) after 72h culture. These two strains have been able to grow well on the mushroom extracts and reached the highest cell density after 16-24h of culture. The D2.1 and D2.2 strains were used for oyster fermentation. The fermented product has attractive colors and delicious taste, as well as meets the product safety requirements for microbiological criteria (*Salmonella* sp. and *E. coli*). After fermentation, total carbohydrate and protein contents were determined by the phenol-sulfuric acid and Kjeldahl methods. The results indicated that D2.1 strain has only reduced the amount of mushroom protein by 2.4%, while D2.2 strain has reduced by 5.3%; For carbohydrate amount of mushrooms, D2.1 strain has decreased by 7.73%, and D2.2 strain has reduced 9.32%, respectively.

Keywords: Lactic acid bacteria, lactic fermentation, oyster mushroom.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic là những vi khuẩn có khả năng lên men sinh axit lactic, thường có dạng hình cầu hay que, không di động, không sinh bào tử, thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, hô hấp kỵ khí tùy tiện (Abee & cs., 1999). Vi khuẩn lactic có vai trò quan trọng trong đời sống của con người. Không chỉ tham gia làm cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột, ngăn chặn rối loạn tiêu hóa, một số vi khuẩn lactic còn có khả năng tổng hợp bacteriocin ức chế vi khuẩn gây bệnh (Rhys & cs., 2008), đồng thời axit lactic do chúng tạo ra còn có tác dụng kìm hãm sự phát triển của vi sinh vật có hại, nhất là vi sinh vật gây thối rữa. Do đó, vi khuẩn lactic được sử dụng rộng rãi trong công nghệ chế biến và bảo quản các loại thực phẩm như: thịt, sữa, rau, củ quả... Thực tế, rau quả muối chua có thể giữ được một vài tuần đến một tháng và trong quá trình lên men lượng axit lactic được sinh ra tạo môi trường axit cho sản phẩm khiến cho lượng vitamin C ít bị hao hụt hơn so với các dạng sản phẩm khác của rau quả. Hơn thế nữa, các vi khuẩn lactic trong khi thực hiện lên men lactic còn tổng hợp vitamin B1, do vậy làm tăng thêm giá trị dinh dưỡng cho sản phẩm rau quả muối chua (Trần Minh Tâm, 1998).

Hiện nay, các loại nấm ăn là loại thực phẩm phổ biến và rất được ưa chuộng trong khẩu phần ăn của người Việt Nam. Năm 2017, hơn 16 loại nấm được trồng ở Việt Nam với sản lượng 115.000 tấn/ năm (Co, 2017). Với giá trị dinh dưỡng cao, nấm đang được coi là “rau sạch, thịt sạch” bởi đặc tính thơm ngon, chứa đạm, đường, chất khoáng và vitamin. Theo Latiff (1996), tính theo trọng khô, trong nấm chứa khoảng 39,9% carbohydrate, 17,5% protein và 2,9% chất béo, và các chất khoáng. Trong số đó, nấm sò là loại nấm có vị ngon, giá trị dinh dưỡng cao, khả năng phòng chống bệnh tốt, nó được sử dụng ngày càng phổ biến trong thực đơn của hàng ngày của các gia đình, đặc biệt là với người ăn chay. Tuy nhiên, nấm sò tươi sau thu hoạch chỉ có thể bảo quản trong thời gian ngắn vì hàm lượng nước và dinh dưỡng cao làm nấm dễ dàng bị thối hỏng. Hiện nay, một số phương pháp bảo

quản nấm như dùng nhiệt độ thấp, sấy khô hay đóng hộp đều có thể làm hao hụt thành phần dinh dưỡng trong nấm. Chính vậy, việc nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn lactic để tạo ra sản phẩm lên men từ nấm sò vừa giúp tăng thời gian bảo quản so với nấm sò tươi lên đến vài tháng, vừa tạo sản phẩm ngon có tạo hình giống xúc xích truyền thống vẫn còn giữ được nhiều giá trị dinh dưỡng của nấm là một giải pháp tối ưu nhất hiện nay. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích lên men nấm sò tươi để thu nhận sản phẩm lên men có giá trị dinh dưỡng cao với mùi chua dịu của acid lactic, mùi thơm của nấm mà vẫn giữ được độ giòn của chân nấm, đồng thời đảm bảo hàm lượng protein và cacbonhydrate của sản phẩm vẫn đạt yêu cầu, cũng như có khả năng đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Nấm sò tươi và các chủng vi khuẩn lactic được thu nhận từ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic

Các mẫu dưa chua và nem chua thu thập tại các chợ trên địa bàn huyện Gia Lâm, Hà Nội được pha loãng theo dãy thập phân, rồi phân lập trực tiếp trên môi trường MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) có bổ sung  $\text{CaCO}_3$  ở điều kiện  $37^\circ\text{C}$  trong 2 ngày (Shelar, 2012). Những khuẩn lạc mọc riêng rẽ có khả năng phân giải  $\text{CaCO}_3$  được chọn để cấy chuyển sang môi trường mới.

Xác định đặc điểm hình thái và sinh hóa của các chủng vi khuẩn được phân lập dựa trên các đặc điểm: hình thái khuẩn lạc và tế bào, khả năng di động, nhuộm Gram, khả năng sinh bào tử, catalase ngoại bào (Bergey's manual of systematic bacteriology).

#### 2.2.2. Thử khả năng lên men đường glucose

Các chủng vi khuẩn lactic được nuôi trong môi trường MRS đến khi mật độ vi khuẩn đạt  $10^8$

tế bào/ml, lấy 1ml dịch nuôi cấy cho vào ống Durham có chứa 9ml dung dịch đường glucose 2%. Ống Durham sau đó được lắc thật đều, rồi úp ngược xuống và được đem đi ủ ở nhiệt độ 37°C. Tại các thời điểm 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 và 22 giờ sau khi ủ, chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham được đánh dấu và ghi nhận (Lý Nguyễn Bình & cs., 2015).

### **2.2.3. Đánh giá khả năng sinh axit của các chủng vi khuẩn lactic**

Xác định lượng axit theo độ Therner (Emanuel & cs., 2005): Vi khuẩn được nuôi cấy trong ống nghiệm chứa 5ml môi trường MRS lỏng, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 37°C. Sau 24h nuôi cấy, dịch nuôi được tiếp giống vào bình tam giác có thể tích 100ml chứa 20ml môi trường MRS lỏng với tỷ lệ tiếp giống 10%, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 37°C. Tại các thời điểm 24h, 48h, 72h nuôi cấy, lấy 1ml dịch nuôi rồi pha loãng với 9ml nước cất, bổ sung 1 giọt chỉ thị phenolphthalein 1%. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi dung dịch chuyển sang màu hồng nhạt bên trong 30 giây thì dừng chuẩn độ ghi lại kết quả. Tại từng thời điểm chuẩn độ, thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Lượng axit lactic sinh ra được tính như sau:

$$m = 0,009 \times 1.000 \times V_{\text{NaOH}}$$

Trong đó:

m: Lượng axit lactic (mg/ml)

V: Thể tích NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ (ml)

0,009: 1ml NaOH tương đương với 0,009g axit lactic = 0,009 × 1.000 (mg).

### **2.2.4. Nuôi cấy vi khuẩn lactic trong môi trường dịch chiết nấm tươi**

Việc nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường dịch chiết nấm sò là bước trung gian để đưa vi khuẩn vào quá trình lên men. Thay vì tiếp giống vi khuẩn trực tiếp từ môi trường MRS chứa nhiều chất phức tạp và có mùi như cao thịt, pepton,... Việc tiếp giống vi khuẩn từ môi trường dịch chiết nấm hoàn toàn có nguồn gốc tự nhiên vào quá trình lên men được thực hiện để đảm bảo tính an toàn cho sử dụng và không để mùi hóa chất ảnh hưởng đến sản phẩm tạo ra. Hơn nữa, dịch chiết

nấm sò cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng của vi khuẩn lactic bao gồm nguồn C, N, vitamin, muối khoáng.

Môi trường dịch chiết nấm sò tươi: nấm sò tươi (200 g/l), glucose (20 g/l), pH 7,0.

Nấm sò tươi thu nhận được đem đi rửa sạch, rồi đun sôi trong 20 phút, gạn lấy nước; 20g glucose được cho vào nước lạnh khuấy tan và cho vào dịch chiết nấm sò. Sau đó, bổ sung nước đun sôi để dung dịch đạt dung tích 1l. Điều chỉnh pH của môi trường đạt giá trị 7,0.

Chủng vi khuẩn lactic được nuôi trong môi trường dịch chiết nấm tươi theo phương pháp của Chockchaisawasdee (2010): sau khi được nuôi trong môi trường MRS lỏng đạt mật độ 10<sup>8</sup> tế bào/ml, vi khuẩn lactic được tiếp giống 10% sang môi trường dịch chiết nấm - đây được coi là môi trường trung gian để các chủng vi khuẩn làm quen với môi trường trước khi bổ sung vào lên men. Tính mật độ tế bào CFU/ml khi nuôi vi khuẩn trong dịch chiết nấm sò tươi. Từ đó, biết được thời điểm và lượng dịch tiếp giống vi khuẩn vào quá trình lên men.

### **2.2.5. Lên men nấm sò tươi sử dụng vi khuẩn lactic**

Được thực hiện theo Chockchaisawasdee (2010), nấm rửa sạch, cắt nhỏ, hấp ở 100°C trong 20 phút giúp giảm vị đắng, đắng của nấm tươi. Để nguội sau đó loại bỏ bớt nước. Gạo nếp vo sạch, nấu chín, để nguội. Phối trộn nguyên liệu theo tỉ lệ % khối lượng:

Nấm sò tươi : Cơm nếp : Dầu thực vật : Tỏi nhuyễn : Ót nhuyễn : Đường : Muối - 40 : 40 : 3 : 2 : 1,5 : 1,5 : 0,4.

Bổ sung 0,1% dịch nuôi cấy vi khuẩn lactic đã được nuôi cấy tăng sinh trên môi trường dịch chiết nấm sò (với mật độ 10<sup>8</sup> tế bào/ml) vào hỗn hợp trên, trộn đều, bọc kín trong màng bọc thực phẩm ủ ở nhiệt độ 20-25°C. Cứ sau mỗi 12h lên men lấy mẫu ra kiểm tra về pH và đánh giá hiệu quả lên men.

### **2.2.6. Xác định các chỉ tiêu của sản phẩm sau lên men**

- Xác định lượng cacbohydrate tổng số của sản phẩm: Chuẩn bị mẫu: 1g mẫu được nghiền

nhỏ và cho vào ống nghiệm, bổ sung 5ml HCl 2N, thủy phân trong bể ổn nhiệt 3 giờ. Trung hòa axit bằng  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  đến khi ngừng có khí thoát ra. Lên thể tích đến 100ml và tiến hành ly tâm thu dịch nổi. Dịch nổi sau đó được sử dụng để xác định lượng carbohydrate tổng số bằng phương pháp phenol - sulfuric axit (Dubois, 1956).

- Xác định lượng protein thô của sản phẩm: Chuẩn bị mẫu: Mẫu được sấy khô đến khối lượng không đổi ở  $70^\circ\text{C}$ , nghiền nhỏ thành bột mịn. Cân 1g mẫu cho vào bình Kjeldahl, cho tiếp 10ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc. Ngâm mẫu qua đêm. Mẫu sau đó được sử dụng để xác định lượng protein thô bằng phương pháp Kjeldahl (TCVN 4328:2001).

- Kiểm định vi sinh vật trong mẫu: Kiểm định *E. coli* được thực hiện theo phương pháp của Maconkey (Buse & cs., 2016).

Kiểm định *Salmonella* sp. được thực hiện theo TCVN 4829:2005.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic

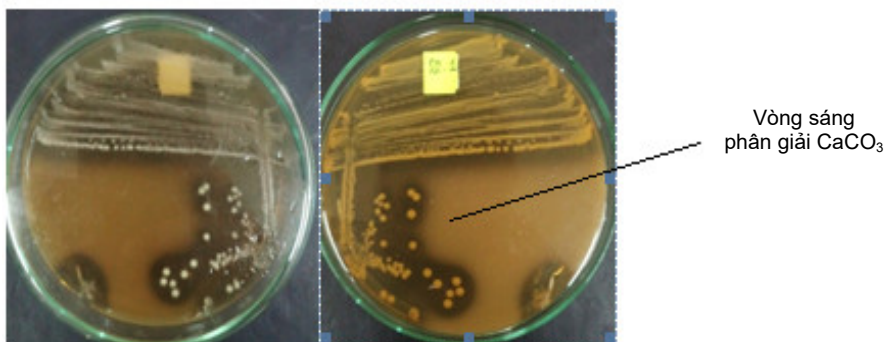
##### 3.1.1. Đặc điểm sinh học của các chủng phân lập

Kết quả phân lập đã thu được 06 chủng vi khuẩn gồm D1.1, D1.2, D1.3, D2.1, D2.2, N2.2 mang các đặc điểm của chi *Lactobacillus* (Bergey's manual of systematic bacteriology) (Kandler, 2005) như vi khuẩn gram dương, không sinh bào tử, không có khả năng di động, không sinh catalase, lên men đường glucose,

phân giải  $\text{CaCO}_3$ . Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước đây về vi khuẩn lactic của Abee & cs. (1999), Sharpe (1979), Axelsson (1998) và Cullimore (2000). Các nghiên cứu đều chỉ ra *Lactobacillus* là một nhóm chính của vi khuẩn lactic, chúng mang những đặc điểm tế bào và đặc điểm sinh học đồng nhất nhau và tương tự như kết quả nghiên cứu được ở trên. Chúng rất phổ biến trong tự nhiên và được coi là an toàn cho con người, ngay trong cơ thể người cũng có sự hiện diện của vi khuẩn. *Lactobacillus* được sử dụng để sản xuất các chế phẩm công nghiệp như sữa chua, phô mai, rau củ muối chua, rượu bia và nhiều sản phẩm khác.

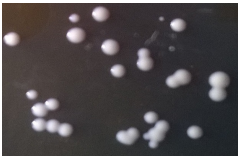
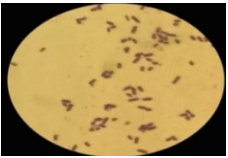
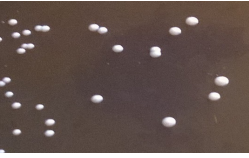
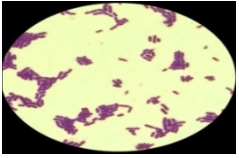





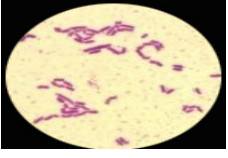


##### 3.1.2. Khả năng sinh axit của các chủng phân lập

Việc xác định lượng axit của các chủng vi khuẩn phân lập cho thấy lượng axit lactic sinh ra ở các thời điểm khác nhau là khác nhau (Hình 2). Lượng axit tăng dần theo thời gian từ 24 giờ đến 72 giờ, qua đó cho thấy lượng axit sinh ra đạt cực đại trong khoảng thời gian từ 48 giờ đến 72 giờ. Lượng axit sinh ra của 6 chủng thuộc loại trung bình ( $\leq 20$  mg/ml) riêng chủng N2.2 sinh axit kém nhất ở cả 3 thời điểm 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ. Hai chủng D2.1 và D2.2 có khả năng sinh axit mạnh hơn các chủng còn lại, thể hiện rõ ở thời điểm 72 giờ nuôi cấy. Tại thời điểm 72 giờ nuôi cấy, lượng axit lactic mà chủng D2.1 sinh ra là 19,17 mg/ml, chủng D2.2 là 19,38 mg/ml. Những chủng có khả năng sinh axit lactic mạnh có thể được sử dụng như nguồn probiotic bởi axit lactic sinh ra có thể ngăn chặn sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh.



Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc chủng vi khuẩn D2.1 sau khi phân lập trên môi trường MRS có bổ sung  $\text{CaCO}_3$

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái của 06 chủng vi khuẩn lactic phân lập**

Kí hiệu	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào và khả năng bắt màu nhuộm Gram
D1.1	 Khuẩn lạc tròn, mép nguyên, màu trắng, bề mặt lồi, có mùi chua	 Gram (+), tế bào hình que ngắn, hai đầu tròn, đứng đơn độc
D1.2	 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, mép nguyên, màu trắng, bề mặt lồi, có mùi chua	 Gram (+), tế bào hình que dài, đứng đơn độc hoặc thành nhóm
D1.3	 Khuẩn lạc tròn, mép nguyên, màu trắng ngà, bề mặt lồi, có mùi chua	 Gram (+), tế bào hình que dài, hai đầu nhọn, đứng đơn độc hoặc thành nhóm
D2.1	 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, mép nguyên, màu trắng, bề mặt lồi, có mùi chua	 Gram (+), tế bào hình que dài, đứng đơn độc hoặc thành nhóm
D2.2	 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, mép nguyên, màu trắng, bề mặt lồi, có mùi chua	 Gram (+), tế bào hình que dài, hai đầu nhọn, đứng đơn độc hoặc thành nhóm
N2.2	 Khuẩn lạc nhỏ, tròn, mép nguyên, màu trắng, bề mặt lồi, có mùi chua	 Gram (+), tế bào hình que ngắn, hai đầu tròn, chủ yếu đứng thành nhóm

Các loại axit hữu cơ như axit lactic hay axit acetic do vi khuẩn lactic sản xuất trong quá trình lên men, đặc biệt là lên men lactose có vai trò tăng khả năng tiêu hóa và hấp thụ. Hơn nữa, axit lactic có thể góp phần làm thay đổi hương vị và mùi hương của thực phẩm (Astuti, 2016).

**3.2. Kết quả thử nghiệm khả năng ứng dụng của hai chủng vi khuẩn D2.1 và D2.2 trong chế biến nấm sò**

**3.2.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn D2.1 và D2.2**

Hai chủng D2.1 và D2.2 được nuôi cấy trong môi trường lỏng, sau mỗi khoảng thời gian 2h lấy mẫu kiểm tra khả năng sinh trưởng thông qua giá trị OD<sub>600</sub>. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên hình 3 cho thấy, cả 2 chủng vi khuẩn này đều có khả năng sinh trưởng rất mạnh (OD ≈ 8), thời gian thế hệ ngắn (khoảng 36 giờ), thời gian trải qua pha tiềm phát và pha lũy thừa

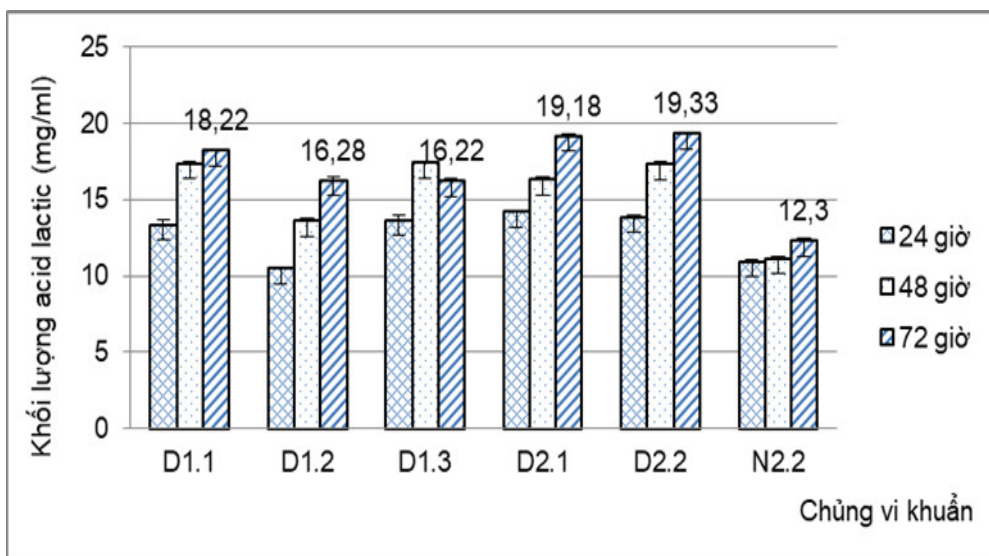
ngắn do vi khuẩn đã được làm quen với môi trường MRS lỏng từ trước. Dựa vào đường cong sinh trưởng, dịch nuôi cấy vi khuẩn được thu nhận ở thời điểm 16 giờ nuôi để tiếp giống.

**3.2.2. Khả năng sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn D2.1 và D2.2 trong môi trường dịch chiết nấm sò**

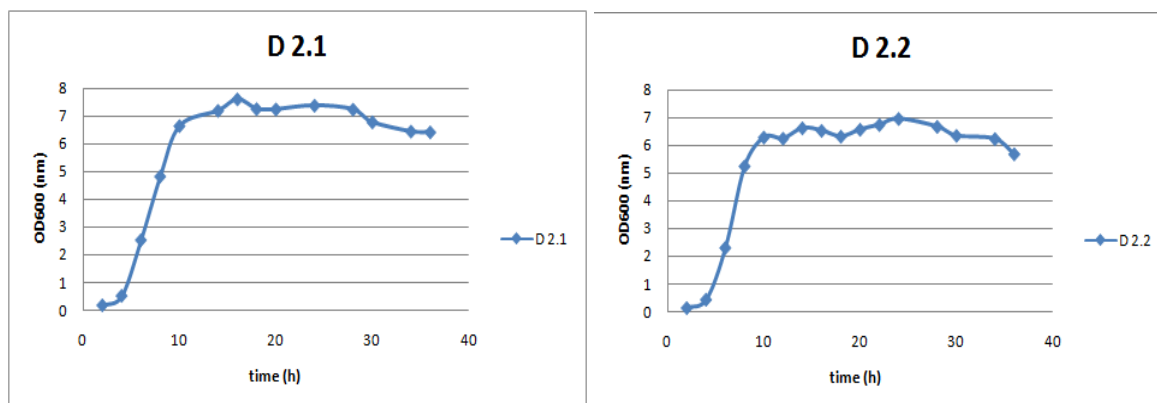
Thông thường, sử dụng các chủng vi khuẩn làm giống khởi động cho quá trình lên men khi mật độ vi khuẩn đạt 10<sup>8</sup> CFU/ml (TCVN 9633:2013). Kết quả được thể hiện ở hình 4 cho thấy, tại thời điểm 16-24 giờ nuôi cấy trong môi trường dịch chiết nấm sò mật độ vi khuẩn đạt mức 10<sup>8</sup> CFU/ml nên ta chọn thời điểm này để tiếp giống vi khuẩn vào quá trình lên men. Bổ sung riêng rẽ từng chủng vi khuẩn vào quá trình lên men, sau đó tiến hành nghiên cứu sản phẩm lên men bổ sung chủng vi khuẩn D2.1 và sản phẩm lên men bổ sung chủng D2.2.

**Bảng 2. Kết quả thử phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn lactic**

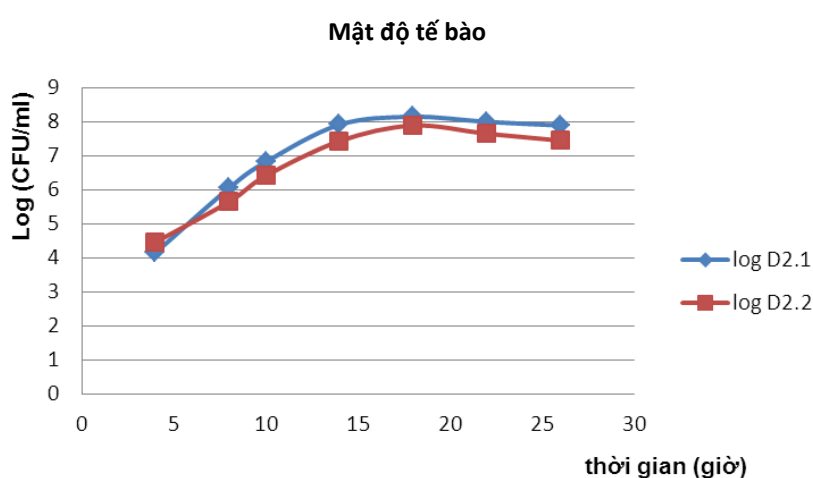
Chủng vi khuẩn	D1.1	D1.2	D1.3	D2.1	D2.2	N2.2
Catalase	-	-	-	-	-	-
Bào tử	-	-	-	-	-	-
Lên men glucose	+	+	+	+	+	+
Phân giải CaCO <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+
Di động	-	-	-	-	-	-



**Hình 2. Kết quả định lượng khả năng sinh axit của các chủng vi khuẩn phân lập**



Hình 3. Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn D2.1 và D2.2



Hình 4. Sinh trưởng của hai chủng vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy dịch chiết nấm sò

Việc sử dụng các chủng vi khuẩn lactic vào quá trình lên men gọi là bổ sung giống khởi động cho lên men hay là nuôi cấy khởi động (starter culture). Nuôi cấy khởi động có thể được hiểu là sự chuẩn bị số lượng lớn các tế bào của ít nhất một loại vi sinh vật được thêm vào nguyên liệu để thực hiện quá trình lên men. Nhóm các vi khuẩn lactic được nghiên cứu từ rất lâu và đóng vai trò quan trọng trong các quá trình lên men, chính vì vậy chúng được coi là an toàn cho khi ứng dụng vào việc sản xuất các thực phẩm lên men và đồ uống (Caplice & Fitzgerald, 1999). Các chủng vi khuẩn lactic khiến cho quá trình axit hóa các nguyên liệu diễn ra nhanh hơn, qua đó sản xuất được các axit hữu cơ (axit lactic là chủ yếu), ethanol, một số enzyme, bacteriocin... Bằng cách này, chúng góp phần cải thiện chất lượng, góp phần tạo hương vị dễ

chịu, cũng như màu sắc bắt mắt hơn cho sản phẩm. Trong những năm gần đây, các sản phẩm lên men lactic được đặc biệt quan tâm và phát triển nhờ khả năng lên men hiệu quả của chúng vì các sản phẩm này đều đạt được sự đồng nhất về chất lượng cảm quan, giúp kiểm soát quá trình lên men chính xác hơn như rút ngắn thời gian và tăng khả năng, hiệu quả của quá trình lên men hơn so với các sản phẩm lên men tự nhiên (Oberman & Libudzisz, 1998). Tuy nhiên, ở Việt Nam quá trình lên men còn thực hiện theo phương pháp truyền thống, chủ yếu dựa vào hệ vi sinh vật có sẵn trong nguyên liệu nên hiệu quả lên men chưa cao nên việc bổ sung trực tiếp giống khởi động vào quá trình lên men được coi là bước đột phá trong công nghiệp sản xuất thực phẩm lên men (Oberman & Libudzisz, 1998).

### 3.2.3. Đánh giá một số chỉ tiêu của sản phẩm sau lên men

Tiến hành chuẩn bị nguyên liệu, bổ sung từng chủng vi khuẩn D2.1 và D2.2 vào quá trình phối trộn, sau đó đóng gói và cho lên men ở nhiệt độ phòng. Gọi tắt sản phẩm lên men có bổ sung chủng vi khuẩn D2.1; D2.2 là sản phẩm D2.1 và sản phẩm D2.2.

Sản phẩm sau khi lên men có cấu trúc săn chắc, vẫn còn giữ màu sắc và độ giòn của nấm sò, mùi thơm dịu nhẹ của axit lactic.

#### a. Sự thay đổi pH của sản phẩm lên men

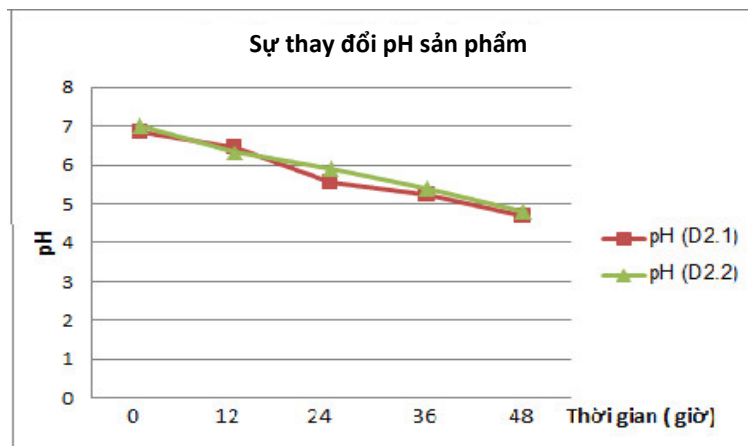
Với các sản phẩm lên men nhờ vi khuẩn lactic thì độ chua là một trong những tiêu chí quan trọng, biểu thị lượng axit được hình thành trong quá trình lên men. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 2 mẫu sản phẩm có sự biến đổi pH gần như là tương đương nhau, kết quả này phù hợp với kết quả định lượng khả năng sinh axit lactic gần như tương đương nhau của chủng vi khuẩn D2.1 và D2.2 (Hình 2). Vào thời gian đầu lên men (0 giờ - 12 giờ), pH thay đổi chưa nhiều do vi khuẩn lactic mới chuyển vào quá trình lên men cần thời gian thích nghi và cạnh tranh với vi khuẩn bản địa trong nguyên liệu. Sau đó, vi khuẩn lactic sinh trưởng mạnh chiếm ưu thế

sinh ra nhiều axit làm pH giảm mạnh (từ 12-48 giờ  $\Delta pH \approx 3$ ). Khi pH sản phẩm dưới 5 ngừng lên men, có thể sử dụng hoặc chuyển vào tủ lạnh 4°C để bảo quản. Sản phẩm lên men chỉ nên dùng ở pH này vì pH thấp ức chế chính khả năng hoạt động của vi khuẩn lactic, tạo điều kiện thuận lợi cho nấm men, nấm mốc phát triển và làm giảm chất lượng sản phẩm.

Trong quá trình lên men, việc giảm pH là do vi khuẩn lactic có khả năng sản xuất ra axit lactic và những axit hữu cơ khác - đây là một yếu tố quan trọng để ức chế sự sinh trưởng của những vi sinh vật không mong muốn. Độ pH thấp làm cho axit hữu cơ vượt qua được màng tế bào và tiếp cận với tế bào chất của tác nhân gây bệnh (Haller & cs., 2001).

#### b. Sự thay đổi hàm lượng dinh dưỡng của sản phẩm sau quá trình lên men

Xác định các chỉ tiêu dinh dưỡng là một trong những tiêu chí quan trọng đánh giá sản phẩm lên men, ở đây hai tiêu chí quan trọng cần được xác định là lượng carbohydrate và protein tổng số. Hai chỉ tiêu này được xác định đối với nguyên liệu đầu vào và các sản phẩm sau khi lên men qua 48h. Kết quả kiểm tra được thể hiện trên bảng 3.



Hình 5. Kết quả biến đổi pH của sản phẩm trong quá trình lên men

Bảng 3. Kết quả định lượng protein và carbohydrate tổng số (tính theo % khối lượng mẫu khô)

Mẫu	Đối chứng	Mẫu D2.1	Mẫu D2.2
Protein thô	33%	30,6%	27,7%
Carbohydrate tổng số	57%	49,27%	47,68%



**Bảng 4. Kết quả kiểm định vi sinh vật trong sản phẩm**

Vi sinh vật	Đơn vị	Kết quả kiểm tra
<i>Salmonella sp.</i>	Tế bào/g	0
<i>E. coli</i>	MPN/g	<3

Như vậy, sau khi thực hiện lên men kết quả cho thấy hàm lượng protein và đường tổng số giảm so với mẫu đối chứng; tuy nhiên hàm lượng protein và đường tổng số giảm không nhiều giống như ở các phương pháp chế biến thực phẩm khác. Cụ thể là, ở mẫu lên men D2.1 hàm lượng protein giảm đi là 2,4% so với mẫu đối chứng, trong khi đó ở mẫu lên men D2.2 thì lại giảm nhiều hơn - 5,3% protein (mẫu đối chứng là mẫu nấm sò tươi chưa trải qua lên men). Với hàm lượng đường, kết quả cũng tương tự như vậy: mẫu lên men D2.1 giảm 7,73% so với mẫu đối chứng, còn mẫu lên men D2.2 giảm 9,32% hàm lượng đường tổng số. Qua đó có thể thấy rằng, đây là một kết quả đầy triển vọng bởi sản phẩm tạo ra không bị mất nhiều chất dinh dưỡng qua chế biến. Hơn nữa, các sản phẩm tạo ra bởi quá trình lên men lactic còn có lợi cho đường tiêu hóa của con người.

Nếu so sánh loại nấm lên men thử nghiệm này với xúc xích thịt-loại thực phẩm cùng trải qua phương thức lên men giống nhau nhưng nguyên liệu chính là thịt, nhận thấy xúc xích thịt thông thường là sản phẩm có hàm lượng protein và chất béo rất cao: lượng protein là 27,2 gam, lượng chất béo là 47,4 gam tính trên 100 gam nguyên liệu, lại hoàn toàn không có chất xơ và tinh bột (Nguyễn Công Khẩn & cs., 2007). Tình trạng này phần nào được cải thiện trong sản phẩm nấm lên men, gạo giúp cung cấp tinh bột, nấm cung cấp lượng protein và chất béo không cao như ở thịt động vật, lại giúp bổ sung lượng chất xơ, vitamin, muối khoáng. Thêm nữa, quá trình lên men lactic giúp bổ sung lợi khuẩn cùng các sản phẩm lên men có lợi cho tiêu hóa.

*c. Đánh giá chỉ tiêu vi sinh vật của sản phẩm sau quá trình lên men*

Kết quả kiểm định được thể hiện trên bảng 4.

Với những chỉ tiêu vi sinh đã kiểm tra được gồm tổng số vi khuẩn hiếu khí, *Salmonella sp.*, *E. coli* thì 2 loại sản phẩm tạo ra đều đạt yêu cầu về an toàn vệ sinh thực phẩm. Tuy nhiên,

còn một số chỉ tiêu như *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* trong mẫu sản phẩm do điều kiện thí nghiệm còn hạn chế nên chưa thể thực hiện được.

Hiện tại chưa có một quy định cụ thể nào, cũng như chỉ tiêu kiểm định vi sinh vật trong các sản phẩm lên men, nhất là lên men nấm nhưng để đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm, các chỉ tiêu kiểm định phải đáp ứng được các yêu cầu của: Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT (Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm); QCVN 8-3:2012/BYT (Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm); Các tiêu chuẩn Việt Nam về rau củ quả đóng hộp (TCVN); nghiên cứu này cũng tham khảo chỉ tiêu kiểm định vi sinh vật theo nghiên cứu về sản phẩm xúc xích nấm chay của Chockchaisawasdee & cs. (2010).

#### 4. KẾT LUẬN

06 chủng vi khuẩn (D1.1, D1.2, D1.3, D2.1, D2.2, N2.2) phân lập được mang các đặc điểm của chi *Lactobacillus* như vi khuẩn gram dương, không sinh bào tử, không có khả năng di động, không sinh catalase, lên men đường glucose, phân giải  $\text{CaCO}_3$ .

Trong số 06 chủng nghiên cứu thì hai chủng vi khuẩn D2.1 và D2.2 có khả năng sinh axit lactic nhiều nhất: 19,17 mg/ml (D2.1) và 19,38 mg/ml (D2.2) sau 72 giờ nuôi cấy. Hai chủng này đều có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt trên dịch chiết nấm sò và đạt mật độ cao nhất tại thời điểm sau 16-24 giờ nuôi cấy. Kết quả lên men sử dụng hai chủng vi khuẩn lactic D2.1 và D2.2 trên môi trường có chứa nấm sò tươi và phụ gia (Nấm sò tươi : Cơm nếp: Dầu thực vật : Tỏi nhuyễn : Ót nhuyễn : Đường : Muối - 40: 40: 3: 2: 1,5: 1,5: 0,4) đã tạo sản phẩm lên men thành công. Sản phẩm sau khi lên men có cấu trúc sần chắc, vẫn còn giữ màu sắc và độ giòn của nấm sò, mùi thơm dịu nhẹ của axit lactic với pH đạt giá trị 5, đảm bảo đủ tiêu chí vi sinh về

*Salmonella* sp. và *E. coli*. Sau quá trình lên men hàm lượng protein và cacbonhydrate của sản phẩm đều giảm so với nguyên liệu gốc, tuy nhiên việc giảm này không đáng kể. Các tiêu chí cảm quan của sản phẩm đạt yêu cầu đối với một sản phẩm lên men.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abee Tjakkó, Beldman G., Broek B., Houben J., Nout R., Rombouts F., Schoustra S., Voragen F., Wouters J., Noomen A. & Walstra P. (1999). Food fermentation part 1. Department of Food Technology and Nutritional Sciences, Wageningen Agriculture University.
- Astuti (2016). Isolation, characterization, and identification lactic acid bacteria from chicken waste Feeces that potential as Probiotics. International Journal of Scientific and Research Publications. 6: 180-191.
- Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2<sup>nd</sup> Edition, Salminen S. and S. von Wright (Eds). Marcel Dekker Inc., New York. pp. 1-72.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2001). TCVN 4328:2001 về thức ăn chăn nuôi - Xác định hàm lượng Nitơ và tính hàm lượng protein thô - Phương pháp Kjeldahl.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2005). TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Cor 1:2004) - Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi-Phương pháp phát hiện *Salmonella* trên đĩa thạch.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2010). TCVN 9633:2013 (ISO 27205:2010) - Sản phẩm sữa lên men - Giống vi khuẩn khởi động - Tiêu chuẩn nhận dạng.
- Buse S.B., Huseyin C., Perihan S.A., A. Ata A. & Salih C. (2016). The examination of the growth of *Escherichia coli* strain on MacConkey agar prepared with wastewater. International Journal of Environmental Science and Development. 7(11): 793-796.
- Caplice E. & Fitzgerald G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and Preservation. Int J Food Microbiol. 50: 131-407.
- Chockchaisawasdee S., Namjaidee S., Pochana S. & Stathopoulos C.E. (2010). Development of fermented oyster-mushroom sausage. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 3(1): 35-43.
- Co V.T.T. (2017). Some typical results and research trends in edible and medicinal mushrooms in 2017-2000 (In Vietnamese). Proceeding of The Annual Scientific Workshop of Agricultural Genetics Institute. Agricultural Genetics Institute, Vietnam.
- Cullimore D.R. (2000). Practical Atlas for bacterial identification. CRC/Lewis Publishers, London, ISBN: 9781566703925:209.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Emanuel V., Adrian V., Ovidiu P. & Gheorghe C. (2005). Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. African Journal of Biotechnology. 4(5): 403-308.
- Haller D., Colbus H., Gänzle M.G., Scherenbacher P., Bode C. & Hammes W.P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. System Appl Microbiol. 24: 218-226.
- Herreros M.A., Sandoval H., Gozalez L., Castro J.M., Fresno J.M. & Tornadijo M.E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol. 22: 455-459.
- Kandler O. & Weis N. (2005). Regular nonsporing gram-positive rods. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 4(2): 1208-1231.
- Latiff L.A., Daran A.B.M. & Mohamed A.B. (1996). Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. Food Chemistry. 56(2): 115-121.
- Lý Nguyên Bình, Trần Văn Khánh, Hà Phương Thảo & Nguyễn Văn Thành (2015). Phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt lực cao từ men rượu. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Công Khả, Nguyễn Thị Lâm, Hà Thị Anh Đào, Lê Hồng Dũng, Lê Bạch Mai, Nguyễn Văn Sĩ (2007). Bảng thành phần thực phẩm Việt Nam. Nhà xuất bản Y học.
- Oberman H. & Libudzisz Z. (1998). Fermented milks. In Microbiology of Fermented Foods, 2<sup>nd</sup> ed., B.J.B.Wood, ed., Blackie Academic & Professional, London. pp. 308-350.
- Rhys J.J., Hanssan M.H., Monique Z., Gale B. & John R.T. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. Food Microbiology. 25: 228-234.
- Sharpe M.E. (1979). Identification of lactic acid bacteria. In: Identification Methods of Microbiologists, Skinner F.A and Loverlock D.W (Eds). Academic Press, London. pp. 233-259.
- Shelar S.S., Warang S.S., Mane S.P., Sutar R.L. & Ghosh J.S. (2012). Characterization of bacteriocin produced by *Bacillus atrophaeus* strain JS-2. Int J Biol Chem. 6: 10-16.
- Trần Minh Tâm (1998). Các quá trình công nghệ trong chế biến nông sản thực phẩm. Nhà xuất bản Nông nghiệp thành phố Hồ Chí Minh. tr. 296.