

## CHỌN VÀ KHẢO SÁT VÀI ĐẶC TÍNH VI KHUẨN ACETIC- BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG LÀM GIẤM TỪ DỊCH TRÁI CÂY

Trịnh Thị Hồng

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh  
(Bài nhận ngày 15 tháng 4 năm 2003, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 25 tháng 9 năm 2003)

**TÓM TẮT:** Phân lập vi khuẩn acetic từ các mẫu giấm được thu thập từ một vài địa điểm ở thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh lân cận.

Kết quả phân lập được 12 chủng vi khuẩn acetic, định danh được 11 chủng là *Acetobacter.sp* (A1,A2....) và một chủng *Gluconobacter.sp* (G9).

Nuôi cấy chủng A7 và G9 trong môi trường lên men có chứa 5% ethanol,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KH_2PO_4$  ở 300C trong 8 ngày thì hàm lượng acid tổng tích lũy trong môi trường tương đối thấp, tương ứng là 2,78% và 2,89%.

Khi nuôi cấy hai chủng trên trong môi trường lên men có rượu trái cây như rượu chuối (chứa 9% ethanol), rượu nho (chứa 10% ethanol), rượu sori (chứa 9% ethanol) với tỉ lệ 20% (v/v), ủ ở 300C, Sau 8-10 ngày thu được giấm nho có độ trong, thơm ngon nhất và có hàm lượng acid tổng tương ứng là 2,88% và 3,04%.

Khi sử dụng nước ép nho (1kg/10lít nước), bổ sung ethanol để đạt nồng độ 5% ethanol, sau đó bổ sung ethanol từng đợt (2,5%; 2,0%;...), kết quả nồng độ acid tổng trong mẫu giấm đạt tới 5,8% và 6,3% tương ứng trong 22 ngày (bằng phương pháp lên men tĩnh).

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Thực phẩm lên men truyền thống được xem là nguồn gen vi sinh vật quý để ứng dụng trong công nghệ lên men các thực phẩm. Nhưng ngược lại, hầu như ngày càng có những dạng sản phẩm hiện đại được làm từ các ngành công nghệ tiên tiến nên dân chúng có khuynh hướng từ bỏ thực phẩm truyền thống của mình. Chính vì vậy dẫn đến việc sản xuất các dạng thực phẩm này giảm dần và thậm chí các vi sinh vật có lợi sẽ dần dần biến mất.

Giấm là một dạng thực phẩm lên men khá phổ biến có tác dụng làm tăng vị ngon, kích thích tiêu hóa, tăng sức khỏe,... có thể sử dụng trong chế biến và bảo quản thực phẩm. Các nguyên liệu được sử dụng thường phổ biến, rẻ tiền khi tận dụng các nguyên liệu này để lên men rượu, kế tiếp là lên men giấm sẽ tạo được sản phẩm có ý nghĩa kinh tế.

Các phương pháp lên men giấm trong dân gian thường cho sản phẩm ít, chậm và bình thường. Trong thực tế cần tạo sản phẩm thơm ngon, đặc trưng hơn hy vọng có thể thay đổi khẩu vị trong việc tạo thành các món ăn hợp khẩu vị. Với mục tiêu là bảo tồn dạng thực phẩm lên men truyền thống và giống vi sinh vật quý hiếm nên Trong phần đề tài này chủ yếu chúng tôi tiến hành chọn và khảo sát vài đặc điểm về phân loại và sơ bộ ứng dụng vi khuẩn lên men acetic để làm giấm từ dịch ép trái cây (các mẫu giấm thu thập từ một vài địa điểm trong thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh lân cận).

### VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

**Vật liệu:** Chủ yếu là các mẫu giấm thu thập tại thành phố Hồ Chí Minh, Đồng Nai, Long An.  
**Phương pháp:**

**Thu mẫu giấm:** chọn mẫu giấm có vị chua nhiều, có hương thơm, chủ yếu tìm mẫu giấm nuôi( đa số mua tại nhà).

**Xác định pH** bằng máy đo và hàm lượng acid tổng của các mẫu giấm thông qua phương pháp chuẩn độ bằng NaOH 0,1N với phenolphthalein là chất chỉ thị màu.

**Phân lập vi khuẩn acetic:** Sử dụng môi trường có glucose, cao nấm men, CaCO<sub>3</sub>; vi khuẩn tạo acid làm tan CaCO<sub>3</sub> nên khuẩn lạc có vòng trong bao quanh được chọn để làm thuần.

Nuôi cấy vi khuẩn sinh acid trên môi trường định lượng acid acetic gồm ethanol, glucose trong 15 ngày, ở nhiệt độ phòng. Giống chuẩn được nuôi trên môi trường làm giàu tỷ lệ 1/10 được cho vào 100ml môi trường lên men acetic trong bình tam giác 500ml, lấy mẫu và xác định hàm lượng acid tổng- chọn vi khuẩn có khả năng sinh acid cao.

**Khảo sát vài đặc tính** về hình thái, sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn và phân loại chúng đến cấp độ giống. Theo Leifson, đặc tính chủ yếu để nhận định giống là khả năng oxy hóa acetate hoặc lactate(pH=6,4)..

**Khảo sát khả năng lên men acetic của chủng tạo acid cao:** Thời gian nuôi cấy, nồng độ ethanol ban đầu, bổ sung khoáng.

**Sử dụng rượu trái cây làm giấm:** Sử dụng môi trường lên men có rượu trái cây chiếm 20%(v/v) như: nho(10%ethanol), sori(8,5%ethanol), mít(9%ethanol), chuối (9%ethanol) và bổ sung đủ ethanol. Thực hiện quá trình lên men và xác định hàm lượng acid tổng ở thời gian thích hợp trên, đồng thời đánh giá màu sắc sản phẩm, hương vị qua thử nếm. Chọn mẫu có chất lượng tốt.

Sử dụng khay chứa 11 môi trường lên men với độ dày 3cm.

**Sử dụng nước ép nho(1kg/10lít nước):** Dùng nước ép nho làm dịch lên men, thực hiện quá trình lên men với hàm lượng ethanol ban đầu như trên. Xác định hàm lượng acid tổng và khi hàm lượng này không tăng lên nữa, bổ sung ethanol để thực hiện quá trình lên men tiếp, đo hàm lượng acid tổng đến khi hàm lượng này không tăng nữa thì tiếp tục bổ sung ethanol. Thí nghiệm được thực hiện cho đến khi vẫn có bổ sung ethanol nhưng hàm lượng acid không tăng được nữa.

## KẾT QUẢ - BIỆN LUẬN

**Giá trị pH và hàm lượng acid tổng trong các mẫu giấm:** Từ 15 mẫu giấm ở các vùng thành phố Hồ Chí Minh, Long An, Đồng Nai, pH thay đổi từ 2,03-3,25 và hàm lượng acid tổng biến thiên từ 0,84-3,46%. Như vậy, độ chua của giấm tiêu thụ ngoài thị trường tại một số địa điểm chưa đạt chuẩn 3% qui định. Điều này cũng có thể do giống không có khả năng tạo acid cao, cũng có thể chưa đến thời điểm thu mẫu, hoặc do hiện tượng lạt giấm. Do đó để đáp ứng độ chua cần thiết cho người tiêu dùng trên thị trường, phải sử dụng “giấm acid”, hoặc nhiều hộ dân sử dụng acid trái cây như: khế, chanh, tắc để thay giấm trong khẩu phần hằng ngày.

**Phân lập:** Từ các mẫu giấm, đã phân lập được 12 chủng vi khuẩn acetic kí hiệu là A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>...

**Khả năng tạo acid của vi khuẩn acetic:** Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường lên men acetic, sau 15 ngày hàm lượng acid tổng biến thiên từ 0,60-1,88%. Kết quả cho thấy từ nguồn carbon duy nhất là ethanol vi khuẩn có thể oxy hóa tạo acid acetic (qua phản ứng định tính) do đó có thể xem như acid acetic chiếm chủ yếu trong acid tổng. Có 4 chủng tạo acid tổng cao: A<sub>5</sub>(1,75%), A<sub>7</sub>(1,88%), A<sub>8</sub>- A<sub>9</sub>(1,77%).

**Định danh:** Khảo sát đặc tính chủ yếu của 12 chủng sinh acid trên cho thấy có đặc tính: Gram âm, catalase dương tính, phát triển được trên môi trường glutamate, manitol, không phân giải

gelatin, dextrin, không sinh H<sub>2</sub>S, không tạo indol, đều có khả năng oxy hóa ethanol thành acid acetic; hai chủng A<sub>5</sub>-A<sub>7</sub> có khả năng tạo sắc tố. Chỉ có chủng G<sub>9</sub> là có khả năng oxy hóa acetate sodium, còn các chủng khác không có. Do chưa có điều kiện để khắc sát chi tiết về thành phần DNA, Ubiquinone nên chỉ kết luận đến mức giống: G<sub>9</sub> *Gluconobacter sp.*; còn các chủng khác là *Acetobacter sp.* Nhận xét về các mẫu giấm phân lập cho thấy có sự hiện diện phổ biến của *Acetobacter*, còn *Gluconobacter* hiếm gặp.

Từ thí nghiệm định lượng acid tổng trên ở phần kết quả 3; chúng tôi chọn *Acetobacter sp.*(A<sub>7</sub>) có 1,88% acid và *Gluconobacter sp.*(G<sub>9</sub>) cho 1,77% acid để nghiên cứu tiếp.

- Xác định thời gian thích hợp cho sự tạo acid: Nuôi cấy A<sub>7</sub> và G<sub>9</sub> trên môi trường lên men pH=4,5, nhiệt độ phòng, xác định hàm lượng acid tổng từ 1 -15 ngày. Kết quả cho thấy hàm lượng acid tăng chậm trong những ngày đầu, từ ngày 5,6,7 tăng nhanh và đến ngày thứ 8 : A<sub>7</sub> đạt 1,78% acid, và G<sub>9</sub> đạt 1,77% acid. Sau đó, hàm lượng acid hầu như không tăng nữa; cho đến ngày thứ 14 -15 chỉ đạt 1,79%(A<sub>9</sub>) và 1,77%(G<sub>9</sub>) ó thể do trong môi trường đã cạn nguồn cơ chất.
- Ảnh hưởng của hàm lượng ethanol ban đầu: Nuôi cấy A<sub>7</sub> và G<sub>9</sub> trên môi trường lên men có hàm lượng ethanol thay đổi 3 - 5 - 8%, sau 8 ngày, nhận thấy đối với môi trường có 5% ethanol cho hàm lượng acid tổng cao nhất đạt 2,54%( A<sub>7</sub>), 2,67%( G<sub>9</sub>).

Môi trường với 3% ethanol, hàm lượng acid tổng chỉ đạt 1,7%(A<sub>7</sub>) và 1,8% (G<sub>9</sub>); là do cơ chất ít nên tạo ít sản phẩm, hàm lượng ethanol cao có thể ức chế sự tạo acid, và hàm lượng acid chỉ đạt 0,46%( A<sub>7</sub>) và 0,96( G<sub>9</sub>).

- Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng: Khi bổ sung khoáng (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0,0025%) vào môi trường lên men, sau 8 ngày nuôi cấy hàm lượng acid tổng đạt đến 2,78%( A<sub>7</sub>) và 2,89%( G<sub>9</sub>); có thể đó là do ảnh hưởng của khoáng trên sự biến dưỡng và tăng cường khả năng oxy hóa của vi khuẩn.

**Sử dụng rượu trái cây lên men giấm:** Do chỉ là bước đầu sử dụng dịch trái cây nên chưa qua nhận xét chính xác của hội đồng cảm quan, tuy nhiên qua đánh giá sơ bộ chúng tôi nhận thấy giấm tạo thành thơm ngon và vị chua dịu so với giấm làm với nước dừa hay chuối là do hương thơm tự nhiên có trong trái cây. Đối với rượu nho giấm có màu đỏ đẹp, hàm lượng acid tổng đạt 2,88%( A<sub>7</sub>) và 3,04%( G<sub>9</sub>).

**Sử dụng nước ép nho lên men giấm:** Dùng nước ép nho làm dịch lên men trong các điều kiện như trên nhưng có bổ sung ethanol từng đợt; kết quả ghi nhận trong bảng sau:

**Bảng:** Hàm lượng acid tổng trong môi trường lên men có bổ ethanol của chủng A<sub>7</sub> và A<sub>9</sub>:

Thời gian lên men (ngày) và nồng độ ethanol bổ sung (%)	A <sub>7</sub>	A <sub>9</sub>
1(0 giờ)	0,019	0,019
2	0,59	0,61
4	1,25	1,35
6	1,80	1,90
7	2,20	2,25

Bổ sung 2,5% ethanol	8	2,15	2,30
	9	2,73	2,80
	10	3,20	3,52
	11	3,50	3,57
	12	4,10	4,21
	13	4,20	4,37
Bổ sung 2% ethanol	14	4,30	4,42
	15	4,60	4,71
	16	5,10	5,23
	17	5,20	5,57
	18	5,70	6,15
	19	5,80	6,07
Bổ sung 1,5% ethanol	20	5,90	6,21
	21	5,80	6,27
	22	5,80	6,30
	23	5,70	6,02

Qua thí nghiệm cho thấy với nồng độ ethanol ban đầu 5%, môi trường lên men cho kết quả ở ngày thứ 7, lượng acid đạt 2,2% (A<sub>7</sub>) và 2,25% (A<sub>9</sub>), sau đó đến ngày thứ 8 hầu như không tăng nữa, thí nghiệm được bổ sung ethanol với nồng độ 2,5% và tiếp tục cho lên men. Ngày thứ 13-14 acid không chênh lệch nhiều, tiếp tục bổ sung ethanol và xác định acid tạo thành. Ở ngày thứ 19 – 20 hàm lượng acid không tăng nữa và tiếp đến dù có thêm ethanol nhưng lượng acid cũng không tăng được nữa.

**Như vậy:** trong môi trường lên men, vi khuẩn oxy hoá ethanol để tạo acid, khi hết cơ chất có thể bổ sung để tiếp tục quá trình lên men. Cho đến lúc nồng độ acid không tăng nữa dù có thêm ethanol: đây có thể là nồng độ ức chế khả năng oxy hóa của vi khuẩn.

## KẾT LUẬN

Khi sử dụng dịch ép trái cây làm rượu, giấm được tạo thành thơm trái cây nên có vẻ đặc trưng hơn “giấm thường”. Giấm có hàm lượng acid tổng từ 5,70% - 6,30%, đạt độ chua cần thiết do đó người tiêu thụ khỏi phải sử dụng “tắc, chanh” để giấm ăn trong khẩu phần hàng ngày. Vấn đề là nên tìm phương pháp rút ngắn thời gian hơn và sử dụng “bã nho” để đạt hiệu quả kinh tế hơn.

## COLLECTION AND STUDY OF SOME ACETIC ACID FORMING BACTERIA CHARACTERISTIC-PRELIMINARY APPLICATIONS TO MAKING VINEGARS FROM FRUIT JUICE

Trinh Thi Hong

**ABSTRACT:** Collected Acetic acid producing bacteria from the vinegar sample in some areas around Hồ Chí Minh city and some neighboring provinces have been isolated.

A total of 12 strains of Acetic acid forming bacteria have been identified as *Acetobacter.sp* ( $A_1, A_2, \dots, A_{12}$ ) and *Gluconobacter.sp*. ( $G_9$  or *Gluc.sp*).

The cultural of *Acet.sp*<sub>7</sub> and *Gluc.sp*<sub>9</sub> were inoculated into a medium consisting of 5% ethanol,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KH_2PO_4$  at 30°C for 8-10 days. The samples were found to have relatively low total acid concentrations: 2,78% and 2,89%, respectively.

Mixing the wine of fruits as from bananas (containing 9% ethanol), grapes (containing 10% ethanol), cherries (9% ethanol) a ratio of 20% (1/5) with the above samples at 30°C, it has been found that after 8 to 10 days the grape vinegar has the highest degree of limpidity with most flavor and a total percentage of acid of 2,88% and 3,04%, respectively.

In addition, with grape juice (1kg/10 l of water), and ethanol added at intervals (5%, then 2,5%, and 2,0%, ...) the over all acid concentration in vinegar sample reach 5,8% and 6,3% in 22 days (under static fermentation).

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng. 1997. Vi sinh vật học (Tập 1, 2), NXB ĐH và THCN Hà Nội.
2. Michio Kozaki et al. 1997. Studies on the Acid producing Bacteria of Traditional Vinigars from the Philippines and Indonesia.
3. Richard Garudo. 1997. *Acetobacter liquefaciens* is a species distant from *Acetobacter xylinum*. Tokyo University of Agric.
4. L.A Unkerkofler et al. 1997. Industrial fermentation.
5. Reese H.Vauglin. 1988. Acetic acid-Vinegar.
6. Yuko Yamada et al. 1997. Isolation and characteization of "Polary flagellated intermediate strains" in Acetic acid bacteria.