

NGHIÊN CỨU THU NHẬN DỊCH CHIẾT GIÀU ACID AMIN TỪ NHỘNG TẦM BẰNG ENZYM

EXTRACTION OF HIGHLY AMINO ACID LIQUID FROM SILKWORM PUPAE BY ENZYME

*Vũ Kim Thoa, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thu Hiền**

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 04/03/2022

Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 05/09/2022

Ngày bài báo được duyệt đăng: 29/09/2022

Tóm tắt: Pluriamin là hỗn hợp acid amin tự nhiên thu được chiết xuất từ nhộng tằm khô. Trong hỗn hợp đó gồm nhiều acid amin thiết yếu quan trọng như leucin, isoleucin, lysin, threonin, cystein, ... Pluriamin cung cấp acid amin cần thiết cho cơ thể, giúp tăng cường thể trạng. Giá trị dinh dưỡng của protein được quyết định bởi mối quan hệ về số lượng và chất lượng của các acid amin khác nhau trong protein đó các acid amin có đặc tính thúc đẩy phát triển của cơ thể như: arginin, tryptophan, acid glutamic, prolin, cystein, serin, tysosin. Các acid amin thiết yếu đối với cơ thể là: Methionin, lysin, tryptophan, phenylalanin, leucin, isoleucin, threonin, valin. Trong nghiên cứu này, các acid amin từ nhộng tằm được chiết xuất bằng phương pháp sử dụng enzyme protease nhằm thu nhận hỗn hợp acid amin và các peptid sinh học có giá trị, có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất thực phẩm chức năng. Hàm lượng acid amin tổng thu được khi thủy phân bằng protease được xác định bằng phương pháp chuẩn độ formol, kết quả đạt 22.7 g/l. Phân tích sản phẩm thủy phân bằng sắc ký TLC cho thấy trong dịch chiết chứa các acid amin có giá trị cao như lysine, alanine, glutamic...

Từ khóa: Pluriamin, acid amin, nhộng tằm, peptid sinh học, enzyme.

Abstract: Pluriamine is a natural amino acid mixture obtained from dried silkworm pupae. In that mixture, there are many important essential amino acids such as leucin, isoleucin, lysine, threonin, cysteine, etc. Pluriamine provides essential amino acids for the body, helping to strengthen the body. The nutritional value of protein is determined by the relationship in quantity and quality of different amino acids in the protein, in which amino acids have growth promoting properties such as: arginine, tryptophan, glutamic acid, proline, cysteine, serine, tysosin. The essential amino acids for the body are: Methionine, lysine, tryptophan, phenylalanine, leucin, isoleucin, threonin, valine. In this study, amino acids from silkworm pupae were extracted using protease enzyme method to obtain a mixture of amino acids and valuable biological peptides, which have potential applications as raw materials

* Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mỏ Hà Nội

in food production. function. The total amino acid content obtained by protease hydrolysis was determined by formol titration method, the result was 22.7 g/l. Analysis of hydrolysis products by TLC chromatography showed that the extract contained high-value amino acids such as lysine, alanine, glutamic...

Keywords: Pluriamin, acid amin, silkworm pupae, black yeast, enzyme.

I. Đặt vấn đề

Axit amin là thành phần quan trọng, cấu thành nên các protein khác nhau, đảm nhiệm nhiều vai trò và chức năng trong các hoạt động sống của cơ thể. Ngoài ra, axit amin còn có tác dụng tổng hợp nên những loại nội tiết tố và chất dẫn truyền thần kinh cần thiết để hỗ trợ cho các quá trình sinh hóa trong cơ thể[11].

Axit amin kết hợp với nhau theo những trình tự nhất định trong những liên kết khác nhau sẽ tạo thành các phân tử khác nhau cả về thành phần lẫn tính chất. Như vậy, giá trị dinh dưỡng của protein được xác định dựa trên mối liên quan về số lượng và chất lượng của các axit amin khác nhau cấu thành nên protein đó[6].

Nhộng tằm là dạng chuyển tiếp của ấu trùng thành con trưởng thành, chứa nhiều chất dinh dưỡng và hoạt chất sinh học. Từ ngàn năm nay, nhân dân đã sử dụng nhộng tằm (sau khi được dùng để kéo lấy tơ) như một món ăn bổ dưỡng quen thuộc[2]. Gần đây, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu về tác dụng đối với sức khỏe con người của các acid amin trong nhộng tằm, cụ thể là Pluriamin. Hàm lượng protein của nhộng tằm tươi sau khi xử lý tẩy dầu mỡ lên đến 60%, chứa nhiều axit amin thiết yếu[4,9].

Các nghiên cứu gần đây về nhộng tằm chủ yếu tập trung vào chức năng của các peptit hoạt tính sinh học thu được bằng cách thủy phân bằng enzym. Một số peptit ức chế enzym chuyển đã được tiếp

cận bằng cách thực hiện thủy phân protein của nhộng tằm, và các peptit hoạt tính sinh học của nhộng tằm được cho là có hiệu quả trong việc chống tăng huyết áp, tiềm năng để điều trị bệnh tiểu đường[7]. Ngoài ra, các enzym thủy phân của nhộng tằm có thể ngăn cản sự phân hóa tiền tế bào và tạo mỡ, có thể được sử dụng để điều trị chứng béo phì trong tương lai.

Chiết xuất hợp chất acid amin bằng phương pháp thủy phân bằng axit là phương pháp đầu tiên để sản xuất acid amin, thường sử dụng axit clohydric. Phương pháp này có nhiều hạn chế, quy trình sản xuất nguy hại, ô nhiễm lớn, đồng thời vì sự khác biệt trong quá trình phản ứng xảy ra nhiều phản ứng, khó kiểm soát, cảm giác ngon miệng và an toàn kém, sản phẩm phụ nhiều, do đó, thường được sử dụng khi sản xuất hóa chất công nghiệp hoặc sản phẩm có giá trị thấp. Trong những năm gần đây, sản xuất acid amin bằng con đường sinh học ngày càng được quan tâm. Các phương pháp sinh học bao gồm phương pháp enzyme, phương lên men và bán lên men.

Enzyme sinh học thủy phân nhộng tằm là phương án khả quan, vì có điều kiện phản ứng nhẹ nhàng, ít sản phẩm phụ, đồng thời thân thiện với môi trường và các đặc tính tốt như cảm giác ngon miệng của sản phẩm đã xác định rằng phương pháp này đáng được nghiên cứu chuyên sâu[1].

II. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu: Nhộng tằm là nhộng tươi (thu được sau quá trình ươm

tơ) thu mua tại chợ dân sinh khu vực Hoàng Mai, Hà Nội sau khi làm sạch được sấy ở nhiệt độ 50°C trong 6h, sau đó xay nhỏ làm nguyên liệu bột.

Enzym protease (Spectrum Chemical, P1820).

2.2. Phương pháp thủy phân nhộng tằm bằng enzym protease

Bột nguyên liệu nhộng tằm hòa vào nước theo tỷ lệ 1:10 (w/v), bổ sung hoặc không bổ sung enzym protease, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 4h, khuấy liên tục trong quá trình giữ nhiệt. Sau khi thủy phân tiến hành ly tâm 5000 vòng trong 15 phút, loại bỏ mỡ nổi trên bề mặt, lọc bằng giấy lọc, thu được dịch chứa hỗn hợp acid amin từ nhộng tằm. Các mẫu thí nghiệm được ly tâm (10.000 rpm ở 10°C trong 10 phút), thu dịch và tiến hành phân tích.

2.3. Xác định acid amin tổng bằng phương pháp chuẩn độ formol

Cho vào bình nón 20ml dung dịch chứa acid amin và 0,5ml dung dịch phenolphthalein 1%. Để trung hòa dung dịch acid amin, cho từng giọt NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt. Cho thêm 20ml dung dịch fomandehit 30% đã trung hòa và lắc đều bình nón. Sau 5 phút dung dịch mất màu. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng đậm (pH = 9,0). Thí nghiệm kiểm tra cũng được tiến hành tương tự với các hoá chất trên nhưng thay dung dịch chứa acid amin bằng nước cất cùng thể tích.

2.4. Phương pháp định tính amino acid bằng sắc ký lớp mỏng TLC (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY)

Sắc ký lớp mỏng là quá trình tách các hợp chất dựa trên ái lực khác biệt

của chúng, trong đó pha tĩnh là lớp mỏng của silica gel trên tấm nhôm và pha động là dung môi. Mẫu phân tích được pha động đưa qua pha tĩnh thông qua các mao quản.

Sấy khô bản sắc ký ở 100°C trong 15 phút. Chấm mẫu cần phân tích và dung dịch acid amin chuẩn (hòa tan 4 axit amin Alanine, Arpartic acid, Glutamic acid, Lysine vào nước RO đạt nồng độ chuẩn 5mg/ml) lên bản sắc ký (thể tích 1-2 μ l). Các vết chấm phải nhỏ, có đường kính 2 - 4 mm. Dùng máy sấy sấy khô vết chấm. Đổ dung môi chạy sắc ký (Pha 100 ml dung môi chạy sắc ký gồm 60ml n-butanol, 15ml acetic acid glacial, 25ml nước RO (tỷ lệ 12:3:5) vào bể chạy sắc ký (chiều cao dung môi từ 1-1.5cm), đặt bản sắc ký đứng vào trong bể chạy sắc ký, sao cho chiều cao dung môi thấp hơn vị trí chấm mẫu trên bản sắc ký). Đập nắp, chạy trong 2-3h, đến khi vạch dung môi chạy đến cách mép trên bản sắc ký 1cm thì lấy bản sắc ký ra, sấy khô dung môi. Phun dung dịch thuốc thử ninhydrin (Thuốc thử ninhydrin: 0.2g ninhydrin trong 100ml ethanol) lên bản sắc ký, sau đó để bản sắc ký ở 80-100°C trong 5 phút và đọc kết quả. Xuất hiện vết mẫu chạy trên bản sắc ký, so sánh vết chất của mẫu phân tích với 4 axit amin chuẩn về màu sắc, hệ số di chuyển R_f, từ đó xác định được các axit amin có trong dịch chiết.

Giá trị R_f của mỗi acid amin được tính theo công thức sau:

$$R_f = \frac{\text{Khoảng cách di chuyển của mẫu}}{\text{Khoảng cách di chuyển của dung môi}}$$

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Lựa chọn phương pháp xử lý nguyên liệu bột nhộng tằm

Bước đầu tiên của quá trình tách chiết là xử lý nguyên liệu nhộng tằm. Đây là bước đầu quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả trích ly. Nhộng tằm sau khi làm sạch được sấy ở nhiệt độ 50°C trong 6h, sau đó xay nhỏ làm nguyên liệu bột.

Quá trình sấy cũng ảnh hưởng một phần không nhỏ tới quá trình thu nhận acid amin. Quá trình sấy không đảm bảo dẫn tới việc bảo quản nhộng sẽ bị hỏng, ẩm mốc. Tiến hành xử lý nguyên liệu theo 2 phương án: (1) Sấy nhộng ở 50°C trong 6h, sau đó đem xay nhuyễn thu bột nhộng. (2) Sấy nhộng ở 50°C trong 6h, sau đó đem xay nhuyễn, tiếp tục sấy ở nhiệt độ trên trong 2h và thu bột nhộng.



Hình 3.1 Hình ảnh nhộng tằm khi được sấy xay

Kết quả khảo sát cho thấy, việc sấy lần 2 bột nhộng sau khi sấy lần 1 và xay là rất quan trọng. Bột nhộng sấy 1 lần độ ẩm còn cao, do nguyên liệu ban đầu khá lớn, nước còn giữ lại trong nguyên liệu khá nhiều. Vì vậy, bột nhộng sấy 1 lần dễ bị hỏng mốc, trọng lượng không ổn định. Với phương án 2, bột nhộng sau khi xay có kích thước nhỏ, khi sấy ở nhiệt độ 50°C trong 2h sẽ giúp loại bỏ hoàn toàn lượng ẩm còn lưu lại trên nguyên liệu, giúp việc bảo quản dễ dàng và thuận lợi.

3.2. Lựa chọn phương pháp chiết xuất acid amin từ nhộng

Trong những nghiên cứu gần đây, pluriamin từ nhộng tằm có thể chiết xuất bằng một trong 3 phương pháp gồm chiết xuất bằng axit, chiết xuất bằng nước và chiết xuất bằng enzyme. Mỗi phương pháp có ưu và nhược điểm, hiệu suất tách cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi ưu tiên hai phương pháp chiết xuất Pluriamin bằng nước hoặc enzyme protease, do tính an toàn của hai phương pháp này. Bột nguyên liệu nhộng tằm hòa vào nước theo tỷ lệ 1:10 (w/v), bổ sung hoặc không bổ sung enzyme protease, sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 4h, khuấy liên tục trong quá trình giữ nhiệt.

Kết quả thể hiện ở bảng 3.1:

Bảng 3.1. Hàm lượng amin tổng thu được theo 2 phương pháp

Phương pháp	Hàm lượng acid amin tổng (g/l)
Chiết xuất bằng nước	3.25
Chiết xuất bằng enzyme	14.3

Trong thí nghiệm khảo sát trên, hàm lượng amino acid tổng thu được khi chiết xuất trong nước đạt 3.25g/l (tương đương hiệu suất 6.5% trọng lượng khô). Nghiên cứu của Niphattha Chatsuwana và cộng sự cho kết quả hàm lượng protein hòa tan trong nước chiết xuất từ nhộng tằm, Bombyx mori Linn là 3,96% theo trọng lượng ướt. Các axit amin chính được tìm thấy trong dịch chiết nhộng tằm là axit glutamic, phong phú nhất, tiếp theo là histidine, phenylalanine và glycine [7].

Dễ dàng nhận thấy, enzyme protease có hiệu quả cao khi chiết xuất acid amin

từ nguyên liệu bột nhộng. Hàm lượng acid amin tổng thu được cao gấp 5 lần so với khi không bổ sung enzym. Kết quả này khá dễ hiểu, bởi protein chiếm tới 60% thành phần của nhộng, với việc bổ sung protease hoạt độ cao sẽ thúc đẩy hiệu suất tách chiết pluriamin từ nhộng.

3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzym protease

Thời gian là có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả chiết tách acid amin bằng enzym, do enzym có bản chất là protein do vậy chúng có khả năng chịu đựng hay độ bền của phân tử protein phụ thuộc vào đặc tính và cấu trúc của enzym đó. Khi kéo dài thời gian ở nhiệt độ và điều kiện thích hợp, sau thời gian nhất định thì hoạt tính sẽ giảm xuống bởi phân tử protein bị thay đổi cấu trúc phân tử. Đồng thời sản phẩm sau quá trình chuyển hóa tạo ra cũng có thể ức chế quá trình chuyển hóa do vậy việc chọn đúng thời điểm ngừng sau quá trình chuyển hóa sẽ đem lại nhiều lợi ích kinh tế cũng như lượng sản phẩm thu hồi.

Tiến hành các bước chiết xuất thu nhận acid amin theo các bước sau:

(1) Xử lý nguyên liệu: nguyên liệu nhộng tằm được làm sạch, loại bỏ tạp chất, sau đó đem đi sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong 4 - 6h thu được bột nhộng nguyên liệu.

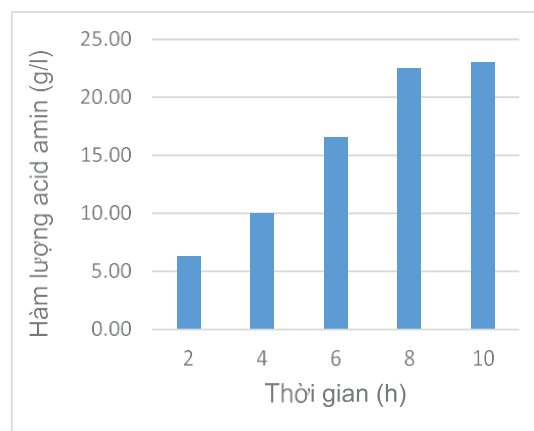
(2) Thủy phân: lấy 10g nhộng tằm sấy khô bổ sung nước cất và enzym protease, gia nhiệt 60°C với thời gian chiết xuất lần lượt là 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h.

(3) Sau khi thủy phân tiến hành ly tâm 5000 vòng trong 15 phút, loại bỏ mỡ

nổi bên trên và đem đi lọc bằng giấy lọc, thu được dịch chứa hỗn hợp acid amin từ nhộng tằm (Pluriamin).

(4) Định tính acid amin trong dịch chiết bằng phương pháp TLC và xác định hàm lượng acid amin tổng.

Kết quả thể hiện ở hình 3.3.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

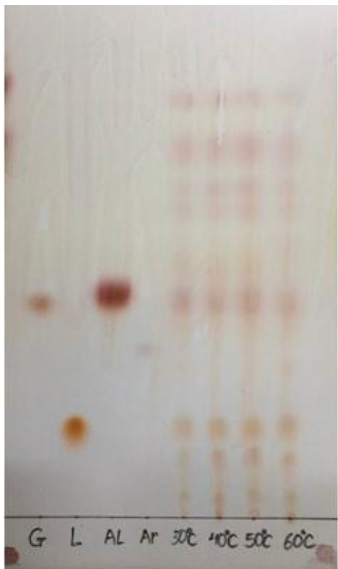
Kết quả đồ thị cho thấy hàm lượng axit amin tăng dần theo thời gian, tăng mạnh trong 6h đầu và cao nhất ở mức 8h (đạt 22.54 g/l). Tại thời điểm 10h, hàm lượng acid amin tổng thu được chỉ đạt 23.02 g/l, gần như tăng rất ít so với mốc thời gian trước. Trong khi đó, để tách chiết amin, chúng ta phải duy trì nhiệt độ và khuấy trong suốt quá trình. Do đó, chúng tôi lựa chọn thời gian thích hợp để chiết xuất là 8h.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzym protease

Để xác định khoảng nhiệt độ thích hợp cho quá trình chiết xuất axit amin, tiến hành như sau: cân 10g bột nhộng tằm, bổ sung 100ml nước và 100μl enzym. Các mẫu thí nghiệm ở nhiệt độ ở các mức nhiệt

độ 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C trong 6h, duy trì khuấy nhẹ trong quá trình gia nhiệt. Phân tích định tính các thành phần trong dịch chiết bằng phương pháp sắc ký bản mỏng TLC. Hàm lượng acid amin tổng của các mẫu chiết xuất xác định bằng phương pháp Anson cải tiến.

Kết quả trên hình 3.3 cho thấy, dịch chiết acid amin có chứa hỗn hợp nhiều acid amin khác nhau, dễ dàng nhận thấy sự có mặt của lysine và alanine cùng rất nhiều các acid amin khác.



Hình 3.3. Phân tích acid amin bằng TLC

G – glutamic L – Lysine
AL – Alanin Ar – Arginin

30°C, 40°C, 50°C, 60°C: mẫu dịch thủy phân nhộng tằm bằng enzyme ở các nhiệt độ khác nhau.

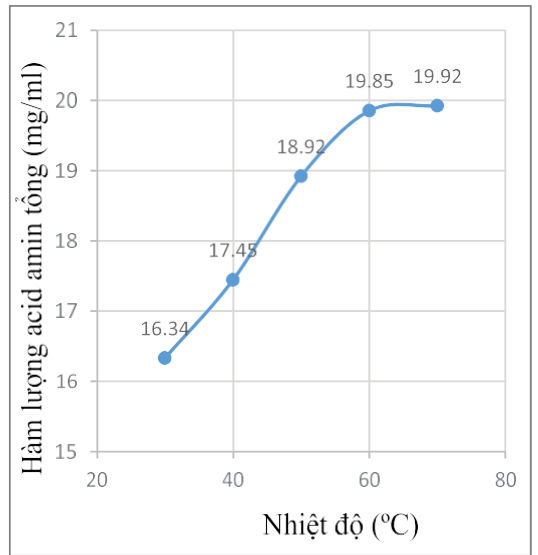
Khi định lượng hàm lượng acid amin tổng trong dịch chiết ở các mốc nhiệt độ khác nhau, kết quả khảo sát cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất tách chiết acid amin từ nguyên liệu.

Từ bảng 3.2, khi nhiệt độ tăng lượng acid amin thu được tăng dần. Ở 30°C,

hàm lượng acid amin thu được là 16.34 g/l. Hàm lượng acid amin tăng dần và đạt 19.85 khi nhiệt độ là 60°C (tăng hơn 20% so với ở nhiệt độ 30°C).

Bảng 3.2. Hàm lượng acid amin tổng thu được ở các nhiệt độ khác nhau

Mẫu thí nghiệm	Nhiệt độ	Hàm lượng acid amin (g/l)
1	30	16.34
2	40	17.45
3	50	18.92
4	60	19.85
5	70	19.92



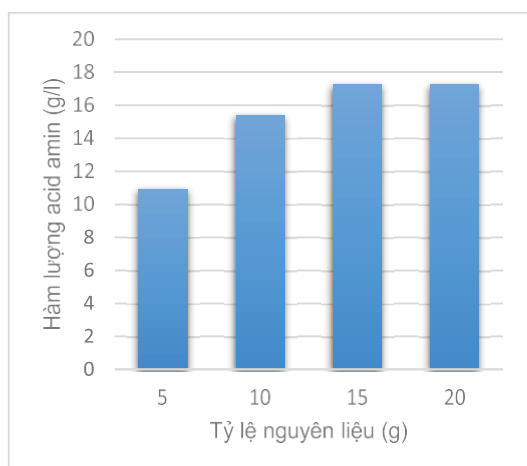
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

Tiếp tục tăng nhiệt độ, ở mức nhiệt độ 70°C thu được hàm lượng axit amin nhiều hơn lượng thu được ở 60°C, tuy nhiên hàm lượng tăng thêm không đáng kể. Ngoài ra, ở nhiệt độ 70°C, một số enzym bị ảnh hưởng đến độ bền và không còn đảm bảo được hoạt tính của enzym trong thời gian dài.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu nhộng đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzym protease

Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu nhộng đến khả năng chiết xuất hàm lượng axit amin của nhộng tằm với các tỷ lệ như sau: lượng bột tằm lần lượt là 5g, 10g, 15g, 20g trong 100ml nước, bổ sung enzyme và gia nhiệt ở 50°C. Sau 6h ủ nhiệt, tiến hành ly tâm thu dịch.

Kết quả xác định dựa trên hàm lượng axit amin của dịch sau ly tâm được biểu thị trong hình 3.5.



Hình 3.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu nhộng đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

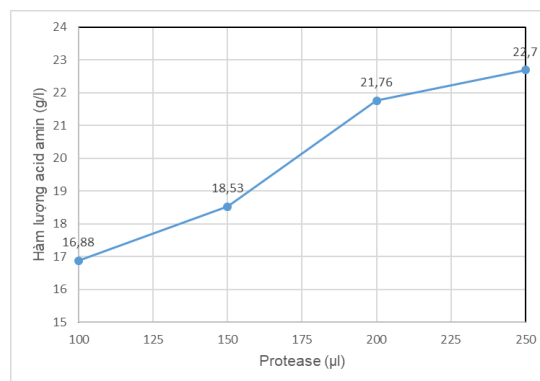
Kết quả đồ thị cho ta thấy khi tăng hàm lượng nguyên liệu nhộng, hàm lượng axit amin thu được tăng dần. Hàm lượng nguyên liệu tăng lên 15g và 20g hàm lượng axit amin tăng không đáng kể. Điều này dễ dàng giải thích đối với các phản ứng thủy phân, khi protein của nhộng tằm là cơ chất tạo thành các acid amin dưới tác dụng của enzyme xúc tác. Với khảo sát này, nhóm nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ nguyên liệu/nước là 15/100 (w/v).

Ảnh hưởng của tỷ lệ protease đến quá trình chiết xuất acid amin bằng enzyme

Tỷ lệ enzyme là một trong những chỉ tiêu quan trọng để chiết xuất axit amin.

Trong phản ứng thủy phân, protein nhộng tằm đóng vai trò cơ chất, phân giải bởi enzyme protease xúc tác thủy phân các thành phần có trong nhộng tằm, giúp quá trình trích ly acid amin đạt hiệu quả cao hơn.

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme bổ sung đến khả năng chiết xuất hàm lượng axit amin của nhộng tằm với các tỷ lệ được bố trí với lượng enzyme tăng dần 100μl, 150μl, 200μl, 250 μl. Tiến hành thí nghiệm với tỷ lệ 10g nhộng, sau 6h ủ nhiệt, nhiệt độ 50°C, và ly tâm thu dịch. Kết quả xác định dựa trên hàm lượng axit amin của dịch sau ly tâm được biểu thị trong đồ thị sau.

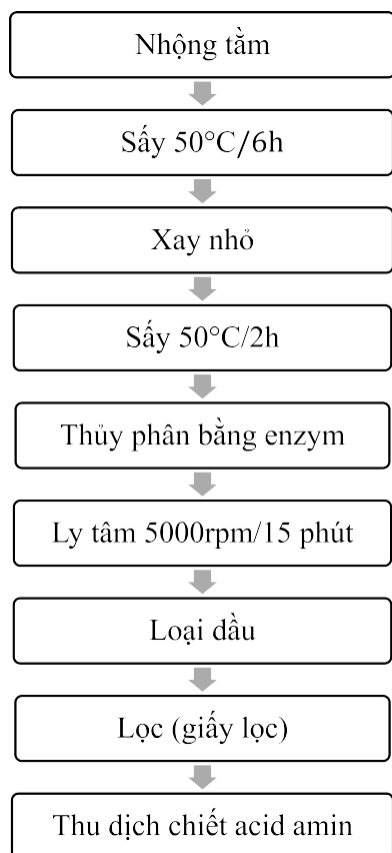


Hình 3.6. Ảnh hưởng của tỷ lệ protease bổ sung đến quá trình thủy phân nhộng tằm bằng enzyme

Biểu đồ trên đã thể hiện một cách rõ nét về ảnh hưởng của enzyme đến hiệu quả tách chiết acid amin từ nhộng. Thể tích enzyme tăng từ 0μl enzyme đến 250μl, lượng acid amin tăng lên rõ rệt. Khi thể tích enzyme vừa đủ để phản ứng thủy phân diễn ra triệt để, tốc độ tăng của sản phẩm có xu hướng chậm lại, so sánh mốc thí nghiệm 200 và 250μl để thấy rõ điều đó.

Dựa trên đồ thị khảo sát hình 3.6, lựa chọn thể tích enzyme thích hợp cho quá trình tách acid amin là 250 μl enzyme protease/10g nguyên liệu bột nhộng tằm.

3.4. Quy trình thu nhận dịch chiết giàu acid amin từ nhộng tằm bằng enzyme



Thuyết minh quy trình công nghệ:

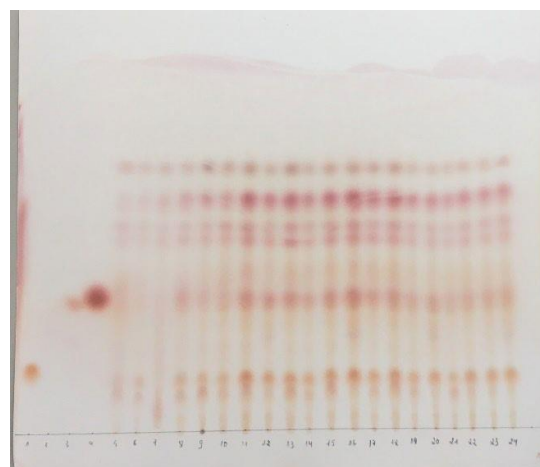
Xử lý nguyên liệu: nguyên liệu nhộng tằm được làm sạch, loại bỏ tạp chất, sau đó đem đi sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong 6h. Sau khi sấy, dùng máy xay để xay nhuyễn, tiếp tục cho vào sấy 50°C trong 2h thu được bột nhộng nguyên liệu.

Thủy phân: lấy 10g nhộng tằm sấy khô bổ sung 100ml nước cất và 100μl enzym protease, gia nhiệt 60°C trong 8h.

Sau khi thủy phân tiến hành ly tâm 5000 vòng trong 15 phút, loại bỏ mỡ nổi bên trên và đem đi lọc bằng giấy lọc, thu được dịch chứa hỗn hợp acid amin từ nhộng tằm (Pluriamin).

Từ các kết quả khảo sát trên, có thể thấy rằng các điều kiện để chiết xuất acid amin rất là quan trọng, hơn thế nữa còn

đóng vai trò lớn về việc đảm bảo cũng như bảo quản được sản phẩm sau này một cách hiệu quả.



Hình 3.7. Phân tích sản phẩm thủy phân nhộng tằm bằng phương pháp sắc ký bản mỏng

Sau khi các thí nghiệm lặp đi lặp lại nhiều lần, nhóm đã thống nhất đưa ra quy trình chiết xuất acid amin từ nhộng tằm bằng enzym.

Một số lưu ý cho quy trình tách chiết nhóm nghiên cứu đã tổng kết sau khi hoàn thành các thí nghiệm trên:

Thứ nhất, tầm quan trọng của công đoạn xử lý nguyên liệu ban đầu. Việc sấy 2 lần giúp bảo quản nguyên liệu nhộng tằm được tốt nhất. Khi sấy một lần, nhộng tằm chưa khô do trong cơ thể nhộng tằm có lượng mỡ khá lớn nhộng tằm chưa khô để một thời gian ngắn sẽ bị ẩm mốc và hỏng.

Thứ hai, dịch chiết acid amin thu được sau khi thủy phân có chứa một lượng lớn mỡ/dầu (thành phần có mặt trong nhộng tằm). Để chiết được dịch dễ dàng cần tách mỡ, có thể dùng giấy lọc. Mỡ sẽ được tách được khỏi dịch nhộng nhanh gọn, không tốn thời gian.

Cuối cùng, sản phẩm dịch chứa acid amin sau ly tâm cần được bảo quản cẩn thận trong tủ lạnh, phân tích ngay sau khi

thu nhận để đảm bảo kết quả chính xác. Các thí nghiệm cần tiến hành cẩn thận và tỉ mỉ, đảm bảo các bước thực hành chính xác, nguyên liệu và dụng cụ vệ sinh.

IV. Kết luận

Quá trình chiết xuất acid amin từ nhộng tằm bằng phương pháp enzyme chịu ảnh hưởng của một số yếu tố bao gồm nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỷ lệ nguyên liệu và enzyme bổ sung. Trên cơ sở các kết quả khảo sát, đề xuất quy trình thu nhận với một số thông số cụ thể như sau: Nhiệt độ thích hợp cho phản ứng thủy phân 60°C; tỷ lệ enzym thích hợp 250 µl/10g nguyên liệu (xử lý theo quy trình đã đề xuất); thời gian thủy phân acid amin là 8h;

Tỷ lệ nguyên liệu/nước: 1/10.

Tài liệu tham khảo:

[1]. CN100591226C. Method for extracting composite amino acid from silkworm pupa by biological enzyme method. Guangdong Huanxi Health Technology Inc.

[2]. D. Paul, Sudipta Dey. Essential amino acids, lipid profile and fat-soluble vitamins of the edible silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Published online by Cambridge University Press: 19 November 2014.

[3]. Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Tô Kim Anh. Thí nghiệm Hóa sinh Công nghiệp, trường ĐH Bách Khoa Hà Nội, 1997.

[4]. Hiroyuki Tomotake, Mitsuki Katagiri, Masayuki Yamato. Silkworm pupae (*Bombyx mori*) are new sources of high quality protein and lipid. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2010; 56(6):446-8.

[5]. Hou Y, Yin Y, Wu G. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015 Aug;240(8):997-1007.

[6]. Hou Y, Wu G. Nutritionally Essential Amino Acids. *Adv Nutr.* 2018 Nov 01;9(6):849-851.

[7]. Niphattha Chatsuwat, Yuporn Puechkamut

and Praphan Pinsirodom. Characterization, Functionality and Antioxidant Activity of Water-Soluble Proteins Extracted from *Bombyx mori* Linn. *Current Applied Science and Technology* Vol. 18 No. 2 May-August 2018.

[8]. Perrin D.D and Boyd Dempsey (1974). Buffer for pH and Metal Ion Control.

[9]. Reeds PJ. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J Nutr.* 2000 Jul;130(7):1835S-40S.

[10]. Srinivas V. Bandlamori, Mousumi Mondal, C Rajendra Singh, Ashwini M. Karkada. Evaluation of Nutritional Composition of Hybrids of Waste Silkworm Pupa *Bombyx Mori* L As A Potential Raw Material For Poultry Feed- A Sustainable Technology For Futur. Volume 01, Issue 10 (12.2012).

[11]. Wu G. Axit amin: chuyển hóa, chức năng và dinh dưỡng. Axit amin. 2009 Tháng 5; 37 (1): 1-17.

[12]. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Rhoads JM, Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.* 2009;37:153–68.

[13]. Xiaotong Li, Hongqing Xie, Yajie Chen, Mingzi Lang, Yuyin Chen, and Liangen Shi. Silkworm Pupa Protein Hydrolysate Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis and S Phase Cell Cycle Arrest in Human Gastric Cancer SGC-7901 Cells. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr; 19(4): 1013.

[14]. Zilin Yu, Hongrui Jiang, Rongcan Guo, Bo Yang, Gang You, Mouming Zhao, Xiaoling Liu. Taste, umami-enhance effect and amino acid sequence of peptides separated from silkworm pupa hydrolysate. *Food Res Int* 2018 Jun;108:144-150.

Địa chỉ tác giả: Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

Email: kimthoacnsh@hou.edu.vn

NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN NEM CHUA SỬ DỤNG VI KHUẨN LACTIC *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

RESEARCH ON FACTORS AFFECTING FERMENTATION FERMENTED PORK ROLL USING LACTIC ACID BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Bùi Thị Hải Hòa^{}, Nguyễn Phương Mai[†]*

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 04/03/2022

Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 05/09/2022

Ngày bài báo được duyệt đăng: 30/09/2022

Tóm tắt: Sản phẩm probiotic có nguồn gốc từ vi khuẩn lactic xuất hiện nhiều trong lĩnh vực công nghệ sản xuất các sản phẩm thực phẩm lên men. *Lactobacillus* là nhóm vi khuẩn lactic được sử dụng nhiều nhất trong lĩnh vực probiotic. Trong nghiên cứu này, kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men nem chua sử dụng chế phẩm vi khuẩn lactic *Lactobacillus plantarum* cho thấy với mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum* trong chế phẩm ban đầu là $1,5 \times 10^7$ ứng với 0,1g chế phẩm sản phẩm nem chua có hàm lượng axit lactic cao nhất đạt 2,592 %, thời gian thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn *L. plantarum* và sản phẩm nem chua có cảm quan đạt yêu cầu là sau 48h lên men so với đối chứng cần 74 – 96h, nhiệt độ phù hợp cho vi khuẩn *L. plantarum* trong chế phẩm phát triển là 32°C.

Từ khóa: nem chua, axit lactic, *L. plantarum*

Abstract: Probiotic products derived from lactic acid bacteria appear a lot in the field of technology for the production of fermented pork roll products. *Lactobacillus* is the most commonly used group of lactic acid bacteria in the probiotic field. In this study, the results of investigating factors affecting the fermentation of meat rolls using lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* showed that with a cell density of *L. plantarum* in the initial preparation of $1,5 \times 10^7$ corresponds to 0.1g of fermented pork product with the highest lactic acid content of 2,592 %, the most suitable time for the growth of *L. plantarum* bacteria and the sensory products of fermented pork roll. The optimal time is after 48 hours of fermentation, while the control takes 74-96 hours, the optimal temperature for inoculating *L. plantarum* bacteria is 32°C.

Keywords: Fermented pork roll, acit lactic, *L. plantarum*

* Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

† Trường Đại học Tài nguyên Môi trường

I. Đặt vấn đề

Nem chua là sản phẩm thịt lên men có giá trị dinh dưỡng cao và thường được ăn sống nhưng không gây ngộ độc nếu được chế biến đúng cách. Theo một kết quả mới công bố trên tạp chí Process Biochemistry, các nhà nghiên cứu của Đại học RMIT tại Melbourne (Úc) phát hiện ra điều này có được là nhờ các vi khuẩn có lợi trong nem chua đã tiêu diệt vi khuẩn có hại. Với phát hiện này, hợp chất diệt vi khuẩn tự nhiên trong nem chua có thể ứng dụng để giữ thực phẩm tươi lâu hơn, ẩn chứa nhiều tiềm năng trong ngành bảo quản thực phẩm. Việc sử dụng chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong các sản phẩm lên men hiện nay ngày càng phổ biến nhằm tạo ra sản phẩm thực phẩm giàu probiotic, đồng thời có các đặc tính quý của sản phẩm lên men và làm tăng hiệu suất của quá trình lên men chuyển hóa đường thành axit lactic dưới xúc tác của vi khuẩn *Lactobacillus*.

II. Cơ sở lý thuyết

2.1. Cơ chế lên men lactic [1]

Lên men lactic là quá trình chuyển hóa đường thành axit lactic nhờ vi sinh vật, điển hình là vi khuẩn lactic. Lên men lactic là một trong những loại hình lên men phát triển nhất trong tự nhiên, có hai kiểu lên men lactic chính là lên men đồng hình và lên men dị hình.

a. Lên men lactic đồng hình (điển hình)

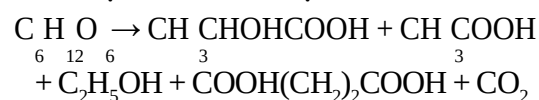
Trong trường hợp này axit pyruvic được tạo thành theo sơ đồ Embden-Mayerhorf-Parnas (EMP), hydro được tách ra và chuyển tới pyruvat. Sau đó axit pyruvic sẽ tạo thành axit lactic dưới tác dụng của enzyme lactatdehydrogenase.

Lượng axit lactic tạo thành chiếm hơn 90%. Chỉ một lượng nhỏ pyruvat bị khử cacbon để tạo thành axit axetic, ethanol, CO₂ và axeton. Lượng sản phẩm phụ tạo thành phụ thuộc vào sự có mặt của oxy. Quá trình chuyển hóa thành axit lactic được mô tả tóm tắt như sau:



b. Lên men lactic dị hình (không điển hình)

Xảy ra trong trường hợp vi khuẩn lactic không có các enzyme cơ bản trong sơ đồ Embden – Mayerhorf – Parnas (aldolase và triozophotphatizomerase). Theo cơ chế này chỉ có 50% lượng đường tạo thành axit lactic, ngoài ra còn có các sản phẩm phụ khác như: axit axetic, rượu etylic, CO₂. Trong cơ chế lên men này các sản phẩm phụ tương tác với nhau để tạo thành ester có mùi thơm. Cơ chế của quá trình lên men lactic dị hình có thể được tóm tắt như sau:



Lượng sản phẩm phụ được tạo thành phụ thuộc hoàn toàn vào chủng vi sinh vật, vào môi trường dinh dưỡng và điều kiện ngoại cảnh. Thông thường axit lactic thường chiếm khoảng 40% lượng đường đã được phân hủy, axit succinic 20%, rượu etylic chiếm 10%, axit axetic 10% và các loại khí gần 20%.

2.2. Khái quát về vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* [2,6]

a. Đặc điểm hình thái

Lactobacillus plantarum là trực khuẩn nhỏ, hình que, thường kết đôi hoặc chuỗi, không di động. Khuẩn lạc của *Lactobacillus plantarum* có màu trắng sữa [1].

b. Đặc điểm sinh lý sinh hóa của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*

Tùy thuộc vào các loại vi khuẩn lactic khác nhau thì có nhu cầu dinh dưỡng khác nhau. Nhu cầu về nguồn dinh dưỡng của vi khuẩn lactic không chỉ là các nguồn dinh dưỡng cơ bản như cacbon, nitơ, photphat và lưu huỳnh mà còn có nhu cầu về một số chất cần thiết khác như vitamin, muối vô cơ...

Nhu cầu dinh dưỡng cacbon:

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có thể sử dụng nhiều loại hydrat cacbon từ các monosaccarit (glucoza, fructoza, mannoza), các disaccarit (saccaroza, lactoza, maltoza) cho đến các polysaccarit (tinh bột, dextrin). Chúng sử dụng nguồn cacbon này để cung cấp năng lượng, xây dựng cấu trúc tế bào và làm cơ chất cho quá trình lên men tổng hợp các axit hữu cơ.

Nhu cầu dinh dưỡng nitơ

Các nguồn nitơ vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có thể sử dụng như: cao thịt, cao nấm men, trypton, dịch thủy phân casein từ sữa, pepton,...Hiện nay cao nấm men là nguồn nitơ được sử dụng nhiều nhất và có hiệu quả nhất. Tuy nhiên ở quy mô công nghiệp không thể sử dụng nguồn nitơ này vì rất tốn kém, người ta thay thế nó bằng dịch thủy phân nấm men, cao ngô, nước amoniac và muối ammon...

Nhu cầu về Vitamin:

Vitamin đóng vai trò là các coenzyme trong quá trình trao đổi chất của tế bào, nên rất cần thiết cho hoạt động sống. Vì vậy cần bổ sung vào môi trường nuôi *Lactobacillus plantarum* các loại vitamin. Các chất chứa vitamin thường sử dụng như nước chiết từ khoai tây, ngô, giá đậu, cà rốt hay dịch tự phân nấm men...

Nhu cầu các hợp chất hữu cơ và muối vô cơ khác

Ngoài các nguồn dinh dưỡng cơ bản như cacbon, nitơ và vitamin thì vi khuẩn lactic còn cần các hợp chất hữu cơ khác cho sự phát triển như các bazơ nitơ hay các axit hữu cơ. Một số axit hữu cơ có ảnh hưởng thuận lợi đến tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* như axit xitric, axit oleic.

Để đảm bảo cho sinh trưởng và phát triển đầy đủ, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* rất cần các muối vô cơ để cung cấp các nguyên tố khoáng như đồng, sắt, natri, kali, photpho, lưu huỳnh, magie đặc biệt là mangan, vì mangan giúp ngăn ngừa quá trình tự phân và ổn định cấu trúc tế bào.

III. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

a. Chủng vi khuẩn

- Chế phẩm *Lactobacillus plantarum* có nguồn gốc từ Viện công nghệ sinh học - Viện khoa học và công nghệ Việt Nam.

b. Nguyên liệu

- Thịt lợn, da lợn, đường, muối ăn, bột ngọt, tỏi, tiêu, ớt, thính gạo, lá chuối.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

a. Phương pháp xác định hàm lượng axit lactic trong sản phẩm nem chua [3,4]

Cân 5g nem chua nghiền nhỏ trong cối sứ vô trùng, sau đó chuyển các mẫu đã nghiền nhỏ sang bình tam giác 250ml rồi bổ sung thêm 150 ml nước cất vô trùng. Đun cách thủy 30 phút ở 80 - 90°C (thỉnh thoảng lắc). Sau khi đun xong để nguội dung dịch rồi lọc qua giấy lọc, xác định hàm lượng axit lactic.

* *Cách xác định:* Lấy 50ml dịch lọc cho vào bình tam giác, bổ sung 2 giọt

phenolphthalein rồi chuẩn độ bằng NaOH 0.1N cho tới khi xuất hiện màu hồng.

* *Kết quả được tính theo công thức sau:*

Lượng axit hữu cơ hòa tan trong mẫu tính ra %:

$$X = \frac{a \cdot 0,009 \cdot V.T. 100\%}{V.C}$$

Trong đó:

a: Số ml NaOH 0.1N cần để chuẩn độ

0,009: Số g axit tương ứng với 1ml NaOH 0,1N

T: hệ số điều chỉnh đối với NaOH 0,1N là 0,99

V: Tổng thể tích dung dịch (ml)

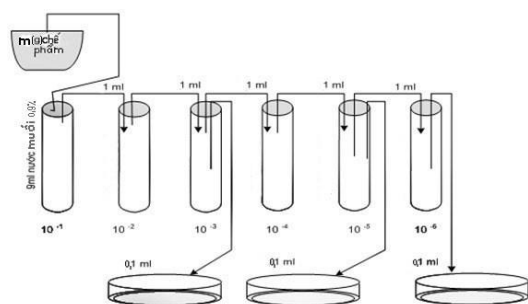
v: Số lit dịch mẫu (ml)

c: Khối lượng mẫu (g)

b. Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* [6]

Cân lần lượt 0,01g, 0,1g, 1g, 10g chế phẩm cho vào ống nghiệm có chứa 9ml nước muối sinh lý 0.9% đã vô trùng, dùng máy lắc vortex lắc đều ống nghiệm lên, ta được mẫu pha loãng 10^{-1} , tiếp tục

pha loãng ở các nồng độ tiếp theo đến 10^{-9} dựa vào sơ đồ sau:



Hình 1. Sơ đồ pha loãng chế phẩm chứa vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*

Tại các nồng độ pha loãng từ 10^{-4} đến 10^{-7} mỗi nồng độ pha loãng lấy 0,1ml

đưa vào môi trường MT1 (với mỗi nồng độ lặp lại 2 lần). Dùng que trang, trang đều dưới ngọn lửa đèn cồn cho đến khô.

Vi khuẩn *L. plantarum* được nuôi ở 37°C , xác định đếm khuẩn lạc của vi khuẩn *L. plantarum* sau 48h.

c. Phương pháp đếm tế bào vi khuẩn lactic [5]

Để xác định tổng số vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có trong chế phẩm, chọn những đĩa có số khuẩn lạc không quá 250 khuẩn lạc ở 2 nồng độ pha loãng liên tiếp. Tổng số vi khuẩn có trong chế phẩm được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1 \times n_2) d}$$

Trong đó:

$\sum C$: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa đã chọn.

V: Thể tích cấy trên mỗi đĩa tính bằng ml

n_1 : Số đĩa của đậm độ pha loãng thứ nhất được giữ lại

n_2 : Số đĩa của đậm độ pha loãng thứ hai được giữ lại

d: Hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng thứ nhất

IV. Kết quả và thảo luận

4.1. Xác định mật độ vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* ban đầu trong chế phẩm

L. plantarum thuộc nhóm vi khuẩn lên men lactic dị hình phổ biến nhất, có nghĩa là ngoài axit lactic được tích lũy trong sản phẩm ra thì nó còn sinh ra một số các sản phẩm dị hình khác nữa như rượu, axit hữu cơ, CO_2 và H_2O . Chính vì thế mà nó tạo nên hương vị đặc trưng cho sản phẩm

lên men lactic. Do vậy, mật độ vi khuẩn *L. plantarum* có mặt trong sản phẩm lên men khác nhau cũng sẽ tạo ra sự khác biệt cho việc tạo hương thơm và vị cho sản phẩm lên

men. Chế phẩm ở các nồng độ khác nhau từ 0,01g ÷ 10g và pha loãng trong nước cất vô trùng, nuôi ở 37⁰C trong thời gian 48h. Kết quả được chỉ ra trong bảng 1 và hình 3

Bảng 1. Mật độ vi khuẩn *L. plantarum* trong chế phẩm

Mật độ tế bào (CFU/g)	2,3x10 ⁶	1,5x10 ⁷	0,9x10 ⁸	0,36x10 ⁹
Chế phẩm (g)	0.01	0.1	1	10



Hình 3. Số lượng khuẩn lạc *L. plantarum* ở nồng độ pha loãng 10⁻⁵

Kết quả thể hiện ở bảng 1 và hình 3 cho thấy, tại các nồng độ pha loãng 10⁻⁴ và 10⁻⁵ thu được số lượng khuẩn lạc trên các đĩa thạch từ 141 đến 239 tế bào, tương ứng 1g chế phẩm thì mật độ tế bào đạt 0,9x10⁸CFU (colony-forming unit). Như vậy, với mật độ tế bào 1,5x10⁷ CFU tương ứng với 0,1g chế phẩm và với mật độ tế bào 0,36x10⁹ CFU tương ứng với 10g chế phẩm được bổ sung vào trong sản phẩm lên men. Như vậy qua khảo sát mật độ vi khuẩn *L. plantarum* trong chế phẩm được chúng tôi lựa chọn trong các nghiên cứu tiếp theo là từ 0,01 – 10g để xác định được khả năng sinh axit lactic trong sản phẩm nem chua.

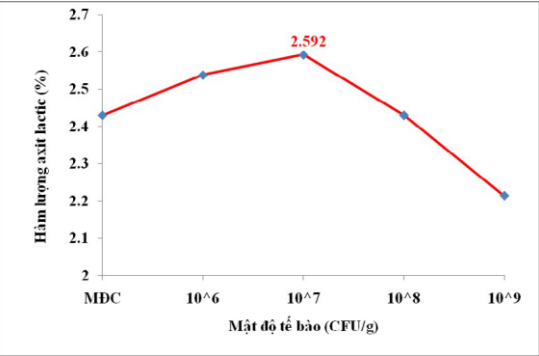
4.2. Ảnh hưởng của mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum* sinh axit lactic trong sản phẩm nem chua

Đối với sản phẩm nem chua, mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum* có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh axit lactic, tạo hương và vị cho sản phẩm. Dựa vào kết quả bảng 1, chúng tôi tiến hành bổ sung

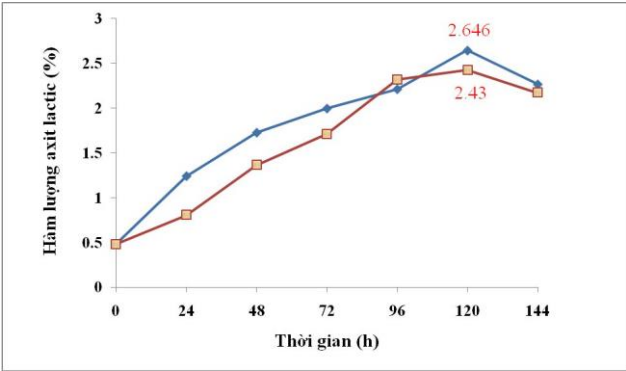
chế phẩm ở các mật độ từ 10⁶ - 10⁹ vào sản phẩm nem chua. Mẫu thí nghiệm được tiến hành song song cùng mẫu đối chứng (MĐC) (không bổ sung chế phẩm). Định kỳ kiểm tra khả năng sinh axit lactic trong sản phẩm nem chua sau 24h.

Kết quả hình 4 cho thấy khi bổ sung chế phẩm có chứa vi khuẩn *L. plantarum* vào nguyên liệu sản xuất nem chua có ảnh hưởng mạnh mẽ đến khả năng tổng hợp axit lactic trong sản phẩm. Ở mật độ tế bào từ 10⁸ và 10⁹ CFU/g nồng độ axit lactic giảm dần từ 2,43% xuống 2,214%, hàm lượng axit lactic đạt thấp hơn so với mẫu đối chứng. Ở nồng độ 10⁶ CFU/g nồng độ axit lactic đạt 2,538%. So với mẫu đối chứng nồng độ 10⁷ CFU/g nồng độ axit tăng khoảng 0,162%, còn tại mật độ tế bào 10⁹ CFU/g nồng độ axit lactic giảm so với mẫu đối chứng là 0,216%. Điều này cho thấy tại nồng độ 10g chế phẩm trên 1kg sản phẩm nem chua do mật độ tế bào quá cao vi khuẩn sử dụng nhanh cơ chất trong môi trường lên men để chuyển hóa nhanh thành axit lactic và không tích lũy được các sản phẩm phụ khác trong quá trình lên men. Axit lactic lại là một axit không bền do đó rất dễ bị các vi khuẩn gây thối trong thịt lẫn ất, do đó làm ảnh hưởng đến khả năng tích lũy của axit lactic trong sản phẩm lên men. Tại mật độ tế bào thấp, tốc độ phát triển của vi khuẩn chậm, khả năng tích lũy axit lactic trong sản phẩm hiệu quả thấp cũng là điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn gây thối hoạt động và lẫn ất. Do đó cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp axit lactic trong sản phẩm nem chua. Kết

quả cũng cho thấy việc bổ sung chế phẩm trong sản phẩm lên men làm tăng hiệu quả tổng hợp axit lactic so với mẫu đối chứng. Do vậy, chúng tôi sử dụng mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum* 10^7 CFU/g làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4. Ảnh hưởng của mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum* đến khả năng tổng hợp axit lactic trong sản phẩm nem chua



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến khả năng tích lũy hàm lượng axit lactic trong sản phẩm nem chua

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến chỉ số pH trong sản phẩm nem chua lên men với vi khuẩn *L. Plantarum* mật độ 10^7 CFU/g

Thời gian (h) pH	Mẫu TN	Mẫu ĐC
0	6,4	6,4
24	4,9	5,9
48	4,5	5,0
72	4,4	4,5
96	4,3	4,4
120	4.3	4,4

4.3. Ảnh hưởng của thời gian lên men nem chua đến khả năng tích lũy axit lactic của vi khuẩn *L. plantarum*

Đối với vi khuẩn lên men lactic nói chung, thời gian càng dài, số lượng vi khuẩn lactic tăng đến một giới hạn nhất định thì sẽ bị các vi khuẩn gây thối lấn át. pH trong sản phẩm tăng lên dẫn đến axit lactic trong sản phẩm bị phân hủy, tích lũy các sản phẩm phụ của quá trình lên men lactic.

Tiến hành xác định thời gian lên men ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp lactic trong sản phẩm nem chua của mẫu đối chứng và dưới tác dụng của 10^7 CFU/g vi khuẩn *L. plantarum* trong chế phẩm. Định kỳ sau 24 giờ lấy mẫu xác định hàm lượng axit lactic tích lũy trong sản phẩm lên men, pH và xác định chỉ tiêu cảm quan (màu sắc, mùi vị, cấu trúc) của sản phẩm. Kết quả chỉ ra trong hình 5, bảng 2 và 3.

Sự tổng hợp axit lactic trong sản phẩm nem chua ảnh hưởng tới khả năng hình thành pH có trong sản phẩm. Sau 24h tiến hành lên men pH trong sản phẩm giảm mạnh mẽ từ 6,4 xuống 4,9. Kết quả này phù hợp với khả năng hành thành axit lactic trong hình 5. Sau đó giá trị pH giữ ổn định tại các ngày lên men tiếp theo.

Song song với việc xác định mức độ thay đổi của giá trị pH và khả năng tích lũy axit lactic trong sản phẩm lên men

chúng tôi tiến hành đánh giá cảm quan thông qua các chỉ tiêu (màu sắc, mùi vị và cấu trúc của sản phẩm lên men). Kết quả

giá trị cảm quan trong bảng 3 cho thấy sản phẩm nem chua sau 48h lên men có thể sử dụng trong tiêu dùng.

Bảng 3. Đánh giá chỉ tiêu cảm quan của sản phẩm nem chua lên men với vi khuẩn *L. Plantarum* mật độ 10^7 CFU/g

Thời gian (h)	Chỉ tiêu	Mẫu thí nghiệm	Mẫu đối chứng
0	Màu sắc	Nhọt, hồng tươi	Nhọt, hồng tươi
	Mùi	Tanh của thịt tươi	Tanh của thịt tươi
	Vị	-	-
	Cấu trúc	Bết dính	Bết dính
24	Màu sắc	Hơi hồng	Hơi hồng
	Mùi	Chua dịu nhẹ, thơm của thính và tỏi	Chua dịu nhẹ, thơm của thính và tỏi
	Vị	Chua dịu nhẹ, hơi ngọt	Chua dịu nhẹ, hơi ngọt
	Cấu trúc	Cứng chắc, bề mặt ẩm, nhẵn mịn	Cứng chắc, bề mặt ẩm, nhẵn mịn
48	Màu sắc	Bên trong hồng, bên ngoài hồng nhạt	Bên trong hồng, bên ngoài hồng nhạt
	Mùi	Chua, thơm của thính và tỏi	Chua, thơm của thính và tỏi
	Vị	Chua dịu	Chua
	Cấu trúc	Cứng chắc, bề mặt ẩm, nhẵn mịn	Cứng, bề mặt ẩm, nhẵn mịn
72	Màu sắc	Hồng nhạt	Hồng nhạt
	Mùi	Chua gắt	Chua gắt, có mùi lạ
	Vị	Chua gắt	-
	Cấu trúc	Mềm, bề mặt hơi ướt	Mềm, bề mặt hơi ướt
120	Màu sắc	Hồng nhạt	Gần như mất màu hồng
	Mùi	Mùi hôi	Mùi hôi thiu
	Vị	-	-
	Cấu trúc	Mềm nhũn	Mềm nhũn

4.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh tổng hợp axit lactic trong nem chua của vi khuẩn *L. plantarum*

Trong các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và tổng hợp axit lactic của vi khuẩn *L. plantarum* thì yếu tố nhiệt độ giữ một vai trò quan trọng. Nhiệt độ tối thích của vi khuẩn lên men lactic dị hình *L. plantarum* là $32 \div 37^{\circ}\text{C}$. Tuy nhiên, ở các nhiệt độ khác nhau sẽ ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và tổng hợp axit lactic của vi khuẩn *L. plantarum*, điều này ảnh hưởng lớn đến khả năng tổng hợp axit lactic trong sản phẩm do đó ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ dải nhiệt độ 9°C , 32°C và 45°C đến khả năng sinh tổng hợp axit lactic và giá

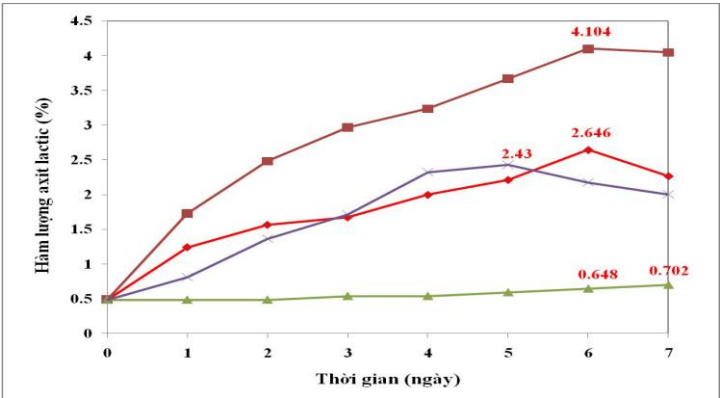
trị cảm quan trong sản phẩm nem chua. Kết quả chỉ ra trong hình 6, bảng 4.

Kết quả trên hình 6 và bảng 4 cho thấy ở 9°C tốc độ lên men chậm, hầu như sau 2 ngày quá trình lên men không xảy ra. Từ ngày thứ 3 cho đến ngày thứ 7 thì quá trình lên men bắt đầu xảy ra nhưng hết sức chậm chạp, axit lactic đạt cao nhất tại ngày thứ 7 là 0,702%. Giá trị pH đo được hầu như không có biến động nhiều. Khi tiến hành lên men ở nhiệt độ phòng (khoảng 32°C) sau 24 giờ lên men khả năng tích lũy axit lactic trong sản phẩm đạt 1,242%, tăng gấp 2,6 lần so với nhiệt độ lên men ở 9°C . Tốc độ lên men sinh tổng hợp axit lactic tăng mạnh ở những ngày lên men tiếp theo và đạt cực đại sau 6 ngày lên men là 2,646%, tăng

3,78 lần so với 9°C sau 7 ngày lên men. Trong khi đó ở nhiệt độ lên men 45°C tốc độ tích lũy axit lactic xảy ra mạnh hơn, sau 24 h lên men khả năng tích lũy axit lactic tăng 1,4 lần so với sản phẩm lên men ở nhiệt độ phòng và đạt giá trị cực đại sau 6 ngày lên men là 4,104%, tăng 1,55 lần so với nhiệt độ phòng tại cùng một thời điểm. Đối với mẫu đối chứng, hàm lượng axit lactic đạt 2,43% sau 5 ngày lên men, tốc độ lên men nhanh và hàm lượng axit lactic có xu hướng giảm nhanh. Như vậy giá trị nhiệt độ phù hợp nhất cho vi khuẩn *L.plantarum*

sinh trưởng, tổng hợp axit lactic và hình thành các sản phẩm phụ trong quá trình lên men lactic cho sản phẩm nem chua là ở nhiệt độ phòng (32 – 37°C).

Song song với việc đánh giá khả năng tổng hợp axit lactic trong sản phẩm nem chua, chúng tôi tiến hành đánh giá chỉ tiêu cảm quan dựa trên một số các chỉ tiêu cơ bản có trong sản phẩm nem chua như: màu sắc, mùi vị, cấu trúc của sản phẩm. Kết quả được chỉ ra trong bảng 4 cho thấy sản phẩm nem chua có bổ sung chế phẩm vi khuẩn *L. plantarum* được lên men tốt nhất ở nhiệt độ phòng.



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp axit lactic trong sản phẩm nem chua

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến chỉ tiêu cảm quan của sản phẩm nem chua lên men với vi khuẩn *L. plantarum* mật độ 10⁷ CFU/g

Thời gian (h)	Chỉ tiêu	9°C	32°C	45°C	MĐC
48	Màu sắc	Hồng nhạt của thịt xay	Hồng	Hồng	Hơi hồng
	Mùi	Tanh của thịt	Chua dịu nhẹ, thơm của tỏi và thính	Chua	Chua dịu nhẹ, thơm của thính và tỏi
	Vị	-	Chua dịu, hơi có vị ngọt	Chua	Chua dịu nhẹ, hơi ngọt
	Cấu trúc	Bết dính	Rắn chắc, bề mặt nhẵn mịn	Rắn chắc, bề mặt ẩm	Cứng chắc, bề mặt ẩm, nhẵn mịn
72	Màu sắc	Hồng nhạt của thịt xay	Hồng nhạt	Hồng nhạt	Bên trong hồng, bên ngoài hồng nhạt
	Mùi	Tanh của thịt	Chua, thơm của tỏi và thính	Chua gắt, có mùi lạ	Chua, thơm của thính và tỏi
	Vị	-	chua	-	Chua
	Cấu trúc	Bết dính	Rắn chắc, bề mặt nhẵn mịn, hơi ẩm	Rắn chắc, bề mặt ướt,	Cứng, bề mặt ẩm, nhẵn mịn

96	Màu sắc	Hồng nhạt của thịt xay	Gần như mất màu hồng	Hồng nhạt, gần như mất màu hồng	Hồng nhạt, gần như mất màu hồng
	Mùi	Tanh của thịt	Chua gắt	Hôi thiu	Chua gắt, có mùi lạ
	Vị	-	Chua gắt	-	-
	Cấu trúc	Bết dính	Hơi mềm, bề mặt ẩm	Mềm, bề mặt ướt, nem bị chảy nước	Mềm, bề mặt hơi ướt
120	Màu sắc	Hồng nhạt của thịt đã có hiện tượng lên men	Mất màu hồng	Nhạt (đã mất màu hồng)	Mất màu hồng
	Mùi	Chua rất nhẹ	Hôi, thiu	Hôi thiu	Mùi hôi thiu
	Vị	-	-	-	-
	Cấu trúc	Hơi chắc	Mềm nhũn, bề mặt ướt	Mềm nhũn, bề mặt ướt, nem bị chảy nước	Mềm nhũn

Kết quả đánh giá cảm quan trên bảng 4 Kết luận

1. Đã xác định được mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum* trong chế phẩm ban đầu là $1,5 \times 10^7$ ứng với 0,1g chế phẩm

2. Đã xác định được khả năng tổng hợp axit lactic với mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum* trong chế phẩm từ 10^6 - 10^9 , trong đó mật độ vi khuẩn *L. plantarum* 10^7 CFU/g cho khả năng tổng hợp axit lactic cao nhất đạt 2,592 % trong sản phẩm nem chua.

3. Đã xác định được nhiệt độ và thời gian phù hợp cho quá trình sinh trưởng của vi khuẩn *L. plantarum* trong lên men nem chua là 32°C và 48h lên men.

Tài liệu tham khảo:

[1]. Lương Đức Phẩm, “Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm”. Nhà xuất bản nông nghiệp. 2002

[2]. Đồ hộp. Phương pháp xác định hàm lượng axit tổng số và axit bay hơi. TCVN 4589:1988. Năm 1988; 2008-12-30, 2918/QĐ-BKHCN

[3]. Nguyễn Mạnh Tuấn, “Phân lập tuyển chọn một số chủng *Lactobacillus* có khả năng sinh axit lactic cao từ các sản phẩm lên men”, Đại học Nông lâm Thái Nguyên, 2012.

[4]. Phan Thanh Tâm, Phạm Công Thành “Khảo sát các yếu tố công nghệ ảnh hưởng đến chất lượng nem chua”. Tạp chí KH&CN các trường ĐH kỹ thuật, số 62, trang 76 – 81, 2007.

[5]. Mai Đàm Linh, Đỗ Minh Phương, Phạm Thị Tuyết, Kiều Hữu Ảnh, Nguyễn Thị Giang, “Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn lactic phân lập trên địa bàn Hà Nội” Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự Nhiên và Công nghệ 24 (2008) 221-226

[6]. Lê Xuân Phương, “Thí nghiệm vi sinh vật học”. Nhà xuất bản nông nghiệp. 2009. 42-58

Địa chỉ tác giả: Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Mở Hà Nội

Email: haihoacnsh@hou.edu.vn

