

THU NHẬN BACTERIOCIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN BỞI TẾ BÀO *LACTOCOCCUS LACTIC* CỐ ĐỊNH TRÊN CHẤT MANG CELLULOSE VI KHUẨN (BC) VÀ ỨNG DỤNG TRONG BẢO QUẢN THỊT TƯƠI SƠ CHẾ TỐI THIỂU

Nguyễn Thúy Hương, Trần Thị Tường An

Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 14 tháng 06 năm 2007, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 19 tháng 04 năm 2008)

TÓM TẮT: Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu việc cố định tế bào vi khuẩn *Lactococcus lactis* trên chất mang cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose-BC) để ứng dụng lên men thu nhận bacteriocin và bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu. Kết quả thu được như sau:
- Hiệu quả sử dụng chế phẩm tế bào vi khuẩn cố định trên BC để lên men thu nhận bacteriocin khá cao: có thể tái sử dụng 9-10 lần mà vẫn đảm bảo về mặt thời gian lên men, số lượng và chất lượng bacteriocin so với đối chứng.

- Bước đầu sử dụng màng mỏng cellulose vi khuẩn (BC) hấp phụ bacteriocin để bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu: có thể bảo quản thịt đến 3 ngày bằng màng BC hấp phụ dịch bacteriocin 200 AU/m vẫn đảm bảo chất lượng thịt, theo TCVN 7046:2002.

- Kết quả thu được cũng góp phần thăm dò 2 ứng dụng mới của cellulose vi khuẩn (BC): sử dụng BC làm chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào vi sinh vật và sử dụng màng mỏng BC làm màng bao thực phẩm.

Từ khóa: Bacteriocin, Bacterial Cellulose, *Lactococcus lactis*.

1. MỞ ĐẦU

Kỹ thuật cố định tế bào đang được đề cập và quan tâm nhiều, đặc biệt trong các lĩnh vực lên men sản xuất các sản phẩm trao đổi chất. Tế bào cố định có nhiều ưu điểm so với việc sử dụng tế bào tự do như: tế bào sau khi được cố định có thể sử dụng được nhiều lần, không lẫn vào sản phẩm và có thể chủ động ngừng phản ứng theo ý muốn.

Bacteriocin được sản sinh bởi vi khuẩn lactic là tác nhân sinh học an toàn trong bảo quản thực phẩm thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học. Bacteriocin là những phân tử peptid do vi khuẩn sinh tổng hợp có hoạt tính kìm hãm đặc hiệu hay ức chế mạnh mẽ sự sinh trưởng và phát triển của một số vi khuẩn gây hại trong thực phẩm [3, 4].

Màng mỏng cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose -BC) là màng polymer sinh học. Màng BC đã được nghiên cứu sử dụng để bảo quản thực phẩm [1].

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu việc cố định tế bào vi khuẩn *Lactococcus lactis* trên chất mang BC để ứng dụng lên men thu nhận bacteriocin và ứng dụng màng BC hấp phụ bacteriocin để bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

- Chủng vi khuẩn: *Lactococcus lactis* spp *lactis* 1 (Lc.lactis) phân lập từ pho mát.
- Chất mang: Cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose- BC) [1].
- Màng bao thực phẩm: Màng mỏng cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose- BC) [1].

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp cố định tế bào: Tế bào được cố định trên chất mang cellulose vi khuẩn (BC) bằng phương pháp hấp phụ (gồm 2 giai đoạn: hấp phụ vi khuẩn trên bề mặt BC và hấp phụ tăng sinh trên và trong chất mang BC).

Hoạt hoá chủng vi khuẩn phân lập trong môi trường MT1 ở 30°C, kỵ khí, 6 giờ.

Bổ sung chất mang BC vô trùng vào dịch tế bào đã hoạt hoá. Quá trình cố định trên chất mang BC sẽ trải qua 2 giai đoạn liên tiếp:

Giai đoạn hấp phụ: trong khoảng 30 phút đầu tiên sau khi ngâm BC trong dịch tế bào, BC sẽ trương nở về trạng thái ban đầu, đồng thời sẽ hấp phụ tế bào vào hệ thống sợi bên trong cũng như trên bề mặt bên ngoài.

Giai đoạn hấp phụ tăng sinh: kế tiếp giai đoạn hấp phụ. Các tế bào đã được hấp phụ giai đoạn trên tiếp tục phát triển và tăng sinh trên giá đỡ BC, khi tiếp tục ở ở điều kiện tối ưu của vi sinh vật cố định [1].

- Định lượng vi khuẩn cố định trên bề mặt màng BC: Quét mẫu đại diện bằng giấy thấm - Dập mẫu vô trùng- Xử lý bằng cellulose- định lượng bằng phương pháp đếm gián tiếp [1,2].

- Lên men bởi chế phẩm tế bào cố định ở quy mô phòng thí nghiệm trong fermenter (8 lít) để thu nhận bacteriocin.

- Xác định hoạt tính bacteriocin (AU/ml) theo phương pháp pha loãng hai lần liên tiếp (Schilliner và Rest) Xác định độ pha loãng cao nhất cho thấy vòng vô khuẩn và xác định hoạt tính bacteriocin (AU/ml) của dịch lên men:

$$AU/ml = DF_i \times (1/V_{bacteriocin})$$

AU: đơn vị hoạt tính

Dfi: độ pha loãng cao nhất có vòng ức chế [5].

- Xác định khả năng kháng khuẩn của dịch bacteriocin: bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Phương pháp này dựa trên khả năng đối kháng giữa vi sinh vật kiểm định và vi sinh vật chỉ thị.

Thực hiện: Chủng vi khuẩn kiểm định được nuôi cấy trong 50 ml môi trường MT1 ở 30°C, kỵ khí, 24 giờ. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, thu nhận dịch nổi. Điều chỉnh pH dịch nổi đến 6,5 bằng NaOH 1N. Sử dụng dịch nổi này như bacteriocin thô, đem kiểm tra khả năng đối kháng như sau:

+ Đổ 15 ml môi trường vào đĩa petri vô trùng. Để thạch đông.

+ Trãi 10µl dịch nuôi cấy qua đêm chủng chỉ thị.

+ Đục lỗ có đường kính 5 mm trên thạch.

+ Bơm 70 µl dịch bacteriocin thô vào lỗ thạch.

+ Ủ đĩa ở 37°C, 12 giờ.

+ Kiểm tra sự tạo thành vòng vô khuẩn. Đo đường kính vòng vô khuẩn [6].

- Điều kiện bảo quản thịt heo ở nhiệt độ mát (15°C)

- Thời điểm đánh giá các chỉ tiêu chất lượng thịt tươi sau 3 ngày bảo quản.

- Đánh giá chất lượng thịt heo tươi theo TCVN 7046:2002.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cố định tế bào *Lactococcus lactis* trên chất mang cellulose vi khuẩn (BC) bằng phương pháp bẫy- hấp phụ

Cellulose vi khuẩn - BC (do *A.xylinum* sản sinh ra) có ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. BC có nhiều ưu thế làm vật liệu chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào [1].

Đối với phương pháp bẫy-hấp phụ trong chất mang BC, chúng tôi xét 3 yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình cố định là: chế độ khuấy đảo trong quá trình hấp phụ, thời gian ủ và nhiệt độ trong thời gian ủ [1].

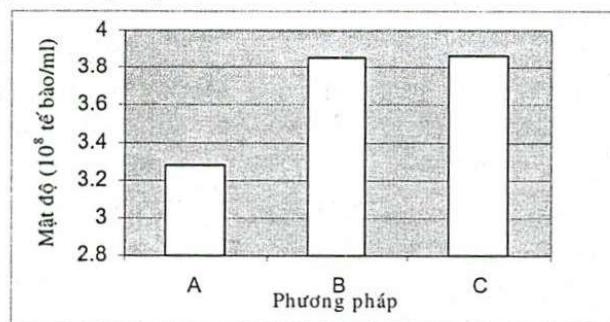
3.1.1 Ảnh hưởng của chế độ khuấy đảo trong quá trình cố định bằng phương pháp hấp phụ

Phương pháp cố định tế bào trên chất mang BC gồm hai giai đoạn: giai đoạn hấp phụ và giai đoạn bẫy tăng sinh. Giai đoạn hấp phụ diễn ra trong 30 phút sau khi bổ sung chất mang BC vô trùng vào dịch vi khuẩn, lúc này BC sẽ hút nước trong môi trường để trương nở về trạng thái ban đầu. Khi nước đi vào cấu trúc BC, nó sẽ mang cả tế bào vi khuẩn đi vào. Tại đây, tế bào sẽ được hệ thống sợi cellulose trong chất mang BC giữ lại. Đồng thời trên bề mặt BC cũng có tế bào được hấp phụ. Tiếp theo là giai đoạn bẫy tăng sinh, thời gian kéo dài phụ thuộc vào đặc điểm tăng trưởng của tế bào được cố định. Các tế bào đã cố định sẽ sử dụng cơ chất khuếch tán từ môi trường để sinh trưởng và phát triển. Như vậy giai đoạn hấp phụ có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất cố định tế bào trên chất mang BC.

Để cải thiện giai đoạn hấp phụ, ngoài việc đơn thuần ngâm BC trong dịch vi khuẩn (phương pháp A), chúng tôi còn khảo sát thêm việc kết hợp sử dụng cánh khuấy (phương pháp B) và máy lắc (200 vòng/ phút) (phương pháp C) trong quá trình này để gia tăng hiệu suất hấp phụ.

Kết quả cải thiện mật độ tế bào hấp phụ trên BC qua 3 phương pháp (phương pháp ngâm, sử dụng cánh khuấy và máy lắc-200 vòng/ phút trong quá trình hấp phụ) biểu thị ở biểu đồ 1.

Hai phương pháp cải tiến nhằm gia tăng khả năng hấp phụ tế bào vi khuẩn trên chất mang đều đạt được kết quả. Mật độ gia tăng từ $3,28 \times 10^8$ tế bào/ g lên đến $3,84 \times 10^8$ (phương pháp B) và $3,86 \times 10^8$ tế bào/ g (phương pháp C).



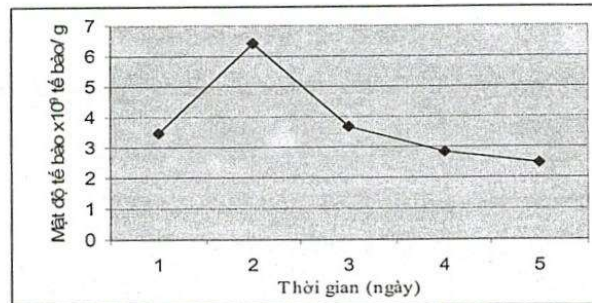
A: Phương pháp cổ điển (ngâm) B: Sử dụng cánh khuấy C: Sử dụng máy lắc

Biểu đồ 1. Mật độ tế bào vi khuẩn cố định trên chất mang qua các phương pháp hấp phụ.

Trong các phương án cải tiến, chúng tôi lựa chọn sử dụng máy lắc 200 vòng/ phút để gia tăng mật độ tế bào hấp phụ lên chất mang trong thời gian BC trương nở do tính thuận tiện, dễ sử dụng và hạn chế được khả năng nhiễm tạp.

3.1.2 Ảnh hưởng của thời gian ủ trong quá trình cố định bằng phương pháp bẫy-hấp phụ

Thời gian ủ chính là thời gian vi khuẩn tăng sinh trên giá thể BC, để nhốt thêm một lượng lớn tế bào vi khuẩn trong mạng lưới cellulose sau quá trình hấp phụ [1,2].

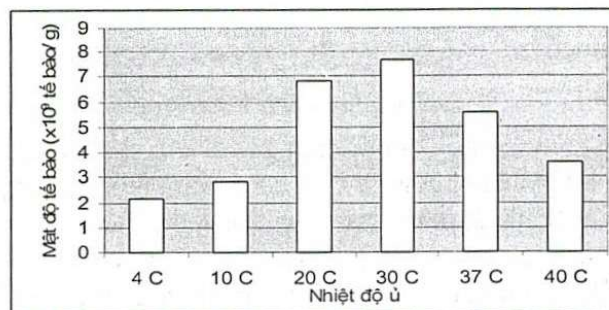


Đồ thị 1. Sự biến đổi mật độ tế bào vi khuẩn theo thời gian ủ trên chất mang BC

Khảo sát khả năng hấp phụ của tế bào vi khuẩn *Lc.lactis* 1 trên giá thể BC, nhận thấy mật độ tế bào trên chất mang đạt giá trị cao sau 1 ngày cố định ($3,46 \times 10^9$ tế bào/g) và đạt giá trị cực đại vào ngày thứ 2 ($6,41 \times 10^9$ tế bào/g); càng kéo dài thời gian bẫy tăng sinh thì mật độ tế bào trên chất mang càng có xu hướng giảm (đồ thị 1). Do dịch vi khuẩn dùng để cố định tế bào *Lc.lactis* 1 đã được hoạt hoá sau 12 giờ nuôi cấy. Thời điểm bắt đầu đưa BC vào dịch vi khuẩn, tế bào sẽ được hấp phụ trên chất mang BC. Sau 24 giờ, những tế bào cố định này sẽ bắt đầu đi vào pha tăng trưởng. Tiếp diễn của quá trình hấp phụ là quá trình bẫy tăng sinh, tế bào cố định sẽ tiếp tục tăng sinh và phát triển trên bề mặt giá thể cũng như trong hệ sợi cellulose của BC với sự có mặt của các thành phần dinh dưỡng trong môi trường. Thời điểm 48 giờ, vi khuẩn đi vào pha ổn định và mật độ tế bào đạt cực đại (tương ứng với mật độ tế bào vi khuẩn hấp phụ trên giá thể BC là cực đại). Sau giai đoạn này, các thành phần dinh dưỡng trong môi trường cũng bắt đầu cạn dần, tế bào đi vào pha suy tàn, vì vậy lượng tế bào cố định trên chất mang BC giảm đáng kể.

Vậy, thời gian ủ tối ưu để cố định tế bào *Lc.lactis* 1 trên chất mang BC là 2 ngày.

3.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ ủ đến lượng tế bào cố định trong quá trình bẫy-hấp phụ



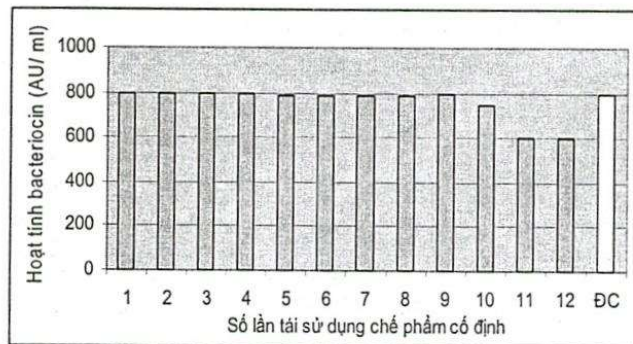
Biểu đồ 2. Sự biến đổi mật độ tế bào vi khuẩn cố định theo nhiệt độ ủ trên chất mang BC

Nhiệt độ trong thời gian ủ của quá trình bẫy-hấp phụ chính là nhiệt độ cần thiết để tăng sinh khối vi khuẩn trên giá thể BC. Với 6 mức khảo sát nhiệt độ từ 4°C đến 40°C , lượng tế bào phát triển trong chất mang BC cao nhất khi ủ ở 30°C đạt $7,67 \times 10^9$ tế bào/g (biểu đồ 2)

Như vậy, với các điều kiện tối ưu cố định *Lactococcus lactis* đã khảo sát: hấp phụ bằng máy lắc, thời gian ủ 2 ngày, ở nhiệt độ 30⁰C, lượng tế bào vi khuẩn cố định trên chất mang đạt được như sau:

- Mật độ trung bình là: $7,67 \times 10^9$ /g.
- Mật độ vi khuẩn mặt ngoài chất mang là: $4,5 \times 10^4$ tế bào/cm².
- Mật độ vi khuẩn bên trong chất mang là: $3,8 \times 10^4$ tế bào/cm².

3.1.4. Ứng dụng chế phẩm vi khuẩn *Lactococcus lactis* cố định trên chất mang BC để lên men thu nhận bacteriocin



Biểu đồ 3. Hoạt tính bacteriocin của các lần tái sử dụng chế phẩm tế bào cố định trên BC

Hoạt tính bacteriocin trong 9 lần lên men tái sử dụng khoảng 800 AU/ml và không có sự khác biệt so với đối chứng khi lên men bằng tế bào tự do. Từ lần lên men tái sử dụng thứ 10, hoạt tính có xu hướng giảm (biểu đồ 3).

Lượng bacteriocin thô thu được trong 10 lần lên men tái sử dụng khoảng 3,5 g/l, không có sự khác biệt so với đối chứng. Từ lần tái sử dụng thứ 11, lượng bacteriocin giảm nhanh còn 2,85 g/l.

Quá trình rửa trôi tế bào tổng cộng qua 10 lần tái sử dụng là $(7,6 \times 10^9 - 5,2 \times 10^9) / 7,6 \times 10^9 = 31\%$ góp phần giải thích cho kết quả trên.

Xét về cả số lượng và chất lượng bacteriocin tạo thành, có thể tái sử dụng chế phẩm tế bào cố định khoảng 9-10 lần.

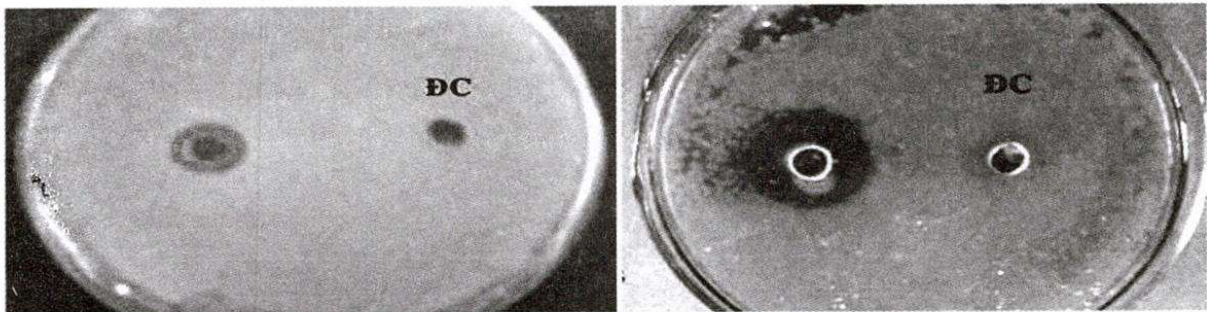
3.2. Ứng dụng bacteriocin để bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu

3.2.1. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch bacteriocin từ *Lc.lactis*

Với mục đích sử dụng dịch bacteriocin từ chủng *Lc.lactis* để bảo quản thịt, chúng tôi tiến hành khảo sát phổ kháng khuẩn của chủng *Lc.lactis* đối với một số chủng vi khuẩn chỉ thị, đặc biệt là những vi khuẩn gây bệnh thường tìm thấy trong thịt heo. Từ bảng 1 cho thấy dịch bacteriocin từ chủng *Lc.lactis* có phổ kháng khuẩn khá rộng, có hoạt tính ức chế vi khuẩn Gram dương và ức chế một số vi khuẩn Gram âm gây bệnh như *Sal. typhimurium* và *E.coli*.

Bảng 1. Khả năng kháng khuẩn của chủng *Lactococcus lactis*

Chủng vi khuẩn chỉ thị	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Chủng vi khuẩn chỉ thị	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	16	<i>Salmonella typhimurium</i>	11
<i>Bacillus cereus</i>	12	<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Bacillus licheniformis</i> 1	15	<i>Streptococcus sp</i>	12
<i>Bacillus licheniformis</i> 2	12	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0
<i>Bacillus lacterlu</i>	13	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	15



(a) *Salmonella typhimurium*

(b) *Lactobacillus plantarum*

Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của dịch bacteriocin của chủng *Lc.lactis* đối với một số chủng chỉ thị

3.2.2. Sử dụng màng mỏng BC hấp phụ bacteriocin bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu

Thịt tươi sau giết mổ thường giảm chất lượng về cả chất lượng cảm quan và chất lượng vi sinh chỉ sau 12 giờ ở nhiệt độ thường (bán ở các chợ) và sau 24 giờ ở nhiệt độ mát (bán ở siêu thị). Đồng thời thịt heo để ở nhiệt độ thường lại là môi trường lý tưởng cho sự sinh trưởng của các vi sinh vật gây hư hỏng thực phẩm cũng như vi sinh vật gây bệnh. Trong khảo sát này, chúng tôi sử dụng màng mỏng BC kết hợp bacteriocin để bảo quản thịt tươi sơ chế-tối thiểu.

Bảng 2. Các phương pháp bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu

Chỉ tiêu theo dõi		Mẫu	ĐC ₀	ĐC ₁	A	B	C	D	E
		Chất lượng cảm quan	Màu sắc	Đặc trung	Sậm màu	Ôi nhẹ	Sậm màu, khô	Đặc trung	Đặc trung
Mùi									
Trạng thái, cấu trúc	Ướt, hơi nhầy		Đặc trung						

	Điểm chung (/20)	20	12	13	16	18,5	18,5	18
Vi sinh (CFU/g)	TSVKHK	4,5 x10 ⁴	2,1 x10 ⁶	1,8 x10 ⁶	2,7 x10 ⁵	2,4 x10 ⁵	2,8 x10 ⁵	6,9 x10 ⁵
	<i>E.coli</i>	35	50	50	35	35	35	50
	<i>S.aureus</i>	Không phát hiện						
	<i>Salmonella</i>							
pH	6,2	5,0	5,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
Thời gian bảo quản tối đa (ngày)	Đối chún g	1	1	3	3	3	3	

(1) ĐC₀: Đối chứng ban đầu: Thịt heo tươi ngay sau giết mổ

(2) ĐC₁: Đối chứng thí nghiệm: Thịt heo tươi theo thời gian bảo quản

(3) Mẫu A: Sử dụng màng BC

(4) Mẫu B: Sử dụng dịch bacteriocin có hoạt tính bacteriocin 400 AU/ml

(5) Mẫu C: Sử dụng màng BC ngâm trong dịch bacteriocin có hoạt tính 400 AU/ml

(6) Mẫu D: Sử dụng màng BC ngâm trong dịch bacteriocin có hoạt tính 200 AU/ml

(7) Mẫu E: Sử dụng màng BC ngâm trong dịch bacteriocin có hoạt tính 100 AU/ml

Dịch bacteriocin thô được thu hồi từ lên men sử dụng chủng *Lc.lactis* 1 bằng phương pháp ly tâm thu dịch nổi và trung hoà về pH 6.0 bằng CaCO₃.

Màng mỏng BC được nuôi cấy và thu nhận, sau khi xử lý [1] được ngâm 30 phút vào trong các dịch bacteriocin có hoạt tính lần lượt là 100, 200 và 400 AU/ml. Trong quá trình 30 phút ngâm, màng BC được trương nở và hấp phụ dịch bacteriocin vào màng. Màng mỏng BC hấp phụ bacteriocin được dùng để làm màng bọc thịt tươi trong bảo quản sơ chế tối thiểu.

Thịt heo tươi được thu nhận ngay sau khi giết mổ và được chia làm 7 mẫu thí nghiệm với phương pháp bảo quản khác nhau. Kết quả đánh giá chất lượng các mẫu thịt sau thời gian bảo quản được trình bày trong bảng 2.

Xét về chất lượng cảm quan, dựa trên các chỉ tiêu và yêu cầu cảm quan của thịt heo (theo TCVN 7046: 2002) chúng tôi có nhận xét sau:

- Mẫu đối chứng thí nghiệm ĐC₁, sau 1 ngày bảo quản, màu sắc, mùi và trạng thái cấu trúc không còn duy trì được so với mẫu đối chứng ban đầu ĐC₀.

- Mẫu A, sau 1 ngày bảo quản, tuy vẫn giữ được mùi đặc trưng nhưng bắt đầu có dấu hiệu ôi sau 1 ngày bảo quản và không giữ được màu sắc và trạng thái cấu trúc so với mẫu đối chứng ban đầu ĐC₀.

- Mẫu B, sau 3 ngày bảo quản, giữ được mùi và trạng thái cấu trúc đặc trưng so với đối chứng ban đầu ĐC₀, tuy nhiên bề mặt thịt bị khô.

- Mẫu C, D, E, sau 3 ngày bảo quản, giữ được màu sắc, mùi và trạng thái cấu trúc đặc trưng so với đối chứng ban đầu.

So sánh điểm chung đánh giá về chất lượng cảm quan cho các mẫu khảo sát, nhận thấy 3 mẫu C, D, E sử dụng bacteriocin cố định trên BC để bảo quản thịt tươi đều có điểm cao (>18/20 điểm) so với các mẫu còn lại. Vì vậy, dựa vào chất lượng cảm quan các mẫu C, D và E được chọn.

Xét về chỉ tiêu vi sinh và độ pH, dựa trên qui định kỹ thuật của thịt tươi về chỉ tiêu vi sinh vật và chỉ tiêu độ pH theo tiêu chuẩn Việt Nam (theo TCVN 7046:2002), chúng tôi nhận thấy:

- Mẫu ĐC₁ có tổng số vi sinh vật hiếu khí và E.coli cao hơn hẳn so với mẫu ĐC₀ và không đạt giới hạn cho phép. Do trong thời gian bảo quản 24 giờ ở 15°C, nhiều vi sinh vật hiếu khí vẫn có khả năng tồn tại nên với điều kiện môi trường thịt giàu dinh dưỡng, chúng tăng trưởng nhanh chóng.

- Mẫu A có tổng số vi sinh vật hiếu khí và E.coli cao hơn hẳn so với mẫu đối chứng ĐC₀ và không đạt giới hạn cho phép. Tuy nhiên, tổng số vi sinh vật hiếu khí ở mẫu A lại thấp hơn ở mẫu ĐC₁. Do mẫu A được bọc bằng một lớp màng mỏng BC nên đã giảm bớt lượng không khí xung quanh mẫu, vì vậy đã cản trở sự tăng trưởng của một số loài vi sinh vật hiếu khí.

- Ở cả bốn mẫu bảo quản thịt B, C, D và E có xử lý với bacteriocin, tổng số vi sinh vật hiếu khí cũng như lượng E.coli thấp hơn so với mẫu ĐC₁ và A rất nhiều (bảng 2). Do bacteriocin của chủng *Lc.lactis* 1 có khả năng kháng một số vi khuẩn hiếu khí, do đó với sự hiện diện của bacteriocin đã ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhiều loài vi khuẩn hiếu khí có trong mẫu thịt. Xét về chất lượng vi sinh, cả hai chỉ tiêu tổng số vi khuẩn hiếu khí và E.coli, các mẫu B, C, D, E đều đạt chỉ tiêu theo TCVN 7046:2002 và QĐBYT 867.

- So sánh giữa hai mẫu B và C, lượng E.coli là tương đương nhưng tổng số vi sinh vật hiếu khí ở mẫu B cao hơn ở mẫu C (bảng 2). Do bacteriocin ở mẫu B ở trạng thái tự do, ban đầu chúng phủ trên bề mặt thịt, sau đó dần dần sẽ thấm vào khối thịt. Dưới tác động của các enzyme protease có trong khối thịt, những phân tử bacteriocin với bản chất là protein sẽ bị phân huỷ dần. Trái lại, bacteriocin ở mẫu C, được cố định bên trong cũng như trên bề mặt màng BC nên rất ít chịu tác động của protease. Vì vậy, tuy cả 2 mẫu đều được xử lý với dịch bacteriocin có cùng hoạt tính (400 AU/ml) nhưng hiệu quả kháng khuẩn của mẫu C lại cao hơn mẫu B.

- Giữa 3 mẫu C, D, E đều được bảo quản bằng màng BC hấp phụ bacteriocin, nhưng hoạt tính bacteriocin càng giảm, khả năng kháng khuẩn càng giảm, vì vậy hiệu quả bảo quản cũng giảm, điều này phù hợp với lý thuyết. So với TCVN 7046:2002, chỉ tiêu tổng số vi khuẩn hiếu khí của các mẫu C, D, E đều nằm trong giới hạn cho phép. So sánh giữa hai mẫu C và B, chỉ tiêu này không có khác biệt nhưng khi so sánh hai mẫu C, D và mẫu E thì tổng số vi khuẩn hiếu khí ở mẫu E cao hơn 2,8 lần so với mẫu C và 2,5 lần so với mẫu D. Vì vậy mẫu E bị loại. Giữa 2 mẫu C và D, không có sự khác biệt, chúng tôi chọn mẫu D do ở mẫu D sử dụng lượng bacteriocin thấp hơn ở mẫu C nên thích hợp hơn cho mục đích bảo quản thực phẩm nhằm đảm bảo tối đa an toàn cho người tiêu dùng và hiệu quả kinh tế.

Ngoài ra, không có phát hiện về *S.aureus* và *Salmonella* trong 7 mẫu thí nghiệm.

Đối với độ pH, ở mẫu ĐC₁ và A đều không đạt chỉ tiêu. pH giảm nhanh (5,0) so với mẫu đối chứng ban đầu ĐC₀ (6,2). Ở 4 mẫu B, C, D, E, pH không khác biệt nhiều so với đối chứng (6,0) và trong giới hạn cho phép.

Tóm lại, qua khảo sát các mẫu thịt tươi sơ chế tối thiểu được bảo quản bằng các phương pháp khác nhau, chúng tôi nhận thấy: Dựa vào chất lượng cảm quan: các mẫu được chọn là C, D và E. Dựa vào chất lượng vi sinh: các mẫu được chọn là C và D. Do đó các mẫu tối ưu cho bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu là C và D. Giữa hai mẫu C và D, chúng tôi chọn phương pháp bảo quản mẫu D vì chỉ cần sử dụng dịch bacteriocin có hoạt tính 200 AU/ml. Các kết quả phân tích trên đây cho thấy: màng mỏng BC chỉ có tác dụng gia tăng chất lượng cảm quan sản phẩm; bacteriocin có tác dụng cải thiện chất lượng vi sinh của sản phẩm. Kết hợp màng mỏng BC hấp phụ bacteriocin có tác dụng vừa tăng chất lượng cảm quan và chất lượng vi sinh ở sản phẩm thịt tươi sơ chế tối thiểu.

Vậy, dùng màng mỏng BC (bacterial cellulose) hấp phụ dịch bacteriocin có hoạt tính 200 AU/ml có thể bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu 3 ngày so với đối chứng chỉ bảo quản được 1 ngày, vẫn đảm bảo theo TCVN 7046: 2002.

4. KẾT LUẬN

- Hiệu quả sử dụng chế phẩm tế bào *Lc.lactis* 1 cố định trên chất mang BC trong lên men thu nhận bacteriocin khá cao: có thể tái sử dụng chế phẩm 9-10 lần mà vẫn đảm bảo về mặt thời gian lên men, số lượng và chất lượng bacteriocin so với đối chứng.

- Bước đầu sử dụng màng mỏng BC hấp phụ bacteriocin để bảo quản thịt tươi sơ chế tối thiểu: có thể bảo quản thịt tươi đến 3 ngày bằng màng BC hấp phụ dịch thô bacteriocin 200 AU/ml vẫn đảm bảo chất lượng thịt theo TCVN 7046:2002.

- Kết quả thu được cũng góp phần thăm dò 2 ứng dụng mới của cellulose vi khuẩn (BC): sử dụng BC làm chất mang trong kỹ thuật cố định tế bào vi sinh vật và sử dụng màng mỏng BC làm màng bao thực phẩm.

IMMOBILIZING *LACTOCOCCUS LACTIC* CELL AND APPLICATING BACTERIAL CELLULOSE MEMBRANE TREATED WITH BACTERIOCIN TO PRESERVING PORK

Nguyen Thuy Huong, Tran Thi Tuong An
University of Technology, VNU-HCM

ABSTRACT: *In this review, we investigate the immobilization of Lactococcus lactis spp lactis 1 in bacterial cellulose and application for producing bacteriocin. The results are given as following:*

- *BC entirely satisfied the conditions required for immobilizing bacterial cell technology.*

- *The effect of using Lactococcus lactis spp lactis 1 cell, immobilized in BC, for producing bacteriocin was high: it could be reused about 9-10 times, the quantity and quality of bacteriocin remained rather good against control experiments.*

- *Application of this bacteriocin, we use it to preserve pork. In turn, bacterial cellulose membrane treated with bacteriocin solutions which inhibit bacteriocin activity about 200 AU/ml. Using this preparation to enveloping pork samples and maintaining at 10-15°C. After three days, comparison of sample and control experiment has many differences in ceptor quality.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Thúy Hương (2006). Tuyển chọn và cải thiện các chủng *Acetobacter xylinum* tạo cellulose vi khuẩn để sản xuất và ứng dụng ở quy mô pilot. *Luận án Tiến sỹ Sinh học*. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP.HCM.
- [2]. Krystynowicz A, Czaja W (2002) Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Industrial Microbiology and Biotechnology* 29:189-195.

- [3]. Lee K. Y. (2000) Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 869-873.
- [4]. Sheu T.Y. (1999) Microentrapment of *Lactobacili* in calcium alginate gel. *Food science* 54: 557-561.
- [5]. S.T.Ogunbanwo et al (2003) Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1, *African Journal of Biotechnology* 2: 219-227.
- [6]. Shah N.P. et al (2000) Probiotic bacteria. *Food science* 8: 563-572.