

SỬ DỤNG CHỦNG VI KHUẨN LACTIC *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* HN02 ĐỂ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM BẢO QUẢN CÁ

NGUYỄN THẾ TRANG, TRẦN ĐÌNH MÀN

I. MỞ ĐẦU

Trong đánh bắt thủy sản hiện nay, lượng cá thương phẩm chỉ chiếm từ 30% - 40%, còn lại là cá tạp. Loại cá tạp này hầu hết được ngư dân bảo quản bằng phương pháp ướp muối, do đó chỉ có thể sử dụng để sản xuất bột cá mặn. Loại bột cá này chỉ dùng cho thức ăn gia súc, trong khi đó nhu cầu bột cá nhạt dùng sản xuất cho gia cầm, thức ăn cho nuôi trồng thủy sản là rất lớn [5 - 7].

Sử dụng vi khuẩn lactic để bảo quản nguyên liệu cá phục vụ chế biến bột cá nhạt đã và đang được nhiều nước trên thế giới quan tâm. Phương pháp làm mắm chua đã có Việt Nam từ lâu. Tuy nhiên do sử dụng vi khuẩn lactic có sẵn trong tự nhiên và chất lượng không ổn định, nguyên liệu bị nát [2].

Để phục vụ việc bảo quản cá chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sử dụng chủng vi khuẩn lactic thuần chủng được phân lập ở Việt Nam, trong đó chủng vi khuẩn lactic HN02 có nhiều ưu điểm, chủng này đã được phân loại thuộc loài *Pediococcus pentosaceus* HN02 [3, 4, 6].

Trong bài báo này chúng tôi trình bày sử dụng chế phẩm vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 để sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic bảo quản cá.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 lấy từ Bộ sưu tập giống Phòng Các chất hoạt tính sinh học từ vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Cá tạp được mua tại chợ cá Đồ Sơn, Hải Phòng dùng làm bảo quản trong phòng thí nghiệm.

- Cá tạp làm nguyên liệu sản xuất quy mô lớn tại Công ty Cổ phần thủy sản Tân Hưng Hải, Thịnh Long - Hải Hậu - Nam Định

- Môi trường nhân giống: MRS, môi nước bắp cải, nước rau cải ...

- Môi trường tạo chế phẩm: bột ngô, đường sacaroza, NaCl ...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Sử dụng phương pháp lên men thông thường để xác định khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 [1].

- Số lượng tế bào vi khuẩn/ml được xác định bằng phương pháp pha loãng [1].

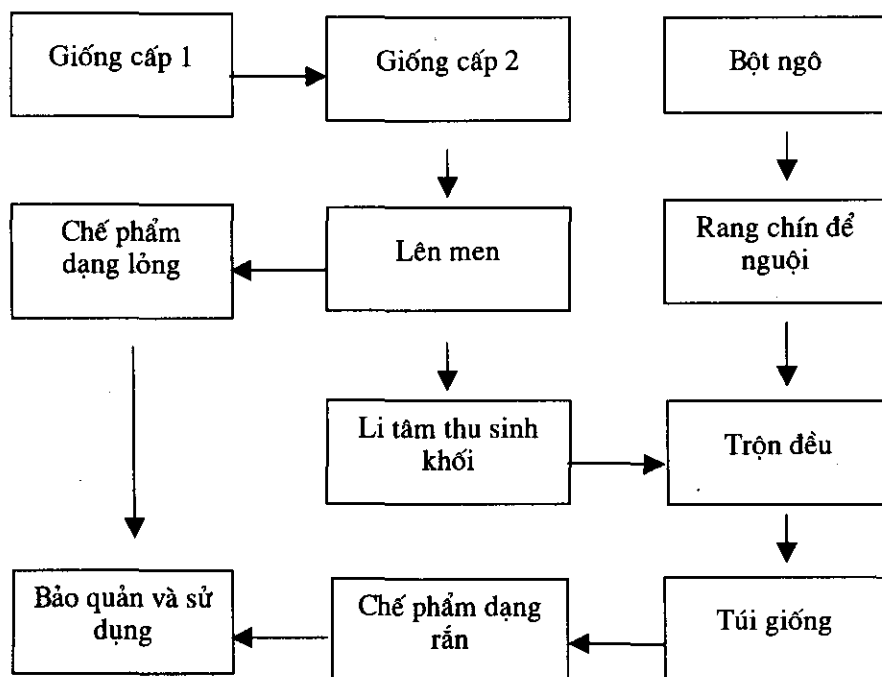
- Lên men tạo chế phẩm vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 đưa ra dạng chế phẩm lỏng và chế phẩm khô: Sử dụng môi trường MRS cho chế phẩm dạng lỏng và môi trường bột ngô tạo chất mang cho chế phẩm dạng rắn.

- Phương pháp đánh giá chất lượng và cảm quan sản phẩm bột cá nhạt theo TCVN 1644 - 2001.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tạo chế phẩm bảo quản cá

+ Nhân giống: Chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* HN02 có khả năng lên men lactic đồng hình, sinh axit lactic cao, ức chế được cả loại vi khuẩn Gram dương và Gram âm như *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas stutzeri* DSM13, *Sarcina lutea* và *Escherichia coli* PA2 [3]. Điều kiện thích hợp cho việc tích lũy axit của chủng *Pediococcus pentosaceus* HN02 khi lên men tĩnh trong môi trường MRS: Nhiệt độ 30° - 35°; pH: 6 - 6,5, nồng độ đường 2%, nồng độ NaCl: 1,5%. Chủng có tốc độ phát triển nhanh và sinh axit cao, sau 36 giờ mật độ tế bào: 2,2.10⁹ CFU/ml, pH: 3,94. Sau 48 giờ mật độ tế bào: 2,4. 10⁹ CFU/ml, pH: 3,93, không sinh độc tố [3]. Chủng *Pediococcus pentosaceus* HN02 có khả năng sử dụng tốt các nguồn dinh dưỡng nitơ khác nhau như: cao thịt, cao ngô, cao men, pepton, ure, NH₄NO₃, NH₄Cl và (NH₄)₂SO₄ và sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp axit tốt trên môi trường nước rau cải, nước bắp cải, nước cà chua, nước mắm, nước chấm và nước cá, thích hợp dùng trong nhân giống để sản xuất chế phẩm [4].



Hình 1. Sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 dùng bảo quản cá

+ Sản xuất chế phẩm: Giống ống nghiệm được nhân giống cấp 1 ra ống nghiệm trên môi trường MRS, thời gian nuôi 24 giờ. Sau đó từ giống cấp 1 này được nhân giống lớn cấp 2 trong bình tam giác. Tiếp sau giống cấp 2 được tiếp tục bổ sung cho lên men lớn trên các môi trường rẻ tiền dễ kiếm như môi trường nước bắp cải, nước rau cải, ... Sau lên men thu được có chế phẩm dạng lỏng có số lượng tế bào đạt 2×10^9 /ml. Trường hợp li tâm thu sinh khối sau đó trộn đều với bột ngô đã rang chín để người thu được chế phẩm dạng rắn, với chế phẩm dạng này số lượng tế bào đạt khoảng 10^9 /g. Sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm được trình bày ở hình 1.

Để đánh giá hiệu quả sử dụng của 2 dạng chế phẩm này, chúng tôi tiến hành sử dụng cho bảo quản cá nước mặn với quy mô trong phòng thí nghiệm.

2. Kết quả bảo quản cá trong phòng thí nghiệm

Chúng tôi tiến hành 2 thí nghiệm song song:

Thí nghiệm 1: dùng môi trường MRS sau khi đã lên men khoảng 36 - 40 giờ, khi số lượng tế bào trong dịch lên men đạt cực đại (2×10^9 CFU/ml), pH môi trường hạ thấp để ủ chua cá, lượng dịch được bổ sung cho khoảng 1/3 so với trọng lượng cá, có bổ sung thêm 0,5% NaCl và 2% đường sacaroza (so với trọng lượng cá), đậy kín bảo quản ủ chua cá.

Thí nghiệm 2: Sử dụng dạng giống khởi động cho lên men chua cá, lượng giống bổ sung cho lên men là 1,5% - 2%, đường sacaroza 2%, NaCl là 0,5%, đậy kín, giữ nhiệt độ phòng (khoảng 30°C), đậy kín lên men chua cá.

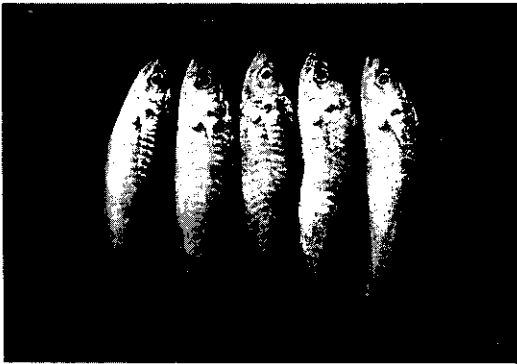
Giống khởi động được phối trộn như sau: bột ngô được rang chín, bổ sung 2% - 5% giống vi khuẩn lactic dạng lỏng (giống này có thể sử dụng được tất cả các môi trường như môi trường đã thí nghiệm ở trên như môi trường nước rau cải, môi trường nước bắp cải, môi trường nước cà chua, môi trường nước mướp, môi trường nước chàm và môi trường nước cá để nhân giống), 2% đường sacaroza, 0,5% NaCl, đựng trong túi kín khí, sau 2 - 3 ngày ta có thể sử dụng được. Qua đánh giá số lượng tế bào, sau 3 ngày đựng trong túi kín (lên men xốp) số lượng tế bào đạt khoảng 2×10^9 CFU/g chế phẩm thô. Kết quả cả 2 thí nghiệm trên được trình bày ở bảng 1 và hình 2.

Bảng 1. Biến đổi của pH và cảm quan cá ở thí nghiệm ủ chua bảo quản và thí nghiệm lên men lactic bảo quản bởi vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* HN02

Thời gian, ngày	Mẫu thí nghiệm			
	Thí nghiệm 1		Thí nghiệm 2	
	pH	Giá trị cảm quan	pH	Giá trị cảm quan
1	4,08	Cá chuyển màu, màu dịch ngâm cá lẫn nước chiết cá, bụng không trương, nguyên con, mùi chua của axit lactic.	5,13	Cá bắt đầu chuyển màu, ra nước chiết, bụng không trương, nguyên con, có mùi chua của axit lactic.
3	4,06	Cá chuyển màu, màu dịch ngâm cá đặc trưng, bụng không trương, nguyên con, mùi chua đặc trưng của axit lactic.	4,27	Cá chuyển màu, màu dịch lên men cá đặc trưng hơi sánh, bụng không trương, nguyên con, mùi chua đặc trưng của axit lactic.

9	4,05	Cá chuyển màu, màu dịch ngâm kết hợp lên men cá đặc trưng, bụng không trương, nguyên con, mùi chua đặc trưng của axit lactic.	4,12	Cá chuyển màu, màu dịch lên men cá đặc trưng hơi sánh, bụng không trương, nguyên con, mùi chua đặc trưng của axit lactic.
25	4,04	Cá chuyển màu, màu dịch ngâm kết hợp lên men cá đặc trưng, bụng không trương, nguyên con, mùi chua đặc trưng của axit lactic.	4,06	Cá chuyển màu, màu dịch lên men cá đặc trưng hơi sánh, bụng không trương, nguyên con, mùi chua đặc trưng của axit lactic.

Kết quả được trình bày ở bảng 1 ta thấy ở cả 2 mẫu thí nghiệm sau 25 ngày lên men đều cho kết quả gần tương tự nhau, nhưng với thí nghiệm ngâm dịch lên men với cá thì không kinh tế, lượng nước nhiều. Với mẫu bảo quản bằng chế phẩm (thí nghiệm 2) cho kết quả tốt hơn, lượng nước dịch lên men chua bảo quản ít hơn rất nhiều thuận lợi cho việc cô sấy. Với kết quả như vậy chúng tôi đã chọn phương án sử dụng giống khởi động cho lên men (thí nghiệm 2) cho những thí nghiệm lên men lactic bảo quản cá sau này.



1. Ảnh cá trước bảo quản



2. Ảnh cá bảo quản sau 25 ngày

Hình 2. Ảnh cá trước và sau bảo quản bởi chế phẩm vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02

3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình bảo quản cá

Cá được đựng trong túi nilong, mỗi túi thí nghiệm đựng 5 kg cá, bổ sung 2% đường, 1% NaCl và lượng giống thay đổi ở các mẫu theo tỉ lệ 0,5%; 1%; 1,5% và 2% so với trọng lượng của cá (số lượng tế bào đạt 10^9 CFU/g chế phẩm). Sự biến đổi pH được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ giống (%) đến biến động pH lên quá trình bảo quản cá bằng chủng VK lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02

Thời gian bảo quản, ngày	Biến động của pH theo tỉ lệ chế phẩm, %			
	0,5	1,0	1,5	2,0
1	5,23	5,13	5,03	5,05
3	4,29	4,27	4,14	4,14
9	4,16	4,12	4,06	4,04
25	4,12	4,10	4,05	4,03

Từ bảng 2 cho thấy với 1,0 - 1,5% giồng phù hợp cho lên men chua dịch để bảo quản cá. Tiếp tục thí nghiệm khác: giữ nguyên lượng cá, giồng khởi động 1,0%; 1% NaCl, thay đổi lượng đường từ 1,0% - 4,0%. Sự biến đổi pH được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ đường (%) đến biến động pH lên quá trình bảo quản cá bằng chủng VK lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02

Thời gian bảo quản, ngày	Biến động của pH theo tỉ lệ đường, %			
	1,0	2,0	3,0	4,0
1	5,21	5,03	5,03	5,00
3	4,54	4,14	4,10	4,10
9	4,29	4,06	4,02	4,00
25	4,19	4,04	4,02	4,00

Từ bảng 3 cho thấy với 2,0% đường phù hợp cho lên men chua dịch bảo quản cá, lượng đường ở tỉ lệ 3,0% - 4,0% biến đổi pH không đáng kể. Thí nghiệm tiếp theo, giữ nguyên lượng cá, giồng 1,0%; 2% đường, thay đổi lượng NaCl từ 0% - 2,0%. Sự biến đổi pH của thí nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỉ lệ NaCl (%) đến biến động pH lên quá trình bảo quản cá bằng chủng VK lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02

Thời gian bảo quản, ngày	Biến động của pH theo tỉ lệ NaCl, %				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
1	5,42	5,42	5,36	5,03	5,02
3	4,49	4,19	4,15	4,14	4,11
9	4,41	4,07	4,07	4,06	4,05
25	4,39	4,03	4,02	4,02	4,03

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy ảnh hưởng của NaCl cũng rất rõ rệt, với lượng 0,5% NaCl bổ sung sau 9 ngày pH đạt 4,07, trong khi đó không bổ sung NaCl sau 9 ngày bảo quản pH mới đạt 4,41. Từ đó cho thấy với lượng NaCl bổ sung trong bảo quản là 0,5% là thích hợp.

Từ kết quả ở bảng 2, 3 và 4 cho thấy với tỉ lệ giồng: 1,0%, đường: 2,0%, NaCl: 0,5%. Thời gian 25 ngày cá bảo quản vẫn đạt chất lượng tốt.

4. Ứng dụng chế phẩm vi khuẩn lactic bảo quản cá ở quy mô sản xuất

Chúng tôi ứng dụng chế phẩm dạng khô bảo quản 4 tấn cá tại Công ty Cổ phần thủy sản Tân Hưng Hải, Thịnh Long, Hải Hậu, Nam Định. Cá sau khi được thu gom từ các tàu đánh cá trên biển về, được ủ chua trong thùng inox, thời gian bảo quản từ 25 ngày đến 1 tháng, sau đó được sấy khô trên dây chuyền hiện đại. Một số chỉ tiêu cảm quan của bột cá sản xuất từ nguyên liệu bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic như: có màu nâu nhạt, mùi đặc trưng của bột cá,

không có mùi mốc, mùi hôi hoặc mùi lạ. Trạng thái bề ngoài của bột cá: tơi, không vón cục, không có sâu mọt, không mốc, không lẫn vật lạ, có độ mịn

Các chỉ tiêu lí - hoá của sản phẩm bột cá như độ ẩm, hàm lượng protein thô, hàm lượng lipit thô, hàm lượng NaCl, hàm lượng tro, hàm lượng nitơ bay hơi tổng số được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Một số chỉ tiêu lí - hoá của bột cá sản xuất từ nguyên liệu bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic

STT	Tên chỉ tiêu	Mức quy định hạng 1	Kết quả
5	Độ ẩm, % khối lượng, không lớn hơn	< 10	10,04
6	Hàm lượng protein thô, % khối lượng, không lớn hơn	> 60	63,13
7	Hàm lượng lipit thô, % khối lượng, không lớn hơn	< 8	8,22
8	Hàm lượng NaCl, % khối lượng, không lớn hơn	< 2	2,28
9	Hàm lượng tro, % khối lượng, không lớn hơn	< 2	1,67
10	Vật rắn sắc nhọn	Không được có	Không có
11	Hàm lượng nitơ bay hơi tổng số, tính theo mg/100 g, không lớn hơn	< 150	152,86

Từ kết quả ở bảng 5 cho thấy sản phẩm bột cá nhạ sản xuất từ chế phẩm vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 bảo quản cá tương đương tiêu chuẩn của bột cá theo TCVN 1644/2001.

IV. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình công nghệ sản xuất 2 dạng chế phẩm vi khuẩn lactic dạng lỏng và dạng rắn dùng cho bảo quản cá nước mặn.

Đã xác định được điều kiện thích hợp nhất cho quá trình bảo quản cá nước mặn: tỉ lệ giống: 1,0%, đường: 2%, NaCl: 0,5%. Thời gian 25 - 30 ngày cá bảo quản đạt chất lượng tốt. Qua đánh giá cho thấy chế phẩm rắn có ưu thế hơn so với dạng lỏng.

Kết quả sử dụng chế phẩm dạng rắn bảo quản 4 tấn cá tại Công ty Cổ phần thủy sản Tân Hưng Hải, Thịnh Long, Hải Hậu, Nam Định, sản phẩm bột cá nhạ sản xuất từ chế phẩm vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 bảo quản cá đạt TCVN 1644 -2001.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty - Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật, Tập 1, Nhà xuất bản KH & KT, Hà Nội, 1972.

2. Nguyễn Hữu Phúc - Các phương pháp lên men truyền thống ở Việt Nam và các nước trong vùng, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Tp Hồ Chí Minh, 1998.
3. Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn, Nguyễn Văn Hợp - Một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn lactic HN02 phân lập từ sản phẩm truyền thống, Báo cáo khoa học, Hội nghị toàn quốc về khoa học sự sống, Thái Nguyên tháng 9-2004, Nhà xuất bản, Hà Nội, 2004, tr. 696-699.
4. Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn, Phạm Việt Cường - 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, Nhà xuất bản KH&KT, Hà Nội, 2005, tr 1432-1434.
5. Rudi K, Skulberg OM, Skulberg R, Jackobsen KS - Application of sequence specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization, Appl Environ Microbiol **66** (9) (2000) 4004-4011.
6. John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H. A. Sneath, James T. Staley and Stanley T. Williams - Bergey's manual of Systematic Bacteriology, 9th Edition, 2, (1986).
7. U. Lyhs - Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products, Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2002.

SUMMARY

USING LACTIC ACID BACTERIUM *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* HN02 FOR MAKING A PREPARATION FOR FISH PRESERVATION

The lactic bacterium strain of *Pediococcus pentosaceus* HN02 was selected from collection of Laboratory of Microbial bio-active compounds from Microorganism, Institute of Biotechnology. It can able to synthesizes highly lactic acid homo-fermentation processing and inhibit both of the Gram positive and Gram negative bacteria, such as the *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas stutzeri* DSM13, *Sarcina lutea* and *Escherichia coli* PA2.

The optimal conditions of temperature, pH, sugar and NaCl concentration for accumulating lactic acid of *Pediococcus pentosaceus* HN02 on the MRS medium were determined as t^0 30 - 35°C, pH = 6.0 - 6.5, 1% - 2%, 1.5 respectively. The growing rate and lactic acid synthesis by *Pediococcus pentosaceus* HN02 is rapid. After 36 hours fermentation, cell density was 2.2×10^9 CFU/ml, reducing of pH to 3.94. After 48 hours fermentation, cell density was 2.2×10^9 CFU/ml, pH was about 3.93.

For *Pediococcus pentosaceus* HN02 strain can use effectively nitrogenous nutrition sources were meat extract, corn extract, yeast extract, peptone, urea, NH_4NO_3 , NH_4Cl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. It also grow and synthesizes acid well in the liquid medium containing of mustard greens, cabbage liquor, tomato liquor, fish source, sauce and water from fish. By the mentioned studies of nitrogenous sources, cheap and suitable medium was determined for making a preparation for fish preservation.

We used two kinds of product (liquid and solid form) for fish preservation process. The solid product had dispised able for fish preservation better than another one.