

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM VI KHUẨN LACTIC LÊN SỰ THAY ĐỔI HÀM LƯỢNG AXIT AMIN CỦA CÁ TẠP SAU THỜI GIAN BẢO QUẢN VÀ ỨNG DỤNG CHO NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn, Phạm Thanh Hà

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Liên hệ với tác giả: thetrang67@yahoo.com

Đến Tòa soạn ngày 25 tháng 10 năm 2009

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lactic từ xưa đã được dùng nhiều trong bảo quản thực phẩm, những sản phẩm như axit lactic, axit acetic, H_2O_2 , CO_2 và các bacteriocin sinh ra bởi loại vi khuẩn này có thể ức chế những vi sinh vật gây bệnh, gây hỏng, kéo dài thời gian bảo quản và cải thiện sự an toàn của sản phẩm [4].

Cá là nguồn cung cấp protein rất quan trọng cho con người, tuy nhiên cá có hạn chế là dễ ươn, hỏng hơn các loại thực phẩm khác vì nó chứa một lượng lớn axit amin tự do. Cá thường được bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic khi việc làm khô cá gặp khó khăn do thời tiết ẩm ướt hoặc việc làm đông lạnh hay chế biến là quá tốn kém [2]. Trong thức ăn chăn nuôi gia súc và nuôi trồng thủy sản cá là thành phần quan trọng không thể thiếu. Bột cá là nguồn protein chất lượng cao, dễ tiêu hóa. Thức ăn cho chăn nuôi gia súc và nuôi thủy sản ở nước ta cần khoảng 300.000 tấn/năm, trong đó bột cá sản xuất công nghiệp chỉ đáp ứng 1/10 nhu cầu, do vậy phải nhập khẩu [11]. Nghiên cứu sản xuất thức ăn có chất lượng cao theo quy mô nhỏ nhằm tận dụng nguyên liệu cá tạp phân tán, tăng khả năng đáp ứng nhu cầu bột cá công nghiệp, giảm nhập khẩu là cần thiết [6].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn lactic: *Pediococcus pentosaceus* HN02; *Lactobacillus brevis* HN26; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HN11 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34 trong bộ sưu tập chủng của Viện Công nghệ sinh học. Các chủng vi khuẩn lactic được nhân giống riêng rẽ trên môi trường MRS [3], ở nhiệt độ và thời gian thích hợp. Dịch nuôi của từng chủng được ly tâm thu sinh khối và trộn với chất mang. Các chế phẩm vi khuẩn lactic bảo quản cá được xác định LD_{50} tại Viện Kiểm nghiệm Bộ Y tế cho kết quả không sinh độc tố.

Cá tạp nước mặn được mua ở chợ cá Đồ Sơn (Hải Phòng) được thiết kế bảo quản cá theo 4 lô thí nghiệm (TN) sau: mỗi lô bổ sung 2% chế phẩm, 2% glucoza, 0,5% NaCl, 0,1% axit sorbic. Các lô TN bổ sung các dạng chế phẩm như sau: TN 1: Chỉ có chất mang, không bổ sung vi khuẩn lactic; TN 2: Chế phẩm chứa hỗn hợp 2 chủng HN02 và HN26; TN 3: Chế phẩm chứa

hỗn hợp 2 chủng HN11 và HN34; TN 4: Chế phẩm chứa hỗn hợp 4 chủng vi khuẩn lactic trên. Sử dụng chất phụ gia Soya Lecithin làm chất keo dính cho thức ăn nuôi trồng thủy sản.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu cá được thủy phân bằng HCl 6N chứa 0,5% phenol, ủ ở 110⁰C trong 24 giờ. Dung dịch thủy phân được làm sạch bằng cách ly tâm lọc bỏ cặn. Dung dịch mẫu được làm khô chân không. Cặn khô được hòa tan trong HCl 0,1N. Phân tích axit amin tổng số và axit amin tự do bằng sắc ký trên máy phân tích axit amin tự động HP-Amino Quan Serie II của Viện Công nghệ sinh học [7]. Đánh giá chất lượng nước ao nuôi và chất lượng cá theo TCVN [9, 10].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

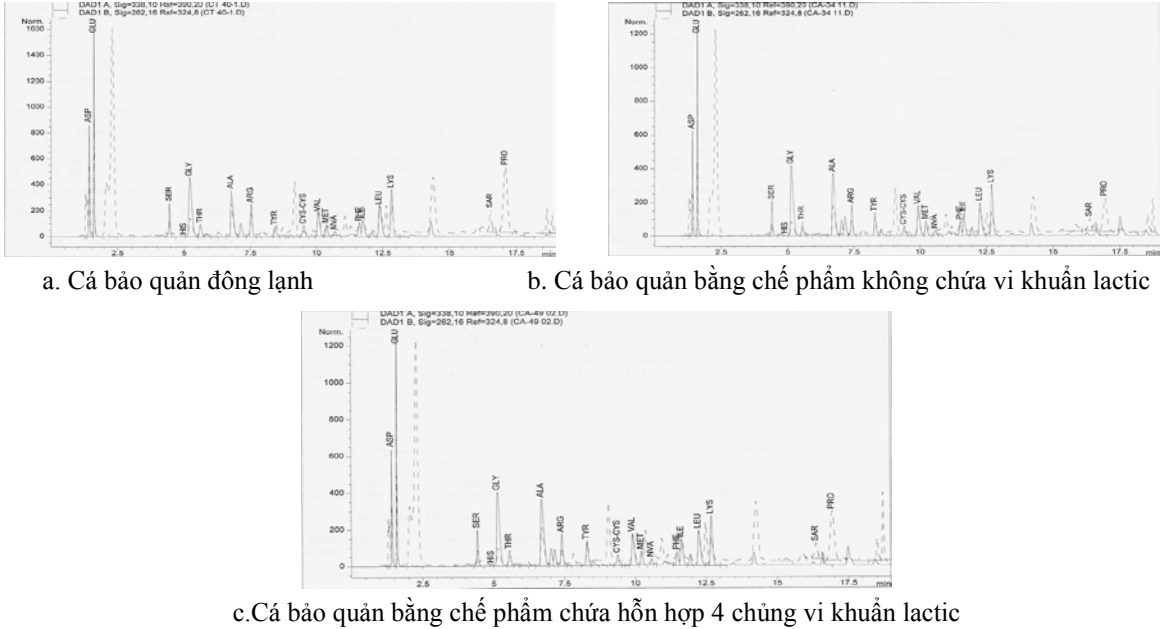
3.1. Ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn lactic đến hàm lượng axit amin của cá bảo quản

Bảng 1. Hàm lượng axit amin tổng số trong các mẫu cá được bảo quản sau 25 ngày

STT	Axit amin	Hàm lượng axit amin tổng số (% (g axit amin/100 g mẫu))				
		Đối chứng	TN 1	TN 2	TN 3	TN 4
1	Aspartic axit	0,32	0,15	0,23	0,22	0,24
2	Glutamic axit	0,69	0,38	0,51	0,51	0,55
3	Serine	0,12	0,06	0,09	0,09	0,10
4	Histidine	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
5	Glycine	0,45	0,34	0,38	0,39	0,42
6	Threonine	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08
7	Alanine	0,32	0,31	0,33	0,33	0,33
8	Arginine	0,27	0,17	0,20	0,20	0,22
9	Tyrosine	0,10	0,16	0,18	0,18	0,16
10	Cystein+Cystine	0,07	0,04	0,05	0,05	0,06
11	Valine	0,17	0,15	0,17	0,16	0,17
12	Methionine	0,09	0,06	0,07	0,08	0,08
13	Phenylalanine	0,14	0,07	0,09	0,11	0,11
14	Isoleucine	0,13	0,11	0,13	0,12	0,13
15	Leucine	0,28	0,20	0,21	0,22	0,22
16	Lysine	0,54	0,36	0,39	0,45	0,45
17	Proline	0,11	0,10	0,11	0,10	0,10
	Tổng số	3,90	2,74	3,23	3,30	3,43

Đây là cách bảo quản cá bằng phương pháp lên men vi sinh vật. Cá tạp trộn với chế phẩm cho vào các thùng nhựa ủ kín. Trong quá trình ủ chua, axit lactic được tạo ra làm pH giảm, sản

phẩm được bảo quản hàng tháng không bị hỏng. Cá đông lạnh làm đối chứng và cá thí nghiệm sau 25 ngày được xác định axit amin tổng số. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và sắc kí đồ ở hình 1.



Hình 1. Sắc kí đồ axit amin tổng số

Kết quả ở bảng 1 cho thấy so với mẫu cá bảo quản bằng đông lạnh hàm lượng axit amin tổng số trong các mẫu thí nghiệm dùng chế phẩm vi khuẩn lactic có giảm (axit amin tổng số 3,23 - 3,43 (g axit amin/100 g mẫu) so với 3,9 (g axit amin/100 g mẫu)), tuy nhiên vẫn đảm bảo yêu cầu dinh dưỡng của sản phẩm [9]. So sánh các thí nghiệm thấy các mẫu cá bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic đều chứa hàm lượng axit amin tổng số cao hơn mẫu cá bảo quản bằng chế phẩm không có vi khuẩn lactic. Protein trong cá bị phân huỷ chủ yếu do enzym sẵn có trong ruột cá và do vi sinh vật xâm nhập vào cá gây ra. Khi bổ sung vi khuẩn lactic vào cá, axit lactic sinh ra nhiều làm giảm pH của sản phẩm, hạn chế sự hoạt động của enzym phân huỷ và sự phát triển của vi sinh vật gây thối. Những bacteriocin sinh ra bởi vi khuẩn lactic cũng góp phần ức chế những vi sinh vật gây bệnh và gây hỏng, làm cho sản phẩm an toàn và giữ được lâu hơn [8]. Mẫu cá bảo quản bằng chế phẩm chứa cả 4 loại vi khuẩn lactic là tốt nhất. Hàm lượng axit amin còn giữ lại trong sản phẩm là cao hơn 2 thí nghiệm chỉ bảo quản bằng 2 loại vi khuẩn lactic. Khi kết hợp sử dụng cả 4 loại vi khuẩn trong bảo quản, hàm lượng axit sinh ra nhiều hơn và những chất kháng khuẩn cũng đa dạng hơn do đó có khả năng bảo quản cá tốt hơn. Kết quả này phù hợp những nghiên cứu trước đây [8].

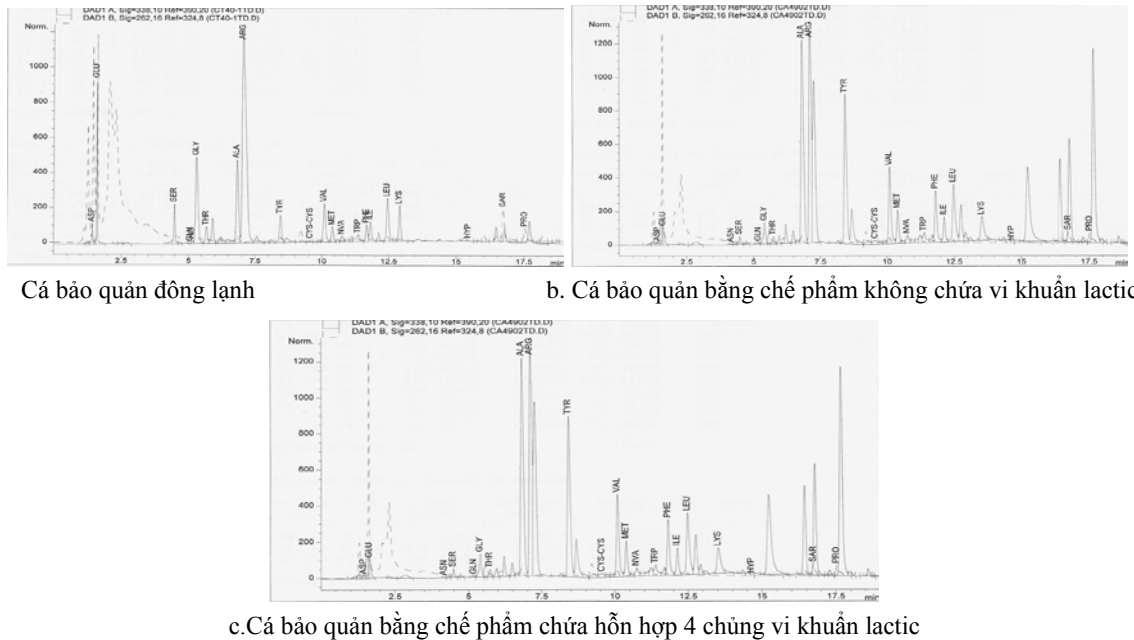
Kết quả phân tích axit amin tự do được trình bày ở bảng 2 và sắc kí đồ axit amin tự do của mẫu đối chứng, TN 1, TN 4 ở hình 2.

Từ bảng 2 cho thấy các mẫu cá được phân tích có gần đầy đủ các axit amin (chỉ có 4-Hydroxy Proline không thấy tồn tại trong các mẫu cá). Vì cá chứa một lượng lớn axit amin tự do nên nó dễ hư hỏng hơn các loại thực phẩm khác. Trong đó có 8 axit amin thiết yếu là isoleusine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan và valine cơ thể động vật không tự tổng hợp được mà bắt buộc phải được cung cấp từ thực phẩm bên ngoài [2].

Axit amin histidine có ở cá đông lạnh nhưng không thấy có ở những mẫu cá thí nghiệm. Trong khi 2 axit amin khác là asparagine và glutamine lại thấy có một lượng nhỏ ở các mẫu cá thí nghiệm nhưng không tìm thấy trong cá tươi đông lạnh, hàm lượng một số axit amin tự do ở các mẫu thí nghiệm thậm chí còn tăng lên so với mẫu cá tươi đông lạnh. Vì vậy, axit amin tự do tổng số ở các mẫu thí nghiệm cao hơn ở mẫu cá tươi đông lạnh. Đặc biệt ở thí nghiệm cá bảo quản bằng chế phẩm chứa cả 4 loại vi khuẩn lactic hàm lượng axit amin tự do tổng số lên tới 61,4 % (mg axit amin/100 g mẫu) trong khi mẫu cá tươi chỉ có 52,03% (mg axit amin/100 g mẫu), cao hơn gần 1,2 lần. Đây là ưu điểm của phương pháp bảo quản cá bằng chế phẩm vi khuẩn lactic.

Bảng 2. Hàm lượng axit amin tự do trong các mẫu cá được bảo quản sau 25 ngày

STT	Axit amin	Hàm lượng axit amin tự do (% (mg axit amin/100 g mẫu))				
		Đối chứng	TN 1	TN 2	TN 3	TN 4
1	Aspartic axit	0,72	0,04	0,10	0,05	1,04
2	Glutamic axit	3,62	0,58	0,74	0,60	0,98
3	Asparagine	-	0,04	0,01	0,06	0,09
4	Serine	1,33	0,31	0,20	0,26	2,28
5	Glutamine	-	0,18	0,10	0,21	0,26
6	Histidine	0,45	-	-	-	-
7	Glycine	5,20	1,54	0,82	1,46	2,36
8	Threonine	1,02	0,35	0,33	0,37	0,64
9	Alanine	4,15	8,06	8,24	8,08	8,09
10	Arginine	17,06	15,14	16,20	14,15	16,00
11	Tyrosine	3,02	10,08	12,80	11,06	12,16
12	Cystein+Cystine	0,27	0,41	0,49	0,39	0,52
13	Valine	2,56	3,10	3,64	3,12	3,36
14	Methionine	1,17	1,71	1,83	1,75	1,78
15	Tryptophan	1,63	0,85	1,14	0,90	1,26
16	Phenylalanine	1,41	2,78	3,55	2,86	2,63
17	Isoleucine	1,48	0,91	1,13	0,94	1,68
18	Leucine	3,29	3,10	3,69	3,12	3,36
19	Lysine	3,47	3,34	2,64	3,37	2,39
20	4 - Hydroxy Proline	-	-	-	-	-
21	Proline	0,18	0,40	0,46	0,50	0,52
Tổng số		52,03	52,92	58,11	53,25	61,40



Hình 2. Sắc kí đồ axit amin tự do

Dùng *L. plantarum* và *L. bulgaricus* làm giống khởi động lên men sản phẩm cá lên men. 3 giống vi khuẩn lactic (*L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *L. mesenteroides*) tách từ sản phẩm cá được đưa vào thử khả năng bảo quản cá trong vòng 52 ngày ở 8°C [4; 5]. Kết quả cho thấy trong trường hợp *L. mesenteroides* được lựa chọn cho kết quả tốt nhất: những thay đổi trong thành phần hữu cơ đạt yêu cầu, hàm lượng histamine sinh ra thấp nhất, sản phẩm có khả năng bảo quản trong thời gian dài. Cá bảo quản đảm bảo về hàm lượng axit amin, đặc biệt là những axit amin không thay thế nên đã được sử dụng làm thức ăn nuôi trồng thủy sản giúp ngư dân chủ động giải quyết được nguồn thức ăn dư thừa sau đánh bắt cũng như khan hiếm vào mùa biển động [2].

3.2. Ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn lactic đến cảm quan của cá bảo quản

Đánh giá cảm quan chất lượng cá [9] cho thấy: Ở mẫu bảo quản đông lạnh: Cá rất tươi, vị tanh nhẹ. Ở TN 1: Có dấu hiệuươn hỏng, mùi khó chịu. Ở TN 2, 3 và 4: Thịt cá không có mùi lạ, cấu trúc cơ thịt vẫn còn tốt. Dùng chế phẩm vi khuẩn lactic có thể giúp bảo quản cá tươi sống mà không làm thay đổi mùi vị sản phẩm. Ngoài ra các gốc tự do và các chất oxy hóa ít xuất hiện hơn. Vi khuẩn lactic ngày nay đã được sử dụng nhiều trong bảo quản các sản phẩm cá. Ngoài nhiệm vụ bảo quản được sản phẩm lâu dài chúng còn có khả năng hạn chế tối đa các vi sinh vật gây bệnh như *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Pseudomonas*, *P. vulgaris*, *C. putrificum*, *C. sporogenes*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *E. coli*, ... với thời gian bảo quản dài mà chất lượng tương đối ổn định, đặc biệt axit amin trong cá hầu như thay đổi không đáng kể [1; 8]. Đây chính là yếu tố quan trọng để chế phẩm lactic dùng bảo quản cá không thua gì so với các cách bảo quản khác như sử dụng lượng đá rất lớn (thường tỉ lệ 1 : 1) mà lại kinh tế hơn.

3.3. Ứng dụng cá bảo quản bởi chế phẩm vi khuẩn lactic cho nuôi trồng thủy sản

Cá biển tạp thường chỉ có thể sử dụng trong thời gian ngắn từ 1 - 2 ngày. Việc sử dụng vi khuẩn lactic để bảo quản giúp người nuôi dự trữ được thức ăn cho cá. Trong nghiên cứu này cá sau 25 ngày bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic được dùng trực tiếp làm thức ăn nuôi cá Lóc Bông và so sánh với thức ăn bằng cá thông thường. Sử dụng cá bảo quản bằng vi khuẩn lactic làm thức ăn nuôi trồng thủy sản được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Ảnh cá trước, sau bảo quản và làm thức ăn cho nuôi cá

Đánh giá ảnh hưởng của thức ăn làm từ cá bảo quản bằng chế phẩm vi khuẩn lactic đến một số chỉ tiêu cảm quan nước ao nuôi trồng cá Lóc Bông nuôi trồng thâm canh ở Hải Hậu, Nam Định trình bày ở bảng 3 và chất lượng cá ở bảng 4.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thức ăn tới một số chỉ tiêu cảm quan chất lượng ao nuôi

STT	Chỉ tiêu	Cá nghiền có vi khuẩn lactic	Cá nghiền không có vi khuẩn lactic
1	Màu của nước ao	Màu xanh sáng hay xanh nhạt cho biết nước ao có mật độ tảo thích hợp, có đầy đủ ôxy.	Màu xanh thường hay xanh hơi tối cho biết nước ao có mật độ tảo tương đối, có ôxy.
2	Độ trong của nước	Ánh sáng mặt trời xuyên qua 30-40 cm	Ánh sáng mặt trời xuyên qua 20-30 cm
3	Mùi của nước ao	Mùi đặc trưng của ao nuôi	Mùi tanh của tảo phát triển

Bảng 4. Đánh giá chất lượng cá

STT	Chỉ tiêu	Cá ao thí nghiệm	Cá ao đối chứng
1	Màu sắc	Màu sắc sáng tự nhiên	Màu sắc sáng tự nhiên
2	Mùi, vị	Mùi tanh tự nhiên của cá, không có mùi lạ	Mùi tanh tự nhiên của cá, không có mùi lạ
3	Trạng thái	Cơ thịt trắng, chắc, đàn hồi tốt	Cơ thịt trắng thường, hơi chắc, đàn hồi trung bình
4	Trọng lượng cá trung bình (g/con)	850 ± 5	750 ± 5
5	Năng suất (%)	113,3	100

Từ bảng 3 và 4 cho thấy dùng cá nghiền có vi khuẩn lactic làm thức ăn cho cá không làm ô nhiễm nước ao nuôi, thậm chí nó còn có tác dụng ức chế sự phát triển của tảo làm nước trong hơn, dùng cá nghiền có vi khuẩn lactic làm thức ăn có thể giúp cá lớn nhanh hơn, thịt cá chắc hơn, năng suất cá tăng 13,3%.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng chế phẩm lactic dùng bảo quản cá cho kết quả tương tự so với cách bảo quản đông lạnh, dùng chế phẩm vi khuẩn lactic có thể giúp bảo quản cá trong thời gian 25 ngày vẫn đảm bảo chất lượng, đặc biệt hàm lượng axit amin ít thay đổi. Mẫu cá bảo quản bằng chế phẩm chứa cả 4 chủng vi khuẩn lactic *P. pentosaceus* HN02; *L. brevis* HN26; *L. lactis* subsp. *lactis* HN11 và *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34 là tốt hơn những chế phẩm có 2 loại vi khuẩn lactic. Ở thí nghiệm cá bảo quản bằng chế phẩm chứa 4 loại vi khuẩn lactic hàm lượng axit amin tự do tổng số cao hơn mẫu cá tươi đông lạnh 1,2 lần. Chế phẩm vi khuẩn lactic có thể giúp bảo quản cá tươi sống mà không làm thay đổi mùi vị sản phẩm. Thức ăn có vi khuẩn lactic bổ sung vào ao nuôi không làm ô nhiễm nước. Cá nuôi sử dụng thức ăn từ sản phẩm cá bảo quản bằng vi khuẩn lactic lớn nhanh, thịt cá chắc, năng suất tăng 13,3%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahamed J., Mahendrakar N. S. - Chemical and microbial changes in fish viscera during fermentation ensiling at different temperatures, *Bioresource technology* ISSN 0960-8524, **59** (1) (1997) 45-46.
2. Bustari Hasan - Fermentation of Fish Silage using *Lactobacillus pentosus*, *Jurnal Natur Indonesia* ISSN 1410- 9379 **6** (1) (2003) 11-15.
3. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. - A medium for the cultivation of lactobacili, *J. Appl. Bact.* **23** (1960) 130-135.
4. Larisa Glatman, Vladimir Drabkin, and Alexander Gelman - Using lactic acid bacteria for developing novel fish food products, *J. Sci. Food. Agric.* **80** (2000) 375-380.
5. L. J. Yin, C. L. Pan, S. T. Jiang - New Technology for Producing Paste-like Fish Products using Lactic Acid Bacteria Fermentation, *Journal of Food Science* **67** (8) (2006) 3114-3118.
6. Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn - Sử dụng vi khuẩn lactic *Pediococcus pentosaceus* HN02 để sản xuất chế phẩm bảo quản cá, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **45** (4) (2007) 35-42.
7. Phan Văn Chi, Nguyễn Bích Nhi, Nguyễn Thị Ty - Xác định thành phần axit amin bằng phương pháp dẫn xuất hóa với O-phthadialdehyt (OPA) và 9-fluorenylmethylchlorformal (FMOC) trên hệ HP-Amino Quant Series II, *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 1997*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 1997, tr. 454-461.
8. Sanni A. I., Asiedu M., Ayernor G.S. - Microflora and Chemical Composition of Momoni, a Ghanaian Fermented Fish Condiment, *Journal of Food Composition and Analysis* **15** (5) (2002) 577-583.
9. TCVN 5090-2008 (2008). ISO 4121: 2003 - Phân tích cảm quan – Hướng dẫn sử dụng các thang đo định lượng đặc trưng, 9 trang.
10. TCVN 1644-2001 (2001) - Thức ăn chăn nuôi. Bột cá, Yêu cầu kỹ thuật, 5 trang.

11. Công nghệ sản xuất bột cá chăn nuôi quy mô nhỏ từ hỗn hợp nhiều loại cá tạp, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II.

<http://www.vietlinh.com.vn/kithuat/chuyende/research/sxbotca.htm>.

SUMMARY

THE CHANGE OF AMINO ACID AFTER FERMENTATION OF FISH SILAGE USING *LACTIC ACID BACTERIA* COMPOST AND APPLICATION IN AQUACULTURE

Lactic acid fermentation is utilized throughout the world as a prime method of preserving fresh food.

Fish, however, is more perishable than other meats as it contains relatively large quantities of free amino acids. If fish is not preserved, it will quickly spoil. The lactic acid bacteria (LAB) are added to raw fish due to the formation of lactic acid. In these products, the pH of fish mixture is lowered making the product safer and easier to keep. The suitability of LAB for fish silage fermentation was investigated. Four kinds of compost were the respectively prepared, using without LAB; with two of LAB strains; with the other two of LAB strains and with four of LAB strains as fermentation starter. The starter were added to raw fish and stored at room temperature for 25 days. Changes in amino acids of silage after storage were evaluated, and the values were compared to the frozen fish. There were no specific changes in the level of amino acid within 25 days of the storage. Total amino acids for frozen fish and for fermented silages were added with LAB strains were 3.90 and 3.23% - 3.43% (g amino acid/ 100 g sample), respectively. Total free amino acids were 52.03 and 58.11% - 61.40% (g amino acid/ 100 g sample), respectively. Fermented fish silage can be successfully prepared using fermentation starters of complex of four of LAB strains *P. pentosaceus* HN02; *L. brevis* HN26; *L. lactis* subsp. *lactis* HN11 and *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* HN34 within 25 days of storage.

Keywords. Lactic acid bacteria, amino acids, compost, fish, preservation.