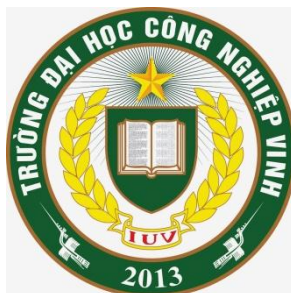


BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHIỆP VINH



GIÁO TRÌNH:
VI SINH VẬT THỰC PHẨM
(Tài liệu nội bộ dành cho sv ngành CNTP)

Vinh, 2020

CHƯƠNG 1: MỞ ĐẦU

Tóm tắt:

Nền văn minh loài người bắt đầu khi những người săn bắt và hái lượm chấp nhận không chỉ sự sản xuất mà còn cả việc bảo quản thực phẩm. Do vậy, từ rất lâu trước khi phát hiện ra sự tồn tại của các vi sinh vật, tầm quan trọng của chúng đối với việc làm hư hỏng thực phẩm và với những rủi ro của sức khỏe con người đã được hình thành trong đầu óc các bậc tổ tiên. Khi những mối tương quan và tầm quan trọng của chúng trong thực phẩm được chứng minh, con người đã cố gắng nhận thức những nguyên lý cơ sở có liên quan đến thực phẩm và các mối quan hệ giữa vi sinh vật với nhau. Kiến thức này đã được sử dụng để khống chế các vi sinh vật không mong muốn và sử dụng có hiệu quả các vi sinh vật mong muốn. Những nghiên cứu hiện nay đang được định hướng tới việc tìm hiểu các vi sinh vật ở cấp độ phân tử. Những gì một nhà vi sinh vật học thực phẩm cần có là các kiến thức sâu về sự phát triển đương thời trong ngành Vi sinh vật học thực phẩm và đặc tính của các vi sinh vật có ý nghĩa quan trọng trong thực phẩm.

1.1 Mở đầu:

Trừ một vài loại thực phẩm vô trùng, còn tất cả các loại thực phẩm đều chứa một hoặc nhiều nhóm vi sinh vật. Một số trong chúng có vai trò mong muốn trong thực phẩm, ví dụ: trong sản xuất các sản phẩm lên men tự nhiên; trong khi các loài khác lại gây hư hỏng thực phẩm hoặc gây ra các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Để nghiên cứu vai trò của vi sinh vật trong thực phẩm và để kiểm soát chúng khi cần thiết thì điều quan trọng là phải phân lập được chúng dưới dạng giống thuần khiết và nghiên cứu được các đặc điểm hình thái, sinh lý, hoá sinh và di truyền của chúng. Một số kỹ thuật đơn giản nhất hiện vẫn được dùng cho các nghiên cứu thuộc loại này đã từng được thiết lập trong thời kỳ hơn 300 năm qua.

1.2 Sự phát triển ra vi sinh vật

Sự phát hiện ra vi sinh vật diễn ra song song với sự phát minh và cải thiện kính hiển vi. Khoảng năm 1658, Athanasius Kircher đã báo cáo rằng, bằng cách sử dụng kính hiển vi, ông đã nhìn thấy những con giun sống nhỏ bé trong thịt thối và trong sữa. Độ phóng đại kính hiển vi của ông còn rất thấp đến mức ông ta đã không thể nhìn thấy vi

khuẩn. Vào năm 1664, Robert Hooke đã mô tả cấu trúc của nấm mốc. Tuy nhiên, chắc hẳn người đầu tiên nhìn thấy các loại vi sinh vật khác nhau, đặc biệt là vi khuẩn dưới một kính hiển vi có lẽ có độ phóng đại không quá 300 lần, phải là Antony van Leeuwenhoek's. Ông đã quan sát vi khuẩn trong nước bọt, nước mưa, giấm và trong các nguyên liệu khác, phác hoạ được ba nhóm hình thái (hình cầu - cầu khuẩn, hình trụ - trực khuẩn và hình xoắn - xoắn khuẩn) và cũng đã cho biết một số vi khuẩn có khả năng chuyển động. Ông gọi chúng là các con thú nhỏ và vào khoảng giữa những năm 1676 và 1683, ông đã báo cáo các quan sát của mình cho tổ chức khoa học hàng đầu vừa được thành lập, đó là Hội Hoàng Gia Luân Đôn, nơi những quan sát của ông đã được đọc với một sự mê hoặc. Vì rằng, các kính hiển vi loại tương đối tốt còn chưa có trong thời gian đó nên trong vòng 100 năm sau, các nhà khoa học và các cá nhân quan tâm khác chỉ thừa nhận các quan sát của Leeuwenhoek's. Vào thế kỷ XIX, nhờ Cách mạng Công nghiệp, các kính hiển vi tốt hơn đã dễ dàng nhận được, điều này đã khuyến khích nhiều bộ óc tò mò muốn quan sát và mô tả các sinh vật mà họ từng phát hiện được dưới kính hiển vi. Khoảng năm 1838, Ehrenberg (người đã đưa ra thuật ngữ vi khuẩn) đã đề xuất ít nhất 16 loài trong bốn chi và vào năm 1875, Ferdinand Cohn đã đưa ra hệ thống phân loại vi khuẩn sơ bộ. Cohn cũng là người đầu tiên đã phát hiện ra một số vi khuẩn sinh bào tử. Cũng giống như vi khuẩn, dù sự tồn tại của các virus kích thước dưới hiển vi đã được thừa nhận vào giữa thế kỷ XIX, song chúng chỉ được nhìn thấy sau khi phát minh ra kính hiển vi điện tử vào những năm 1940.

1.3 Chúng đến từ đâu?

Sau sự phát hiện của Leeuwenhoek's, mặc dù không xảy ra hoạt động bùng nổ nào, song một số bộ óc tò mò đã muốn biết các con thú nhỏ có mặt trong nhiều đối tượng khác nhau ấy đã đến từ đâu. Xã hội vừa thoát thai khỏi thời kỳ Phục hưng, còn khoa học, được coi như một môn triết học thực nghiệm, thì đang ở thời kỳ sơ khai của nó. Thuyết phát sinh tự nhiên, tức là sự sinh ra của một dạng sống nào đó từ các đối tượng không sống, được rất nhiều người trong các tầng lớp trí thức và quý tộc theo đuổi. Từ thời đại của những người Hy Lạp, sự xuất hiện của giòi từ các cơ thể chết và thịt thối đã được coi như một sự phát sinh tự nhiên. Tuy nhiên, vào khoảng năm 1665, Redi đã bác

bỏ giả thuyết đó bằng cách chỉ ra rằng, giòi trong thịt và cá thối chỉ có thể xuất hiện nếu chúng bị ruồi đậu vào. Những người bênh vực thuyết phát sinh tự nhiên tranh luận rằng, các con thú nhỏ không thể tự phát sinh (phát sinh sinh học), mà chúng có mặt ở trong các đồ vật khác nhau là nhờ sự phát sinh không sinh học (phát sinh tự nhiên). Vào năm 1749, Turbevill Needham đã chỉ ra rằng, thịt và canh thịt đã nấu chín, sau đó được bảo quản trong chai được đậy kín có thể xuất hiện các con thú nhỏ sau một thời gian ngắn. Điều này được sử dụng như một bằng chứng về sự xuất hiện của các con thú nhỏ này nhờ phát sinh tự nhiên. Lazzaro Spallanzani (1765) đã chỉ ra rằng, nếu nấu canh thịt trong một cái chai rồi đóng kín nó lại ngay lập tức thì sẽ ngăn ngừa được sự xuất hiện của các sinh vật hiển vi này, từ đó bác bỏ học thuyết của Needham. Đây là thời kỳ mà Antoine Laurent Lavoisier và các cộng tác viên của ông chỉ ra sự cần thiết của oxi đối với sự sống. Những tín đồ của thuyết tự sinh đã phủ nhận quan sát của Spallanzani khi họ giả thiết rằng, trong các chai đóng kín đã không có đủ lực sống (oxi) để làm xuất hiện các con thú nhỏ nhờ cách tự sinh. Sau đó Schulze (vào năm 1830, bằng cách cho không khí chạy qua axit), Theodore Schwann (vào năm 1838, cho không khí chạy qua ống nghiệm đang đốt nóng) và Schroeder (vào năm 1854, cho không khí chạy qua bông) đã chỉ ra rằng, vi khuẩn không thể xuất hiện trong nước thịt đã đun sôi ngay cả khi có mặt không khí. Cuối cùng, vào năm 1861, Louis Pasteur đã chứng minh được rằng, trong canh đun sôi, vi khuẩn chỉ có thể sinh trưởng nếu canh bị nhiễm bẩn bởi các vi khuẩn được mang đến từ các hạt bụi trong không khí. Các nghiên cứu thận trọng và có đối chứng của ông đã chứng minh rằng, vi khuẩn có khả năng sinh sản (phát sinh sinh học) và sự sống không thể bắt nguồn từ sự tự sinh. Vào năm 1870, John Tyndall đã chỉ ra rằng, canh đã đun sôi được bảo quản trong không khí không chứa bụi của một cái hộp sẽ không dẫn đến sinh trưởng của vi sinh vật.

1.4 Chức năng của chúng là gì?

Sự tham gia của các sinh vật không nhìn thấy được vào nhiều loại bệnh khác nhau ở người đã bị Roger Bacon nghi ngờ ngay từ thế kỷ thứ XIII. Vào thế kỷ thứ XVI, Girolamo Fracastoro ở Verona đã giả thiết rằng, nhiều bệnh ở người được truyền từ người sang người nhờ các sinh vật nhỏ. Điều này cũng được Kircher chỉ ra vào năm 1658. Vào

năm 1762, von Plenciz ở Viên đã giả thiết rằng, các sinh vật khác nhau không nhìn thấy được là những kẻ chịu trách nhiệm đối với nhiều loại bệnh. Theodore Schwann (1837) và Hermann Helmholtz (1843) đã cho rằng, sự thối rữa và sự lên men có liên quan đến sự có mặt của các sinh vật bắt nguồn từ không khí. Cuối cùng, vào năm 1875, Pasteur đã chỉ ra rằng, sự lên men rượu vang từ nho và sự chua của rượu vang là do các vi sinh vật gây ra. Ông cũng chứng minh rằng, sự hư hỏng của thịt và sữa có liên quan tới sự sinh trưởng của vi sinh vật. Về sau ông đã chỉ ra mối liên quan giữa vi sinh vật với một số bệnh ở người, trâu, bò và cừu và ông cũng đã tạo ra các vaccin chống lại một số bệnh ở người và động vật do vi sinh vật gây ra, kể cả bệnh dại. ở Đức, Robert Koch, (vào những năm 1880 và 1890) đã phân lập được giống thuần khiết của các vi khuẩn gây ra bệnh than, bệnh tả và bệnh lao. ông cũng đề xuất các giả thuyết Koch's nổi tiếng để liên kết một tác nhân vi khuẩn gây bệnh đặc thù với một bệnh đặc thù. Cùng với những sự liên kết của ông, ông cũng đã phát triển các kỹ thuật nuôi cấy trên đĩa thạch để phân lập vi khuẩn dưới dạng giống thuần khiết và xác định số lượng vi sinh vật trong các mẫu, tạo ra đĩa Petri (Petri là nhân viên trong phòng thí nghiệm của ông), các phương pháp nhuộm để quan sát tốt hơn các vi khuẩn dưới kính hiển vi và việc sử dụng hơi nước để khử trùng nguyên liệu khi nuôi vi khuẩn. Dần dần, tầm quan trọng của vi sinh vật đối với các bệnh ở người và động vật, với độ phì nhiêu của đất, các bệnh ăn thực vật, sự lên men, sự hư hỏng thực phẩm và các bệnh phát sinh từ thực phẩm, cũng như các lĩnh vực khác đã được thừa nhận và vi sinh vật học đã được phát triển như một bộ môn đặc thù. Sau đó nó được chia nhỏ thành một số* dưới bộ môn như vi sinh vật học y học, vi sinh vật học đất, bệnh học thực vật và vi sinh vật học thực phẩm.

1.5 Sự phát triển của vi sinh vật thực phẩm trước năm 1990

Chắc chắn rằng, tổ tiên loài người của chúng ta trước đây, những người đi săn và hái lượm, đã biết về sự hư hỏng thực phẩm và các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Ngay cả khi chưa nhận thức được gì về các tác nhân gây bệnh, họ đã sử dụng băng và lửa để bảo quản thực phẩm và giữ chúng an toàn. Khoảng 8.000 năm trước Công nguyên, khi nông nghiệp và chăn nuôi được chấp nhận bởi các nền văn minh sớm thì sự cung cấp thực phẩm, đặc biệt là các sản phẩm nông nghiệp, đã được tạo ra dồi dào trong các mùa trồng

trọt. Việc bảo quản thực phẩm trở nên quan trọng để đảm bảo cho việc cung cấp thực phẩm đều đặn trong cả năm. Giữa những năm 8000 và 1000 trước Công nguyên, nhiều phương pháp bảo quản thực phẩm như phơi khô, nấu, nướng, hun khói, ướp muối, ướp đường (bằng mật ong), bảo quản ở nhiệt độ thấp (trong băng), bảo quản thiếu không khí (trong các túi), lên men (với quả, hạt và sữa), muối và thêm gia vị đã được sử dụng, chủ yếu là để giảm bớt sự hư hỏng. Tuy nhiên, người ta không thể biết chắc chắn liệu xã hội vào thời đó, đã thừa nhận về các bệnh được truyền qua đường thực phẩm hay chưa. Tuy nhiên, vào những thời kỳ sau đó những văn bản của nhiều tôn giáo đã cho thấy rằng, các xã hội đã công nhận một mối liên quan giữa bệnh với một số loại thực phẩm. Một số* điều luật, như không ăn thịt từ động vật bị bệnh hoặc từ động vật đã bị giết chết bởi bọ ăn xác thối, hoặc không ăn thực phẩm xuất hiện một cách không tự nhiên hoặc đã bị xử lý bởi một người thiếu vệ sinh,... đã được soạn ra để đảm bảo sức khỏe cho công dân chống lại các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Lên men đã được sử dụng một cách mạnh mẽ bởi nhiều xã hội khác nhau không chỉ để bảo quản thực phẩm mà còn như một phương pháp để sản xuất nhiều loại thực phẩm mong muốn từ sữa, thịt, trứng, ngũ cốc, quả và rau. Sau khi Leeuwenhoek's phát hiện ra sự tồn tại của vi sinh vật ở mọi nơi (chủ yếu là vi khuẩn và nấm men) vào những năm 1670, một số" người đã bắt đầu tìm kiếm mối liên quan giữa vai trò tiềm tàng của những vi sinh vật này với sự hư hỏng thực phẩm, sự lên men thực phẩm và các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Những sự phát triển chủ yếu của các ý tưởng về vai trò tiềm tàng của vi sinh vật trong thực phẩm và bằng chứng khoa học về chúng đã được khởi đầu bởi Pasteur vào những năm 1870, được kế tục bởi nhiều nhà khoa học khác trước khi kết thúc thế kỷ XIX. Điều này đã mở đường cho sự ra đời của ngành Vi sinh vật học thực phẩm giai đoạn sớm ở thế kỷ XX. Một số" sự phát triển chính trong thế kỷ XIX sẽ được kể ra sau đây: Sự lên men thực phẩm: Năm 1822, C.J. Person đã đặt tên cho sinh vật hiển vi tìm được trên bề mặt của rượu vang trong quá trình sản xuất giấm là *Mycoderma mesentericum*. Pasteur vào năm 1868 đã chứng minh rằng, cơ thể này có liên quan tới sự chuyển hoá rượu thành axit axetic và đặt tên cho nó là *Mycoderma aceti*.

Vào năm 1898, Martinus Beijerinck đặt tên lại cho nó là *Acetobacter aceti*. Năm 1837, Theodor Schwann gọi sinh vật tham gia vào sự lên men đường là *Saccharomyces* (nấm đường).

Năm 1838, Charles Cogniard-Latour giả thiết rằng, sự sinh trưởng của nấm men có liên quan tới sự lên men rượu.

Năm 1860, Louis Pasteur chỉ ra rằng, lên men axit lactic và lên men rượu từ đường là kết quả của sự sinh trưởng của vi khuẩn (loại đầu) và của nấm men (loại sau).

Năm 1883, Emil Christian Hansen sử dụng giông thuần khiết của nấm men để lên men bia. Sự hư hỏng thực phẩm:

Năm 1804, Francois Nicolas Appert phát triển phương pháp bảo quản thực phẩm trong các chai thủy tinh đóng kín bằng cách dùng nước sôi để xử lý. Ông đã ghi công kỹ thuật này cho Lazzaro Spallanzani (1765), người đầu tiên sử dụng phương pháp này để bác bỏ thuyết tự sinh.

Năm 1819, Peter Durand phát triển phương pháp bảo quản thực phẩm đóng hộp trong các lon bằng thép. Charles Mitchell đã đưa việc mạ kẽm cho các lon kim loại vào năm 1839.

Năm 1870, L. Pasteur đề nghị xử lý rượu vang bằng nhiệt ở 145°F (62,7°C) trong 30 phút để tiêu diệt các vi khuẩn gây chua. F. Soxhlet đã tiến xa hơn bằng cách đun sôi sữa 35 phút để giết các vi khuẩn lây nhiễm. Sau đó phương pháp này đã được cải tiến, được gọi là khử trùng Pasteur và được sử dụng chủ yếu để tiêu diệt các thể dinh dưỡng của các tác nhân gây bệnh cũng như nhiều vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm.

Năm 1895, Harry Russell đã chỉ ra rằng, sự trương phồng kèm theo mùi khó chịu của đậu đóng hộp là do sự sinh trưởng của các vi khuẩn kháng nhiệt (mang bào tử) gây ra. Các bệnh phát sinh từ thực phẩm:

Năm 1820, Justin Kerner đã mô tả sự ngộ độc thực phẩm do ăn phải xúc xích tiết (bệnh botulism). Bệnh gây tử vong do ăn phải xúc xích tiết đã được thừa nhận từ năm 900 trước Công nguyên.

Năm 1849, John Snow giả thiết về sự lây lan của bệnh tả qua nước uống bị nhiễm nước cống. Vào năm 1854, Filippo Facini đã gọi tên trực khuẩn tả là *Vibrio cholera*, sau

đó vi khuẩn này được Robert Koch phân lập dưới dạng thuần khiết vào năm 1884. Năm 1856, William Budd giả thiết rằng, sự nhiễm bẩn nước từ phân của những người đã bị nhiễm trùng sẽ truyền bệnh sốt thương hàn và ủng hộ việc sử dụng clo cho các nguồn nước để vượt qua khó khăn này. Vào năm 1800, G. de Morveau và W. Cruikshank ủng hộ sự sử dụng clo để làm sạch nước uống. Vào năm 1885, Theodor Escherich đã phân lập được *Bacterium coli* (về sau được đặt tên là *Escherichia coli*) từ phân và giả thiết rằng, một số chủng của loài vi khuẩn này có liên quan tới bệnh tiêu chảy ở trẻ em. Năm 1888, A.A. Gartner đã phân lập được *Bacterium* (về sau là *Salmonella*) enteritidis từ các cơ quan của một người bị bệnh cũng như từ thịt mà người đó đã ăn vào.

Vào năm 1896, Marie von Ermengem đã chứng minh rằng, *Salmonella enteritidis* gây ra một bệnh chết người ở những người ăn phải xúc xích đã bị nhiễm khuẩn.

Năm 1894, J. Denys liên hệ *Staphylococcus* sinh mủ với cái chết của một bệnh nhân đã ăn phải thịt của một con bò bị bệnh.

Năm 1895, Marie von Ermengem phân lập được *Bacillus botulinus* (*Clostridium botulinum*) từ thịt bị nhiễm khuẩn và chứng minh rằng, nó gây ra bệnh botulism. Các kỹ thuật trong vi sinh vật học:

Năm 1854, Heinrich Schroder và Theodore von Dusch sử dụng bông để nút ống nghiệm và chai lọ chứa các môi trường sẽ được xử lý bằng nhiệt để ngăn ngừa sự nhiễm vi sinh vật.

Năm 1876, Car Weigert sử dụng xanh methylen (một thuốc nhuộm tổng hợp) để nhuộm vi khuẩn hoà trong nước.

Năm 1877, Ferdinand Cohn chỉ ra tính bền nhiệt của nội bào tử của *Bacillus subtilis*.

Năm 1878, Joseph Lister phân lập được *Streptococcus* (ngày nay là *Lactococcus*) *lactis* dưới dạng giông thuần khiết nhờ các dịch pha loãng từ sữa chua.

Những năm 1880, Robert Koch và các cộng tác viên của ông đã đưa vào nhiều phương pháp quan trọng được sử dụng trong tất cả các ngành của vi sinh vật học như môi trường đặc (lúc đầu là gelatin, sau đó là thạch) để thuần khiết và đếm số lượng vi

khuẩn, đĩa Petri, nhuộm lông roi, khảo sát môi trường bằng hơi nước ở các nhiệt độ trên 100°C, chụp ảnh các tế bào và bào tử.

Năm 1884, Hans Christian Gram tiến hành nhuộm Gram các tế bào vi khuẩn.

1.5 Vi sinh vật học thực phẩm vào giai đoạn hiện nay:

Vào đầu thế kỷ XX, các nghiên cứu được tiếp tục để tìm hiểu mối liên quan và tầm quan trọng của các vi sinh vật, đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm. Các phương pháp đặc thù đã được phát triển để phân lập và mô tả chúng. Tầm quan trọng của vệ sinh trong xử lý thực phẩm để giảm sự lây nhiễm bởi vi sinh vật đã được thừa nhận. Các phương pháp đặc thù đã được nghiên cứu để ngăn ngừa sự sinh trưởng cũng như để loại bỏ sự hư hỏng và tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh. Cũng đã có một số mối quan tâm tới việc phân lập các vi khuẩn có lợi có liên quan tới lên men thực phẩm, đặc biệt là lên men sữa, cũng như việc nghiên cứu các đặc tính của chúng. Tuy nhiên, sau những năm 1950, vi sinh vật học thực phẩm đã bước vào một kỷ nguyên mới. Sự có mặt của các thông tin cơ sở về các đặc điểm sinh lý, hoá sinh và sinh học của các loại thực phẩm khác nhau, mối quan hệ giữa các vi sinh vật trong môi trường thực phẩm và sinh lý, hoá sinh, di truyền và miễn dịch vi sinh vật học đã giúp mở ra những lĩnh vực mới trong vi sinh vật học thực phẩm. Trong số đó có:

1.5.1 Lên men thực phẩm / Các chế phẩm probiotic

- Sự tạo ra các chủng có các hoạt tính trao đổi chất mong muốn nhờ sự chuyển gen giữa các chủng.
- Sự tạo ra các vi khuẩn lactic đề kháng bacteriophage.
- Kỹ nghệ chuyển hoá các chủng sản xuất thừa các chất chuyển hoá mong muốn.
- Tạo ra các phương pháp sử dụng vi khuẩn lactic để cung cấp các protein miễn dịch.
- Xác định trình tự genom của các vi khuẩn lactic quan trọng và các bacteriophage nhằm hiểu biết tốt hơn các đặc tính của chúng.
- Bảo quản sinh học thực phẩm bằng các vi khuẩn mong muốn và các chất chuyển hoá kháng vi sinh vật của chúng.
- Tìm hiểu các đặc tính quan trọng của các vi khuẩn probiotic và tạo ra các chủng mong muốn.

- Các phương pháp có hiệu quả để sản xuất các giông khởi động sử dụng trực tiếp trong chế biến thực phẩm.

1.6.2. Sự hư hỏng thực phẩm

- Xác định và khống chế các vi khuẩn gây hư hỏng mới có liên quan tới những sự thay đổi hiện thời trong các phương pháp chế biến và bảo quản thực phẩm.
- Hư hỏng do các enzym vi khuẩn gây ra trong các thực phẩm đông lạnh và bảo quản trong phòng lạnh với tuổi thọ kéo dài.
- Phát triển các phương pháp phân tử (công nghệ nano) để xác định các chất chuyển hoá của các vi khuẩn gây hư hỏng và dự đoán tuổi thọ tiềm tàng của các loại thực phẩm.
- Tầm quan trọng của các stress môi trường lên tính đồ kháng của các vi khuẩn gây hư hỏng đối với các chất bảo quản có tính kháng Vi sinh vật.

1.6.3. Các bệnh phát sinh từ thực phẩm

- Các phương pháp phát hiện sự xuất hiện của các vi khuẩn gây bệnh phát sinh từ các loại thực phẩm bị nhiễm bẩn.
- ứng dụng các kỹ thuật của sinh học phân tử (công nghệ nano) để phát hiện nhanh các vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm và trong môi trường.
- Các phương pháp phát hiện có hiệu quả và kiểm soát các virus gây bệnh phát sinh từ thực phẩm.
- Tiềm năng lây lan các bệnh do prion từ động vật dùng làm thực phẩm sang người.
- Tầm quan trọng của các stress môi trường lên sự phát hiện và phá huỷ các tác nhân gây bệnh.
- Các yếu tố" có liên quan tới sự tăng các tác nhân gây bệnh kháng kháng sinh trong thực phẩm.
- Sự bám dính của các tác nhân gây bệnh lên thực phẩm và bề mặt thiết bị.
- Các cơ chế sinh bệnh của các tác nhân gây bệnh từ thực phẩm.
- Các phương pháp hiệu quả để nghiên cứu dịch tễ học các bệnh phát sinh từ thực phẩm.
- Kiểm soát các thể ký sinh gây bệnh trong thực phẩm.

1.6.4. Những vấn đề khác

- ứng dụng sự phân tích rủi ro tại các điểm kiểm soát then chốt (HACCP) trong quá trình sản xuất, chế biến và bảo quản thực phẩm.
- Các công nghệ chế biến thực phẩm mới.
- Vi sinh vật học của các loại thực phẩm không chế biến hoặc thực phẩm ăn ngay được xử lý nhiệt thấp.
- Kiểm soát vi sinh vật các loại thực phẩm từ trang trại đến bàn ăn (quản lý chất lượng tổng số).
- Nội quy an toàn thực phẩm.

1.7. Vi sinh vật thực phẩm và các nhà vi sinh vật thực phẩm:

Từ những sự thảo luận ở trên, có thể thấy rõ ràng những gì môn học Vi sinh vật học thực phẩm đã đem lại. Trước những năm 1970, vi sinh vật học thực phẩm chỉ được coi như một ngành ứng dụng chủ yếu tham gia vào việc kiểm tra chất lượng thực phẩm về mặt vi sinh vật học. Từ đó đến nay, công nghệ đã được sử dụng trong việc sản xuất, chế biến, phân phối và bán lẻ thực phẩm và mô hình tiêu thụ sản phẩm đã thay đổi nhiều. Những sự thay đổi này đã làm xuất hiện các vấn đề mới không thể được giải quyết chỉ bằng việc sử dụng các kiến thức ứng dụng. Do vậy, vi sinh vật học thực phẩm hiện đại của hôm nay cần phải bao gồm cả một lượng lớn khoa học cơ bản để hiểu được và giải quyết có hiệu quả các vấn đề vi sinh vật có liên quan đến thực phẩm. Môn học sẽ bao gồm không chỉ các trạng thái vi sinh vật học của sự hư hỏng thực phẩm, các bệnh phát sinh từ thực phẩm và sự kiểm soát hiệu quả chúng cũng như sự chế biến sinh học thực phẩm mà cả những thông tin cơ sở về sinh thái học, sinh lý học, trao đổi chất và di truyền học vi sinh vật. Các thông tin này đang giúp tạo ra các phương pháp phát hiện nhanh và hiệu quả các vi khuẩn gây hư hỏng và các vi khuẩn gây bệnh, giúp tạo ra các chủng vi sinh vật mong muốn nhờ công nghệ ADN tái tổ hợp, giúp sản xuất các thực phẩm lên men có chất lượng cao hơn, giúp tạo ra các enzyme bền nhiệt trong chế biến thực phẩm và các chất phụ gia thực phẩm, giúp phát triển các phương pháp loại bỏ vi khuẩn khỏi thực phẩm, bề mặt thiết bị và giúp kết hợp một số phương pháp kiểm soát nhằm không chỉ có hiệu quả các vi sinh vật gây hư hỏng và gây bệnh trong thực phẩm. Sinh viên sau khi đã

hoàn thành Giáo trình Vi sinh vật học thực phẩm cần phải đạt được các kiến thức trong các lĩnh vực sau đây:

- Xác định được chất lượng thực phẩm và các hợp phần thực phẩm về mặt vi sinh vật học bằng cách sử dụng các kỹ thuật thích hợp.
- Xác định được các loại vi sinh vật tham gia vào sự gây hư hỏng, các rủi ro sức khỏe và xác định nguồn của chúng.
- Thiết kế các quy trình chính xác để kiểm soát các vi sinh vật gây hư hỏng và các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm.
- Học tập các phương pháp nhanh để phân lập và xác định các tác nhân gây bệnh, các vi khuẩn gây hư hỏng từ thực phẩm và từ môi trường.
- Xác định việc ứng dụng các công nghệ mới vào chế biến thực phẩm có thể gây ra những vấn đề đặc biệt về vi sinh vật học như thế nào để thiết kế các quy trình vượt qua những khó khăn đó.
- Thiết kế các quy trình vệ sinh hiệu quả để kiểm soát các vấn đề trong các thiết bị chế biến thực phẩm.
- Sử dụng có hiệu quả các vi sinh vật mong muốn để sản xuất các thực phẩm lên men.
- Thiết kế các phương pháp để sản xuất các giống khởi động tốt hơn nhằm sử dụng trong thực phẩm lên men và trong các chế phẩm probiotic.
- Nắm vững các nội quy thực phẩm (trong nước và quốc tế).
- Hiểu biết về các vấn đề vi sinh vật học của các thực phẩm nhập nội.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 1

1. Mô tả ngắn gọn những đóng góp của các nhà khoa học sau đây trong sự phát triển của vi sinh vật học và vi sinh vật thực phẩm: (a) Leeuwenhoek's, (b) Spallanzani, (c) Pasteur, (d) Koch, (e) Hess, (f) Cohn, (g) Lister, (h) Soxhlet (i) Gartner và (j) Appert.
2. Tại sao các thí nghiệm của Needham nhằm bác bỏ sự phát sinh tự nhiên của vi sinh vật lại thất bại, nhưng Pasteur lại thành công trong việc bác bỏ học thuyết này?
3. Kể ba lĩnh vực quan trọng trong nghiên cứu công nghệ sinh học thực phẩm, sự gây hư hỏng thực phẩm và các bệnh phát sinh từ thực phẩm đương thời.

4. Giải thích ngắn gọn những sự khác biệt chủ yếu trong sự hiểu biết về tầm quan trọng của vi sinh vật trong thực phẩm trước và sau những năm 1900.
5. Kể các tác nhân gây bệnh đã được chứng minh là có liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm trước năm 1900.
6. Miêu tả ngắn gọn những gì một sinh viên ngành Vi sinh vật học thực phẩm cần phải biết

CHƯƠNG 2: ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ SINH LÝ VI SINH VẬT.

Tóm tắt:

Hai vấn đề chủ yếu cần nắm vững trong chương:

- 1) Hệ thống danh pháp vi khuẩn, một hệ thống thay đổi nhanh chóng do sự phát triển của các kỹ thuật sinh học phân tử mới.*
- 2) Các đặc tính hình thái sinh lý của các vi sinh vật quan trọng trong thực phẩm.*

2.1. Mở đầu:

Các nhóm vi sinh vật quan trọng trong thực phẩm bao gồm một số' loài và một số" typ vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và virus. Không được đề cập đến ở đây như song tảo, nguyên sinh động vật và giun (như giun tròn) cũng có tầm quan trọng trong thực phẩm. Một số" nguyên sinh động vật và giun có liên quan đến những rủi ro cho sức khỏe, còn một số" tảo thì liên quan đến sự rủi ro sức khỏe qua các sản phẩm chế biến sinh học (như nguồn vitamin hay protein đơn bào).

Vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và virus có tầm quan trọng trong thực phẩm do chúng có khả năng gây ra các bệnh phát sinh từ thực phẩm và làm hư hỏng thực phẩm, đồng thời cũng được dùng để sản xuất thực phẩm hoặc các hợp phần của thực phẩm. Nhiều loài vi khuẩn, một số" nấm mốc và virus, nhưng trừ nấm men, có khả năng gây ra các bệnh phát sinh từ thực phẩm.

Do khả năng sinh trưởng được trong thực phẩm (virus không phát triển được trong thực phẩm), đa số" vi khuẩn, nấm mốc và nấm men có tiềm năng gây hư hỏng thực phẩm. Một số" loài vi khuẩn, nấm mốc và nấm men thường được coi là an toàn hoặc coi là chính thực phẩm, hoặc cả hai, sẽ được sử dụng để sản xuất các loại thực phẩm lên men hay các hợp phần của thực phẩm.

Trong số" bốn nhóm trên, vi khuẩn là nhóm lớn nhất. Nhờ có mặt ở khắp nơi và có tốc độ sinh trưởng nhanh, ngay dưới các điều kiện nấm men và nấm mốc không sinh trưởng được, nên chúng được coi là nhân tố" quan trọng nhất trong việc làm hư hỏng thực phẩm và trong các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Prion và các tiểu thể nhiễm trùng mang bản chất protein gần đây được xác định là tác nhân gây ra các bệnh viêm não dạng

xốp ở người và động vật. Tuy nhiên, khả năng gây ra các bệnh phát sinh từ thực phẩm của chúng còn chưa được biết rõ.

2.2. Sự phân loại vi sinh vật:

Các sinh vật có cấu trúc tế bào trên cơ sở những mối quan hệ chủng loại phát sinh và tiến hoá lúc đầu được xếp thành năm giới, ở đó vi khuẩn thuộc nhóm sinh vật nhân sơ (tiền nhân) còn nấm mốc, nấm men (có nhân thật) được xếp vào nhóm nấm.

Vào những năm 1970, domain nhân sơ được đổi thành Eubacteria (vi khuẩn thật — có murein trên thành tế bào) và Archaeobacteria (vi khuẩn cổ - không có murein trên thành tế bào). Vào những năm 1990, các domain này được chuyển thành Bacteria và Archaea. Archaea bao gồm những vi sinh vật cực đoan nhất và không quan trọng đối với vi sinh học thực phẩm. Virut không được coi là tế bào sống và không nằm trong hệ thống phân loại này. Để phân loại nấm men, nấm mốc và vi khuẩn, một sô" thang bậc sau giới đã được sử dụng, gồm ngành, lớp, họ, chi và loài. Nhóm hệ thống học cơ sở là loài. Một sô" loài có các đặc tính giống nhau tạo thành chi. Ở các sinh vật nhân chuẩn, các loài của cùng một chi có thể lai với nhau.

Điều này không đúng với sinh vật nhân sơ, mặc dù sự chuyển nguyên liệu di truyền bằng tiếp hợp cũng tồn tại ở nhiều loài vi khuẩn. Một số chi tạo nên họ và quy trình tương tự sẽ được tiếp tục trong các thứ bậc khác. Trong vi sinh học thực phẩm, các thứ bậc loài, chi và họ kể trên ít khi được sử dụng. Ở vi khuẩn, một loài được coi là tập hợp các chủng mang các đặc tính chung. Một chủng là con cháu của một khuẩn lạc duy nhất (tế bào đơn). Trong số các chủng của cùng một loài, một chủng được coi là chủng chuẩn phải được sử dụng như là một chủng tham chiếu để so sánh với các đặc tính của một chủng chưa biết. Tuy nhiên, khi nắm được trình tự genom hoàn chỉnh, hệ thống này sẽ còn thay đổi trong tương lai. Một số phương pháp đã được sử dụng để xác định mối quan hệ họ hàng giữa vi khuẩn, nấm men và nấm mốc. ở nấm men, nấm mốc, hình thái, sinh sản, bản chất hoá sinh của các đại phân tử và mô hình trao đổi chất được sử dụng cùng với các tiêu chí khác. Đối với hình thái học vi khuẩn, đặc điểm nhuộm Gram, thành phần protein, trình tự amino axit của một số protein đặc thù, thành phần bazơ (mol% G + C), phép lai axit nucleic (ADN và ARN), trình tự bazơ nucleic cũng như sự phân loại sô"

với sự trợ giúp của máy tính đã được sử dụng. Thành phần protein, trình tự amino axit, thành phần bazơ, phép lai ADN và ARN và trình tự bazơ nucleotit có liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp tới bản chất di truyền của sinh vật và do vậy cung cấp một cơ hội tốt hơn trong việc so sánh hai cơ thể ở mức độ di truyền, ở tỷ lệ mol% G + C, nếu hai chủng khác nhau tới 10% hoặc hơn thì chúng hầu như không có quan hệ gì với nhau. Tương tự, trong thí nghiệm lai, hai chủng được coi là một nếu ADN của chúng có sự tương đồng tới 90% hoặc hơn. Với trình tự bazơ nucleotit thì trình tự trong ARN ribosom 16S của các chủng sẽ được so sánh. Một trình tự khoảng 1.500 nucleotit nằm trên một đoạn ARN ribosom 16S là đoạn được bảo toàn nhất, do vậy các chủng họ hàng phải có sự tương đồng cao. Trong phân loại số", nhiều đặc tính được so sánh như đặc tính hình thái, đặc tính sinh lý và đặc tính hoá sinh. Mỗi đặc tính đều có giá trị tương đương. Hai chủng thuộc cùng một loài cần có mức độ tương đồng 90% hoặc hơn. Những mối quan hệ trong virus, nếu có, còn chưa được biết rõ. Hệ thống phân loại của chúng khá tùy tiện và dựa trên các kiểu bệnh mà chúng gây ra (ví dụ virus hepatitis gây ra bệnh viêm gan), hàm lượng axit nucleic (ADN và ARN, mạch đơn hoặc mạch kép) và các cấu trúc hình thái. Trong thực phẩm, hai nhóm virus có tầm quan trọng là các virus vi khuẩn (bacteriophage) của các vi khuẩn dùng làm giống khởi động và một số vi khuẩn gây bệnh phát sinh từ thực phẩm cũng như các virus gây bệnh cho người có liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm.

2.3. Danh pháp:

Nhóm hệ thống học cơ sở ở vi khuẩn, nấm men và nấm mốc là loài. Và mỗi loài được đặt cho một tên.

Tên gồm hai phần: phần đầu là tên chi, còn phần thứ hai là tính ngữ chỉ loài. Cả hai đều được Latin hoá; khi viết chúng được in nghiêng (hoặc gạch dưới), ký tự đầu tiên của tên chi được viết hoa (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium roquefortii* và *Lactobacillus acidophilus*).

Một loài vi khuẩn có thể được chia thành nhiều dưới loài (subsp. hoặc ssp.) nếu các thành viên chỉ ra những sự khác biệt nhỏ nhưng nhất quán về tính chất. Trong những trường hợp như vậy, một tính ngữ thứ 3 (dưới loài) sẽ được sử dụng (ví dụ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* hoặc *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*). Trong một số trường hợp, các

thứ bậc nằm dưới dưới loài còn được sử dụng để phân biệt các chủng, được thừa nhận bởi các đặc tính đặc thù (ví dụ serovar = phản ứng kháng nguyên; biovar = sản sinh một chất trao đổi đặc thù và phagovar = miễn cảm với một phage đặc thù). Những thứ bậc này không có tầm quan trọng về phân loại nhưng lại có ý nghĩa thực tiễn (ví dụ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* là một chủng *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* sinh diacetyl, một hợp chất gây hương quan trọng trong một số sản phẩm sữa lên men). Mỗi chủng trong một loài có thể được nhận dạng bằng một con số" chủng, hoặc một ký tự, hoặc kết hợp cả hai (ví dụ *Pediococcus acidilactici* LB923).

Ở cấp độ họ, tên vi khuẩn được viết dưới dạng số" nhiều, giống cái, rồi thêm tiếp vĩ ngữ aceae (ví dụ Enterobacteriaceae). Toàn bộ các loài và chủng trong một chi có thể được viết kết hợp bằng cách sử dụng "spp" sau tên chi (ví dụ *Lactobacillus* spp.) hoặc viết dưới dạng danh từ số" nhiều của chi (ví dụ lactobacilli đối với *Lactobacillus*, lactococci đối với *Lactococcus*, leuconostocs đối với *Leuconostoc*, hoặc salmonellae đối với *Salmonella*), nhưng không in nghiêng. Tên khoa học của vi khuẩn được gọi theo quy định của Mã danh pháp quốc tế vi khuẩn (International Code of Nomenclature of Bacteria). Ủy ban quốc tế về phân loại học vi khuẩn thuộc Liên đoàn vi sinh vật "học quốc tế (International Committee on Systematic Bacteriology of International Union of Microbiological Association) sẽ kiểm tra tính hiệu lực của từng tên và sau đó công bố danh sách các tên vi khuẩn đã được phê duyệt ở từng thời kỳ. Một tên mới (loài và chi) phải được công bố trong International Journal of Systematic Bacteriology trước khi nó được đánh giá để đưa vào danh sách phê duyệt. Mọi thay đổi về tên (chi hoặc loài) đều phải được phê duyệt bởi ủy ban này. Khi viết tên của cùng một loài trên một lần trong một bài báo, thông thường chỉ sử dụng cả tên chi và tính ngữ loài ở lần đầu, còn sau đó thì viết tắt tên chi. Trong Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, chỉ có ký tự đầu tiên được sử dụng (ví dụ: lần đầu viết *Listeria monocytogenes* còn sau đó viết *L. monocytogenes*). Trong hầu hết các bài báo công bố ở Mỹ, người ta cũng áp dụng cách viết như vậy. Tuy nhiên, nó sẽ gây ra sự lộn lộn khi một bài báo chứa nhiều loài có cùng ký tự đầu tiên trong tên chi (*Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc lactis* và *Lactococcus lactis* đều viết dưới dạng *L. lactis*). Vì vậy, trong một số" tạp chí Châu Âu, người ta sử dụng

nhiều hơn một ký tự nhưng không theo một hệ thống nhất định nào (ví dụ *Lact. lactis*, *Lc. lactis*, *Leu. lactis*, *Lb. lactis*, *L. ist monocytogenes*).

Trong giáo trình này, để giảm bớt sự lộn lộn đối với bạn đọc (mà nhiều trong số các bạn không được làm quen với sự thay đổi nhanh chóng về danh pháp học vi khuẩn), chúng tôi sử dụng hệ thống 3 ký tự (ví dụ *Lis. monocytogenes*, *Leu. lactis*, *Sta. aureus* đối với *Salmonella*; *Shi. dysenteriae* đối với *Shigella*; *Sta. aureus* đối với *Staphylococcus*).

Trong một vài trường hợp hiếm hoi cần phải thay đổi một chút (ví dụ *Lactococcus lactis* và *Lactobacillus lactis* được viết dưới dạng *Lac. lactis* và *Lab. lactis*, để tương ứng với hai chi trên). Mới đây, hệ thống danh pháp đối với *Salmonella* lại đã được thay đổi. Virut, như đã nói ở trên không được gọi tên theo cách dùng cho vi khuẩn. Chúng thường được đặt tên theo ký tự, hoặc con số hoặc kết hợp cả hai (ví dụ, bacteriophage T4 hoặc X), tên bệnh mà chúng gây ra (ví dụ hepatitis A, gây bệnh viêm gan) hoặc bằng các phương pháp khác (ví dụ các virut dạng Norwalk, gây một loại bệnh viêm đường ruột dạ dày ở người phát sinh từ thực phẩm).

2.4. Hình thái và cấu trúc của vi sinh vật gặp trong thực phẩm:

2.4.1. Nấm men và nấm mốc

Cả nấm men và nấm mốc đều là sinh vật nhân chuẩn nhưng nấm men là đơn bào trong khi nấm mốc là đa bào. Các tế bào nhân chuẩn thường lớn hơn (20 - 100 μ m) so với các tế bào nhân sơ (1 - 10 μ m). Tế bào nhân chuẩn có thành tế bào rắn chắc và màng sinh chất mỏng. Thành tế bào không chứa mucopolysaccharide, rắn chắc và được cấu tạo từ hydrat cacbon. Màng sinh chất chứa sterol. Tế bào chất linh động (chảy thành dòng) và chứa các bào quan (ty thể, không bào) có màng bao quanh. Ribosome thuộc kiểu 80S và được gắn với lưới nội chất. ADN đứng thẳng hàng (nhiễm sắc thể), chứa các histon và được bao quanh bởi màng nhân. Sự phân bào xảy ra nhờ nguyên phân (tức là sinh sản vô tính); sinh sản hữu tính nếu có thì xảy ra nhờ giảm phân. Nấm mốc có dạng sợi, phân nhánh, không di động. Thành tế bào được cấu tạo từ cellulose, kitin, hoặc cả hai. Một cơ thể nấm mốc (tảo) được cấu tạo từ rất nhiều sợi (hypha). Tập hợp của nhiều sợi được gọi là hệ sợi (mycelium). Một sợi có thể không phân nhánh, phân nhánh đơn nhân, hoặc phân nhánh

đa nhân. Đó có thể là sợi nấm sinh dưỡng hoặc sợi nấm sinh sản. Sợi nấm sinh sản thường vươn vào không khí và tạo nên các bào tử ngoại sinh nằm tự do (bào tử đỉnh) hoặc nằm trong túi (bào tử túi). Hình dạng, kích thước và màu sắc của bào tử được dùng cho phân loại. Nấm men phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Tế bào có hình oval, hình cầu hoặc kéo dài, có kích thước từ 5 — 30 X 2 — 10 μ m. Chúng không di động. Thành tế bào chứa polysaccarit (glycan), protein và lipid. Thành có thể mang những vết sẹo là nơi xảy ra sự nảy chồi. Màng nằm dưới thành. Tế bào chất có dạng hạt mảnh do chứa riboxom và các bào quan. Nhân thể hiện rõ với một màng nhân bao quanh.

2.4.2. Tế bào vi khuẩn

Vi khuẩn là các vi sinh vật đơn bào, hầu hết có kích thước khoảng 0,5 - 1,0 X 2,0 - 10 μ m và có ba dạng hình thái: hình cầu (cocci), hình que (bacilli) và hình dấu phẩy (comma). Chúng có thể tạo các tập đoàn thành từng đám hoặc từng chuỗi (hai tế bào hoặc hơn) hoặc bốn tế bào một. Chúng có thể chuyển động hoặc không chuyển động. Nguyên liệu tế bào chất được bao bọc trong một thành cứng ở phía bề mặt và một màng ở dưới thành. Các chất dinh dưỡng nằm dưới dạng phân tử hoặc ion được vận chuyển từ môi trường qua màng nhờ một vài cơ chế đặc thù. Màng cũng chứa các thành phần phát sinh năng lượng, nó cũng tạo thành các gai đâm vào tế bào chất (mesoxom). Nguyên liệu tế bào chất không chuyển động và không chứa các bào quan được bao bọc bởi một màng tách biệt. Riboxom thuộc loại 70S và phân tán trong tế bào chất. Nguyên liệu di truyền (ADN cấu trúc và ADN plasmit) có dạng vòng không được bao bọc trong một màng nhân và không chứa các protein cơ sở như các histon. Cả sự chuyển gen lẫn sự tái tổ hợp di truyền đều xảy ra nhưng không có sự tạo thành giao tử hoặc hợp tử. Sự phân bào xảy ra bằng cách phân đôi. Các tế bào nhân sơ cũng có thể chứa lông roi, màng gấp, các protein bề mặt và pili cho các chức năng đặc thù. Một số cũng tạo thành nội bào tử (mỗi tế bào một bào tử). Dựa vào đặc tính nhuộm Gram, vi khuẩn được chia thành Gram âm và Gram dương. Các tế bào Gram âm chứa thành tế bào phức tạp có một màng ngoài (OM) và một màng giữa (MM). OM được cấu tạo từ lipopolysaccarit (LPS), lipoprotein (LP) và phospholipit. Các phân tử phospholipit được sắp xếp thành một lớp kép với phần kỵ nước (các axit béo) quay vào trong và phần ưa nước (glyxerol và phosphat) quay ra ngoài. Các

phân tử LPS và LP nằm giữa lớp phospholipit. Lớp OM giới hạn sự vận chuyển và có chức năng như một hàng rào. Tính đề kháng của các vi khuẩn Gram âm với nhiều enzym (lysozym, enzym thủy phân mucopeptit), các phân tử kỵ nước (SDS và muối mật), các chất kháng sinh (penixilin) là do đặc tính hàng rào của lớp OM. Các phân tử LPS cũng có đặc tính kháng nguyên. Nằm dưới lớp OM là lớp MM được cấu từ một lớp peptidoglican hoặc mucopeptit mỏng nằm giữa các nguyên liệu chu chất chứa một vài loại protein. Nằm dưới các nguyên liệu chu chất là màng sinh chất hoặc màng trong (IM) được cấu tạo từ một lớp phospholipit kép mà ở đó có chứa nhiều loại protein. Các tế bào Gram dương chứa một lớp thành dày được cấu tạo từ vài lớp mucopeptit (chịu trách nhiệm đối với cấu trúc dày, rắn) và hai loại axit teichoic. Một số loài cũng có một lớp khác nằm phía trên bề mặt được gọi là lớp protein bề mặt (SLP). Các phân tử axit teichoic của thành được liên kết với các lớp mucopeptit, còn các phân tử lipoteichoic thì được liên kết với cả mucopeptit lẫn màng tế bào chất. Các axit teichoic tích điện âm (do các nhóm phosphat) có thể liên kết hoặc điều hoà sự chuyển động của các phân tử mang điện dương vào và ra khỏi tế bào. Các axit teichoic mang đặc tính kháng nguyên và có thể được sử dụng để xác định vi khuẩn Gram dương bằng phương pháp huyết thanh học. Do tính phức tạp trong thành phần hoá học của thành, các vi khuẩn Gram dương được coi là đã tiến hoá trước các vi khuẩn Gram âm. Thành tế bào vi khuẩn Gram dương (A) và Gram âm (B) CM: Màng tế bào chất; CW: Thành tế bào; SL: Lớp chất nhày.

2.4.3. Virut

Chúng được coi là các thực thể chưa có cấu trúc tế bào. Các virut vi khuẩn (bacteriophago) quan trọng trong vi sinh vật học thực phẩm phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Chúng được cấu thành từ các axit nucleic (ADN hoặc ARN) và một số protein. Các protein tạo nên phần đầu (bao quanh axit nucleic) và phần đuôi. Một bacteriophago tự gắn vào bề mặt của một tế bào vi khuẩn vật chủ và tiêm axit nucleic của nó vào bên trong tế bào vật chủ. Sau đó, nhiều bacteriophago sẽ được tạo thành bên trong tế bào vật chủ và được giải phóng ra ngoài sau khi tế bào bị dung giải. Một số virut gây bệnh đã được xác định là gây ra các bệnh phát sinh từ thực phẩm ở người. Tuy nhiên, vì rằng, chúng khó phát hiện được trong thực phẩm nên sự tham gia của các virut gây bệnh khác

trong các bệnh phát sinh từ thực phẩm còn chưa được biết một cách chính xác. Hai virus quan trọng nhất có liên quan đến các vụ bùng phát phát sinh từ thực phẩm là virus hepatitis A và virus dạng Norwalk, cả hai đều là các virus ARN mạch đơn. Hepatitis A là một virus đường ruột trần, nhỏ, đa diện, đường kính khoảng 30nm. Mạch ARN được bao bọc trong một vỏ capsit.

2.5. Các vi sinh vật quan trọng trong thực phẩm

2.5.1. Các chỉ nấm mốc quan trọng

Nấm mốc quan trọng trong thực phẩm vì chúng có thể sinh trưởng ngay trong các điều kiện mà ở đó nhiều vi khuẩn không thể mọc được như pH thấp, hoạt độ nước (A_w) thấp và áp suất thẩm thấu cao. Nhiều loại nấm mốc được tìm thấy trong thực phẩm. Chúng là những vi sinh vật gây hư hỏng quan trọng. Nhiều chủng cũng sản sinh các mycotoxin và liên quan đến các bệnh ngộ độc do thực phẩm. Nhiều loại được sử dụng trong chế biến sinh học thực phẩm. Cuối cùng, nhiều loài được sử dụng để sản xuất các chất điều vị thực phẩm và các enzym. Một số trong các chi nấm mốc thường gặp nhất trong thực phẩm được liệt kê sau đây. *Aspergillus*: Phân bố rộng và chứa nhiều loại quan trọng trong thực phẩm, các thành viên của chi này có sợi phân nhánh và tạo ra các bào tử hoặc đính bào tử vô tính có màu đen. Nhiều loài là chịu hạn (có khả năng sinh trưởng ở A_w thấp) và có thể sinh trưởng ở trong các hạt, gây ra hư hỏng. Chúng cũng tham gia vào sự gây hư hỏng các loại thực phẩm như mứt, thịt hộp, quả hạch, quả và rau. Một số loài và chủng sản sinh mycotoxin (ví dụ *Aspergillus flavus* sinh aflatoxin). Nhiều loài hoặc chủng cũng được sử dụng trong chế biến thực phẩm hoặc chất điều vị thực phẩm. *Asp. oryzae* được sử dụng để thủy phân tinh bột nhờ α -amylase để sản xuất rượu sake. *Asp. niger* được sử dụng để sản xuất axit citric từ đường saccarose và để sản xuất các enzym như β -galactosidase. *Alternaria*: Các thành viên của chi này có sự phân nhánh và tạo thành bào tử hoặc đính bào tử màu tơi. Chúng gây ra bệnh thối rữa ở cà chua và vị khét ở một số sản phẩm sữa. Một số loài sản sinh mycotoxin. Loài điển hình: *Alternaria tenuis*. *Fusarium*: Nhiều dạng có liên quan đến bệnh thối rữa ở các loại quả, cà chua và ngũ cốc. Chúng tạo nên khuẩn lạc dạng bông và tạo vách ngăn, mang đính bào tử hình lưỡi liềm. Loài điển hình: *Fusarium solani*. *Geotrichum*: Có vách ngăn và tạo thành bào

tử đốt hình chữ nhật. Khi sinh trưởng tạo thành khuẩn lạc dạng kem, bông trông giống như nấm men. Chúng dễ mọc trong các thiết bị và thường sinh trưởng trong các sản phẩm sữa (môc sữa). Loài điển hình: *Geotrichum candidum*. Mucor: Phân bố rộng. Các thành viên có sợi nấm không có vách ngăn và tạo thành các cuống bào tử túi. Chúng tạo thành các khuẩn lạc dạng bông. Một số loài được sử dụng trong lên men thực phẩm và như một nguồn enzym. Chúng gây hư hỏng rau. Loài điển hình: *Mucor rouxii*. *Penicillium*: Phân bố rộng và gồm nhiều loài. Các thành viên có sợi nấm có vách ngăn và tạo thành cuống đính bào tử trên một đầu đính bào tử hình chổi màu lục lam. Một số loài được sử dụng trong sản xuất thực phẩm như *Penicillium roquefortii* và *Pen. camembertii* trong sản xuất phomat. Nhiều loài gây ra các bệnh thối rữa do nấm ô quả và rau. Chúng cũng gây hư hỏng ở ngũ cốc, bánh mì và thịt. Một số chủng sản sinh mycotoxin (ví dụ ochratoxin A). *Rhizopus*: Sợi nấm không có vách ngăn và tạo thành các cuống bào tử túi trong các túi. Chúng gây hư hỏng nhiều loại quả và rau. *Rhizopus stolonifer* là nấm mốc bánh mì màu đen thường gặp

2.5.2. Các chi nấm men quan trọng

Nấm men quan trọng trong thực phẩm do khả năng gây hư hỏng của chúng. Nhiều loài cũng được sử dụng trong chế biến sinh học thực phẩm, Một số được sử dụng để sản xuất các chất điều vị thực phẩm. Một số chi quan trọng được mô tả ngắn sau đây. *Saccharomyces*: Tế bào tròn, hình oval hoặc kéo dài. là chi quan trọng nhất và chứa nhiều nhóm khác nhau. Các biến chủng của *Saccharomyces cerevisiae* được sử dụng trong công nghiệp bánh mì để làm nở bột mì và trong lên men rượu. Chúng cũng gây hư hỏng thực phẩm khi sinh cặn và CO₂. *Pichia*: Tế bào hình oval đến hình trụ tạo thành các đám sợi nấm trong bia, rượu vang và rượu quả từ đó gây hư hỏng sản phẩm. Một số cũng được sử dụng để sản xuất các loại thực phẩm phương Đông. Loài điển hình: *Pichia membranaefaciens*. *Rhodotorula*: Là các nấm men tạo sắc tố và có thể làm mất màu các loại thực phẩm như thịt, cá và dưa chua. Loài điển hình: *Rhodotorula glutinis*, *Torulopsis*: Tế bào có hình cầu tới hình oval. Chúng gây hư hỏng sữa vì chúng có thể lên men đường lactose (ví dụ *Torulopsis versatilis*). Chúng cũng có thể làm hỏng các loại dịch quả cô đặc và các thực phẩm chua. *Candida*: Nhiều loài, làm hỏng các loại thực phẩm chứa độ axit,

muối, đường cao và tạo thành các đám sợi nấm trên bề mặt dịch lỏng. Một số có thể gây khét ô bơ và các sản phẩm sữa (ví dụ *Candida lipolyticum*). *Zygosaccharomyces*: Gây hư hỏng ở các thực phẩm có độ axit cao như nước châm, dưa chuột muối, mứt, mại-o-ne, rau trộn, đặc biệt là các loại chứa ít axit, muối và đường (ví dụ *Zygosaccharomyces bailii*).

2.5.3. Các virus quan trọng

Virus quan trọng trong thực phẩm vì ba nguyên nhân. Một số có thể gây các bệnh đường ruột và do vậy, nếu có mặt trong thực phẩm, Nấm men thuộc chi A gây nên các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Virus hepatitis A và virus dạng Norwalk có liên quan đến các vụ dịch phát sinh từ thực phẩm. Một số virus đường ruột khác như virus polio, virus echo và virus coxsackie có thể gây các bệnh phát sinh từ thực phẩm, ở một số nước có trình độ vệ sinh chưa cao, chúng có thể lây nhiễm thực phẩm và gây bệnh. Một số virus vi khuẩn (bacteriophage) được sử dụng để xác định một số tác nhân gây bệnh (các chủng *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*) dựa vào tính miễn cảm của tế bào đối với hàng loạt bacteriophage ở các độ pha loãng thích hợp.

Bacteriophage được sử dụng để truyền các đặc tính di truyền ở một số loài hoặc chủng vi khuẩn qua quá trình tải nạp (ví dụ ở *Escherichia coli* hoặc *Lactococcus lactis*). Cuối cùng, một số bacteriophage có thể rất quan trọng vì chúng có thể làm hỏng các quá trình lên men. Nhiều vi khuẩn lactic được sử dụng làm giống khởi động trong lên men thực phẩm miễn cảm với các bacteriophage khác nhau. Bacteriophage có thể lây nhiễm và tiêu diệt các giống vi khuẩn khởi động, qua đó làm hỏng sản phẩm. Trong số các vi khuẩn lactic, bacteriophage đã được phân lập từ nhiều loài thuộc các chi *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* và *Lactobacillus*. Còn chưa biết gì về bacteriophage của *Pediococcus*. Nhiều phương pháp thao tác di truyền các giống khởi động lactic đã được tạo ra, nhờ đó chúng trở nên đề kháng với nhiều loại bacteriophage.

2.5.4. Các chi vi khuẩn quan trọng

Việc phân loại vi khuẩn thay đổi nhanh chóng. Trong cuốn *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, xuất bản giữa những năm 1984 - 1988, 420 chi vi khuẩn đã được liệt kê trong chương dựa trên sự khác nhau về đặc tính của chúng. Từ đó đến nay,

nhiều chi khác đã được tạo ra như *Lactococcus* (thuộc nhóm N của *Streptococcus* trước đây) và *Carnobacterium* (một số loài trước đây nằm trong chi *Lactobacillus*). Trong lần xuất bản thứ 9 của *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1993), hơn 560 chi đã được liệt kê trong 35 nhóm. Trong số này có 48 chi chứa các loài thường liên quan tới sự hư hỏng thực phẩm, rủi ro sức khỏe và chế biến sinh học thực phẩm. Các loài thuộc các chi khác ngoài 48 chi này cũng được tìm thấy trong thực phẩm nhưng tầm quan trọng tương đối của chúng còn chưa được xác định rõ. Nhiều tên loài ở một số chi không còn giá trị nữa và do vậy không được tìm thấy trong sách *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* đang lưu hành. Trong cuốn sách này, chỉ những loài và chi hiện đã được phê duyệt và liệt kê trong *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* mới được sử dụng. Các đặc tính quan trọng của các chi này và tầm quan trọng của chúng sẽ được mô tả ở đây. Kể từ lần xuất bản thứ 9 của *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* đến nay, nhiều chi mới đã được bổ sung. Một số có tầm quan trọng trong thực phẩm sẽ được liệt kê ở đây.

2.5.4.1. Các vi khuẩn Gram âm hiếu khí *Campylobacter*:

Có hai loài, *Campylobacter jejuni* và *Cam. coli*, là các tác nhân gây bệnh phát sinh từ thực phẩm. Nhỏ (0,2 - 1 μm), vi hiếu khí, hình xoắn, di động, gặp trong đường ruột của người, động vật và chim. Ưa ấm. *Pseudomonas*: Tế bào hình que thẳng hoặc uốn cong (0,5 - 5 μm), hiếu khí, di động, dinh dưỡng lạnh (sinh trưởng ở nhiệt độ thấp). Phân bố rộng rãi trong môi trường, gồm rất nhiều loài. Một số loài quan trọng trong thực phẩm là *Pseudomonas fluorescens*, *Pse. aeruginosa* và *Pse. putida*. Đó là các vi khuẩn gây hư hỏng quan trọng, có thể chuyển hoá hàng loạt hydrat cacbon, protein và lipid trong thực phẩm. *Xanthomonas*: Hầu hết đặc tính của nhóm này giống như đặc tính của *Pseudomonas*. Gây bệnh thực vật, do vậy có thể gây hư hỏng quả và rau. Các chủng *Xanthomonas campestris* được sử dụng để sản xuất gôm xanthan như một chất làm bền thực phẩm. *Acetobacter*: Hình elip tới hình que (0,6 - 4 μm), đứng một mình hoặc thành chuỗi ngắn; di động hoặc không, hiếu khí, oxi hoá ethanol thành axit axetic, ưa ấm. Làm chua các đồ uống chứa rượu và dịch quả, được sử dụng để sản xuất giấm (axit axetic), có thể làm hỏng một số loại quả. Phân bố rộng trong các loại quả và ở những nơi có lên

men rượu. Loài quan trọng: *Acetobacter aceti*. *Gluconobacter*: Nhiều đặc tính của nhóm này giống với các đặc tính của *Acetobacter*. *Gluconobacter oxydans* gây hư hỏng dưa, táo và lê (gây thối). *Acinetobacter*: Hình que (1 X 2µm) đứng thành cặp hoặc chuỗi nhỏ, chuyển động xoắn do sự có mặt của lông nhưng ở cực tế bào; hiếu khí nghiêm ngặt và sinh trưởng giữa 20 và 35°C. Gặp trong đất, nước, công rãnh. Loài quan trọng: *Acinetobacter calcoaceticus*. *Moraxella*: Hình que rất ngắn, thường gần với hình cầu (1 X 1,5µm), đứng một mình, thành từng cặp hoặc chuỗi ngắn; có thể có màng gấp, chuyển động xoắn có thể gặp ở một số tế bào, sinh trưởng tối ưu ở 30 - 35°C. Gặp ở màng nhầy của người và động vật. Loài quan trọng: *Moraxella lacunata*. 31 *Alteromonas*: Có nguồn gốc từ biển và có mặt trong các loại thực phẩm biển. Cần 100mM NaCl cho sinh trưởng tối ưu (không giống *Pseudomonas*). Vì vậy, *Alteromonas putrefaciens* (loài mới đây được đặt tên lại là *Shewanella putrefaciens*) có nhiều đặc tính giống với *Pseudomonas*, nên trước đây nó được gọi là *Pseudomonas putrefaciens*. Là các chủng quan trọng trong việc gây hư hỏng cá và thịt. Dinh dưỡng lạnh. *Flavobacterium*: Hình que có cạnh song song (0,5 X 3µm), không chuyển động, khuẩn lạc có màu, một số loài là dinh dưỡng lạnh. Gây hư hỏng sữa, thịt và các thực phẩm chứa protein khác. Loài điển hình: *Flavobacterium aquatile*. *Aeromonas*: Hình que hoặc hình cầu-que (0,5 X 1µm), chuyển động, có mặt trong nước, đất và các nguyên liệu chứa phân, ưa ấm. Gây hư hỏng các loại thực phẩm giàu protein. Loài điển hình: *Aeromonas faecalis*. *Brucella*: Hình cầu-que (0,5 X phần lớn đứng đơn độc, không di động. Các loài khác nhau gây ra bệnh ở động vật gồm trâu, bò, lợn và cừu. Chúng cũng là tác nhân gây bệnh ở người và có liên quan tới các bệnh brucellosis phát sinh từ thực phẩm. *Brucella abortus* gây bệnh sảy thai ở bò. *Psychrobacter*: Chi này được tạo ra năm 1986 và chỉ chứa một loài *Psychrobacter immobilis*. Hình cầu—que (1 X 1,5µm) và không di động. Có thể sinh trưởng ở 5°C hoặc thấp hơn, sinh trưởng tối ưu ở 20°C và không có khả năng sinh trưởng ở 35°C. Gặp trong cá, thịt và các sản phẩm gia cầm.

2.5.4.2. Các vi khuẩn Gram âm kỵ khí không bắt buộc *Citrobacter*;

Hình que, thẳng (1 X 4µm), đứng đơn độc hoặc thành cặp, thường di động, ưa ấm. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật, chim và trong môi trường. Nằm trong

nhóm coliform như là một vật chỉ thị về vệ sinh. Loài quan trọng: *Citrobacter freundii*. *Escherichia*: Hình que, thẳng (1 X 4 μ m), di động hoặc không di động, ưa ấm. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật máu nóng và chim. Nhiều chủng không gây bệnh nhưng một số gây bệnh đối với người, động vật và có liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Được sử dụng làm vật chỉ thị về vệ sinh trong nhóm coliform và fecal coliform (về lý thuyết, các chủng này không gây bệnh). Loài quan trọng: *Escherichia coli*. *Enterobacter*: Hình que thẳng (1 X 2 μ m), di động, ưa ấm. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật, chim và trong môi trường. Nằm 32 trong nhóm coliform như là một vật chỉ thị về vệ sinh. Loài quan trọng: *Enterobacter aerogenes*. *Edwardsiella*: Hình que nhỏ (1 X 2 μ m) di động. Gặp trong đường ruột của động vật máu lạnh và trong nước ngọt. Có thể gây bệnh cho người nhưng không thấy có liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm. *Erwinia*: Hình que nhỏ (1 X 2 μ m), đứng thành cặp hoặc chuỗi ngắn, di động, kỵ khí không bắt buộc, sinh trưởng tối ưu ở 30°C. Nhiều loài là tác nhân gây bệnh thực vật và gây hư hỏng các sản phẩm thực vật. Loài điển hình: *Erwinia amylovora*. *Hafnia*: Hình que nhỏ (1 X 2 μ m), di động, ưa ấm. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật, chim và trong môi trường. Có liên quan tới sự hư hỏng thực phẩm. Loài điển hình: *Hafnia alvei*. *Klebsiella*: Hình que, cỡ trung bình (1 X 4 μ m), đứng một mình hoặc thành cặp, di động, có màng gấp, ưa ấm. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật, chim, đất, nước và ngũ cốc. Nằm trong nhóm coliform, là vật chỉ thị về vệ sinh. Loài quan trọng: *Klebsiella pneumoniae*. *Morganella*: Hình que nhỏ (0,5 X 1 μ m), di động, ưa ấm. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật. Có thể gây bệnh nhưng không có liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Loài điển hình: *Morganella morganii*. *Proteus*: Hình que nhỏ, thẳng (0,5 X 1,5 μ m), di động mạnh tạo thành các vết lan trên môi trường thạch, một số sinh trưởng được ở nhiệt độ thấp. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật và trong môi trường. Nhiều loài có liên quan tới sự hư hỏng thực phẩm. Loài điển hình: *Proteus vulgaris*. *Salmonella*: Hình que, cỡ trung bình (1 X 4 μ m)) thường di động, ưa ấm. Có khoảng trên 2.000 serovar và tất cả đều được coi là tác nhân gây bệnh ở người. Gặp trong nội chất đường ruột của người, động vật, chim và côn trùng.

Căn nguyên chủ yếu của các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Loài điển hình: *Salmonella enterica* ssp. *enterica*.

Shigella: Hình que nhỏ, không di động, ưa ấm. Gặp trong đường ruột của người và linh trưởng. Có liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Loài điển hình: *Shigella dysenteriae*. *Serratia*: Hình que nhỏ (0,5 X 1,5µm), di động, khuẩn lạc trắng, hồng hoặc đỏ, một số sinh trưởng được ở nhiệt độ tủ lạnh. Tồn tại trong môi trường gây hư hỏng thực phẩm. Loài điển hình: *Serratia liquefaciens*. *Yersinia*: Hình que nhỏ (0,5 X 1µm), di động hoặc không di động, có thể sinh trưởng ở 1°C. Có mặt trong nội chất đường ruột ở động vật. *Yersinia enterocolitica* đã từng tham gia vào các vụ bệnh dịch phát sinh từ thực phẩm.

Vibrio: Hình que uốn cong (0,5 X 1µm), di động, Ưa ấm, gặp trong nước ngọt và môi trường biển. Một số loài cần NaCl cho sinh trưởng. Một số loài là các tác nhân gây bệnh và liên quan đến các bệnh phát sinh từ thực phẩm (*Vibrio cholerae*, *Vib. parahaemolyticus* và *Vib. vulnificus*), trong khi các loài khác có thể gây hư hỏng thực phẩm (*Vib. alginolyticus*). *Aeromonas*: Hình que nhỏ (0,5 X 1µm), đứng một mình hoặc thành cặp, di động, dinh dưỡng lạnh. Gặp trong môi trường nước. *Aeromonas hydrophila* bị nghi ngờ là tác nhân tiềm tàng gây bệnh phát sinh từ thực phẩm. *Plesiomonas*: Hình que nhỏ (0,5 X 1µm), di động. Gặp ở cá và các loài động vật thủy sinh. *Plesiomonas shigelloides* bị nghi ngờ là tác nhân tiềm tàng gây bệnh phát sinh từ thực phẩm.

2.5.4.3. *Rickettsia Coxiella*:

Gram âm, không di động, tế bào rất nhỏ (0,2 X 0,5µm), sinh trưởng trong các tế bào vật chủ. Tương đối đề kháng với nhiệt độ cao (bị tiêu diệt bởi khử trùng Pasteur). *Coxiella burnetii* gây bệnh nhiễm trùng ở trâu, bò và có liên quan tới bệnh sốt Q ở người (đặc biệt khi ăn sữa chưa khử trùng Pasteur).

2.5.4.4. Các cầu khuẩn Gram dương *Micrococcus*:

Tế bào hình cầu (0,2 X 2µm), đứng thành cặp, bốn tế bào một hoặc từng đám, hiếu khí, không di động. Một số loài tạo khuẩn lạc màu vàng, ưa ấm, đề kháng với xử lý nhiệt thấp. Gặp ở da động vật có vú. Có thể gây hư hỏng thực phẩm. Loài điển hình: *Micrococcus luteus*. *Staphylococcus*: Tế bào hình cầu (0,5 X 1µm), đứng một mình,

thành cặp hoặc thành đám, không di động, ưa ấm, kỵ khí không bắt buộc, sinh trưởng ở 10% NaCl. Các chủng *Staphylococcus aureus* thường có liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm. *Sta. carnosus* được sử dụng để chế biến một số xúc xích lên men. Nơi sống chủ yếu là da của người, động vật và chim. *Streptococcus*: Tế bào hình cầu hoặc hình trứng (1|1 μ m), đứng thành cặp hoặc chuỗi, không di động, kỵ khí không bắt buộc, ưa ấm. *Streptococcus pyogenes* là tác nhân gây bệnh và liên quan tới các bệnh phát sinh từ thực phẩm, có mặt dưới dạng hội sinh trong đường hô hấp 34 của người. *Str. thermophilus* được sử dụng trong lên men sữa, có thể có mặt trong sữa tươi, có thể sinh trưởng ở 50°C. *Enterococcus*: Tế bào gần hình cầu (1|0.5 μ m), đứng thành cặp hoặc chuỗi, không di động, kỵ khí không bắt buộc, một số chủng sống sót khi khử trùng Pasteur, ưa ấm. Nơi sống thông thường là nội chất đường ruột của người, động vật, chim và trong môi trường, có thể bám vào các bề mặt thiết bị, được sử dụng làm vật chỉ thị vệ sinh. Có tầm quan trọng trong sự gây hư hỏng thực phẩm. Loài điển hình: *Enterococcus faecalis*. *Lactococcus*: Tế bào hình trứng dài (0.5 X đứng thành cặp hoặc chuỗi ngắn, không di động, kỵ khí không bắt buộc, ưa ấm, nhưng có thể sinh trưởng ở 10°C, sinh axit lactic. Được sử dụng để sản xuất nhiều loại thực phẩm chế biến sinh học, đặc biệt là các sản phẩm sữa lên men. Loài điển hình: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* và subsp. *cremoris*. Có mặt trong sữa tươi, thực vật, một số chủng sinh bacterioxin, một số có biên độ vật chủ tương đối rộng chống lại các vi khuẩn Gram dương và có tiềm năng như các chất bảo quản sinh học cho thực phẩm. *Leuconostoc*: Tế bào hình cầu hoặc hình hạt đậu, đứng thành cặp hoặc chuỗi ngắn, không di động, kỵ khí không bắt buộc, lên men lactic dị hình, ưa ấm nhưng một số loài và chủng có thể sinh trưởng ở (hoặc dưới) 3°C. Một số được sử dụng trong lên men thực phẩm. Các chủng dinh dưỡng lạnh có liên quan tới sự gây hư hỏng (tạo thành khí) của các thực phẩm đóng gói chân không để tủ lạnh. Gặp ở thực vật, thịt và sữa. Loài điển hình: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. carnosum*. *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* sản sinh dextran khi sinh trưởng trên đường saccharose. Một số chủng sản sinh bacterioxin, một số có phổ rộng chống lại các vi khuẩn Gram dương và các chủng này có tiềm năng sử dụng như là các chất bảo quản sinh học cho thực phẩm. *Pediococcus*: Tế bào hình cầu (1|1 μ m), đứng thành bốn tế

bào một, chủ yếu đứng thành cặp, không di động, kỵ khí không bắt buộc, lên men lactic đồng hình, ưa ấm, song có thể sinh trưởng ở 50°C. Một số loài sống sót sau khử trùng Pasteur. Một số loài và chủng được sử dụng trong lên men thực phẩm. Một số có thể gây hư hỏng các đồ uống chứa cồn. Gặp ở các nguyên liệu thực vật và một số sản phẩm thực phẩm. Loài điển hình: *Pediococcus acidilactici* và *Ped. pentosaceus*. Một số chủng sản sinh bacterioxin, một số có phổ rộng chống lại các vi khuẩn Gram dương và chúng có thể sử dụng làm các chất bảo quản sinh học cho thực phẩm. *Sarcina*: Tế bào hình cầu lớn (1 - 2µm), tồn tại dưới dạng hình lập phương tám tế bào một hoặc hơn, không di động, sinh axit và khí từ hydrat cacbon, kỵ khí không bắt buộc. Có mặt trong đất, các sản phẩm thực vật và phân động vật. Có thể có liên quan tới sự gây hư hỏng thực phẩm có nguồn gốc thực vật. Loài điển hình: *Sarcina maxima*.

2.5.4.5. Các trực khuẩn Gram dương sinh nội bào tử *Bacillus*:

Các tế bào hình que, thẳng, thay đổi nhiều về kích thước (nhỏ, trung bình hoặc lớn; 0,5-1 X 2 - 10µm) và hình dạng (dày hoặc mỏng), đứng đơn độc hoặc thành chuỗi, di động hoặc không di động, ưa ấm, hoặc dinh dưỡng lạnh, hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc. Tất cả đều tạo thành nội bào tử có hình cầu hoặc hình oval nhỏ hoặc lớn (mỗi tế bào một bào tử). Bào tử kháng nhiệt cao. Gồm nhiều loài mà một số trong chúng có tầm quan trọng trong thực phẩm vì chúng có thể gây các bệnh phát sinh từ thực phẩm (*Bacillus cereus*) hoặc gây hư hỏng thực phẩm, đặc biệt là các sản phẩm đóng hộp (*Bac. coagulans*, *Bac. stearothermophilus*). Enzym từ một số loài và chủng có thể được sử dụng trong chế biến sinh học thực phẩm (*Bac. subtilis*), Có mặt trong đất, bụi và các sản phẩm thực vật (đặc biệt là các đồ gia vị). Nhiều loài và chủng có thể sinh enzym ngoại bào thủy phân được các hydrat cacbon, protein và lipid. *Sporobacterales*: Hình que mảnh, kích thước trung bình (1 - 4µm), di động, vi hiếu khí, lên men lactic đồng hình, tạo thành nội bào tử (sự tạo thành bào tử hiếm gặp ở trong hầu hết các môi trường) nhưng bào tử ít bền nhiệt hơn so với các bào tử của *Bacillus*. Gặp ở trong thức ăn của gà và trong đất. Tầm quan trọng trong thực phẩm còn chưa biết rõ. Loài điển hình: *Sporobacterales inulinus*. *Clostridium*: Tế bào hình que, thay đổi nhiều về kích thước, hình dạng, di động hoặc không di động, kỵ khí (một số loài cực kỳ mẫn cảm với oxy), ưa ấm hoặc dinh dưỡng

lạnh. Tạo thành nội bào tử (hình oval hoặc hình cầu) thường nằm ở một cực của tế bào, một số' loài hình thành bào tử nghèo nàn, bào tử bền nhiệt. Gặp trong đất, trong chất lắng cặn của biển, cống rãnh, thực vật đang thối rữa và các sản phẩm động vật hoặc thực vật. Một số là các tác nhân gây bệnh và có tầm quan trọng trong thực phẩm {*Clostridium botulinum*, *Clo. perfringens*), còn các loài khác có tầm quan trọng trong sự gây hư hỏng thực phẩm {*Clo. tyrobutyricum*, *Clo. saccharolyticum*, *Clo. iaramie*). Một số' loài được sử dụng làm nguồn enzyme để thủy phân hydrat cacbon và protein trong chế biến thực phẩm.

2.5.4.6. Trục khuẩn Gram âm sinh nội bào tử *Desulfotomaculum*:

Một loài quan trọng trong thực phẩm là *Desulfotomaculum nigrificans*. Các tế bào có kích thước trung bình, hình que, di động, ưa nhiệt, kỵ khí nghiêm ngặt và sinh H₂S. Nội bào tử hình oval và kháng nhiệt. Gặp trong đất. Gây hư hỏng đối với các thực phẩm đóng hộp.

2.5.4.7. Trục khuẩn Gram dương dạng thông thường không sinh bào tử *Lactobacillus*:

Tế bào hình que thay đổi nhiều về hình dạng và kích thước, một số" rất dài trong khi số" khác lại có dạng hình cầu-hình que, đứng đơn độc hoặc thành chuỗi nhỏ hoặc chuỗi lớn, kỵ khí không bắt buộc; hầu hết các loài đều không di động, ưa ấm (nhưng một số loài là dinh dưỡng lạnh) có thể lên men lactic đồng hình hoặc dị hình. Gặp trong các nguồn thực vật, trong sữa, thịt và phân. Nhiều loài được sử dụng trong chế biến sinh học thực phẩm (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lab. helveticus*, *Lab. plantarum*) và một số" được sử dụng làm chế phẩm probiotics {*Lab. acidophilus*, *Lab. reuteri*, *Lab. casei* subsp. *casei*). Một số loài có thể sinh trưởng ở nhiệt độ thấp trong các sản phẩm bảo quản ở nhiệt độ tủ lạnh (*Lab. sake*, *Lab. curvatus*). Một số' chủng sinh bacterioxin. Trong số' chúng, một số" có phổ rộng có thể được sử dụng làm các chất bảo quản sinh học cho thực phẩm. *Carnobacterium*: Giống về nhiều đặc điểm với các tế bào *Lactobacillus*, gặp trong thịt và cá, kỵ khí không bắt buộc, lên men lactic dị hình, không di động, có thể sinh trưởng trong thực phẩm, đặc biệt là trong các sản phẩm thịt bảo quản trong nhiệt độ tủ lạnh. Một số* chủng sinh bacterioxin. Loài điển hình: *Carnobacterium piscicola*.

Brochothrix: Giống về nhiều đặc điểm với Lactobacillus, kỵ khí không bắt buộc, lên men lactic đồng hình, không di động, gặp trong thịt. Có thể sinh trưởng trong thịt và các sản phẩm thịt đóng gói chân không để trong tủ lạnh. Loài điển hình: Brochothrix thermosphacta. Listeria: Trục khuẩn ngắn ($0,5 \times 1 \mu\text{m}$), đứng một mình hoặc thành chuỗi ngắn, di động, kỵ khí không bắt buộc, có thể sinh trưởng ở 1°C . Tế bào bị tiêu diệt bởi khử trùng Pasteur. Các loài phân bố rộng trong môi trường và được phân lập từ các loại thực phẩm khác nhau. Một số chủng Listeria monocytogenes là các tác nhân gây bệnh quan trọng phát sinh từ thực phẩm.

2.5.4.8. Trục khuẩn Gram dương dạng bất thường không sinh bào tử Corynebacterium:

Hình que hơi uốn cong, một số tế bào nhuộm màu không đều, kỵ khí không bắt buộc, không di động, ưa ẩm, gặp trong môi trường, thực vật và động vật. Một số loài gây hư hỏng thực phẩm. Corynebacterium glutamicum được sử dụng để sản xuất axit glutamic. Brevibacterium: Các tế bào có thể thay đổi từ dạng que đến dạng gần cầu, hiếu khí, không di động, ưa ẩm. Hai loài Brevibacterium linens và Bre. casei có liên quan tới sự tạo thành hương thơm cho một số loại phomat do sản sinh các hợp chất lưu huỳnh (như methanethiol). Trong các sản phẩm giàu protein khác, chúng có thể gây hư hỏng (ở cá). Chúng gặp ở các loại phomat khác nhau và sữa tươi. Propionibacterium: Trục khuẩn đa hình ($0,5 \times 2 \mu\text{m}$), có thể có dạng gần hình cầu, phân nhánh, đứng một mình hoặc thành chuỗi ngắn. Các cấu hình dạng V hoặc Y và thành từng đám giống như chữ Trung Quốc, không chuyển động, kỵ khí, ưa ẩm. Các Propionibacterium sữa được sử dụng trong lên men thực phẩm (Propionibacterium freudenreichii trong sản xuất phomat Thụy Sĩ). Sinh prolin và axit propionic. Gặp trong sữa tươi, phomat Thụy Sĩ và trong thức ăn gia súc ủ chua. Bifidobacterium: Trục khuẩn với nhiều hình dạng khác nhau, đứng một mình hoặc thành chuỗi, sắp xếp thành dạng chữ V hoặc dạng ngôi sao, không di động, ưa ẩm, kỵ khí. Chuyển hoá các hydrat cacbon thành lactac và axetat. Gặp trong ruột già của người, động vật và chim. Một số loài được sử dụng để tạo chế phẩm probiotic (Bifidobacterium bifidum, Bif. infantis, Bif. adolescentis).

2.5.4.9. Một số chi mới:

Dựa trên các nghiên cứu về tính tương đồng của các axit nucleic, một số chi mới đã được hình thành từ các chi đang tồn tại. Một số có tầm quan trọng trong thực phẩm sẽ được liệt kê ở đây. Hầu hết đặc tính của chúng giống với đặc tính của các loài trong các chi cũ. Các ví dụ bao gồm *Tetragenococcus* (từ *Pediococcus*), *Vagococcus* (từ nhóm *Streptococcus* N), *Weissella* và *Oenococcus* (cả hai đều từ *Leuconostoc*), *Kocuria* (từ *Micrococcus*), *Shewanella* (từ *Pseudomonas*) và *Alicyclobacillus* (từ *Bacillus*).

2.6. Các nhóm vi khuẩn quan trọng trong thực phẩm:

Trong số các vi sinh vật gặp trong thực phẩm, vi khuẩn tạo nên nhóm có tầm quan trọng chủ yếu. Điều này không chỉ bởi vì nhiều loài khác nhau có thể có mặt trong thực phẩm mà còn vì tốc độ sinh trưởng nhanh của chúng, khả năng sử dụng các chất dinh dưỡng có trong thực phẩm và khả năng sinh trưởng dưới một sự thay đổi lớn về nhiệt độ, độ thoáng khí, pH hoặc độ nước, cũng như khả năng vượt qua các điều kiện khắc nghiệt như khả năng sống sót của bào tử ở nhiệt độ cao. Để tiện xem xét, các vi khuẩn quan trọng trong thực phẩm đã được tùy tiện chia thành một số nhóm dựa trên cơ sở những sự giống nhau ở một số đặc điểm. Sự xếp nhóm này hoàn toàn không có ý nghĩa phân loại. Dưới đây sẽ xem xét một số trong các nhóm này và tầm quan trọng của chúng trong thực phẩm.

2.6.1. Các vi khuẩn lactic

Chúng là các vi khuẩn sinh những lượng tương đối lớn axit lactic từ hydrat cacbon. Các loài chủ yếu thuộc các chi *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* và *Streptococcus thermophilus* nằm trong nhóm này.

2.6.2. Các vi khuẩn axetic

Chúng là các vi khuẩn sản sinh ra axit axetic như *Acetobacter aceti*.

2.6.3. Các vi khuẩn propionic

Chúng là các vi khuẩn sản sinh axit propionic và được sử dụng trong lên men sữa. Các loài như *Propionibacterium freudenreichii* thuộc về nhóm này.

2.6.4. Các vi khuẩn butyric

Chúng là các vi khuẩn sản sinh axit butyric với những số lượng tương đối lớn. Một số *Clostridium* spp. như *Clostridium butyricum* thuộc về nhóm này.

2.6.5. Các vi khuẩn phân giải protein

Chúng là các vi khuẩn có khả năng thủy phân protein vì chúng sản sinh các proteinase ngoại bào. Các loài trong các chi *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, một số trong họ *Enterobacteriaceae* và *Brevibacterium* thuộc về nhóm này.

2.6.6. Các vi khuẩn phân giải lipid

Chúng là các vi khuẩn có khả năng thủy phân các triglycerit vì rằng chúng sản sinh các lipase ngoại bào. Các loài trong các chi *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* và *Flavobacterium* thuộc về nhóm này.

2.6.7. Các vi khuẩn phân giải đường

Chúng là các vi khuẩn có khả năng thủy phân các hydrat cacbon phức tạp. Các loài trong các chi *Bacillus*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* và *Enterobacter* thuộc về nhóm này.

2.6.8. Các vi khuẩn ưa nhiệt

Chúng là các vi khuẩn có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ 50°C hoặc hơn. Các loài từ các chi *Bacillus*, *Clostridium*, *Pedococcus*, *Streptococcus* và *Lactobacillus* thuộc về nhóm này.

2.6.9. Các vi khuẩn dinh dưỡng lạnh

Chúng là các vi khuẩn có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ của phòng lạnh (khoảng 5°C). Một số loài từ các chi *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Listeria*, *Yersinia* và *Aeromonas* thuộc về nhóm này.

2.6.10. Các vi khuẩn chịu nhiệt

Chúng là các vi khuẩn có khả năng sống sót sau khi được xử lý nhiệt bằng khử trùng Pasteur. Một số loài từ các chi *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Bacillus* (bào tử) và *Clostridium* (bào tử) thuộc về nhóm này.

2.6.11. Các vi khuẩn chịu mặn

Chúng là các vi khuẩn có khả năng tồn tại ở các nồng độ muối cao (khoảng 10%). Một số loài từ các chi Bacillus, Micrococcus, Staphylococcus, Pediococcus, Vibrio và Corynebacterium thuộc về nhóm này.

2.6.12. Các vi khuẩn chịu axit

Chúng là các vi khuẩn có khả năng tồn tại ở pH thấp Lactobacillus, Pediococcus, Lactococcus, Enterococcus và Streptococcus thuộc về nhóm này.

2.6.13. Các vi khuẩn ưa thẩm thấu

Chúng là các vi khuẩn có khả năng sinh trưởng ở một môi trường có áp suất thẩm thấu tương đối cao hơn áp suất cần thiết đối với các vi khuẩn khác. Một số loài từ các chi Staphylococcus, Leuconostoc và Lactobacillus thuộc về nhóm này. Chúng ưa thẩm thấu thấp hơn nhiều so với nấm men và nấm mốc.

2.6.14. Các vi khuẩn sinh khí

Chúng là các vi khuẩn sinh các loại khí (CO₂, H₂, H₂S) khi chuyển hoá các chất dinh dưỡng. Một số loài từ các chi Leuconostoc, Lactobacillus, Propionibacterium, Escherichia, Enterobacter, Clostridium và Desulfotomaculum thuộc về nhóm này.

2.6.15. Các vi khuẩn sinh chất nhày

Chúng là các vi khuẩn sản sinh chất nhày vì chúng tổng hợp các polysaccharit. Một số loài và chủng từ các chi Xanthomonas, Leuconostoc, Alcaligenes, Enterobacter, Lactococcus và Lactobacillus thuộc về nhóm này.

2.6.16. Các vi khuẩn sinh bào tử

Chúng là các vi khuẩn có khả năng sinh bào tử. Các loài từ các chi Bacillus, Clostridium và Desulfotomaculum thuộc về nhóm này. Chúng có thể được phân chia tiếp thành vi khuẩn sinh bào tử hiếu khí, vi khuẩn sinh bào tử kỵ khí, vi khuẩn sinh bào tử chịu axit nhẹ, vi khuẩn sinh bào tử ưa nhiệt và vi khuẩn sinh bào tử tạo thành spore.

2.6.17. Các vi khuẩn hiếu khí

Chúng là các vi khuẩn đòi hỏi oxi cho sinh trưởng và sinh sản. Các loài từ các chi Pseudomonas, Bacillus và Flavobacterium thuộc về nhóm này.

2.6.18. Các vi khuẩn kỵ khí

Chúng là các vi khuẩn không thể sinh trưởng khi có mặt oxi. Các loài Clostridium thuộc về nhóm này.

2.6.19. Các vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc

Chúng là các vi khuẩn có khả năng sinh trưởng cả khi có mặt lẫn khi không có mặt oxi. Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, các tác nhân gây bệnh đường ruột và một số loài Bacillus, Serratia cũng như các coliform thuộc về nhóm này.

2.6.20. Các coliform

Các loài Escherichia, Enterobacter, Citrobacter và Klebsiella thuộc về nhóm này. Chúng được sử dụng làm chỉ số về vệ sinh.

2.6.21. Các coliform phân

Chủ yếu là Escherichia coli thuộc nhóm này. Chúng cũng được sử dụng làm chỉ số về vệ sinh.

2.6.22. Các tác nhân gây bệnh đường ruột

Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, Escherichia, Vibrio, Listeria, hepatitis A, gây bệnh và các chi khác có thể gây nhiễm trùng đường ruột dạ dày thuộc về nhóm này. Do tầm quan trọng của các nhóm vi khuẩn này trong thực phẩm, nhiều kỹ thuật phòng thí nghiệm đã được thiết kế để phát hiện một nhóm đặc thù thay cho việc phát hiện một chi hoặc một loài đặc thù. Tương tự, các kỹ thuật kiểm soát đôi khi cũng được thiết kế để tiêu diệt hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của một nhóm đặc thù.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 2

1. Kể 5 phương pháp được sử dụng trong phân loại vi khuẩn. Tại sao các trình tự nucleotit trong ARNr 16S được sử dụng như một kỹ thuật quan trọng trong phân loại?
2. Giải thích các thuật ngữ sau đây và cho một ví dụ đối với mỗi thuật ngữ về phương diện danh pháp học vi khuẩn: (a) họ, (b) chi, (c) loài, (d) dưới loài, và (e) biovar (sử dụng phương pháp khoa học trong các ví dụ). Cho biết số" nhiều của Lactobacillus, Staphylococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Listeria, và Salmonella.
3. Kể những sự khác nhau cơ bản giữa nấm men, nấm mốc, vi khuẩn và bacteriophage quan trọng trong thực phẩm.

4. Kể những sự khác biệt về bản chất hoá học và chức năng của các cấu trúc thành tế bào giữa các vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Điều này có thể giúp xác định các đặc tính bất màu Gram của một chủng vi khuẩn chưa biết như thế nào?
5. Kể tên 4 loài nấm mốc và 2 loài nấm mốc quan trọng nhất trong thực phẩm.
6. Thảo luận về tầm quan trọng của các bacteriophage trong thực phẩm. Giải thích ngắn gọn prion khác bacteriophage ở chỗ nào?
7. Trong các nhóm vi sinh vật sau đây, mỗi nhóm kể tên hai chi:
 - a) Trục khuẩn hiếu khí Gram dương.
 - b) Trục khuẩn kỵ khí không bắt buộc Gram âm.
 - c) Cầu khuẩn Gram dương.
 - d) Trục khuẩn sinh bào tử Gram dương.
 - e) Trục khuẩn không sinh bào tử Gram dương. Kể các đặc tính chung được sử dụng để xếp các chi hay các loài thành nhóm và mỗi nhóm cho một tên chi làm ví dụ.

CHƯƠNG 3: TRAO ĐỔI CHẤT Ở VI SINH VẬT

Tóm tắt:

Trong phạm vi sinh trưởng, các môi trường vật lý và hoá học kiểm soát sinh trưởng của vi sinh vật chủ yếu bằng cách ảnh hưởng lên quá trình trao đổi chất có liên quan tới sự tổng hợp năng lượng và các thành phần tế bào của chúng. Vượt qua phạm vi sinh trưởng, các yếu tố này, đứng riêng rẽ hoặc kết hợp, có thể được sử dụng để khống chế sinh trưởng của vi sinh vật và thậm chí tiêu diệt chúng. Sinh trưởng thực sự được thực hiện nhờ sự chuyển hoá các chất dinh dưỡng khác nhau có trong thực phẩm.

3.1. Mở đầu:

Khả năng của vi sinh vật (trừ virus) sinh trưởng hoặc sinh sản trong một loại thực phẩm được quyết định bởi môi trường thực phẩm cũng như môi trường bảo quản thực phẩm cũng được gọi là môi trường bên trong và môi trường bên ngoài của thực phẩm. Không thể nghiên cứu ảnh hưởng của bất kỳ yếu tố* nào lên sinh trưởng một cách độc lập vì các yếu tố" có quan hệ tương hỗ với nhau. Ngược lại, ảnh hưởng của bất kỳ yếu tố" nào lên sinh trưởng cũng sẽ được so sánh khi giữ các yếu tố" khác không thay đổi.

3.2. Các yếu tố bên trong hoặc môi trường thực phẩm:

Các yếu tố' bên trong của một loại thực phẩm bao gồm các chất dinh dưỡng, các nhân tố' sinh trưởng và các chất kìm hãm (hay là các chất kháng vi sinh vật), hoạt độ nước, pH và thế oxi hoá-khử. Ảnh hưởng của mỗi yếu tố' lên sinh trưởng sẽ được thảo luận một cách tách biệt. Tuy nhiên, như đã nói ở trên, trong một hệ thực phẩm, các yếu tố cùng có mặt và cùng gây nên hiệu quả lên sinh trưởng trong sự kết hợp với nhau, hoặc theo hướng có lợi, hoặc theo hướng có hại.

3.2.1. Các chất dinh dưỡng và sinh trưởng

Sinh trưởng của vi sinh vật được thực hiện qua sự tổng hợp các thành phần tế bào và năng lượng. Các chất dinh dưỡng cần thiết cho quá trình này có nguồn gốc từ môi trường trực tiếp của tế bào vi khuẩn và nếu tế bào đang sinh trưởng trong một loại thực phẩm

thì chính thực phẩm sẽ cung cấp các chất dinh dưỡng. Các chất dinh dưỡng này bao gồm hydrat cacbon, protein, lipit, muối khoáng và các vitamin. Nước không được coi là một chất dinh dưỡng mà nó cần như một môi trường cho các phản ứng hoá sinh dùng để tổng hợp sinh khối tế bào và năng lượng. Mọi loại thực phẩm đều chứa 5 nhóm chất dinh dưỡng chủ yếu nói trên một cách tự nhiên hoặc được bổ sung thêm từ bên ngoài, đồng thời hàm lượng của chúng dao động nhiều tùy loại thực phẩm. Nói chung thịt giàu protein, lipit, muối khoáng và vitamin nhưng nghèo hydrat cacbon hơn. Các thực phẩm có nguồn gốc thực vật lại giàu hydrat cacbon nhưng có thể nghèo protein, muối khoáng và một số vitamin. Một số loại thực phẩm như sữa và nhiều loại thực phẩm chế biến chứa cả 5 loại chất dinh dưỡng nói trên với hàm lượng đủ đáp ứng cho sinh trưởng của vi sinh vật. Các nhóm vi sinh vật có mặt thường xuyên trong thực phẩm thường có nhu cầu dinh dưỡng thay đổi nhiều. Vi khuẩn có nhu cầu cao nhất, sau đó đến nấm men và nấm mốc.

Các vi sinh vật khác nhau nhiều về khả năng sử dụng các hydrat cacbon phân tử lớn và phức tạp (như tinh bột và cellulose) các protein lớn (ví dụ casein có trong sữa) và các lipit. Các vi sinh vật có khả năng sử dụng các phân tử này thường tạo ra các enzym ngoại bào chuyên hoá để thủy phân các phân tử phức tạp thành các dạng đơn giản hơn bên ngoài tế bào trước khi vận chuyển chúng vào bên trong tế bào. Nấm mốc có khả năng cao nhất về mặt này. Điều này tạo một cơ hội cho một loài sinh trưởng được trong một quần thể hỗn hợp ngay cả khi nó không có khả năng chuyển hoá các phân tử phức tạp. Các tế bào vi sinh vật sau khi chết và bị dung giải sẽ giải phóng ra các enzym nội bào có khả năng xúc tác sự phân giải các chất dinh dưỡng có trong thực phẩm thành các chất đơn giản hơn, các dạng này sau đó lại được dùng làm nguồn dinh dưỡng cho các vi sinh vật khác.

3.2.1.1. Các hydrat cacbon trong thực phẩm

Các hydrat cacbon chủ yếu có mặt trong các loại thực phẩm khác nhau một cách tự nhiên hoặc được thêm vào dưới dạng các hợp phần, có thể được xếp thành nhóm, dựa trên bản chất hoá học của chúng, như sau: Các monosaccarit:

Các hexose: glucose, fructose, mannose, galactose.

Các pentose: xylose, arabinose, ribose, ribulose, xylulose.

Các disaccarit: Lactose (galactose + glucose).

Saccharose (fructose + glucose).

Maltose (glucose + glucose).

Các oligosaccarit:

Raffinose (glucose + fructose + galactose).

Stachyose (glucose + fructose + galactose + galactose).

Các polysaccarit: Tinh bột (các đơn vị glucose).

Glycogen (các đơn vị glucose).

Cellulose (các đơn vị glucose).

Inulin (các đơn vị fructose).

Hemicellulose (các đơn vị xylose, galactose, mannose).

Các dextran (cao phân tử của α -1,6 glucose).

Các pectin. Gôm và chất nhày.

Lactose chỉ gặp trong sữa và do vậy có mặt trong các loại thực phẩm được làm từ sữa hoặc chứa sữa và các sản phẩm sữa. Glycogen có mặt trong các mô động vật, đặc biệt là trong gan. Các pentose, hầu hết các oligosaccarit và polysaccarit có mặt tự nhiên trong các loại thực phẩm có nguồn gốc thực vật. Thông thường, mọi vi sinh vật gặp trong thực phẩm đều chuyển hoá glucose, nhưng khả năng sử dụng các hydrat cacbon khác thì khác nhau đáng kể. Sở dĩ như vậy là vì tính bất lực của một số vi sinh vật trong việc vận chuyển một số monosaccarit và disaccarit đặc thù vào trong tế bào và tính bất lực trong việc thủy phân các polysaccarit bên ngoài tế bào. Nấm mốc là bọn có khả năng sử dụng các polysaccarit tốt nhất. Các loại hydrat cacbon của thực phẩm được chuyển hoá bởi vi sinh vật cơ bản nhằm cung cấp năng lượng theo một số con đường trao đổi chất nhất định. Một số sản phẩm trao đổi chất có thể được sử dụng để tổng hợp các thành phần tế bào của vi sinh vật (ví dụ, để tạo ra các amino axit nhờ sự amin hoá một số keto axit). Các vi sinh vật cũng tạo ra các sản phẩm trao đổi chất phụ có liên quan tới sự gây hư hỏng thực phẩm (CO_2 tạo ra các lỗ khí) hoặc sự chế biến sinh học thực phẩm (axit lactic trong các thực phẩm lên men). Một số cũng được chuyển hoá để sản sinh các axit hữu cơ

nư axit lactic, axit propionic và butyric, các axit này có hiệu quả đối kháng lên sinh trưởng và sự tồn tại của nhiều loại vi khuẩn. Vi sinh vật cũng có thể trùng hợp hoá một số monosaccarit để tạo ra các hydrat cacbon phức tạp như dextran, các nguyên liệu của màng giáp và thành tế bào (hoặc màng ngoài và màng giữa ở các vi khuẩn Gram âm). Một số các hydrat cacbon này từ các tác nhân gây bệnh có thể gây ra những sự rủi ro cho sức khỏe (tạo thành các phức chất với protein), một số có thể gây hư hỏng thực phẩm (như triệt tiêu lớp chất nhày), một số có thể được sử dụng trong sản xuất thực phẩm (các dextran được dùng làm chất làm bền). Các phương thức chuyển hoá hydrat cacbon được sử dụng rộng rãi trong phòng thí nghiệm để nhận dạng bằng hoá sinh học các vi sinh vật chưa biết phân lập được từ thực phẩm.

3.2.1.2. Protein trong thực phẩm

Các thành phần chứa protein trong các loại thực phẩm là các protein đơn giản, protein kết hợp, các peptit, các hợp chất nitơ phi protein (NPN) (các amino axit, ure, ammoniac, creatinin, trimethylamin). Các protein và các peptit là các chất trùng hợp chứa các amino axit khác nhau không có hoặc có các thành phần hữu cơ (như hydrat cacbon), hoặc vô cơ (như sắt) và chứa khoảng 15 - 18% ni tơ. Các protein đơn giản của thực phẩm là các chất trùng hợp chứa amino axit như albumin (trong trứng), globulin (trong sữa), glutelin (gluten trong ngũ cốc), prolamin (zein trong hạt) và albuminoid (collagen trong cơ). Chúng khác nhau nhiều về độ hoà tan, đặc tính này xác định khả năng của vi sinh vật trong việc sử dụng một protein đặc thù. Nhiều vi sinh vật có thể thuỷ phân albumin là chất hoà tan trong nước. Ngược lại collagen không hoà tan trong nước hoặc trong các dung dịch muối và axit loãng, chỉ được thuỷ phân bởi một vài loại vi sinh vật. So với các protein đơn giản thì các protein kết hợp của thực phẩm khi khi thuỷ phân sẽ sinh ra các kim loại (các metalloprotein như hemoglobin và myoglobin), hydrat cacbon (các glycoprotein dưới dạng mucin), phosphat (các phosphoprotein như casein), lipit (các lipoprotein như một số loại có mặt trong gan). Các protein có mặt với hàm lượng cao hơn trong các loại thực phẩm có nguồn gốc động vật so với các loại thực phẩm có nguồn gốc thực vật. Song các thực phẩm thực vật như quả, hạt, hoặc đậu lại giàu protein. Các protein dưới dạng hợp phân cũng có thể được bổ sung vào thực phẩm.

Vi sinh vật khác nhau nhiều về khả năng chuyển hoá các protein thực phẩm của chúng. Hầu hết vận chuyển các amino axit và các peptit nhỏ vào bên trong tế bào như là một số" *Lactococcus* spp. Vi sinh vật cũng tạo ra các proteinase và các peptidase ngoại bào để thủy phân những protein và peptit lớn thành các peptit và các amino axit nhỏ trước khi các chất này có thể được vận chuyển vào bên trong tế bào. Các protein hoà tan miễn cảm hơn đối với hoạt động thủy phân này có thể là thành phần không mong muốn (do làm mất kiến tạo trong thịt) hoặc mong muốn (tạo hương vị trong phomat). Các vi sinh vật cũng có thể chuyển hoá các hợp chất NPN khác nhau gặp trong các loại thực phẩm.

Các amino axit nằm bên trong tế bào vi khuẩn được chuyển hoá theo các con đường khác nhau để tổng hợp các thành phần tế bào, năng lượng và các sản phẩm phụ khác nhau. Nhiều trong số các sản phẩm phụ này là các thành phần không mong muốn (ví dụ việc tạo ra NH_3 và H_2S làm hỏng thực phẩm và các độc tố" cũng như các amin sinh học gây rủi ro sức khỏe), hoặc mong muốn (ví dụ một số" hợp chất của lưu huỳnh tạo hương thơm cho phomat cheddar). Sự sản sinh các sản phẩm trao đổi chất đặc thù được sử dụng để nhận dạng các chủng vi sinh vật phân lập được từ thực phẩm trong phòng thí nghiệm. Ví dụ như khả năng của *Escherichia coli* tạo thành indol từ tryptophan, được sử dụng để phân biệt loài này với các loài họ hàng không sản sinh indol (như *Enterobacter* spp.).

3.2.1.3. Lipit trong thực phẩm

Lipit trong thực phẩm gồm các hợp chất có khả năng chiết được bằng các dung môi hữu cơ mà một số" trong đó là các axit béo, các glyxerit, các phospholipit, các chất sáp và các sterol. Lipit trong các loại thực phẩm có nguồn gốc động vật phong phú hơn trong các loại thực phẩm có nguồn gốc thực vật mặc dù quả hạch, các hạt có dầu, dừa, ô liu lại chứa hàm lượng lipit cao hơn. Các thực phẩm chế biến có thể rất dao động về hàm lượng lipit. Các cholesterol thường có mặt trong các loại thực phẩm có nguồn gốc động vật và các thực phẩm chứa các hợp phần từ nguồn động vật. Nói chung lipit là các chất ít được ưa chuộng đối với sự tổng hợp năng lượng và nguyên liệu tế bào ở vi sinh vật. Nhiều loại vi sinh vật có thể tạo ra các lipase ngoại bào, enzym này có thể thủy phân các glyxerit thành axit béo và glyxerol. Các axit béo có thể được vận chuyển vào tế bào và

được sử dụng để tổng hợp năng lượng trong khi glyxerol có thể được chuyển hoá tách biệt. Một số vi sinh vật cũng tạo ra các oxidase ngoại bào, enzym này có khả năng oxy hoá các axit béo chưa bão hoà để tạo ra các aldehyt và keton khác nhau. Nói chung, nấm mốc có khả năng sản sinh các enzym này mạnh hơn. Tuy nhiên, một số nhóm vi khuẩn như *Pseudomonas*, *Achromobacter* và *Alicaiigenes* cũng có khả năng sản sinh các enzym. Việc dung giải các tế bào vi sinh vật chết trong thực phẩm làm giải phóng các lipase và oxidase nội bào, các enzym này sau đó có thể thực hiện các phản ứng hoá học. Trong nhiều loại thực phẩm, hoạt động của các enzym này có liên quan tới sự gây hư hỏng (ví dụ làm khét), trong khi ở các loại thực phẩm khác, các enzym trở nên có ích vì tạo ra các hương thơm mong muốn (ví dụ ở các loại phomat được làm chín bởi nấm mốc). Một số vi sinh vật đường ruột có ích như các chủng *Lactobacillus acidophilus* có thể chuyển hoá cholesterol và người ta cho rằng, chúng có khả năng làm giảm nồng độ cholesterol trong huyết thanh của người.

3.2.1.4. Muối khoáng và vitamin ở thực phẩm

Vi sinh vật cần một vài nguyên tố ở liều lượng nhỏ như phospho, canxi, magie, sắt, lưu huỳnh, mangan và kali. Hầu hết các thực phẩm đều chứa các nguyên tố này với số lượng đầy đủ. Nhiều vi sinh vật có thể tổng hợp các vitamin nhóm B và các loại thực phẩm cũng chứa hầu hết các vitamin nhóm B. Nói chung, hầu hết các loại thực phẩm đều chứa các hydrat cacbon, protein, lipid, muối khoáng và các vitamin với số lượng đầy đủ để cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết cho sinh trưởng của nấm mốc, nấm men và vi khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn Gram âm thường có mặt trong thực phẩm. Một số loại thực phẩm có thể chứa những hàm lượng giới hạn một hoặc một vài chất dinh dưỡng cần cho sự sinh trưởng nhanh của một số vi khuẩn Gram dương, đặc biệt là một số loài *Lactobacillus* khó tính. Khi sự sinh trưởng của chúng cần được kích thích thì một số hydrat cacbon, amino axit không thay thế và các vitamin nhóm B có thể được bổ sung vào thực phẩm. Sẽ không thể hoặc không thực tế nếu muốn không chế sự sinh trưởng của vi sinh vật trong một loại thực phẩm bằng cách hạn chế các chất dinh dưỡng.

3.2.2. Các nhân tố sinh trưởng và các chất kìm hãm trong thực phẩm

Thực phẩm cũng có thể chứa một số yếu tố kích thích sinh trưởng hoặc gây hiệu quả âm tính lên sinh trưởng của vi sinh vật. Bản chất chính xác của các nhân tố' sinh trưởng còn chưa được biết rõ, nhưng chúng có mặt một cách tự nhiên trong một số" loại thực phẩm. Ví dụ, các nhân tố' sinh trưởng có mặt trong cà chua kích thích sinh trưởng ở một số" loài *Lactobacillus*. Các yếu tố này có thể được thêm vào các nguyên liệu thô trong quá trình chế biến sinh học thực phẩm, hoặc thêm vào môi trường để phân lập một số" loài vi khuẩn khó tính từ thực phẩm. Thực phẩm cũng chứa những chất hoá học hoặc một cách tự nhiên, hoặc được thêm vào, có thể gây tác động xấu lên sinh trưởng của vi sinh vật. Một số chất kìm hãm tự nhiên là lysozym có trong trứng, agglutinin trong sữa và eugenol trong cây đinh hương. Các chất kìm hãm tùy thuộc vào cơ chế tác động của chúng có thể ngăn ngừa hoặc làm giảm sinh trưởng của vi sinh vật hoặc giết chết vi sinh vật.

3.2.3. Hoạt độ nước và sinh trưởng

3.2.3.1. Nguyên tắc

Hoạt độ nước (A_w) là số" đo sự có sẵn của nước dùng được cho các chức năng sinh học và có liên quan tới hàm lượng nước có mặt trong thực phẩm dưới dạng tự do. Trong một hệ thực phẩm, lượng nước tổng số" hoặc độ ẩm có thể có mặt dưới dạng tự do và dạng liên kết. Nước liên kết là phần được sử dụng để hydrat hoá các phân tử ưa nước và để hoà tan các chất tan và nó không dùng được cho các chức năng sinh học; do vậy nó không thuộc về A_w . A_w của một loại thực phẩm có thể được biểu diễn bằng tỷ lệ giữa áp lực hơi nước của thực phẩm đó (p , < 1) với áp lực của nước tinh khiết (P_o , $=1$) tức là P_o/P . Nó dao động giữa khoảng 0 đến 1 và chính xác hơn là từ >0 đến <1 vì rằng, không có loại thực phẩm nào có hoạt độ nước bằng 0 hoặc bằng 1. A_w của một loại thực phẩm có thể được xác định từ độ ẩm tương đối ở trạng thái cân bằng (ERH) bằng cách chia ERH cho 100 (vì ERH được biểu hiện bằng phần trăm).

3.2.3.2. A_w của thực phẩm

A_w của thực phẩm dao động từ khoảng 0,1 - 0,99. Các giá trị A_w của một số nhóm thực phẩm như sau: ngũ cốc, bánh bích quy, đường, muối, sữa bột là 0,10 - 0,20; mì sợi, mật ong, socola, trứng khô là $<0,60$; mứt, thạch, quả khô, phomat parmesan, quả

hạch là từ 0,60 - 0,85; xúc xích lên men, thịt hun khói khô, sữa đặc có đường, siro quả thường là 0,85 - 0,93; sữa đã bay hơi, nước ép cà chua, bánh mì, dịch quả, cá ướp muối, xúc xích, phomat đã chế biến là 0,93 - 0,98; còn thịt tươi, cá, quả, rau, sữa, trứng là 0,98 - 0,99. Aw của các loại thực phẩm có thể được hạ thấp bằng cách loại bỏ nước (giải hấp) và được nâng cao bằng cách hấp phụ thêm nước và hai thông số" này có thể được sử dụng để vẽ một biểu đồ đẳng nhiệt hấp phụ đối với một loại thực phẩm. Quá trình giải hấp phụ sẽ cho các giá trị Aw tương đối thấp hơn so với quá trình hấp phụ tại cùng một độ ẩm của thực phẩm. Đây là một đại lượng quan trọng trong việc không chế vi sinh vật bằng việc làm giảm Aw của một loại thực phẩm. Aw của một loại thực phẩm có thể được hạ thấp bằng một số biện pháp, chẳng hạn thêm các chất hoà tan, các ion, các loại keo ưa nước và làm đông lạnh hoặc làm khô.

3.2.3.3. Aw và sinh trưởng của vi sinh vật

Phần nước tự do trong một loại thực phẩm cần cho sinh trưởng của vi sinh vật. Nó cần để vận chuyển các chất dinh dưỡng và loại bỏ các chất thải, thực hiện các phản ứng enzym, tổng hợp các nguyên liệu tế bào và tham gia vào các phản ứng hoá sinh khác như phản ứng thủy phân các chất trùng hợp thành các đơn phân tử (protein thành amino axit). Mỗi loài hoặc nhóm vi sinh vật có một mức độ Aw tối ưu, cực đại và cực tiểu cho sinh trưởng. Nói chung các giá trị Aw tối thiểu cho sinh trưởng của một nhóm vi sinh vật như sau: hầu hết nấm mốc là 0,8, nấm mốc ưa khô thấp tới 0,6, hầu hết nấm men 0,85, nấm mốc ưa ẩm thấp 0,6 - 0,7; hầu hết vi khuẩn Gram dương 0,90 và vi khuẩn Gram âm 0,93. Một số ngoại lệ là sinh trưởng của *Staphylococcus aureus* xảy ra ở 0,85 và của vi khuẩn ưa mặn ở 0,75. Aw cần thiết cho các vi khuẩn sinh bào tử để hình thành bào tử và cần thiết cho các bào tử để nảy mầm, cần cho các vi sinh vật sinh độc tố' để tạo ra độc tố" nói chung cao hơn Aw cực tiểu dành cho sinh trưởng của chúng. Tương tự, Aw cực tiểu cho sinh trưởng trong một điều kiện lý tưởng thấp hơn trong điều kiện không lý tưởng. Ví dụ, nếu Aw cực tiểu đối với sinh trưởng của một chủng sinh trưởng ở pH 6,8 là 0,91 thì ở pH 5,5 nó có thể là 0,95 hoặc hơn. Khi Aw bị hạ xuống thấp hơn mức tối thiểu cần thiết cho sinh trưởng của vi sinh vật thì tế bào vẫn sẽ còn sống sót trong một thời gian nhưng nếu Aw bị giảm một cách đột ngột thì các tế bào vi sinh vật trong quần thể sẽ mất khả

năng sông sót, thường lúc đầu rất nhanh sau đó chậm dần. Thông tin này được sử dụng để không chế các vi sinh vật gây hư hỏng thực phẩm và các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm cũng như để nâng cao sinh trưởng của các loài mong muốn trong quá trình chế biến sinh học thực phẩm (như thêm muối khi chế biến thịt hun khói), hoặc trong việc phát hiện các vi sinh vật trong phòng thí nghiệm (thêm muối vào môi trường khi xác định số" lượng *Sta. aureus*).

3.2.4. pH và sinh trưởng

3.2.4.1. Nguyên tắc

pH chỉ ra nồng độ ion hydro trong một hệ thống và được biểu diễn dưới dạng $-\log [H^+]$, tức là logarit âm của nồng độ ion hydro hoặc proton, Nó dao động từ 0 đến 14, trong đó 7 là pH trung tính. Các nồng độ H^+ có thể khác nhau trong một hệ thống tùy thuộc vào loại axit nào có mặt. Một số axit mạnh được sử dụng trong thực phẩm như HCl và axit phosphoric sẽ phân ly hoàn toàn, các axit yếu như axit axetic hoặc axit lactic sẽ giữ cân bằng giữa dạng phân ly và dạng không phân ly.

$[HC1] \rightarrow [H^+] + [C1^-]$, pH của HC0,1 N là 1,1.

$CH_3COOH \rightarrow [H^+] + [CH_3COO^-]$, pH của CH_3COOH 0,1N là 2,9. Độ axit là sự đảo ngược của pH; một hệ thống có độ axit cao sẽ có pH thấp và ngược lại.

3.2.4.2. pH của thực phẩm

Tùy thuộc vào kiểu thực phẩm, pH có thể thay đổi nhiều. Dựa trên cơ sở pH, thực phẩm có thể được chia thành các thực phẩm có độ axit cao (pH dưới 4,6) và thực phẩm có độ pH thấp (4,6 hoặc cao hơn). Đa số quả, dịch quả, thực phẩm lên men (từ quả, rau, thịt hoặc sữa) và dầu giấm có độ axit cao (pH thấp), trong khi đa số" rau, thịt, cá, sữa và xúp có độ axit thấp (pH cao). Tuy nhiên, cà chua là một loại rau có độ axit cao (pH từ 4,1- 4,4). Giới hạn pH cao của hầu hết các loại thực phẩm có độ axit thấp nằm dưới 7,0, chỉ có một số loại thực phẩm như trai, sò (pH 7,1) và lòng trắng trứng (pH 8,5) là pH vượt quá 7. Tương tự giới hạn pH thấp của hầu hết các loại thực phẩm có độ axit cao nằm dưới 3,0 loại trừ ở một số" loại quả có múi (chanh, cam, bưởi) và dịch quả quýt, ở đó pH có thể nằm dưới 2,2. Độ axit của các loại thực phẩm có thể có nguồn gốc tự nhiên (như trong quả), được tạo ra trong lên men (như trong các loại thực phẩm lên men), hoặc được

thêm vào trong quá trình chế biến (như trong các loại dầu giấm). Các thực phẩm cũng có thể chứa các hợp chất có khả năng đệm. Một loại thực phẩm như sữa và thịt, do khả năng đệm tốt, sẽ không bị giảm pH khi so với một sản phẩm thực vật khi có mặt một lượng axit như nhau.

3.2.A.3. pH và sinh trưởng của vi sinh vật

pH của một loại thực phẩm có ảnh hưởng sâu sắc lên sinh trưởng và độ sống sót của các tế bào vi sinh vật. Mỗi loài có một pH tối ưu và một phạm vi pH cho sinh trưởng. Nói chung, nấm mốc và nấm men có khả năng sinh trưởng ở pH thấp hơn so với vi khuẩn và các vi khuẩn Gram âm mẫn cảm hơn đối với pH thấp so với các vi khuẩn Gram dương. Phạm vi pH đối với sinh trưởng dành cho nấm mốc là 1,5—9,0; cho nấm men là 2,0-8,5; với vi khuẩn Gram dương là 4,0-8,5; với vi khuẩn Gram âm là 4,5-9,0. Từng loài riêng biệt lại khác nhau nhiều về giới hạn pH thấp đối với sinh trưởng; chẳng hạn *Pedococcus acidilactici* có thể sinh trưởng ở pH 3,8, còn *Sta. aureus* có thể sinh trưởng ở pH 4,5, là những pH mà thông thường *Salmonella* không thể sinh trưởng. Giới hạn pH thấp đối với sinh trưởng của một loài có thể cao hơn một chút nếu pH được điều chỉnh bằng axit mạnh thay cho một axit yếu (do các phân tử không phân ly của chúng). Các chủng kháng axit hoặc chịu axit có thể nhận được tính đề kháng với pH thấp so với các chủng khác thuộc cùng một loài (ví dụ, các *Salmonella* kháng axit). Khi pH trong một loại thực phẩm bị giảm xuống dưới giới hạn thấp dành cho sinh trưởng của một loài vi sinh vật thì tế bào không chỉ dừng sinh trưởng mà còn mất khả năng sống, tốc độ của nó tùy thuộc vào độ lớn của sự giảm pH. Điều này thể hiện rõ ràng với các axit yếu, đặc biệt với các axit có hằng số* phân ly (pK) cao hơn, như axit axetic so với axit lactic (có giá trị pK là 4,8 so với 3,8). Sở dĩ như vậy là vì ở cùng pH, axit axetic chứa nhiều phân tử không bị phân ly hơn so với axit lactic. Các phân tử không bị phân ly do ưa lipid, sẽ xâm nhập vào trong tế bào và được phân ly để tạo thành H^+ trong tế bào chất. Điều này gây ra sự giảm pH nội bào, hậu quả là sẽ phá hủy gradient proton giữa phía bên trong và phía bên ngoài tế bào và làm biến mất lực chuyển dời proton (PMF) cũng như khả năng phát sinh năng lượng của tế bào. Thông tin về ảnh hưởng của pH lên sinh trưởng và khả năng sống sót của các tế bào vi sinh vật có tầm quan trọng để phát triển các phương pháp ngăn

ngừa sinh trưởng của các loại vi sinh vật không mong muốn trong thực phẩm (ví dụ, trong các thực phẩm được axit hoá), được sử dụng để tạo ra một số loại thực phẩm lên men (ví dụ sự sinh trưởng lần lượt của các vi khuẩn lactic trong sự lên men dưa chua) và để phân lập một cách chọn lọc các vi sinh vật chịu axit từ thực phẩm (ví dụ, nấm men và nấm mốc trong một môi trường có pH 3,5). Tính chịu axit nhận được bởi các tác nhân gây bệnh và các vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm sẽ làm cho việc kiểm soát các thực phẩm có pH thấp gặp nhiều khó khăn.

3.2.5. Thế oxi hoá-khử, oxi và sinh trưởng

3.2.5.1. Nguyên tắc

Thế oxi hoá-khử (O-R) đo sự chênh lệch về thế trong một hệ thống được tạo ra bởi một phản ứng ghép đôi mà ở đó, cùng một lúc một chất bị oxi hoá và chất kia bị khử. Quá trình bao gồm sự mất các điện tử từ một chất bị khử (như vậy nó sẽ bị oxi hoá) và sự nhận được các điện tử bởi một chất bị oxi hoá (như vậy nó sẽ bị khử). Chất cho điện tử, do nó khử một chất bị oxi hoá, cũng được gọi là tác nhân khử. Tương tự, chất nhận điện tử được gọi là tác nhân oxi hoá. Thế oxi hoá—khử, được viết là Eh, được đo bằng các đơn vị điện tử là milivon (mV). Trong phạm vi bị oxi hoá nó được biểu diễn dưới dạng +mV, còn trong phạm vi bị khử nó được biểu diễn dưới dạng “-mV. Trong các hệ thống sinh học, sự oxi hoá và sự khử các chất là phương tiện chủ yếu để phát sinh năng lượng. Néili oxi tự do có mặt trong hệ thống thì nó có thể tác động như một chất nhận điện tử. Khi vắng mặt oxi tự do thì oxi liên kết với một số" hợp chất khác như NO_i và S O₄, có thể nhận điện tử. Trong một hệ thống không có mặt oxi thì các hợp chất khác có thể nhận điện tử. Như vậy, sự có mặt của oxi không phải là một yêu cầu đòi hỏi với các phản ứng oxi hoá-khử.

3.2.5.2. Thế oxi hoá-khử trong thực phẩm

Thế oxi hoá-khử của một loại thực phẩm có thể bị ảnh hưởng bởi thành phần hoá học của nó, sự thao tác chế biến và điều kiện bảo quản nó (trong mối quan hệ với không khí). Các thực phẩm tươi có nguồn gốc động vật và thực vật thường nằm ở trạng thái khử do sự có mặt của các chất khử như axit ascorbic, các loại đường khử và nhóm SH của các protein. Sau sự ngừng hô hấp của các tế bào trong thực phẩm, oxi sẽ khuếch tán vào bên

trong và làm thay đổi thế oxi hoá-khử. Quá trình chế biến, như nước nóng, có thể làm tăng hoặc giảm các hợp chất khử và làm thay đổi Eh. Một thực phẩm được bảo quản trong không khí sẽ có Eh (+mV) so với khi được bảo quản trong chân không, hoặc trong các loại khí cải biến (như CO₂ và N₂). Oxi có thể có mặt trong thực phẩm dưới dạng khí (trên bề mặt, được bắt giữ bên trong) hoặc dưới dạng hoà tan.

3.2.5.3. Thế oxi hoá-khử và sinh trưởng của vi sinh vật

Trên cơ sở sinh trưởng, khi có mặt và khi vắng mặt oxi tự do, vi sinh vật đã được chia thành các nhóm hiếu khí, kỵ khí, kỵ khí không bắt buộc hay vi hiếu khí. Các vi sinh vật hiếu khí cần oxi tự do để sinh năng lượng vì oxi tự do tác động như chất nhận điện tử cuối cùng thông qua hô hấp hiếu khí. Các vi sinh vật kỵ khí không bắt buộc có thể sinh năng lượng nếu oxi tự do có mặt hoặc chúng có thể sử dụng oxi liên kết trong các hợp chất như NO₃ và SO₄ làm chất nhận điện tử cuối cùng thông qua hô hấp kỵ khí. Nếu O₂ không có mặt, thì các hợp chất khác sẽ được sử dụng để nhận điện tử (hoặc hydro) thông qua lên men (kỵ khí). Một ví dụ về điều này là sự nhận hydro từ NADH bởi pyruvat để tạo thành lactat. Các vi sinh vật kỵ khí và kỵ khí không bắt buộc chỉ có thể chuyển điện tử nhờ lên men.

Nhiều vi sinh vật kỵ khí (bắt buộc hoặc nghiêm ngặt) không thể sinh trưởng khi có mặt, thậm chí một lượng nhỏ oxi tự do vì chúng thiếu superoxid dismutase cần thiết để phá huỷ các gốc tự do độc của oxi. Việc thêm các chất phân huỷ như các ion (ví dụ thioglycolat), sẽ giúp chúng vượt qua tính miễn cảm đôi với các gốc tự do này. Các vi sinh vật vi hiếu khí sinh trưởng tốt hơn khi có mặt ít oxi hơn. Sự sinh trưởng của các vi sinh vật và khả năng sinh năng lượng của chúng bằng các phản ứng trao đổi chất đặc thù phụ thuộc vào thế oxi hoá-khử của thực phẩm. Phạm vi Eh, ở đó vi sinh vật có thể sinh trưởng là: hiếu khí (+500) - (+300)mV; kỵ khí không bắt buộc (+300) - +(100)mV; còn kỵ khí (+100) - (-250)mV hoặc thấp hơn. Tuy nhiên, phạm vi này thay đổi nhiều với nồng độ các thành phần khử có trong thực phẩm và với sự có mặt của oxi, Nấm mốc, nấm men và các chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Moraxella* và *Micrococcus* là một số ví dụ về các loài hiếu khí. Một số ví dụ về các vi sinh vật kỵ khí không bắt buộc là các vi khuẩn lactic và các vi khuẩn trong họ Enterobacteriaceae. Vi khuẩn kỵ khí quan trọng nhất trong thực

phẩm là *Clostridium*. Một ví dụ về vi khuẩn vi hiếu khí là *Campylobacter* spp. Phạm vi Eh chỉ ra rằng, ở mỗi nhóm, một số loài thì nghiêm ngặt hơn về nhu cầu Eh so với các loài khác. Mặc dù hầu hết nấm mốc là hiếu khí nghiêm ngặt song một số có thể chịu được các điều kiện ít hiếu khí hơn. Tương tự, nấm men về cơ bản là hiếu khí song một số có thể sinh trưởng dưới Eh thấp (dưới +300mV). Nhiều loài *Clostridium* có thể sinh trưởng ở Eh +100mV nhưng một số loài lại đòi hỏi ~-150mV hoặc thấp hơn. Sự có mặt và vắng mặt của oxi và Eh của thực phẩm sẽ xác định khả năng sinh trưởng của một nhóm vi sinh vật cụ thể trong một loại thực phẩm và các con đường trao đổi chất đặc thù được sử dụng trong sinh trưởng để phát sinh năng lượng và tạo ra các sản phẩm trao đổi chất phụ. Điều này có tầm quan trọng trong sự gây hư hỏng thực phẩm (như sự thối rữa của thịt bởi *Clostridium* spp trong điều kiện kỵ khí) và tạo ra các đặc tính không mong muốn của các thực phẩm lên men (như sự sinh trưởng của các loài *Penicillium* trong phomat xanh trong điều kiện hiếu khí). Thông tin này cũng có tầm quan trọng trong việc phân lập các vi sinh vật được quan tâm từ thực phẩm trong phòng thí nghiệm (như *Clostridium laramie*, một vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt từ thịt bị hư hỏng).

3.3. Các yếu tố bên ngoài:

Các yếu tố bên ngoài quan trọng trong sinh trưởng của vi sinh vật trong một loại thực phẩm bao gồm các điều kiện môi trường mà ở đó nó được bảo quản. Đó là nhiệt độ, độ ẩm tương đối và môi trường khí. Độ ẩm tương đối và điều kiện khí của sự bảo quản ảnh hưởng lên Aw và Eh của thực phẩm. Ảnh hưởng của hai yếu tố này lên sinh trưởng của vi sinh vật đã được thảo luận ở trên. Phần này sẽ chỉ thảo luận ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản thực phẩm lên sinh trưởng của vi sinh vật. Nhiệt độ và sinh trưởng:

3.3.1. Nguyên tắc

Sinh trưởng của vi sinh vật được thực hiện nhờ các phản ứng enzym. Người ta đã biết rõ rằng, trong một phạm vi nhất định, cứ khi nhiệt độ tăng 10°C thì tốc độ xúc tác của một enzym sẽ tăng gấp đôi. Tương tự, tốc độ phản ứng enzym bị giảm đi một nửa khi nhiệt độ giảm đi 10°C. Ngoài phạm vi sinh trưởng, môi trường này sẽ thay đổi. Vì rằng, nhiệt độ ảnh hưởng lên các phản ứng enzym nên nó có tầm quan trọng lên sinh trưởng của vi sinh vật trong thực phẩm.

3.3.2. Thực phẩm và nhiệt độ

Các loại thực phẩm đều được tiếp xúc với các nhiệt độ khác nhau, từ thời gian sản xuất đến lúc tiêu thụ. Tùy thuộc vào điều kiện chế biến, một thực phẩm có thể được tiếp xúc với độ nóng cao từ 65°C (nướng thịt) tới trên 100°C (chế biến ở nhiệt độ siêu cao). Để bảo quản dài ngày, một thực phẩm có thể được giữ ở 5°C (bảo quản trong phòng lạnh) tới -20°C hoặc thấp hơn (bảo quản đông lạnh). Một số thực phẩm tương đối bền cũng được giữ ở 10 - 35°C (từ nhiệt độ lạnh đến nhiệt độ môi trường). Một số thực phẩm chín được giữ ở nhiệt độ ấm (50 - 60°C) trong vài giờ (ví dụ, trong các siêu thị). Các nhiệt độ khác nhau cũng có thể được sử dụng để kích thích sự sinh trưởng của các vi sinh vật mong muốn trong lên men thực phẩm.

3.3.3. Sinh trưởng và độ sống sót của vi sinh vật

Các vi sinh vật quan trọng trong thực phẩm được chia thành ba nhóm dựa trên nhiệt độ sinh trưởng của chúng, mỗi nhóm có nhiệt độ tối ưu và một phạm vi nhiệt độ dành cho sinh trưởng:

- 1) ưa nhiệt (sinh trưởng ở nhiệt độ tương đối cao) có tối ưu ở khoảng 50°C và dao động từ 45 - 70°C.
- 2) ưa ấm, sinh trưởng ở nhiệt độ môi trường có tối ưu ở 35°C và dao động từ 10 - 45°C.
- 3) ưa lạnh (sinh trưởng ở nhiệt độ lạnh), với tối ưu ở 15°C và dao động từ -5 đến 20°C.

Tuy nhiên, sự phân chia này không cứng nhắc và có thể nằm chồng chéo lên nhau. Hai thuật ngữ khác cũng hay được sử dụng trong vi sinh vật học thực phẩm, rất quan trọng khi nói về sinh trưởng của vi sinh vật ở các nhiệt độ phòng lạnh và sự sống sót của vi sinh vật khi được xử lý nhiệt thấp hay khử trùng Pasteur. Đó là vi sinh vật dinh dưỡng lạnh và vi sinh vật chịu nhiệt. Bọn dinh dưỡng lạnh là những vi sinh vật sinh trưởng ở nhiệt độ của phòng lạnh (0 - 5°C), bất kể phạm vi tối ưu đối-với nhiệt độ sinh trưởng của chúng là bao nhiêu. Chúng thường sinh trưởng nhanh giữa 10 và 30°C. Nấm mốc, nấm men và nhiều vi khuẩn Gram âm thuộc các chi *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, và *Aeromonas*; cũng như vi khuẩn Gram dương thuộc các chi *Leuconostoc*,

Lactobacillus, Bacillus, Clostridium và Listeria được xếp vào nhóm này. Các vi sinh vật sống sót sau khử trùng Pasteur được gọi là các vi sinh vật chịu nhiệt. Chúng bao gồm các loài thuộc các chi Micrococcus, Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Pediococcus và Enterococcus. Bào tử của các vi khuẩn cũng được xếp vào nhóm này. Chúng có các nhiệt độ sinh trưởng khác nhau và nhiều loài có thể sinh trưởng ở nhiệt độ của phòng lạnh cũng như nhiệt độ của bồn ươm nhiệt. Khi thực phẩm được tiếp xúc với các nhiệt độ nằm ngoài nhiệt độ sinh trưởng cực đại và cực tiểu thì các tế bào sẽ chết nhanh ở các nhiệt độ cao hơn và tương đối chậm ở các nhiệt độ thấp hơn. Sinh trưởng và độ sống sót của vi sinh vật có tầm quan trọng trong việc làm giảm sự hư hỏng thực phẩm và làm tăng tính an toàn chống lại các tác nhân gây bệnh cũng như trong chế biến sinh học thực phẩm. Nhiệt độ sinh trưởng cũng được sử dụng một cách có hiệu quả trong phòng thí nghiệm để đếm và phân lập vi sinh vật từ thực phẩm.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 3

1. Kể các yếu tố bên trong và bên ngoài cần thiết cho sự sinh trưởng của vi sinh vật trong thực phẩm.

2. Các chất dinh dưỡng chủ yếu trong thực phẩm được chuyển hoá bởi vi sinh vật là gì? Kể các nhóm hydrat cacbon chủ yếu có mặt trong thực phẩm. Kể các hydrat cacbon có mặt trong sữa và trong thịt; các đường pentose có mặt trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật; và một oligosaccharit có mặt trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật.

3. Thảo luận: Bằng cách nào vi khuẩn có khả năng chuyển hoá các đại phân tử của hydrat cacbon, protein, lipid? Nấm mốc khác với vi khuẩn trong sự chuyển hoá các phân tử này như thế nào?

4. Thảo luận: Tầm quan trọng của các chất kháng vi sinh vật trong thực phẩm có khả năng gây hiệu quả xấu lên sinh trưởng của vi sinh vật.

5. Định nghĩa A_w và giải thích các quá trình giải hấp phụ và hấp phụ độ ẩm trong một loại thực phẩm. Thảo luận: Tầm quan trọng của A_w trong sinh trưởng của vi sinh vật. Các vi sinh vật ưa mặn, ưa thẩm thấu, ưa khô khác nhau về A_w tối thiểu cần thiết đối với sinh trưởng như thế nào?

6 . Định nghĩa pH và thảo luận: Các yếu tố" ảnh hưởng lên pH của một loại thực phẩm. Thảo luận: Vai trò của pH lên sinh trưởng của vi sinh vật. Bằng cách nào một tế bào vi khuẩn duy trì pH nội bào cao (6,0), trong khi sinh trưởng trong một môi trường có pH thấp (5,0)? Cho ví dụ về một vi khuẩn chịu axit và một vi khuẩn kháng axit.

7. Định nghĩa thế oxi hoá-khử và thảo luận nó ảnh hưởng như thế nào lên sinh trưởng của vi sinh vật trong một loại thực phẩm? Bằng cách nào các vi sinh vật có thể được xếp thành nhóm dựa trên khả năng sinh trưởng tại các thế oxi hoá-khử và cường độ oxi khác nhau?

8. Bằng cách nào vi sinh vật được xếp thành nhóm dựa trên nhiệt độ sinh trưởng và độ rộng của chúng? Thảo luận về tầm quan trọng của các vi sinh vật dinh dưỡng lạnh và chịu nhiệt trong chế biến và dự trữ thực phẩm ở các nhiệt độ phòng lạnh.

CHƯƠNG 4: SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN Ở VI SINH VẬT

Tóm tắt:

Sự tạo thành bào tử bởi một số nấm men, nấm mốc và vi khuẩn là một phương tiện sống sót và kế tiếp quá trình sống. Ở nấm men và nấm mốc, sự hình thành bào tử xảy ra nhờ quá trình vô tính và hữu tính; ở vi khuẩn, nó xảy ra qua sự biệt hoá, được điều hoà và biểu hiện bởi nhiều gen. Sự hình thành bào tử cho phép phát tán các loài rộng rãi trong môi trường cũng như sự lây nhiễm vào thực phẩm. Sự sinh trưởng của chúng trong thực phẩm có thể là không mong muốn khi chúng gây hư hỏng và sản sinh độc tố (trừ nấm men) và có thể là mong muốn trong chế biến một số loại thực phẩm. Các phương pháp phá huỷ bào tử và kìm hãm sự nảy mầm của bào tử (ở vi khuẩn) bằng các phương tiện khác nhau đã được sử dụng để kiểm soát sự sinh trưởng của chúng trong thực phẩm, sự hình thành bào tử ở một số loài vi khuẩn được coi là một phương tiện sống còn dưới các điều kiện stress về lý hoá của môi trường được điều hoà về mặt di truyền. Tế bào của nhiều loài vi khuẩn, dưới các điều kiện dưới tối ưu cho sinh trưởng hoặc dưới gây chết sẽ biểu hiện các đặc tính khác nhau mà các cơ chế kiểm soát chúng hiện còn chưa được biết rõ một cách đầy đủ. Các điều kiện này được quan sát ở nhiều vi khuẩn phát sinh từ thực phẩm và có tầm quan trọng trong vi sinh vật học thực phẩm.

4.1. Mở đầu:

Các vi sinh vật quan trọng trong thực phẩm thường sinh sản theo lối phân đôi (hoặc kéo dài như trong trường hợp nấm mốc không có vách ngăn). Ngoài ra, nấm mốc, một số nấm men và một số vi khuẩn có thể hình thành bào tử. Ở nấm mốc và nấm men, sự hình thành bào tử có liên quan đến sự sinh sản; trong khi ở vi khuẩn, đó là một quá trình sống sót ở một môi trường không thuận lợi. ở nấm mốc và nấm men, sự hình thành bào tử xảy ra nhờ sinh sản hữu tính và vô tính và sinh sản hữu tính cung cấp một cơ sở cho sự cải thiện chủng đôi với những chủng được sử dụng trong công nghiệp, ở vi khuẩn, sự hình thành bào tử xảy ra thông qua sự biệt hoá và nó cung cấp một phương tiện để duy trì sự sống trong một môi trường khắc nghiệt. Trong các loại bào tử, bào tử vi khuẩn có ý nghĩa đặc biệt trong thực phẩm do tính đề kháng của chúng với nhiều biện pháp oxi hoá và bảo quản được sử dụng trong thực phẩm. So với bào tử vi khuẩn, bào tử nấm mốc

và nấm men ít đề kháng hơn với những sự xử lý như vậy. Sự hình thành bào tử ở nấm mốc, nấm men và vi khuẩn sẽ được thảo luận ngắn gọn ở đây.

4.2. BÀO TỬ NẤM MỐC

Nấm mốc hình thành bào tử bằng cả sinh sản hữu tính lẫn sinh sản vô tính và trên cơ sở này được phân loại thành nấm hoàn chỉnh hay nấm bất toàn. Nấm mốc tạo thành một số lượng lớn các bào tử vô tính và về mặt hình thái có thể phân thành bào tử đính, bào tử túi và bào tử đốt. Bào tử đính được tạo ra trên những sợi nấm hữu thụ, được gọi là công sinh bào tử đính. Trong số các nấm mốc quan trọng trong thực phẩm thì các loài *Aspergillus* và *Penicillium* hình thành bào tử đính. Bào tử túi được tạo thành trong các túi ở đỉnh của một sợi nấm hữu thụ (công sinh bào tử túi). Các loài *Mucor* và *Rhizopus* là những ví dụ về nấm mốc hình thành bào tử túi. Bào tử đốt được hình thành nhờ việc phân đoạn một sợi nấm được gấp ở chi *Geotrichum*. Một bào tử vô tính trong môi trường thích hợp sẽ nảy mầm để tạo thành một sợi nấm và bắt đầu lại sự sinh trưởng để tạo thành tản. Các bào tử hữu tính được tạo thành từ sự liên kết giữa đỉnh của hai sợi nấm, hai giao tử hoặc hai tế bào. Tuy nhiên, trong số các nấm mốc quan trọng trong thực phẩm, sinh sản hữu tính ít khi quan sát được. Một số ví dụ bao gồm *Mucor* và *Neurospora*.

4.3. Bào tử nấm men:

Dựa trên khả năng hình thành bào tử, nấm men quan trọng trong thực phẩm được chia thành hai nhóm: những nấm men có khả năng tạo ra các bào tử túi hữu tính, được gọi là các *Ascomycetes* (nấm men thật) và các nấm men không tạo thành bào tử, được gọi là nấm men giả. Các ví dụ về một số* nấm men quan trọng trong thực phẩm tạo thành bào tử túi là *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* và *Hansenula*. Các loài *Candida*, *Torulopsis* và *Rhodotorula* không hình thành bào tử. Các bào tử túi hình thành nhờ tiếp hợp của hai tổ' bào nấm men; trong một số' trường hợp điều này có thể xảy ra nhờ sự liên kết giữa tế bào mẹ và tế bào con (tế bào con). Con số" bào tử được tạo thành trong một túi thay đổi tùy loài. Trong một môi trường thuận lợi, mỗi bào tử sẽ phát triển thành một tế bào nấm men.

4.4. Bào tử của vi khuẩn:

Khả năng tạo thành bào tử chỉ được giới hạn ở một số' chi vi khuẩn, cụ thể là các chi vi khuẩn Gram dương *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*,

Sporosarcina và các loài vi khuẩn Gram âm thuộc chi Desulfohalobium. Trong số này, Bacillus, Alicyclobacillus, Clostridium và Desulfohalobium rất đáng quan tâm trong thực phẩm vì chúng bao gồm các loài tham gia vào sự gây hư hỏng thực phẩm cũng như các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Một số loài Bacillus và Clostridium được sử dụng để sản xuất các enzym quan trọng trong chế biến sinh học thực phẩm. Ngược với bào tử nấm mốc và nấm men, các tế bào vi khuẩn tạo ra các nội bào tử (bên trong tế bào) và mỗi tế bào chỉ tạo thành một bào tử. Trong quá trình hình thành bào tử và cho đến khi bào tử hiện ra sau sự dung giải tế bào, bào tử có thể nằm ở cực, ở trung tâm hoặc ở bên mô trung tâm làm cho tế bào bị phồng lên. Dưới kính hiển vi phản pha, bào tử xuất hiện như những cấu trúc hình cầu, hình oval khúc xạ ánh sáng. Bề mặt của bào tử có điện tích âm và kỵ nước. Bào tử, so với tế bào dinh dưỡng thì đề kháng hơn với những sự xử lý vật lý và hoá học kháng vi sinh vật mà nhiều biện pháp vẫn được sử dụng trong chế biến và bảo quản thực phẩm, sở dĩ như vậy là vì cấu trúc đặc thù của bào tử khá khác biệt với cấu trúc của tế bào dinh dưỡng mà chúng được sinh ra. Từ trong ra ngoài một bào tử có cấu trúc sau: một lõi nguyên sinh chất chứa các thành phần quan trọng của tế bào như ADN, ARN, các enzym, axit dipicolinic (DPN), các cation hoá trị hai và rất ít nước; một màng trong bao xung quanh màng nguyên sinh chất; thành tế bào mềm bao quanh màng này và bao bên ngoài thành của tế bào dinh dưỡng, lớp vỏ bao quanh thành tế bào được cấu tạo từ các peptit, glycan và một lớp màng ngoài; cũng như một lớp áo bào tử nằm bên ngoài vỏ và màng, được cấu tạo từ các lớp protein tạo cho bào tử tính đề kháng. Bào tử của một số loài còn có một cấu trúc nữa được gọi là vỏ ngoài phủ lên lớp áo. Trong quá trình nảy mầm và tăng trưởng, lớp vỏ bị thủy phân, màng ngoài và áo bào tử bị loại khỏi tế bào sinh ra nó. Các bào tử không hoạt động về mặt trao đổi chất và nằm ở trạng thái nghỉ, nó có thể giữ ở trạng thái nghỉ trong nhiều năm nhưng có khả năng xuất hiện dưới dạng tế bào dinh dưỡng trong một môi trường thích hợp. Trái với các vi khuẩn không sinh bào tử, chu trình sống của vi khuẩn sinh bào tử có một chu kỳ dinh dưỡng (nhờ sự phân đôi) và một chu kỳ bào tử. Chu kỳ bào tử cũng trải qua nhiều bước diễn ra theo trình tự, ở đó một tế bào sẽ hình thành một bào tử và một tế bào dinh dưỡng sẽ được xuất hiện từ một bào

tử. Các bước này được kiểm soát về mặt di truyền và bị ảnh hưởng bởi các thông số môi trường và các hiện tượng hoá sinh khác nhau.

4.4.1. Sự hình thành bào tử

Bước quá độ từ một chu kỳ tế bào dinh dưỡng bình thường sang sự hình thành bào tử ở các vi khuẩn sinh bào tử được khởi động bởi sự thay đổi trong các thông số môi trường, đang tạo điều kiện cho sự sinh trưởng tối ưu của tế bào. Các yếu tố môi trường này bao gồm sự giảm việc cung cấp chất dinh dưỡng (đặc biệt là các nguồn cacbon, nitơ và phospho) và những sự thay đổi về nhiệt độ và pH tối ưu. Bước quá độ từ chu kỳ phân chia tế bào sang sự hình thành bào tử được kiểm soát về mặt di truyền với sự tham gia của rất nhiều gen. Một tế bào chỉ khởi đầu sự hình thành bào tử vào lúc kết thúc sự nhân đôi ADN. Một hợp chất khởi động có thể được huy động tại thời điểm tế bào phải quyết định có tiến hành phân bào bình thường hay phải bắt đầu các bước để hình thành bào tử. Hợp chất khởi động chắc chắn được tổng hợp khi chất dinh dưỡng bị cạn kiệt hay khi các điều kiện bất lợi khác xảy ra. Adenosin bistrifosphat (Abt) có thể là một trong những hợp chất khởi động vì nó được tổng hợp từ các vi khuẩn hình thành bào tử trong điều kiện cạn kiệt cacbon và phospho. Các sự kiện trong sự hình thành bào tử có thể được chia thành 7 bước sau:

1) Kết thúc sự nhân đôi ADN, sắp xếp nhiễm sắc thể thành sợi trục và hình thành mesosom.

2) Lõm màng tế bào ở gần một cực và hình thành vách ngăn.

3) Hình thành tiền bào tử.

4) Tạo thành và áo tế bào mầm, tích lũy Ca^{2+} và tổng hợp DPN.

5) Hình thành áo bào tử.

6) Bắt đầu chín. Loại nước nguyên sinh chất, xuất hiện sự kháng nhiệt và tính khúc xạ.

7) Dung giải thành nhờ enzym và giải phóng bào tử. Trước bước 3, quá trình xảy ra thuận nghịch. Tuy nhiên, khi đã đi vào bước 3 thì tế bào sẽ chuyển sang chu kỳ hình thành bào tử.

4.4.2. Trạng thái nghỉ

Bào tử được hình thành theo cách như vậy để giữ sự sống trong các điều kiện bất lợi. Điều này đạt được nhờ sự tăng tính đề kháng với các môi trường cực đoan và nhờ sự giảm hoạt tính trao đổi chất để lui về trạng thái nghỉ. Sự mất nước của lõi và sự giảm chuyển động phân tử là các thuộc tính của trạng thái nghỉ. Trong một điều kiện thích hợp, trạng thái nghỉ của bào tử có thể được kết thúc nhờ hàng loạt phản ứng hoá sinh tham gia vào sự hoạt hoá bào tử, sự nảy mầm, sự tăng trưởng và sự lớn lên. Một số bào tử có thể cần thời gian dài trước khi các trình tự của sự nảy mầm và được gọi là các bào tử siêu nghỉ. Chúng khá thường gặp ở *Bacillus* và *Clostridium*. Người ta cho rằng, trạng thái siêu nghỉ là hậu quả của bản chất vốn có của bào tử, của sự thương tổn bào tử và của các yếu tố môi trường. Một số bào tử có những yêu cầu nghiêm ngặt để có thể nảy mầm và không nảy mầm cùng các bào tử khác. Các bào tử bị tổn thương cần được sửa chữa vết thương trước khi chúng nảy mầm và tăng trưởng. Một thành phần nào đó trong môi trường có thể ngăn ngừa sự nảy mầm của một số bào tử. Trong thực phẩm, các bào tử siêu nghỉ có thể gây ra nhiều vấn đề. Sau chế biến chúng có thể không được phát hiện trong thực phẩm bằng các phương pháp xét nghiệm thông thường. Nhưng trong giai đoạn bảo quản chúng có thể nảy mầm và tăng trưởng, rồi sau đó gây hư hỏng thực phẩm, hoặc nếu là một tác nhân gây bệnh thì bào tử có thể làm cho thực phẩm trở nên không an toàn đối với người tiêu dùng.

4.4.3. Hoạt hoá

Sự hoạt hoá bào tử trước khi nảy mầm được đi kèm bởi sự tái tổ chức các đại phân tử trong bào tử. Bào tử có thể được hoạt hoá theo các cách khác nhau như xử lý nhiệt dưới gây chết, chiếu xạ, xử lý áp lực cao với các tác nhân oxi hoá hoặc khử, để ở pH cực đoan, xử lý bằng áp suất cao và siêu âm. Những sự xử lý này có lẽ sẽ làm tăng quá trình nảy mầm bằng cách làm tăng tính thấm của các cấu trúc bào tử đối với các tác nhân gây nảy mầm để tái tổ chức các loại phân tử. Quá trình này là thuận nghịch, tức là một bào tử sẽ không nhất thiết phải nảy mầm sau khi đã được hoạt hoá nếu môi trường không thuận lợi.

4.4.4. Sự nảy mầm

Một số thay đổi về cấu trúc và chức năng sẽ xảy ra trong quá trình nảy mầm. Một khi quá trình nảy mầm đã khởi động, trạng thái nghỉ được kết thúc một cách không thuận nghịch. Những thay đổi về cấu trúc bao gồm sự hydrat hoá lõi, sự tiết Ca^{2+} và DPN và sự mất tính đề kháng cũng như tính khúc xạ. Những sự thay đổi chức năng bao gồm sự khởi động hoạt động trao đổi chất, sự hoạt hoá các protease đặc thù và các enzym dung giải vỏ cũng như sự giải phóng các sản phẩm dung giải vỏ. Nói chung, về mặt trao đổi chất, nảy mầm là một quá trình phân giải. Sự nảy mầm có thể được khởi đầu (khởi động) bởi pH thấp, nhiệt độ cao, áp suất cao, lysozym, các chất dinh dưỡng (các amino axit, các hydrat cacbon), canxi-DPN và các yếu tố khác. Quá trình có thể bị kìm hãm bởi D-alanin, ethanol, EDTA, NaCl (ở nồng độ cao), NO_2 và sorbat.

4.4.5. Tăng trưởng

Sự tăng trưởng bao gồm các quá trình sinh tổng hợp và sửa chữa giữa các thời kỳ sau sự nảy mầm của bào tử và trước sự lớn lên của một tế bào dinh dưỡng. Các sự kiện trong pha này bao gồm sự trương lên của bào tử do sự hydrat hoá và sự hấp thu chất dinh dưỡng; sự sửa chữa và tổng hợp ARN, protein và các nguyên liệu của màng và thành tế bào; sự dung giải áo, sự kéo dài tế bào và sự sao chép ADN. Các yếu tố có thể tăng cường quá trình này bao gồm các chất dinh dưỡng, pH và nhiệt độ thích hợp. Với sự kết thúc giai đoạn tăng trưởng, tế bào dinh dưỡng sẽ xuất hiện từ bào tử và đi vào chu kỳ "tế bào dinh dưỡng nhờ sự phân đôi". Quá trình hình thành bào tử như đã thảo luận ở trên bao gồm các quá trình biệt hoá tế bào không thuận nghịch trong một môi trường bất lợi và được điều hoà và biểu hiện bởi nhiều gen. Chức năng của nhiều gen đã được nghiên cứu với các thể đột biến của *Bacillus subtilis* (các thể đột biến spo). Chúng phong toả sự hình thành các thành phần khác nhau trong quá trình hình thành bào tử. Sự biểu hiện của các gen chức năng này được điều chỉnh bởi các gen mã hoá cho các yếu tố sigma (σ). Trong một môi trường thuận lợi, sự nảy mầm và sự tăng trưởng cũng được thực hiện trung gian qua các gen khác cho phép một nội bào tử đi vào chu kỳ phân chia tế bào.

4.5. Tầm quan trọng của bào tử trong thực phẩm:

Sự hình thành bào tử, đặc biệt là ở nấm mốc và một số loài vi khuẩn, cho phép chúng tồn tại một thời gian dài và cung cấp cơ sở cho sự kế tiếp của loài. Phương tiện

phát tán dễ dàng nhờ bụi và không khí có trong môi trường. Theo cách này, thực phẩm có thể bị nhiễm khuẩn từ bào tử chứ không phải từ các nguồn khác. Trong một môi trường thực phẩm thích hợp, bào tử sẽ nảy mầm, lớn lên và tạo ra các hiệu quả không mong muốn (hoặc mong muốn). Các bào tử nấm mốc và nấm men tương đối miễn cảm với nhiệt và sinh trưởng của chúng cũng có thể bị ngăn cản bởi việc bảo quản thực phẩm khi vắng mặt không khí. Nhiều loài *Bacillus*, *Clostridium* và *Desulfotomaculum* có liên quan tới sự gây hư hỏng thực phẩm và các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Do tính kháng nhiệt cao, bào tử có tầm quan trọng và được quan tâm đặc biệt trong sản xuất thực phẩm. Sự chú ý đặc biệt cần phải được tập trung vào quá trình chế biến và bảo quản thực phẩm sao cho bào tử sẽ được phá huỷ hoặc ngăn ngừa nảy mầm và tăng trưởng, vì rằng các bào tử chưa nảy mầm không thể gây ra sự hư hỏng và bệnh phát sinh từ thực phẩm. Một khả năng khác là cảm ứng cho bào tử nảy mầm và tăng trưởng rồi sau đó xử lý chúng bằng các tác nhân kháng vi sinh vật để tiêu diệt chúng. Các bào tử siêu nghỉ của các loài gây hư hỏng và gây bệnh đặt ra một vấn đề khác. Vì chúng thường không được phát hiện cùng với các bào tử khác, điều kiện chế biến sẽ trở nên được chấp nhận sai lầm với suy nghĩ rằng, toàn bộ bào tử đã bị loại bỏ. Sau đó các bào tử siêu nghỉ vẫn còn tồn tại này sẽ có thể nảy mầm, tăng trưởng và lớn lên và làm hỏng thực phẩm, hoặc làm cho nó không còn an toàn nữa. Vì rằng, không thể phá huỷ toàn bộ bào tử trong nhiều loại thực phẩm, một số phương pháp đặc thù, hoặc tổ hợp của các phương pháp chế biến và bảo quản đã được tạo ra để vượt qua các vấn đề về bào tử trong thực phẩm. Trong việc đóng hộp các loại thực phẩm có độ axit thấp, sự xử lý bằng nhiệt rất cao đã được sử dụng để đạt được sự vô trùng thương mại có thể giết chết bào tử của mọi vi khuẩn gây bệnh và hầu hết các vi khuẩn gây hư hỏng (trừ một số vi khuẩn gây hư hỏng ưa nhiệt). Để ngăn ngừa sự nảy mầm của bào tử, tùy loại thực phẩm mà nitrit (trong thịt chế biến), pH thấp (các sản phẩm chứa axit), Aw thấp hoặc muối cao đã được sử dụng. Áp lực thủy tĩnh cao cũng đang được nghiên cứu để xác định tiềm năng phá huỷ bào tử của nó. Mặc dù bào tử của nấm mốc bị phá huỷ ở áp lực tương đối thấp ($< 400\text{MPa}$), song bào tử của nhiều vi khuẩn gây bệnh và gây hư hỏng cần phải được xử lý bằng một tổ hợp có áp lực rất cao ($> 700\text{MPa}$) và nhiệt độ cao ($> 90^{\circ}\text{C}$) để nhận được và sự vô trùng thương mại. Từ lâu người ta đã biết

rằng, bào tử của nhiều vi khuẩn phát sinh từ thực phẩm có thể được hoạt hoá để nảy mầm và tăng trưởng ở một phạm vi áp lực thấp. Sau sự xử lý bằng áp lực như vậy, một sự xử lý bằng chất kháng khuẩn khác cũng như một chu trình áp lực khác bằng nhiệt hoặc chất bảo quản kháng khuẩn có thể được thực hiện để phá huỷ các bào tử đã nảy mầm và đã tăng trưởng trước khi sự sinh trưởng của tế bào bắt đầu. Ảnh hưởng của một số' thông số' lên sự nảy mầm như biên độ áp suất, thời gian tạo áp suất, nhiệt độ tạo áp suất và việc giữ thời gian sau khi tạo áp suất đang được nghiên cứu. Có thể thấy rằng, dưới các điều kiện kể trên, sự cảm ứng nảy mầm bào tử thay đổi nhiều tùy loài. Nói chung, sự nảy mầm sẽ tăng theo áp suất và nhiệt độ trong phạm vi nghiên cứu. Nhiều nghiên cứu như vậy với nhiều chủng của các loài quan trọng sẽ cung cấp nhiều dữ liệu có ý nghĩa hơn để xác định tiềm năng của biện pháp xử lý này đối với sự không chế bào tử trong thực phẩm.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 4

1. Kể những sự khác biệt giữa bào tử nấm mốc, nấm men và vi khuẩn.
2. Kể 5 chi vi khuẩn phát sinh từ thực phẩm hình thành bào tử.
3. Vẽ và chú thích cấu trúc của một bào tử vi khuẩn và thảo luận về các chức năng hoặc đặc tính của từng thành phần cấu trúc.
4. Kể các bước xảy ra giữa hình thành bào tử vi khuẩn và sự xuất hiện của nó dưới dạng tế bào dinh dưỡng. Tương tự kể các sự kiện chính diễn ra trong mỗi bước.
5. Thảo luận về các cơ chế khởi động trong sự hình thành bào tử và trong sự nảy mầm bào tử ở vi khuẩn.
6. Thảo luận về tầm quan trọng của bào tử vi khuẩn trong thực phẩm.
7. Thảo luận ngắn gọn về các phương pháp được sử dụng để kiểm soát các vấn đề có liên quan tới bào tử vi khuẩn trong thực phẩm.
8. Giải thích bằng cách nào áp lực thuỷ tĩnh thấp có thể có liên quan tới sự xử lý kháng vi sinh vật khác để tiêu diệt bào tử vi khuẩn trong thực phẩm?

CHƯƠNG 5: GIÔNG KHỞI ĐỘNG VÀ CÁC BACTE RIOPHAGO

Tóm tắt:

Việc phân lập và xác định các vi sinh vật có liên quan đến lên men thực phẩm đã giúp cho việc sử dụng các loài và các chủng đặc biệt dưới dạng giống thuần khiết cho lên men có kiểm soát. Các giống khởi động này hiện được sản xuất bởi các nhà sản xuất giống thương mại cho việc sử dụng bởi các hãng chế biến thực phẩm để khởi động trực tiếp lên men các nguyên liệu thô. Điều này cũng giúp làm giảm sự tổn thất về sản phẩm do việc hư hỏng giống khởi động gây ra, chủ yếu là do sự tấn công của phagơ. Sự tạo ra các giống khởi động kháng phagơ cũng đã giúp vượt qua khó khăn trên. Các nghiên cứu hiện nay về trình tự gen của các vi khuẩn lactic và bacteriophagơ của chúng sẽ rất có ích cho sự tạo ra các chủng vi khuẩn sử dụng hiệu quả trong lên men thực phẩm trong tương lai.

5.1. Mở đầu:

Giông khởi động là một thuật ngữ chung và đã được thay đổi theo thời gian. Hiện tại, nó có nghĩa là một chủng vi sinh vật được dùng như thực phẩm được lựa chọn, có các hoạt tính trao đổi chất đã biết và ổn định, và các đặc tính khác được sử dụng để sản xuất các loại thực phẩm lên men có vẻ ngoài, hình thức, cấu trúc và hương vị mong muốn. Một SÔI giống khởi động cũng được sử dụng để sản xuất các chất bổ sung cho thực phẩm như các chế phẩm probiotic, hoặc như một loại thuốc. Đến cuối thế kỷ XIX, thuật ngữ có nghĩa là việc cấy một lượng nhỏ kem lên men (chua), hoặc sữa lên men (giống khởi động) vào kem nguyên chất hoặc sữa nguyên chất để khởi động sự lên men trong sự sản xuất bơ và phomat. Quá trình này được thừa nhận là tạo ra các sản phẩm tốt hơn so với các sản phẩm thu được từ quá trình lên men tự nhiên các nguyên liệu thô. Các giống khởi động này là những hỗn hợp của các vi khuẩn chưa biết rõ. Các cơ sở chế biến thực phẩm được bắt đầu bằng sự duy trì một giống khởi động tốt qua việc cấy truyền hàng ngày giống khởi động gốc và tạo ra nguyên liệu cấy từ những giống khởi động đó. Tuy nhiên, bản chất vi khuẩn học của những giống khởi động này (kiểu và tỷ lệ giữa các vi khuẩn mong muốn và vi khuẩn không mong muốn) qua những lần cấy truyền liên tiếp đã trở nên liên tục bị mất cảm với những thay đổi do sự chiếm ưu thế từ các vi khuẩn có mặt

ban đầu, hoặc từ các chủng lây nhiễm trong quá trình xử lý. Khó khăn đã xuất hiện trong việc sản xuất các sản phẩm có chất lượng nhất quán và do những thất bại trước sự tấn công của bacteriophagơ lên các vi khuẩn khởi động, ở cả Mỹ và Châu Âu, một số hãng tư nhân đã bắt đầu cung cấp những loại giống hỗn hợp có thành phần vi khuẩn chưa biết rõ để sản xuất phomat. Sau đó, các chủng riêng biệt đã được thuần khiết và kiểm tra về những đặc điểm của chúng và các giống chứa các chủng thuần khiết đã được sản xuất nhờ các công ty thương mại này. Lúc đầu, những loại giống khởi động như vậy chỉ được tạo ra để sản xuất các loại phomat. Hiện nay, các loại giống khởi động dành cho nhiều loại sản phẩm sữa lên men, các sản phẩm thịt lên men, một số rau lên men, một số sản phẩm bánh mì lên men, cho lên men rượu và cho các mục đích khác (đặc biệt là với các cơ thể đã được cải biến về mặt di truyền. GMO) đã có mặt trên thị trường. Phần này sẽ trình bày ngắn gọn về lịch sử, trạng thái hiện thời, các vấn đề về bacteriophagơ và sự sản xuất các giống cô đặc.

5.2. Lịch sử:

Sự phát triển các giống khởi động đầu tiên bắt nguồn từ nhu cầu và những sự thay đổi trong công nghiệp sản xuất phomat. Trước những năm 1950, các nhà sản xuất nhỏ đã sản xuất những số lượng ít ỏi phomat để thỏa mãn những người tiêu dùng ở địa phương. Một phòng nuôi được sử dụng để duy trì một chai giống gốc được cấy truyền hàng ngày, giống này nhận được từ một nhà sản xuất giống hoặc một nhà sản xuất gần đó. Cũng phòng nuôi đó lại được sử dụng để nuôi giống đại trà qua nhiều lần cấy truyền giống gốc nhằm đáp ứng thể tích nguyên liệu cấy (để đáp ứng nhu cầu từ 1 đến 2 % thể tích sữa cần được chế biến thành phomat). Các giống khởi động này là một hỗn hợp các chủng vi khuẩn chưa được xác định và do vậy đã có khó khăn để sản xuất ra một sản phẩm có chất lượng nhất quán. Cũng tồn tại vấn đề hư hỏng giống khởi động do sự tấn công của các bacteriophagơ. Để vượt qua những vấn đề về chất lượng, giống khởi động đơn chủng (gồm một chủng mong muốn được phân lập từ một hỗn hợp) đã được sử dụng. Điều kiện vệ sinh tốt và các máy móc sản xuất mới được thiết kế đã được đưa vào để vượt qua các vấn đề về phagơ. Từ những năm 1950, những cơ sở sản xuất phomat lớn đã thay thế các nhà sản xuất nhỏ. Họ cần các sản phẩm có chất lượng ổn định và không thể chấp nhận

được quá nhiều nhược điểm của giông khởi động do bị phago tấn công. Các nhà sản xuất giông khởi động đã tạo ra các giông đơn chủng và cung cấp chúng dưới dạng đông khô cho những người sản xuất phomat, về phần mình, những nhà sản xuất này lại sử dụng chúng để sản xuất giông gốc và giông đại trà. Để vượt qua những vấn đề về phago, sự sử dụng luân phiên các chủng (mỗi ngày sử dụng một chủng khác nhau) nhằm ngăn ngừa sự hình thành một phage đặc thù, cũng như việc dùng các giông đa chủng đã được thực hiện (nếu chủng này bị giết bởi một phage đặc thù thì một chủng khác sẽ hoạt động). Sau đó, các môi trường xác định để sản xuất giông đại trà nhằm giảm bớt sự tấn công của phago đã được đưa vào. Ngay cả lúc đó, sản lượng hàng ngày của những lượng lớn giông đại trà - một số nhà sản xuất phomat dùng tới trên 1.000.000 gal sữa (= 3.780.000 lít) mỗi ngày và cần trên 10.000 gal (= 37.800 lít) giông đại trà - và việc duy trì một lượng lớn các chủng vi khuẩn xác định để sử dụng qua sự luân phiên hoặc các giông đa chủng (một số có thể giữ tới 30 chủng hoặc hơn) và sử dụng chúng trong những tổ hợp thích hợp (nhờ đó chúng tương hợp được với nhau) đã đòi hỏi những thiết bị lớn và xác định, các nhà vi sinh vật học có trình độ và một đội ngũ vận hành lớn. Điều này đã được vượt qua một phần nhờ vào những năm 1960, người ta đã dùng các chế phẩm đông lạnh cô đặc được vận chuyển bằng đường hàng không từ các nhà sản xuất giông tới những nhà sản xuất phomat trong đá khô, chúng có thể được sử dụng trực tiếp để sản xuất giông đại trà. Điều này cùng với việc nhận được một số môi trường ức chế phago (PIM) để sản xuất giông đại trà, đã giúp các nhà sản xuất phomat vượt qua được sự nhút nhát về kinh phí và công sức cần thiết để duy trì một phòng thí nghiệm vi sinh vật học cũng như một lượng lớn các chủng giông khởi động. Những môi trường làm từ sữa này chứa một nồng độ phosphat cao để tạo phức với canxi có trong sữa và nhờ vậy làm cho cation hoá trị hai này không được phago hấp phụ và các tế bào vi khuẩn tránh được sự lây nhiễm. Để nhận được mật độ tế bào cao bằng cách duy trì pH cao, các môi trường đã có các hệ thống kiểm soát pH từ bên trong và bên ngoài. Sau đó giông cô đặc được làm đông lạnh, chứa 10^{11} - 10^{12} tế bào/ml đã được cấy vào. Chúng có thể được sử dụng trực tiếp để cấy vào sữa trong các bể phomat (DVS), qua đó loại trừ được nhu cầu phải sản xuất giông đại trà của người sản xuất phomat.

Từ những năm 1970, tính phổ biến của một số" loại sản phẩm sữa lên men (đặc biệt là sữa bơ và yogurt), cũng như các loại xúc xích lên men, một số" sản phẩm lên men dân tộc và các sản phẩm lên men tăng cường sức khỏe đã kích thích các nhà sản xuất thương mại lớn sản xuất chúng. Để đáp ứng nhu cầu của họ, các loại giống đông lạnh khác nhau để cấy trực tiếp vào nguyên liệu thô đã được tạo ra. Người ta đã tìm cách sản xuất các giống cô đặc dưới dạng đông khô. Các giống đông khô có thể loại trừ được vấn đề công kênh trong việc vận chuyển các giống đông lạnh trong đá khô, cũng như sự tan bất thường của chúng, điều này sẽ ngăn cản sự sử dụng chúng. Các giống đông khô cũng có thể được sử dụng trực tiếp để tạo ra sản phẩm, hoặc cũng có thể được sử dụng để sản xuất giống khởi động đại trà. Tuy nhiên, nhiều chủng không sống sót tốt trong điều kiện đông lạnh. Do vậy, việc sử dụng giống dưới dạng đông lạnh trong các vận hành thương mại lớn đã bị hạn chế. Chúng có mặt dưới dạng những gói nhỏ để sử dụng trực tiếp bởi các nhà sản xuất nhỏ các thực phẩm lên men hoặc để sản xuất giống đại trà trước khi cấy vào nguyên liệu thô. Một tiến bộ mới đạt được gần đây là sự thu nhận các giống khởi động được thiết kế theo yêu cầu khách hàng để đáp ứng những nhu cầu cụ thể của một nhà sản xuất thực phẩm. Một sự hiểu biết về cơ sở di truyền của một số" đặc điểm mong muốn quan trọng cũng như các đặc điểm ức chế sự tấn công của phage trong giống khởi động đã giúp tạo ra những giống tự thiết kế lấy.

5.3. Giống cô đặc

Trong lên men thực phẩm có kiểm soát, một giống khởi động được đưa vào nguyên liệu thô với nồng độ khoảng 10^6 tế bào sống/ml (hoặc/gam) nên lên men cần được tiến hành ở một tốc độ mong muốn. Trong một quá trình thông thường, một giống khởi động đại trà chứa khoảng 10^8 tế bào/ml sẽ cần được cấy với nồng độ 1% vào nguyên liệu thô. Một nhà sản xuất phomat sử dụng 1.000.000 gal hoặc hơn mỗi ngày, sẽ cần 1.000 gal giống đại trà /ngày hoặc hơn. Thể tích lớn này được sản xuất từ giống gốc qua một số" lần cấy truyền trực tiếp, do vậy cần nhiều sự chuẩn bị tại các thiết bị chế biến và việc nhiễm phage sẽ có thể xảy ra, vì phage gặp khắp nơi trong môi trường chế biến. Ngược lại, trong việc sản xuất các giống cô đặc, hầu hết sự chuẩn bị đều được tiến hành bởi những nhà sản xuất giống dưới các điều kiện môi trường có kiểm soát, qua đó

giảm được các vấn đề về phagơ. Các chủng sẽ được nuôi trong các môi trường thích hợp để thu một mật độ tế bào cao (có thể lên tới trên 1010/ml). Các tế bào thu được nhờ ly tâm rồi lại được hoà tan trở lại vào một dịch thể để có nồng độ khoảng 1012 tế bào/ml. Với 360ml giông cô đặc đông lạnh chứa trong một hệ thống DVS có thể được bổ sung vào một bể chứa 5.000 gal sữa để đạt nồng độ tế bào sống ban đầu mong muốn (10G⁺ 7 tế bào/ml). Môi trường huyền phù cần chứa các nhân tở kháng lạnh để làm giảm sự chết và sự tổn thương tế bào trong quá trình làm lạnh và làm tan. Tế bào trong một hỗn hợp chứa trong các chai kim loại sẽ được làm đông lạnh bằng đá khô-axeton (-78°C) hoặc bằng nitơ lạnh (-196°C) và được bảo quản ở nhiệt độ đó. Chúng thường được vận chuyển tới các nhà sản xuất bằng đường hàng không trong các hộp StyrofoamTM chứa đủ đá khô. Nhà sản xuất sẽ giữ các chai này ở - 20 °C; hoặc thấp hơn và sử dụng nó trong một thời hạn do nhà sản xuất giông quyết định. Ngay trước khi sử dụng, chai giông sẽ được làm tan trong nước ấm (45°C) và được cấy vào nguyên liệu thô. Các hướng dẫn sử dụng đối với loại giông này sẽ được cung cấp bởi các nhà sản xuất giông. Để sản xuất giông đậm đặc đông khô, dịch tế bào đậm đặc được làm đông lạnh theo lát (thành những lớp mỏng hoặc những giọt nhỏ) trong đá khô-axeton hoặc trong nitơ lỏng, sau đó được làm khô trong chân không. Nguyên liệu đã được làm đông khô sau đó sẽ được đóng gói trong các túi chất dẻo dưới điều kiện chân không và bảo quản ở - 20⁰ hoặc ở nhiệt độ tủ lạnh. Chúng được vận chuyển tới nhà sản xuất bằng các phương tiện nhanh ở nhiệt độ thường hoặc ở trong các hộp chứa túi đá. Nhà sản xuất sẽ bảo quản giông đông khô ở -20°C hoặc trong tủ lạnh và sử dụng chúng trong thời gian quy định, Ngay trước khi sử dụng, giông đông khô sẽ được hoà lẫn với nước ấm (tốt nhất là nước đun sôi đã được làm nguội, hoặc nước vô trùng) và cấy vào nguyên liệu thô.

5.4. Các vấn đề của giông khởi động:

5.4.1. Tính đối kháng chủng

Trong một giông chứa các chủng hỗn hợp, ở đó giông khởi động thường chứa hai chủng hoặc nhiều hơn, sự chiếm ưu thế của một chủng so với các chủng khác dưới một điều kiện nhất định có thể làm thay đổi nhanh thành phần của giông. Tính chiếm ưu thế có thể bắt nguồn từ môi trường sinh trưởng tối ưu hoặc do sự tạo ra các chất chuyển hoá

kìm hãm (ví dụ các bacteriocin). Điều này có thể ảnh hưởng lên chất lượng sản phẩm và làm tăng sự thất bại của giống khởi động do sự tấn công của phagơ. Các nhà sản xuất giống SG kiểm tra tính tương hợp giữa các chủng mong muốn và tạo ra các loại giống hỗn hợp chỉ với các chủng tương hợp để tránh tính đôi kháng chủng.

5.4.2. Sự mất đi một đặc tính mong muốn

Một chủng mang một đặc tính mong muốn liên kết với plasmit có thể bị mất đi đặc tính này trong quá trình bảo quản, nuôi cấy thứ cấp và dưới một số điều kiện sinh trưởng. Các stress lý hoá và sự làm đông lạnh kéo dài có thể dẫn đến sự mất một đặc tính. Các nghiên cứu di truyền học đang được tiến hành để tìm hiểu về tính bền vững của các đặc tính này. Một số chủng có tính bền vững tốt hơn về một số đặc tính nào đó đã được tạo ra và đang được sử dụng. Trong tương lai sẽ nhận được nhiều chủng như vậy.

5.4.3. Sự chết và sự tổn thương tế bào

Việc sử dụng hiệu quả các giống cô đặc đông lạnh hoặc đông khô, đặc biệt là sử dụng trực tiếp (như các giống DVS), phụ thuộc vào hai đặc tính quan trọng:

- 1) Các giống cần phải chứa số lượng lớn các tế bào sống và
- 2) Các tế bào phải có pha tiềm phát ngắn, nhờ đó chúng có thể bắt đầu sinh sản rất nhanh. Các tế bào tiếp xúc với các môi trường (hoặc stress) vật lý hoặc hoá học khắc nghiệt có khả năng làm giảm sự sống sót, sinh trưởng và trao đổi chất. Việc làm đông lạnh hoặc làm tan cũng như việc làm đông khô và tái hydrat hoá đã được biết có thể gây nên sự huỷ hoại tế bào, qua đó dẫn đến sự chết và sự tổn thương tế bào. Điều này có thể dẫn đến những tình huống là một số giống cô đặc không đáp ứng được yêu cầu về nồng độ tế bào sống ban đầu 1067 tế bào/ml (hoặc /g) nguyên liệu thô và pha tiềm phát tương đối ngắn trong quá trình lên men. Các nhà sản xuất giống đã thành công trong việc làm giảm sự huỷ hoại tế bào bằng cách sử dụng các chất kháng lạnh trong các dung môi hoà tan và bằng cách làm đông lạnh tế bào nhanh ở một nhiệt độ rất thấp. Một số trong các nguyên nhân của sự mất khả năng sống của tế bào là sự làm tan và sự tái đông lạnh, sự làm tan kéo dài trước khi sử dụng, sự trộn lẫn các giống đang được làm tan hoặc sự tái hydrat hoá các giống đông khô trong các dung dịch đậm đặc của các thành phần khác (như muối hong khô hoặc hỗn hợp gia vị được sử dụng trong lên men xúc xích) và việc

bảo quản kéo dài ở -20°C hoặc ở nhiệt độ cao hơn. Nhiều trong số các nguyên nhân này có mặt tại môi trường chế biến sản phẩm do sự thiếu hiểu biết của những người chuẩn bị giông. Để tiến hành sản xuất tốt nhất các giông cô đặc, mọi hướng dẫn từ các nhà sản xuất cần phải được tuân thủ một cách nghiêm ngặt.

5.4.4. Các chất kìm hãm trong nguyên liệu thô

Sữa có thể chứa các chất kháng sinh, do các động vật đã được điều trị một số bệnh nhiễm trùng mang tủy (bệnh viêm vú), các chất sát trùng (từ thiết bị). Thịt có thể chứa các thành phần được sử dụng để chế tạo xúc xích lên men, như phosphat hoặc nitrit và các chất sát trùng từ thiết bị. Các yếu tố này có thể ngăn cản hoặc làm giảm sinh trưởng của các giông khởi động.

5.4.5. Bacteriophage của các vi khuẩn lactic

Vai trò của các bacteriophage (hay phage) trong việc làm hỏng giông khởi động trong lên men thực phẩm đã được thừa nhận từ lâu. Một sự thảo luận ngắn về chu trình sống của chúng dẫn đến việc làm hỏng giông khởi động cũng như một số biện pháp hiện thời để vượt qua các vấn đề về phage trong lên men thực phẩm sẽ được trình bày ở đây.

5.4.5.1. Hình thái và đặc tính

Bacteriophage là các virus qua lọc của vi khuẩn phân bố rộng trong môi trường, đặc biệt là trong các môi trường lên men thực phẩm. Một phage chứa vài protein (tạo ra đầu, đuôi, sợi đuôi và bao co rút) và ADN, xếp thẳng hàng hoặc có dạng vòng, mạch kép, có kích thước khoảng 20 đến 55kb. Phân tử ADN mạch kép được bao gói bên trong đầu, đầu có thể tròn hoặc hình đa diện. Một số sơ đồ đã được đề nghị vào các thời kỳ khác nhau để phân loại bacteriophage của các vi khuẩn lactic. Ngày nay, một sơ đồ đang được sử dụng, ở đó, chúng được phân loại theo cả họ, nhóm và kiểu hình thái. Ba họ Myoviridae, Siphoviridae và Podoviridae nằm trong ba nhóm: A (có đuôi co rút), B (đuôi dài không co rút) và C (đuôi ngắn co rút). Chúng có thể có ba kiểu hình thái đó là: 1 (đầu đa diện nhỏ); 2 (đầu tròn nhỏ) và 3 (đầu tròn lớn). *Lactobacillus* ssp. *lactis* và ssp. *cremoris* dường như chứa rất nhiều loại phage khác nhau. Chúng được chia thành 12 loài, trong đó ba loài nằm trong họ Siphoviridae và có tầm quan trọng do bản chất độc của chúng. Ba loài trong họ Siphoviridae là loài 936 (tất cả đều độc với đầu đa diện nhỏ, ví dụ skl),

loài c2 (tất cả đều độc và có đầu tròn, ví dụ c2) và loài P335 (chứa cả phagơ độc và phagơ ôn hoà, có đầu da diện nhỏ, ví dụ TP901-1). Sự phân tích trình tự genom đã chỉ ra rằng, các loài trong cùng một họ cũng như các loài trong các họ khác nhau thay đổi nhiều. Ngược lại sự phân tích của các phagơ của *Streptococcus thermophilus* (ví dụ sfi 19, sfi 11) chỉ ra một sự tương đồng tương đối cao. Các phagơ của một số loài *Lactobacillus* đã được xác định và trình tự genom của một số loài và chủng hiện cũng đã nhận được, đó là *Lactobacillus delbrueckii* (LL—H), *Lab. plantarum* (phi-gle), *Lactobacillus johnsonii* (Lj 965), *Lab. gasseri* (adh) và *Lab. casei* (a2). Rất ít phagơ của *Leuconostoc* và *Oenococcus* đã được phân lập và không có phagơ nào đã được phân lập từ *Pediococcus*.

5.4.5.2. Chu trình sống

Một phagơ không thể tự sinh sản trong thực phẩm, ngược lại nó được hấp phụ (bằng Ca^{2+}) qua đuôi của nó lên bề mặt tế bào vi khuẩn (vật chủ chuyên hoá) và tiêm ADN của nó vào bên trong tế bào chất của tế bào. Nếu nó là một phagơ sinh tan thì tế bào vi khuẩn sẽ sinh ra một số lượng lớn các bản sao của ADN phagơ và protein phagơ. Sau sự lắp ráp các protein và ADN phagơ để tạo ra các phagơ trưởng thành, tế bào vi khuẩn sẽ bị dung giải, qua đó giải phóng các phagơ (tới 200) vào môi trường. Đơn lượt mình, chúng lại tấn công các tế bào vi khuẩn khác. Đây là các phagơ sinh tan. Chu kỳ sinh sản của chúng (chu kỳ sinh tan) kéo dài khoảng 20 đến 30 phút. Có một loại phagơ khác (được gọi là phagơ ôn hoà), chúng không sinh tan và ADN của chúng, sau khi được tiêm vào tế bào chất, được gắn vào ADN vi khuẩn. ADN của phagơ (được gọi là prophagơ) sẽ được mang bởi ADN vi khuẩn (trạng thái tiềm tan) và khi tế bào vi khuẩn sinh sản, prophagơ cũng được sinh sản mà không tạo ra sự có mặt của phagơ trong chủng vi khuẩn (chủng tiềm tan). Chủng nào tế bào chủ còn mang prophagơ, thì nó còn miễn dịch với sự tấn công của phagơ cùng loại. Các nghiên cứu genom gần đây đã chỉ ra rằng, ADN của một chủng vật chủ có thể chứa 5 kiểu prophagơ hoặc hơn. Tuy nhiên, một prophagơ có thể được cảm ứng bởi một tác nhân vật lý (như tia UV), hoặc hoá học (như mitomycin C), qua đó làm cho ADN phagơ tách rời khỏi ADN vi khuẩn và phục hồi lại chu trình sinh tan.

5.4.5.3. Tính chuyên hoá vật chủ

Người ta đã phát hiện được các bacteriophage chống lại nhiều loài *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* và *Oenococcus oenos* đang được sử dụng trong lên men thực phẩm. Các phage có tính chuyên hoá vật chủ và có thể có một chủng vật chủ chuyên hoá đối với một phage đặc thù, cho tới một vài chủng họ hàng đối với một phage. Một chủng vi khuẩn cũng có thể là vật chủ của nhiều kiểu phage khác nhau. Một chủng vi khuẩn có thể chứa các enzym giới hạn có khả năng thuỷ phân và phá huỷ ADN của phage. Một phage có thể là sinh tan hoặc ôn hoà. Mọi phage đều cần Ca^{2+} để được hấp phụ lên bề mặt tế bào của các giống vi khuẩn lactic.

5.4.5.4. Các phương pháp kiểm soát

Sau sự phát hiện ra sự thất bại của giống khởi động có liên quan tới bacteriophage trong lên men thực phẩm, người ta đã tiến hành các bước nhằm làm giảm sự nhiễm phage với các giống khởi động. Các bước này gồm giữ vệ sinh thích hợp để làm giảm sự tạo thành phage trong các thiết bị chế biến, cả khi chuẩn bị các giống đại trà lẫn trong lên men sản phẩm; việc sử dụng các môi trường không miễn cảm với phage, việc luân phiên các chủng và việc sử dụng các chủng hỗn hợp để làm giảm sự hình thành một phage đặc thù ở nồng độ có thể gây ra sự hư hỏng của giống khởi động. Tiếp theo, các chủng khởi động kháng phage đã được tạo ra. Lúc đầu, bằng cách nuôi một chủng vi khuẩn miễn cảm khi có mặt một phage sinh tan đặc thù, các tế bào không bị giết chết bởi phage nói trên sẽ được phân lập và được cung cấp cho các nhà sản xuất. Các nghiên cứu mới đây đã chỉ ra rằng, bằng các kỹ thuật di truyền, một chủng vi khuẩn có thể được làm cho trở nên không miễn cảm với một hoặc nhiều phage. Các kỹ thuật này bao gồm sự cải biến bản chất di truyền của một chủng khởi động để ức chế sự hấp phụ của phage, sự phá huỷ ADN phage bằng các hệ thống enzym giới hạn của tế bào, hoặc bằng cách đào thải phage trước sự dung giải. Bằng cách kết hợp các đặc điểm này nhờ thao tác di truyền, một chủng đề kháng với một số phage có thể được tạo ra. Các nghiên cứu hiện thời về sự phân tích genom của các vi khuẩn lactic và các bacteriophage sẽ giúp tạo ra các chủng khởi động kháng phage.

5.5 Giống nấm men và giống nấm mốc:

Các chủng đặc thù của giống nấm men khởi động (ví dụ *Saccharomyces cerevisiae*) được sử dụng để làm nở bột mì trong các loại sản phẩm bánh mì và để sản xuất cồn trong bia, rượu vang, rượu cất, đã được tạo ra. Các nấm men này được sản xuất bởi các nhà sản xuất giống cũng như các nhà sản xuất thực phẩm. Các nhà sản xuất giống nuôi nấm men trong các môi trường thích hợp, cô đặc tế bào, rồi cung cấp dưới dạng giống đông lạnh hay đông khô. Nấm mốc được sử dụng làm giống khởi động- trong một số loại sản phẩm có mặt trên thị trường từ các nhà sản xuất giống. Các chủng được sử dụng phải không sinh mycotoxin. Nấm mốc được nuôi trên bề mặt của một dịch thể hoặc môi trường rắn (bánh mì) cho đến khi chúng hình thành bào tử. Bào tử được thu thập, làm khô dưới dạng bột, đóng gói và cung cấp cho các nhà sản xuất.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 5

1. Định nghĩa giống khởi động.
2. Liệt kê ngắn gọn những tiến bộ chủ yếu trong công nghệ giống khởi động kể từ những năm 1950.
3. Giống khởi động cô đặc được chuẩn bị như thế nào? Công nghệ này, khác với việc sản xuất các giống khởi động đại trà như thế nào?
4. Mô tả ngắn gọn phương pháp được sử dụng để tạo ra một môi trường không miễn cảm với bacteriophage để sản xuất các giống khởi động đại trà.
5. Kể các vấn đề trong giống khởi động có thể ảnh hưởng đến việc sử dụng chúng. Những khó khăn nào có thể tồn tại do sự làm tan băng và sự tái đông lạnh một giống khởi động?
6. Định nghĩa các thuật ngữ phage sinh taru phage ôn hoà, prophage, hiện tượng tiềm tan và chu trình sinh tan của các bacteriophage.
7. Cho một ví dụ về các bacteriophage của từng chi sau đây: *Lactococcus*, *Streptococcus* và *Lactobacillus*.
8. Bằng cách nào có thể tạo ra các chủng khởi động đồ kháng với bacteriophage?

CHƯƠNG 6: VI SINH VẬT HỌC TRONG SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN

Tóm tắt:

Lên men thực phẩm có liên quan đến việc sử dụng các giống khởi động đặc thù ở một số loại thực phẩm được dùng làm nguyên liệu ban đầu. Nguyên liệu ban đầu có thể là sữa, thịt, cá, quả, rau, ngũ cốc, hạt và các loại khác. Chúng được sử dụng tách biệt hoặc kết hợp. Xu hướng hiện nay là sử dụng lên men có kiểm soát thay cho lên men tự nhiên. Việc cải thiện chủng đã giúp vượt qua được một số nhược điểm của lên men có kiểm soát. Thông tin về genom sẽ giúp cải tạo chủng trong tương lai.

6.1. Mở đầu:

Trong buổi bình minh của văn minh nhân loại, chắc chắn do vô tình, con người đã nhận ra rằng, dưới một số" hoàn cảnh, khi các thực phẩm thô có nguồn gốc động vật hoặc thực vật được bảo quản để dùng về sau, chúng có thể bị biến đổi thành các thực phẩm khác, song lại là các thực phẩm mong muốn với độ bảo quản dài hơn. Xác suất của một hiện tượng như vậy có thể xảy ra sau khi con người tìm cách làm ra nhiều sản phẩm hơn so với lượng họ cần ăn ngay và do vậy, cần phải dự trữ chúng. Trên cơ sở này, người ta có thể đoán rằng, thực phẩm lên men chắc là đã xuất hiện từ khoảng những năm 7000 - 8000 trước Công nguyên tại các vùng nhiệt đới Mesopotamia và Thung lũng Ấn Độ. Về sau, những nền văn minh khác cũng đã tạo ra các thực phẩm lên men từ các nguyên liệu thô khác nhau, đặc biệt là để bảo quản các thực phẩm nhận được từng mùa và do vậy, số lượng dồi dào chỉ có vào một mùa thu hoạch ngắn. Các sản phẩm sữa lên men, các đồ uống chứa cồn từ quả và hạt ngũ cốc, bánh mì từ bột nở đã trở nên phổ biến trong các nền văn minh sớm tại vùng Trung Á và ở Thung lũng Ấn Độ và sau đó, tại các nước Ai Cập, Hy Lạp và La Mã. Hiện nay, trên 3.500 loại thực phẩm lên men khác nhau đang được con người tiêu thụ trên toàn thế giới, trong số' đó nhiều loại là các thực phẩm dân tộc và chỉ được sản xuất với số lượng nhỏ để đáp ứng nhu cầu cho dân cư ở một vùng nào đó. Một số' hiện được sản xuất ở quy mô thương mại và chỉ một số nhỏ được sản xuất bởi các nhà sản xuất lớn. Việc sản xuất bởi các nhà sản xuất lớn hiện ngày càng tăng.

Hiện tại có một mối quan tâm về việc tiêu thụ nhiều loại thực phẩm lên men khác ngoài phomat, bánh mì, dưa chuột muối và các đồ uống chứa cồn. Một nguyên nhân đòi hỏi sự tăng cường này là người tiêu dùng quan tâm đến các loại thực phẩm tự nhiên và các loại thực phẩm lành mạnh, họ nghĩ các loại thực phẩm lên men có thể thoả mãn các yêu cầu này. ở các nước mà nhiều loại thực phẩm lên men đã được tiêu thụ từ lâu nhưng chỉ được sản xuất với số lượng nhỏ, thì giờ đây chúng cũng bắt đầu được sản xuất với số lượng lớn ở quy mô thương mại. Rõ ràng, trong tương lai, việc tiêu thụ nhiều sản phẩm lên men sẽ được nâng cao ở phạm vi toàn cầu.

6.2. Các phương pháp sản xuất:

Trong quá trình sản xuất một sản phẩm lên men, hai trạng thái có liên quan với nhau nhưng lại tách biệt nhau, một liên quan tới tầm quan trọng của hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật trong lên men và dự trữ sản phẩm, còn trạng thái kia là các thông số* được sử dụng trong chế biến và dự trữ sản phẩm. Chương này chủ yếu trình bày kỹ về trạng thái vi sinh vật học. Lên men bao gồm sự tiếp xúc của nguyên liệu thực phẩm thô hoặc nguyên liệu thực phẩm ban đầu với các điều kiện kích thích sự sinh trưởng và trao đổi chất của các vi sinh vật đặc thù và mong muốn. Khi các vi sinh vật mong muốn sinh trưởng, chúng sử dụng một số chất dinh dưỡng và tạo ra một số sản phẩm cuối cùng. Các sản phẩm cuối cùng này, cùng với các thành phần không được chuyển hoá của nguyên liệu ban đầu, sẽ tạo nên những thực phẩm lên men mong muốn mà chất lượng của chúng chủ yếu phụ thuộc vào bản chất của các sản phẩm trao đổi chất CUỐI cùng.

6.2.1. Các nguyên liệu thô (ban đầu)

Nhiều loại nguyên liệu thô có nguồn gốc từ thực vật và động vật đã được sử dụng để tạo ra các thực phẩm lên men. Chúng bao gồm sữa (từ bò, trâu, cừu, dê, ngựa), thịt (bò, lợn, cừu, dê và gia cầm), cá (nhiều loại), trứng (gà và vịt), rau và dịch ép của rau, nhiều loại quả và dịch quả, hạt ngũ cốc, củ, đậu và hạt. Một số được sử dụng kết hợp với nhau.

6.2.2. Các vi sinh vật được sử dụng

Nhiều loài và chủng mong muốn thuộc vi khuẩn, nấm men, nấm mốc có liên quan tới sự lên men thực phẩm. Tùy thuộc vào sản phẩm, sự lên men có thể đạt được bằng một

loài hoặc một chủng chiếm ưu thế duy nhất. Tuy nhiên, trong đa số quá trình lên men, một quần thể hỗn hợp của nhiều loài và chủng vi khuẩn, hoặc thậm chí vi khuẩn và nấm men, vi khuẩn hoặc nấm mốc sẽ được sử dụng. Khi một quá trình lên men bao gồm một quần thể hỗn hợp, thì quần thể không đối kháng với nhau, ngược lại chúng phải có tính hợp đồng tác dụng. Sinh trưởng cực đại của một vi sinh vật mong muốn và tốc độ lên men tối ưu tùy thuộc vào các thông số môi trường như các chất dinh dưỡng, nhiệt độ nuôi, thế oxy hoá-khử và pH. Trong quá trình lên men, nếu các loài khác nhau trong một quần thể hỗn hợp đòi hỏi các điều kiện môi trường khác nhau (ví dụ, nhiệt độ sinh trưởng) thì một sự thỏa hiệp cần phải được tạo ra để tạo điều kiện cho sinh trưởng của tất cả các loài xảy ra ở một tốc độ trung bình. Phụ thuộc vào nguyên liệu thô hoặc nguyên liệu ban đầu và một nhu cầu đặc thù, các hydrat cacbon (đường glucose trong lên men thịt), muối, citrat và các chất dinh dưỡng khác sẽ được thêm vào. Trong một số quá trình lên men tự nhiên, một số loài có thể cùng tham gia để tạo ra các đặc tính mong muốn cuối cùng của sản phẩm. Tuy nhiên, thay cho việc sinh trưởng đồng thời, chúng xuất hiện theo trình tự với hiệu quả là mỗi loài đặc thù chiếm ưu thế ở từng giai đoạn nhất định trong quá trình lên men. Nhưng, bằng việc phân tích sản phẩm cuối cùng để phân lập các loài tham gia vào quá trình lên men một loại thực phẩm như vậy sẽ không đưa ra một bức tranh đúng đắn. Ngược lại, các mẫu cần phải được phân tích tại các khoảng cách thời gian khác nhau để xác định loài nào chiếm ưu thế trong khoảng thời gian nào và trình tự xuất hiện của chúng. Cuối cùng, một số khu hệ vi sinh vật thứ yếu (khu hệ thứ cấp) có thể có mặt ở một nồng độ rất thấp trong nguyên liệu thô và tại sản phẩm cuối cùng sẽ không thể phát hiện được chúng khi phân tích đồng loạt. Tuy nhiên, chúng có thể có đóng góp quan trọng đối với các đặc tính mong muốn, đặc biệt là đối với một hương thơm độc nhất nào đó của sản phẩm.

6.2.3. Quá trình lên men

Thực phẩm có thể được lên men theo ba cách khác nhau dựa trên các nguồn vi sinh vật mong muốn: lên men tự nhiên, lên men kế tiếp và lên men được kiểm soát.

6.2.3.1. Lên men tự nhiên

Nhiều nguyên liệu thô được sử dụng trong lên men (thường không được xử lý bằng nhiệt) chứa cả vi sinh vật mong muốn và các vi sinh vật đi kèm. Các điều kiện nuôi cấy được thiết kế để kích thích sự sinh trưởng nhanh của các loài mong muốn và không kích thích hoặc làm chậm sinh trưởng của các loài đi kèm (nhiều loài là không mong muốn). Một sản phẩm được sản xuất bằng con đường lên men tự nhiên có thể có một số hương thơm mong muốn bắt nguồn từ sự trao đổi chất của khu hệ đi kèm. Tuy nhiên, vì khu hệ vi sinh vật tự nhiên có trong nguyên liệu thô không phải luôn luôn giống nhau cho nên khó có thể tạo ra một sản phẩm có các đặc tính nhất quán trong một thời gian dài. Tương tự, cơ hội bị thất bại do sự sinh trưởng của khu hệ vi sinh vật không mong muốn và các bệnh phát sinh từ thực phẩm do các tác nhân gây bệnh gây ra là rất cao.

6.2.3.2. Lên men kế tiếp

Trong phương pháp này, một lượng sản phẩm từ quá trình lên men đã thành công sẽ được bổ sung vào nguyên liệu ban đầu của quá trình lên men kế tiếp và các điều kiện được thiết kế nhằm kích thích sự sinh trưởng của các vi sinh vật có nguồn gốc từ sản phẩm trước đó. Phương pháp này hiện vẫn được thực hành trong sản xuất nhiều sản phẩm dân tộc ở quy mô nhỏ. Duy trì các đặc tính của sản phẩm trong một thời gian dài là một việc khó khăn do những sự thay đổi về loại hình vi sinh vật. Cơ hội thất bại và các bệnh phát sinh từ thực phẩm cũng cao.

6.2.3.3. Lên men được kiểm soát

Nguyên liệu ban đầu (có thể được xử lý bằng nhiệt) được cấy với một liều lượng lớn (10⁶/ml hoặc hơn) giống thuần khiết chứa các chủng hoặc loài vi sinh vật đơn độc hoặc hỗn hợp (giống khởi động). Điều kiện cấy được thiết kế để tạo sinh trưởng tối ưu cho giống khởi động. Những lượng lớn sản phẩm có thể được tạo ra hàng ngày với các đặc tính nhất quán và biết trước. Nói chung, có ít cơ hội thất bại về phương diện sản phẩm và các bệnh phát sinh từ thực phẩm. Tuy nhiên, có thể thiếu sự sinh trưởng của khu hệ vi sinh vật thứ cấp mong muốn và kết quả là, sản phẩm thiếu sự có mặt của các hương thơm mong muốn. Như đã nói ở trên, hiện nay trên thế giới có trên 3500 loại thực phẩm lên men. Các phương pháp khác nhau đã được sử dụng để xếp chúng vào một số nhóm chủ yếu.

Trong giáo trình này sẽ chỉ miêu tả một vài sản phẩm của từng nhóm, các tiêu chí vi sinh vật học chỉ của một số' sản phẩm lên men sữa, sản phẩm thịt và sản phẩm rau nhằm hiểu biết về các phương pháp tham gia vào các quá trình lên men tự nhiên và lên men được kiểm soát.

6.3. Các sản phẩm sữa lên men:

Các sản phẩm sữa lên men có thể được chia sơ bộ thành hai nhóm: các sản phẩm sữa lên men và các loại phomat. Trong các sản phẩm sữa lên men, mọi thành phần của sữa đều được giữ lại trong sản phẩm cuối cùng, trừ những gì đã được chuyển hoá một phần nhờ vi khuẩn. Trong các loại phomat, một phần lớn trong số" các hợp phần của sữa đã bị loại bỏ trong dịch đường sữa nhằm thu nhận các sản phẩm cuối cùng.

6.3.1. Thành phần và chất lượng của sữa

Sự sinh trưởng của các vi sinh vật mong muốn và chất lượng của một sản phẩm sữa lên men bị ảnh hưởng bởi thành phần và chất lượng của sữa được sử dụng trong quá trình lên men. Sữa bò chứa khoảng 3,2% protein, 4,8% lactose, 3,9% lipit, 0,9% muối khoáng, các nguyên tố" vi lượng và vitamin và khoảng 87,2% nước. Trong thành phần protein, casein trong dịch keo dưới dạng caseinat canxi có mặt với hàm lượng cao hơn so với hai loại protein hoà tan khác là albumin và globulin. Lactose là phần hydrat cacbon chủ yếu và có mặt trong dung dịch, còn lipit thì phân tán dưới dạng các cấu tử hình cầu có độ lớn khác nhau trong nhũ dịch (mỡ trong nước). Các chất muối khoáng có mặt trong dung dịch và dưới dạng keo với casein. Các vitamin hoà tan trong nước có mặt trong pha lỏng trong khi các vitamin hoà tan trong mỡ có mặt cùng với lipit. Thành phần chất rắn (khoảng 12,8%) được gọi là chất rắn tổng số (TS) và TS không chứa lipit được gọi là chất rắn phi mỡ (SNF, chiếm vào khoảng 8,9 %). Dịch đường sữa chiếm chủ yếu các thành phần hoà tan trong nước, một ít chất béo và nước. Sự sinh trưởng của các vi sinh vật mong muốn có thể bị ảnh hưởng xấu bởi một số" thành phần có mặt một cách tự nhiên hoặc được xâm nhập vào sữa dưới dạng các chất nhiễm bẩn. Các chất kháng vi sinh vật tự nhiên là các agglutinin và hệ enzym lactoperoxidase-isothiocynat. Các agglutinin có thể tạo ra các đám làm vón cục các tế bào khởi động và làm chậm sinh trưởng cũng như trao đổi chất của chúng. Hệ lactoperoxidase-isothiocynat có thể kìm hãm các giông khởi

động. Các chất kháng vi sinh vật có thể gây khó khăn chỉ khi sữa tươi được sử dụng, vì cả hai đều bị phá hủy khi sữa được xử lý nhiệt. Sữa cũng có thể chứa các chất kháng sinh do người ta sử dụng chúng trong thức ăn hoặc để điều trị các động vật bị một số bệnh nhiễm trùng như bệnh viêm vú. Sự có mặt của chúng cũng có thể gây ảnh hưởng lên sinh trưởng của các giông khởi động. Một số loại sữa có thể chứa các protease và lipase bền nhiệt do một số vi khuẩn dinh dưỡng lạnh như các loài *Pseudomonas* tạo ra trong lúc sữa tươi được bảo quản ở phòng lạnh trước khi đem khử trùng Pasteur. Các enzym này có thể duy trì độ bền sau khi bị xử lý nhiệt và có thể gây khiếm khuyết sản phẩm (sản lượng phomat thấp, protein bị phân hủy, mùi khét). Trước khi sữa được sử dụng trong lên men, cần phải lưu ý các trạng thái đó.

6.3.2. Các sản phẩm sữa lên men chính

Nhiều loại sản phẩm sữa lên men được tạo ra ở các khu vực khác nhau trên thế giới. Một số được sản xuất nhờ lên men có kiểm soát và các loại vi sinh vật cũng như vai trò của chúng đã được biết rõ. Trong nhiều sản phẩm khác được lên men tự nhiên hoặc lên men kế tiếp, mặt bằng vi sinh vật và vai trò của chúng còn chưa được biết rõ một cách chính xác. Nhiều loại vi khuẩn lactic và một số nấm men thường chiếm ưu thế trong khu hệ vi sinh vật của các sản phẩm này. Sau đây là một số sản phẩm:

- 1) Sữa bơ. Được chế tạo với các loài *Lactococcus* không có hoặc cùng với *Leuconostoc cremoris*; một số có thể có biovar *diacetylactis* thay cho *Leu. cremoris* (như ymer ở Đan Mạch), trong khi một số khác có thể chứa các biến chủng kém chất lượng thuộc các loài *Lactococcus* (langfil ở Na Uy) hoặc nấm mốc *Geotrichum candidum* (trong vili ở Phần Lan).
- 2) Yogurt. Được chế tạo với *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; một số loại có thể được bổ sung *Lab. acidophilus*, *casei*, *rhamnosus* và *Bifidobacterium* spp.; một số cũng chứa các loài *Lactococcus* và *Lab. plantarum*, số khác cũng chứa cả *Lab. acidophilus*, *casei*, *rhamnosus* và *Bifidobacterium* spp.; một số cũng có thể chứa các loài *Lactococcus* và *Lab. plantarum* cùng như các nấm men lên men lactose (dahi ở Ấn Độ).
- 3) Sữa acidophilus. Được chế tạo từ *Lab. acidophilus*.

- 4) Sữa bifidus. Được chế tạo từ *Bifidobacterium* spp.
- 5) Yakult. Được chế tạo từ *Lab. casei*; cũng có thể chứa *Bifidobacterium* spp.
- 6) Kefir. Được chế tạo từ *Lab. kefir* (một số loài nấm men, cùng với *Leuconostoc*, *Lactobacillus* và *Lactococcus* spp.).
- 7) Kumiss. Được chế tạo từ *Lab. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và nấm men. Trong số này sữa bơ và yogurt sẽ được thảo luận ở đây.

6.3.3. Vi sinh vật học của sự lên men sữa bơ

Được sản xuất từ váng sữa nhờ lên men có kiểm soát với các giông khởi động.

6.3.3.1. Đặc tính của sản phẩm

Nó cần phải có một vị chua dễ chịu (từ axit lactic) và có hương thơm mạnh (từ diacetyl), hơi có bọt (từ CO₂). Phải có màu trắng mịn, dày và có thể dễ dàng.

6.3.3.2. Chế biến

- 1) Váng sữa 9% SNF + citrat (0,2 %).
- 2) Làm nóng tới 185°F (85°C) trong 30 phút (để giết chết vi khuẩn và phago).
- 3) Làm lạnh tới 72°F (22 °C), thêm giông khởi động, lắc 50 phút (cho không khí xâm nhập).
- 4) Ủ ở 72°F (22 °C) trong 12 giờ, pH 4,7, độ axit 0,9%.
- 5) Làm vỡ gel, làm lạnh tới 40°F (4,5°C) và thêm muối (đóng gói).

6.3.3.3. Giông khởi động (lên men có kiểm soát)

Lac. lactis ssp. *lactis* hoặc *cremoris* được sử dụng để tạo thành axit và *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* để tạo thành diacetyl và CO₂. Chúng có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng đông lạnh cô đặc. (*Lac. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* nói chung không được sử dụng vì nó có thể tạo ra quá nhiều axetaldehyt, từ đó làm cho sản phẩm có màu lục và mất vị yogurt).

6.3.3.4. Sinh trưởng

ở 72°F sẽ có một sự sinh trưởng cân bằng giữa hai loài và một sản lượng bằng nhau giữa axit, diacetyl và CO₂. Trên 72°F, sinh-trưởng của các loài *Lactococcus* sẽ chiếm ưu thế, tạo nhiều axit và ít hương thơm; dưới 72°F, sinh trưởng của các loài *Leuconostoc* chiếm ưu thế, tạo ít axit và nhiều hương thơm.

6.3.3.5. Hoá sinh học

Lactose sẽ được thuỷ phân nhờ P~(3-galactosidase có trong *Lactococcus* ssp. và p~galactosidase trong *Leuconostoc* sp.. Để tạo hương vị mong muốn, tỷ lệ diacetyl: axetaldehyt phải $> 3 : 1$ và $< 4,5 : 1$.

6.3.3.6. Di truyền học

Các chủng *Lactococcus lactis* phải vận chuyển được và thuỷ phân được lactose (lac+), chuyển hoá được P-galactose theo con đường tagatose và các galactose theo con đường Leloir, đề kháng với phage, không sinh chất nhày, không có hoạt tính phân huỷ protein cao. Các loài *Leuconostoc* phải có khả năng vận chuyển và sử dụng được citrat để tạo ra nhiều diacetyl, ít axetaldehyt và lên men lactose, đề kháng phage và không sinh chất nhày. Các chủng phải không sinh các chất kìm hãm (như các bacteriocin) chống lại nhau nhưng có thể có hoạt tính kháng vi sinh vật đối với các vi sinh vật không mong muốn. Qua sự chọn lọc và thao tác di truyền, các chủng sinh trưởng nhanh, có các đặc điểm mong muốn và đề kháng với một số phage đã được tạo ra. Thông tin hiện nay về trình tự genôm của các chủng *Lactococcus* và *Leuconostoc* cũng như các phage của chúng sẽ giúp tạo ra các chủng tốt hơn trong tương lai.

6.3.3.7. Các vấn đề về vi sinh vật

Do sự sản sinh quá nhiều axetaldehyt (đặc biệt nếu sử dụng biovar diacetyllactis) thì sản phẩm có màu xanh (ví dụ yogurt) có thể được tạo ra. Một cấu trúc nhày chứng tỏ có sự nhiễm các vi khuẩn sinh chất nhày (*Alicyclobacillus faecalis*) hoặc giống khởi động đó (một số chủng *Lac. lactis*) bản thân là những vi sinh vật tạo chất nhày (các polysaccharit ngoại bào). Mùi nấm men chứng tỏ có sự nhiễm các nấm men lên men lactose và mùi phomat chứng tỏ có sự nhiễm các vi khuẩn dinh dưỡng lạnh phân giải protein (trong khi bảo quản). Hoạt tính phân giải protein của các vi khuẩn lây nhiễm trong giồng khởi động cũng có thể gây ra vị đắng, đặc biệt là trong lúc bảo quản.

6.3.4. Vi sinh vật học của sự lên men yogurt

6.3.4.1. Đặc tính của sản phẩm

Yogurt thông thường là một khối bán lỏng do sự ngưng kết sữa (váng sữa, mô toàn phần hoặc mô tỷ lệ thấp) bởi các vi khuẩn khởi động. Nó có vị axit gắt với hương thơm

giống như quả hạnh nhân và một cảm giác trơn miệng. Hương thơm là hiệu quả kết hợp giữa axetaldehyt, lactat, diacetyl và axetat, nhưng 90% hương thơm là do axetaldehyt. Nhiều loại yogurt đang có mặt trên thị trường, ví dụ yogurt bình thường, yogurt quả, yogurt có hương thơm và có màu, yogurt hỗn hợp, yogurt có đường, yogurt được xử lý nhiệt, yogurt được làm đông lạnh, yogurt được làm khô, yogurt chứa hàm lượng lactose thấp, yogurt chứa cacbonat.

6.3.4.2. Chế biến

Yogurt nói chung được lên men thành từng mẻ nhưng phương pháp lên men liên tục cũng đã được phát triển. Quá trình lên men từng mẻ của yogurt bình thường, chứa hàm lượng mỡ thấp (2 %), diễn ra như sau:

- 1) Sữa đã được đồng nhất (12 % TS) cộng với chất làm bền (1%). Chất làm bền được đưa vào để tạo cấu trúc gel mong muốn.
- 2) Xử lý nhiệt đến 185°F (85°C) trong 30 phút và làm nguội đến 110 WF (43,3°C). Xử lý nhiệt giúp phá hủy tế bào dinh dưỡng của vi sinh vật và làm yếu một chút casein, tạo điều kiện tốt cho việc tạo gel.
- 3) Thêm giống khởi động, ủ ở 110°F (43,3°C) đến pH 4,8 trong khoảng 6 giờ, độ axit đạt 0,9%. Giống khởi động có thể sử dụng trực tiếp dưới dạng đông lạnh DVS hoặc dịch nuôi (2 - 3%).
- 4) Làm nguội nhanh tới 85°F trong khoảng 30 phút để làm giảm tiếp sự sinh trưởng của giống khởi động và sự tạo thành axit, đặc biệt bởi các loài *Lactobacillus*, lắng và bơm vào máy lọc.
- 5) Đóng gói vào các hộp và làm nguội bằng cách thổi khí tới 40°F (4,4°C). Quá trình làm nguội cuối cùng sôi khí sẽ làm giảm nhanh nhiệt độ nhằm kích thích sự sinh trưởng của giống khởi động.
- 6) Giữ 24 giờ, pH giảm xuống 4,3.

6.3.4.3. Giống khởi động (lên men có kiểm soát)

Dùng giống cô đặc đông lạnh hoặc DVS đông khô thông thường, *Lab delbrueckii* ssp. *bulgaricus* và *Str. thermophilus* được sử dụng. Một số nhà sản xuất cũng kết hợp hai loài này với các loài khác như *Lab. acidophilus* và *Bifidobacterium* spp., *Lab. rhamnosus* hay

Lab. casei. Tuy nhiên, nói chung chúng không cạnh tranh tốt về mặt sinh trưởng với hai loài thuộc giống khởi động của yogurt. Bởi vậy chúng được đưa vào với số" lượng cao sau khi lên men và trước khi đóng gói. Chúng có thể sống sót tốt khi có mặt yogurt chứa các giống khởi động thông thường. Để có một sản phẩm tốt, hai loài giống khởi động phải được bổ sung với tỷ lệ: 1 Streptococcus: 1 Lactobacillus. Trong sản phẩm cuối cùng, tỷ lệ không vượt quá 3 : 2 . Tuy nhiên, các tế bào Lactobacillus mẫn cảm hơn với sự làm đông lạnh và làm đông khô. Trong giống cô đặc đông lạnh được dùng dưới dạng DVS, các vi khuẩn sống sót có thể không có mặt với tỷ lệ mong muốn, trừ khi chúng được bảo quản tốt.

6.3.4.4. Sinh trưởng

Đỗ tạo sự cân bằng sinh trưởng của cả hai loài, lên men cần được tiến hành ở khoảng 110⁰ F (43,3°C). ở nhiệt độ này, cả axit lẫn các hợp chất thơm đều được tạo ra ở nồng độ mong muốn. Nếu nhiệt độ tăng lên quá 110°F thì Lactobacillus sp. sẽ chiếm ưu thế, gây ra việc tạo thành nhiều axit và ít chất thơm; ở nhiệt độ dưới 110°F, sinh trưởng của Streptococcus sp. chiếm ưu thế, qua đó tạo thành một sản phẩm chứa ít axit và nhiều hương thơm hơn. Hai loài sẽ sinh trưởng cộng sinh khi cùng mọc trong sữa. Lúc đầu Streptococcus sp. mọc nhanh khi có mặt oxi hoà tan và sản sinh axit focmic và CO₂. Điều kiện kỵ khí, axit focmic và CO₂ sẽ kích thích sự sinh trưởng của Lactobacillus sp., vì khuẩn này chứa các hệ enzym proteinase ngoại bào và peptidase phong phú và tạo ra các peptit và amino axit từ các protein của sữa (bên ngoài tế bào). Một số" trong các amino axit này như glycin, valin, histidin, leucin và methionin, cần thiết cho sinh trưởng của Streptococcus sp. là bọn thiếu các enzym phân huỷ protein. Streptococcus sp. nhận được các enzym này từ sữa và sinh trưởng nhanh cho đến khi pH giảm xuống tới khoảng 5,5, vào thời điểm đó sinh trưởng của Streptococcus sp. chậm lại. Tuy nhiên, sinh trưởng của Lactobacillus sp. vẫn tiếp tục tương đối nhanh cho đến khi nhiệt độ giảm xuống 85°F, kế tiếp là sự giảm pH xuống 4,8. ở 85°F, cả hai đều sinh trưởng chậm dần nhưng Streptococcus sp. gặp khó khăn hơn. ở 40°F và pH khoảng 4,3, cả hai loài đều ngừng sinh trưởng. Cả hai loài đều có hiệu quả đồng tác dụng lên tốc độ sinh trưởng, tốc độ tạo thành axit và lượng axetaldehyt được tạo thành khi sinh trưởng cùng nhau so với khi sinh

trưởng tách biệt. Các loài khi sinh trưởng tách biệt trong sữa sẽ tạo ra khoảng 8 - 10 ppm axetaldehyt; khi sinh trưởng cùng nhau, lượng axetaldehyt tạo thành sẽ tăng đến hàm lượng mong muốn là 25 ppm hoặc cao hơn.

6.3.4.5. Hoá sinh học Chuyển hoá lactose:

Cả hai loài đều có hệ thống p-galactosidase kiến trúc và lactose (được vận chuyển nhờ hệ thống permease) được thủy phân thành glucose và galactose. Cả hai loài đều là vi khuẩn lên men đồng hình và tạo ra lactat từ glucose theo con đường EMP. Các chủng Lab.

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* có các enzym của con đường Leloir để chuyển hoá galactose, nhưng trong khi chuyển hoá mạnh glucose chúng không sử dụng tốt galactose. Đa số các chủng *Str. thermophilus* không chứa các enzym của con đường Leloir (hoặc chứa một hệ thống rất yếu) và do vậy không chuyển hoá được galactose. Kết quả là galactose bị bài tiết ra ngoài gây ra sự tích lũy đường này trong yogurt.

Tạo thành hương thơm:

Hợp chất thơm chủ yếu trong yogurt là axetaldehyt (25 ppm), với một chút diacetyl (0,5 ppm) và axetat. Axetaldehyt được sản xuất theo hai con đường: từ glucose qua pyruvat bởi *Streptococcus* sp. và từ threonin (được cung cấp hoặc được sản xuất nhờ quá trình phân huỷ protein có trong sữa) nhờ *Lactobacillus* sp. Tạo thành fomat:

Fomat (cần cho sinh trưởng của *Lactobacillus*) được tạo thành bởi *Str. thermophilus* từ pyruvat nhờ tác dụng của fomat lyase. Tạo thành chất nhày (glycan):

β -galactosidase ở một số chủng *Str. thermophilus* trùng hợp hoá glucose để tạo thành các oligosaccharit và glycan, chất này sẽ tạo ra độ nhớt cho yogurt. Phân huỷ protein: Nếu tích lũy thừa, một số peptide sẽ gây ra vị đắng. Threonin góp phần vào sự tạo hương thơm.

6.3.4.6. Di truyền học

- Kiểu hình *Lac*⁺: ở cả hai loài, tính trạng p-galactosidase và permease có liên kết với các nhiễm sắc thể, kiến trúc rất bền. Một số chủng có thể có hoạt tính p-galactosidase rất mạnh.

- Kiểu hình Gal+: *Lab. deibruceckii* ssp. *bulgaricus* có kiểu hình Gal+ nhưng *Str. thermophilus* thường có kiểu hình Gal-. Các chủng có kiểu hình Gal+ có thể được tạo ra để làm giảm sự tích lũy galactose trong sản phẩm. “ Kiểu hình Pro+: Các chủng *Lab. deibruceckii* ssp. *bulgaricus* khác nhau về khả năng thủy phân protein. Các chủng có hoạt tính phân huỷ protein mong muốn cần được sử dụng. Sự phân huỷ protein quá mạnh có thể gây tác dụng xấu lên cấu trúc và làm tăng sự tạo thành vị đắng.
- Tính đề kháng với phago: cả hai loài đều có phago; các chủng đề kháng cần phải được tạo ra và sử dụng.
- Môi quan hệ cộng sinh và đồng tác dụng: Việc chọn lọc chủng mang tổ hợp của hai đặc tính này là cần thiết.
- Hiệu quả đôi kháng: Các chủng cần không sinh ra các hợp chất kìm hãm (như các bacteriocin) chống lại nhau.
- Sống sót tốt khi được đông lạnh hoặc đông khô: Cơ sở di truyền cần phải được nghiên cứu để tạo ra các chủng đề kháng nhằm sản xuất các loại giông khởi động cô đặc.
- Toàn bộ trình tự genom của một số chủng thuộc mỗi loài hiện đã nhận được, chúng sẽ giúp trong tương lai tạo ra các chủng mong muốn hơn để sử dụng trong sản xuất yogurt.

6.3.4.7. Các vấn đề về vi sinh vật

Trong yogurt bình thường, vấn đề hương thơm có thể có liên quan tới nồng độ của aldehyt. Nồng độ thấp sẽ cho vị chua và mùi phân và quá nhiều aldehyt có thể cho vị chua chín. Tương tự, quá nhiều diacetyl sẽ tạo ra vị bơ. Sự sinh quá nhiều axit khi bảo quản sẽ tạo ra vị chua. Sự phân huỷ protein và tích lũy các peptit đắng trong quá trình bảo quản có liên quan tới vị đắng. Việc sản sinh các polysaccharit ngoại bào bởi giông khởi động có thể tạo ra cấu trúc nhớt và đặc quánh (có thể được mong muốn ở một số hoàn cảnh). Sự sinh trưởng của nấm men trong khi bảo quản cũng có thể tạo ra mùi quả, đặc biệt là ở yogurt chứa quả và quả hạch. Trong các loại yogurt có màu, có hương thơm và yogurt hỗn hợp thường xuất hiện nhiều vấn đề tương tự. Khi được bảo quản lâu, nấm mốc có thể phát triển trên bề mặt.

6.3.5. Phomat

Phomat được sản xuất bằng cách làm đông casein có trong sữa với axit lactic được tạo ra bởi các vi khuẩn lactic và với enzyme rennin hoặc không, sau đó là bằng sự thu

nhận casein để chế biến tiếp. Quá trình này có thể bao gồm cả sự làm chín. Quá trình chắc chắn đã được phát hiện ngẫu nhiên tại Trung Đông vào 7.000 trước Công nguyên, từ sự đông sữa dự trữ trong dạ dày bê bởi axit lactic do các vi khuẩn lactie sinh ra (và có lẽ cả rennin ở trong dạ dày). Hiện nay nhiều loại phomat đã được sản xuất trên thế giới, sử dụng tới trên 20 % tổng số sữa được tạo ra. Tại Mỹ, tổng sản lượng các loại phomat vào năm 1982 là 4,4 tỷ pao (2 tỷ kg) và vào năm 1987, tăng lên 5,3 tỷ pao (2,4 tỷ kg). Do sự tăng toàn cầu của sự tiêu thụ phomat, sự sản xuất phomat sẽ tiếp tục tăng không chỉ ở Mỹ mà ở cả các nước khác, đặc biệt là ở những nước có nguồn sữa dồi dào ở Châu Âu và ở New Zealand. Phomat được phân loại theo các cách khác nhau. Một số loại phomat được phân loại dựa trên giống khởi động được sử dụng và một số khu hệ vi sinh vật thứ cấp quan trọng sẽ được đề cập dưới đây.

6.3.5.1. Phomat không chín

Mềm: Phomat đồng quê với giống khởi động là *Lac. iactis* ssp. *iactis* và *cremoris* và *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Phomat Mozzarella có giống khởi động là *Str. thermophilus* và *Lab. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

6.3.5.2. Phomat chín:

Mềm: Phomat Brie có giống khởi động là *Lac. iactis* ssp.; *Penicillium* sp. và nấm men là khu hệ thứ cấp. * Bán cứng: Phomat Gouda có giống khởi động là *Lac. iactis* ssp. và *Leuconostoc* spp.; *Propionibacterium* của sữa có thể là khu hệ thứ cấp. Phomat xanh lam có giống khởi động là *Lac. iactis* ssp., *Leuconostoc* spp.; *Penicillium roquefortii*, nấm men và các *Micrococcus* là khu hệ thứ cấp. * Cứng: Phomat Cheddar có giống khởi động là *Lac. iactis* ssp.; một số *Lactobacillus* và *Pediococcus* (và có thể *Enterococcus*) là khu hệ thứ cấp hoặc khu hệ kết hợp. Phomat Thụy Sĩ có giống khởi động là *Str. thermophilus*, *Lab. helveticus* và *Propionibacterium* spp. sữa; *Enterococcus* có thể là khu hệ thứ cấp (kết hợp). Phomat đồng quê, phomat cheddar, phomat Thụy Sĩ và phomat xanh lam sẽ được thảo luận tiếp để tìm hiểu về cơ sở vi sinh vật học của phomat chưa chín và phomat chín.

6.3.6. Vi sinh vật học của phomat đồng quê

6.3.6.1. Đặc tính

Phomat đồng quê được làm từ mỡ nghèo và váng sữa, và có cấu trúc mềm với độ ẩm khoảng 80%. Nó không được làm chín và có hương vị bơ do diacetyl (cùng với axit lactic và một lượng nhỏ axetaldehyt).

6.3.6.2. Chế biến (từ váng sữa)

- 1) Khử trùng Pasteur, làm nguội tới 70°F (21,1 °C), thêm giống khởi động và ủ 12 giờ ở pH 4,7.
- 2) Để sữa đông, cắt thành cục, đun ở 125°F (51,7°C) trong 50 phút hoặc hơn.
- 3) Loại bỏ dịch đường sữa, khuấy để loại bỏ nhiều hơn nhằm thu được cục sữa khô.
- 4) Thêm muối, thêm kem và bổ sung chất bảo quản.
- 5) Đóng gói và giữ trong tủ lạnh.

6.3.6.3. Giống khởi động (lên men có kiểm soát)

Giống cô đặc đông lạnh có thể được sử dụng. Các chủng hỗn hợp của *Lac. iactis* ssp. *cremoris* và *iactis* thường được dùng để sinh axit, *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* có thể được bổ sung lúc đầu (trong trường hợp đó citrat được thêm vào sữa), chủ yếu để tạo diacetyl. *Lac. iactis* ssp. *iactis* biovar *diacetylactis* có thể được sử dụng để tạo diacetyl nhưng không được nuôi trong sữa do chúng tạo thành quá nhiều CO₂ làm cho cục sữa đông nổi lên. Ngược lại, nó được nuôi tách biệt trong kem, sau đó được sử dụng để kem hoá cục sữa đông.

6.3.6.4. Sinh trưởng hoá sinh học và di truyền học

Sinh trưởng hoá sinh học và di truyền học (kể cả việc cải thiện chủng, giống hiện tại) giống như các quá trình đã được mô tả đối với sữa bơ.

6.3.6.5. Các vấn đề về vi sinh vật

- Sinh trưởng chậm: Yếu hoặc bị mất kiểu hình Lac⁺, bị phage tấn công, số tế bào sống sót trong giống cô đặc đông lạnh ít, hiệu quả đối kháng giữa các chủng khởi động do các nguyên nhân đã mô tả trước đây.
- Sự nổi của cục sữa đông: Được gây ra bởi sự tạo thành quá nhiều CO₂ do các giống khởi động tạo hương vị.
- Hương vị gắt: Do tạo nhiều axetaldehyt và ít diacetyl từ sự mất cân bằng chuyển hoá và trong môi trường khử.

– Sản lượng thấp: Do sự phân huỷ protein từng phần đối với casein bởi các proteinase bền nhiệt được tạo ra trong sữa tươi bảo quản lạnh bởi các vi khuẩn dinh dưỡng lạnh như *Pseudomonas* spp.

- Mất hương vị: Do sự khử diacetyl thành axetoin trong một môi trường khử cũng như do sự sinh trưởng của các vi sinh vật không mong muốn trong bảo quản, như *Pseudomonas* spp.

- Bị hỏng: Do độ ẩm cao và hàm lượng axit thấp, các vi khuẩn dinh dưỡng lạnh gây hư hỏng (như *Pseudomonas* spp.), nấm men và nấm mốc có thể sinh trưởng trong lúc bảo quản. Các chất bảo quản như sorbat có thể được sử dụng để kéo dài tuổi thọ dưới điều kiện bảo quản trong phòng lạnh.

6.3.7. Vi sinh vật học của phomat Cheddar

6.3.7.1. Đặc tính của sản phẩm

Phomat cheddar được làm từ sữa nguyên chất, chứa dưới 39% độ ẩm, 48% mỡ và nói chung có màu da cam-vàng (do màu được bổ sung vào) và được làm chín. Độ mịn và độ mạnh của hương vị đặc trưng thay đổi tùy theo giống khởi động được sử dụng và thời gian làm chín. Hương vị điển hình là do kết quả của sự cân bằng giữa các thành phần gây hương vị được tạo ra trong quá trình làm chín nhờ sự phân giải bằng enzym các hydrat cacbon, protein, lipid trong phomat cheddar chưa làm chín.

6.3.7.2. Chế biến

- 1) Khử trùng Pasteur. Thêm chất màu và giống khởi động.
- 2) Ủ ở 86 °F (30°C) để độ axit tăng lên 0,2 %; thêm rennin.
- 3) Ủ để tạo sữa đông (khoảng 30 phút) và cắt thành cục.
- 4) Làm nguội tới 100 °F (37,8°C), loại bỏ dịch đường sữa.
- 5) Nghiền, thêm muối, đóng khuôn, ép khoảng 16 giờ để loại hết dịch đường sữa.
- 6) Làm khô trong 5 ngày ở 50°F (10°C), tạo sáp và hoá rắn ở 40°F (4,4°C) từ 2 đến 12 tháng.

6.3.7.3. Giống khởi động (lên men có kiểm soát)

Giống khởi động bao gồm các chủng hỗn hợp được chọn lọc của *Lac. lactis* ssp. *cremoris* hoặc *lactis*. *Leuconostoc* có thể thêm vào để tạo hương vị. Các giống khởi động có thể được sử dụng dưới dạng giống cô đặc đông lạnh (DVS).

6.3.7.4. Sinh trưởng

Sinh trưởng được thực hiện ở 86 °F (30°C), đối với các giống khởi động ưa ấm để khởi động sinh trưởng sớm và sản sinh axit lactic tới nồng độ 0,2% trong 60 phút. Điều này quan trọng khi việc làm đông casein có thể xảy ra nhanh sau khi bổ sung rennin. Trong quá trình hoá rắn, các tế bào giống khởi động (và cả khu hệ thứ cấp) sẽ chết dần và giải phóng các enzym nội bào vào bên trong phomat.

6.3.7.5. Hoá sinh học

Một lượng lớn các phản ứng hoá sinh học xảy ra trong các giai đoạn chế biến khác nhau, từ sự ủ ban đầu đến khi kết thúc sự làm chín, nhiều giai đoạn còn chưa được biết rõ. Một số sẽ được mô tả ở đây. Đầu tiên sự chuyển hoá lactose sẽ sản sinh axit lactic cũng như một số diacetyl, axetat, ethanol và axetaldehyt, đặc biệt dưới điều kiện hiếu khí. Rennin sẽ làm yếu casein để tạo ra paracasein, chất này sẽ bị đông lại ở axit thấp và nhiệt độ thấp. Ngoài ra các proteinase và peptidase ngoại bào của giống khởi động sẽ chuyển hoá các protein của sữa thành các peptit và các amino axit rồi vận chuyển chúng vào bên trong tế bào. Thông thường, rất ít, nếu có sự phân giải lipid xảy ra nhờ sinh trưởng của vi sinh vật. Trong quá trình hoá rắn, sự phân giải phần lactose còn lại trong cục sữa đông sẽ tiếp tục, Tuy nhiên, một sự thay đổi lớn sẽ xảy ra trong các protein và các hợp chất chứa nitơ khác. Nhờ tác dụng của rennin (vẫn còn trong cục sữa đông) và các proteinase nội bào, ngoại bào và các peptidase, các peptit có độ lớn khác nhau và các amino axit sẽ được giải phóng. Sự phân giải tiếp theo các amino axit sẽ tạo ra H₂S, methanethiol và các hợp chất lưu huỳnh gần gũi, các amin và các sản phẩm khác. Lipid cũng bị phân giải, giải phóng ra các axit béo có độ dài từ C4 đến C8 (có mặt trong phần mỡ của sữa). Các phản ứng khác sẽ tạo nên các lacton, keton và thioester. Một số trong các phản ứng này không do enzym xúc tác. Hương vị điển hình của phomat cheddar là kết quả của một sự cân bằng giữa các sản phẩm được sinh ra từ sự phân giải các hydrat cacbon, protein và lipid trong quá trình chế biến và quá trình hoá rắn. Nồng độ của các

thành phần này thay đổi theo thời gian hoá rắn. Một số khu hệ vi sinh vật thứ cấp sống được sau xử lý nhiệt hoặc về sau xâm nhập vào sữa và cục sữa đông trong quá trình chế biến cũng có vai trò nhất định trong việc tạo hương vị phomat cheddar. Những vi khuẩn này bao gồm một số Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Micrococcus và một số trực khuẩn Gram âm. Chúng có thể đóng góp cho hương vị mạnh điển hình mà có thể bị mất đi nếu chỉ dùng các chủng khởi động xác định. Một số trong các khu hệ này hiện đã được biết và tạo ra một số hợp chất gây hương thay vì các hợp chất tích tụ nhanh và ở nồng độ cao (ví dụ các axit béo bay hơi và HoS).

6.3.7.6. Di truyền học

Các đặc tính kiểu hình như đã mô tả trước đây đối với các loài này cần được xem xét. Các chủng Lac⁺ có khả năng tạo axit lactic nhanh ở giai đoạn đầu là các chủng đáng ưu tiên. Tương tự, các chủng có hoạt tính proteinase (Pro⁺) yếu là các chủng mong muốn vì rằng, chúng không gây ra sự phân huỷ protein nhanh và với sự tích lũy một số peptit và sự xuất hiện của vị đắng trong sản phẩm. Trong các giống khởi động hỗn hợp, chúng cần phải không gây hiệu quả đối kháng. Tương tự, các chủng cũng phải kháng với nhiều loại phago.

6.3.7.7. Các vấn đề về vi sinh vật

Vị đắng trong phomat cheddar, đặc biệt là trong các sản phẩm đã được làm chín, là do kết quả của sự tích lũy các peptit đắng có khối lượng phân tử 1.000 đến 12.000 Da và giàu các amino axit kỵ nước. Các giống khởi động có khả năng thủy phân protein nhanh (các giống khởi động nhanh) có khuynh hướng sản sinh các peptit đắng nhiều hơn so với các giống khởi động chậm. Các enzyme của chúng thủy phân protein nhanh từ đó giải phóng ra những lượng lớn peptit, sau đó lại được thủy phân tiếp một cách chậm chạp thành các peptit nhỏ hơn và các amino axit bởi các peptidase, điều này dẫn đến sự tích lũy các peptit. Do có tính kỵ nước, các peptit đắng nói chung bị thủy phân chậm dẫn đến việc chúng bị tích tụ lại. Việc sử dụng các giống khởi động chậm để phân huỷ protein ở tốc độ chậm hoặc việc xử lý phomat với peptidase, hoặc cả hai sẽ có hiệu quả trong việc làm giảm độ đắng. Sinh trưởng của nấm mốc trên bề mặt hoặc trong các túi khí nằm bên trong phomat có thể xảy ra sau khi loại bỏ nguyên liệu đóng gói khỏi phomat. Các bào tử

thường có mặt trong nguyên liệu thô hoặc nhiễm vào sản phẩm trong quá trình chế biến và trước khi dán kín. Không thể xác định được từ hình thái khuẩn lạc, liệu chúng có sinh mycotoxin hay không, tốt nhất là không nên ăn phomat đã bị mọc nhiều nấm. *Staphylococcus aureus*, nhiễm vào sữa sau khi xử lý nhiệt có thể sinh trưởng trong quá trình chế biến phomat cheddar và sinh các enterotoxin. Độc tố sẽ nằm lại trong phomat, thậm chí sau khi tế bào bị chết bởi quá trình hoá rắn. Sự ngộ độc thực phẩm có thể xảy ra do ăn phải các loại phomat như vậy (thậm chí khi chúng được xử lý nhiệt trong một xô' chế phẩm). Các amin sinh bọc (histamin từ histidin và tyramin từ tyrosin) có thể được tạo thành bởi sự decarboxyl hoá một số amino axit (bởi các decarboxylase của giông khởi động), đặc biệt là trong phomat được làm chín trong một thời gian dài. Các phản ứng dị ứng có thể xảy ra khi ăn phải các loại phomat này. Các khu hệ thứ cấp có thể có vai trò quan trọng trong sự tạo thành amin kể trên.

6.3.8. Vi sinh vật học của phomat Thụy Sĩ

6.3.8.1. Đặc điểm

Phomat Thụy Sĩ được làm từ sữa đã loại váng một phần (của bò) và được làm đông bởi axit và rennin; nó cứng và chứa khoảng 41% độ ẩm và 43% mỡ. Phomat phải chứa các lỗ hổng có kích thước trung bình một cách đồng đều. Nó có vị ngọt do prolin và có hương thơm của quả hạch.

6.3.8.2. Chế biến

- 1) Khử trùng Pasteur, thêm giông khởi động, ủ ở 90°F (32,2°C) để tăng độ axit lên 0,2 %.
- 2) Thêm rennin, ủ đến khi đông rắn lại, cắt thành cục kích thước mỗi chiều khoảng 0,3 - 0,32cm. Đun 1 giờ ở 125°F (51,7°C).
- 3) Loại bỏ dịch đường sữa, ép cục sữa đông trong 16 giờ, cắt thành miếng, ngâm nước muối ở 55°F (12,8°C) từ 1 đến 3 ngày.
- 4) Làm khô bề mặt đóng gói bằng chân không, giữ 7 ngày ở 55°F (12,8°C) và chuyển sang 75°F (23,9°C) từ 1 đến 4 tuần.
- 5) Hoá rắn ở 37°F (2,8°C) từ 3 đến 9 tháng.

6.3.8.3. Giông khởi động (lên men có kiểm soát)

Giống khởi động là *Str. thermophilus* và *Lab. heilveticus* là giống sơ cấp để sinh axit, *Propionibacterium* sp. là giống thứ cấp để tạo lỗ hổng, vị và hương.

6.3.8.4. Sinh trưởng

Các giống khởi động sơ cấp sinh trưởng trong quá trình lên men, nấu và chế biến. Trong quá trình này, sinh trưởng của *Str. thermophilus* được kích thích. *Propionibacterium* sinh trưởng mạnh trong khi bảo quản ở 75°F (23,9°C). Trong quá trình hoá rắn, không có giống khởi động nào mọc được, các tế bào chết dần và giải phóng các enzym nội bào.

6.3.8.5. Hoá sinh học

Lactose được thủy phân bởi p-galactosidase của cả hai loại vi khuẩn lactic và được chuyển hoá theo con đường EMP. *Str. thermophilus* tạo axit lactic L+ còn *Lab. heilveticus* tạo axit lactic D—. Một lượng nhỏ axetat cũng được tạo thành. Sự sản sinh một lượng lớn lactat là rất quan trọng để kích thích sinh trưởng của các *Propionibacterium*. Trong quá trình bảo quản ở 75°F (23,9°C), các *Propionibacterium* sẽ chuyển hoá lactat (nhờ lactat dehydrogenase) thành pyruvat, chất này sau đó được chuyển hoá thành axit propionic, axetat và CO₂. Sự tạo thành các lỗ hổng xảy ra do sự sản sinh CO₂, độ lớn và sự phân bố của các lỗ hổng phụ thuộc vào tốc độ sản sinh CO₂. Các protein được thủy phân bởi rennin, các proteinase nội bào và các peptidase của các giống khởi động, đặc biệt là các *Propionibacterium*, dẫn đến sự sản sinh những peptit nhỏ và amino axit, các chất này tham gia vào sự tạo thành hương quả hạch và vị ngọt (vị ngọt là do hàm lượng tương đối cao của prolin do *Propionibacterium* sinh ra) trong quá trình hoá rắn, sự phân huỷ lipid xảy ra không đáng kể.

6.3.8.6. Di truyền học

Sự sản sinh nhanh lactat với lượng lớn từ lactose bởi các vi khuẩn lactic và tính đề kháng của chúng với phage (một số chủng *Lab. heilveticus* chứa các phage ôn hoà sẽ bị hoạt hoá ở nhiệt độ chế biến cao dẫn đến sự huỷ hoại giống khởi động) có tầm quan trọng lớn. Các chủng *Propionibacterium* cần phải tạo ra CO₂ ở tốc độ thích hợp để tạo thành số lượng và kích thước các lỗ hổng mong muốn (sự phân bố đồng đều của các lỗ hổng có kích thước trung bình là điều mong muốn).

6.3.8.7. Các vấn đề về vị sinh vật

Bào tử của *Clostridium tyrobutyricum*, có mặt trong sữa tươi hoặc nhiễm vào, có thể nảy mầm sinh trưởng và gây khét và các bong bóng khí trong loại phomat có độ axit thấp này. Nisin đã được sử dụng làm chất bảo quản sinh học để kiểm soát vấn đề này.

6.3.9. Vi sinh vật học của phomat xanh lam

6.3.9.1. Đặc điểm

Phomat xanh lam là loại phomat bán cứng (46% độ ẩm, 50% mỡ) được làm chín bởi nấm mốc, sản xuất từ sữa nguyên chất (sữa bò). Đó là một phomat dễ vỡ, có màu xanh lam, có vị mỡ thủy phân gắt.

6.3.9.2. Chế biến

1) Đồng nhất hoá, khử trùng Pasteur, thêm giống khởi động và ủ ở 90°F (32,2°C), để độ axit tăng tới 0,2 %.
2) Thêm rennin, ủ cho rắn lại, cắt, nấu ở 100 °F (37,8°C) và loại bỏ dịch đường sữa. 3) Thu cục sữa đông, chắt trong 16 giờ và ngâm trong nước muối 7 ngày. 4) Chọc để không khí có thể đi vào bên trong. Thêm bào tử nấm mốc, giữ ở 50°F (10 °C) trong điều kiện độ ẩm cao trong 4 tuần. 5) Giữ ở 40°F (4,4°C), để hoá rắn trong 3 tháng.

6.3.9.3. Giống khởi động và sinh trưởng (lên men có kiểm soát)

Lac. lactis ssp. *cremoris* hay *lactis* và *Leu. cremoris* hay *lactis* được dùng làm giống khởi động sơ cấp và bào tử của *Pen. roquefortii* được dùng làm giống khởi động thứ cấp. Các giống khởi động lactic sinh trưởng đến lúc hoá rắn và từ lactose chúng tạo ra lactac, diacetyl, axetat, CO₂ và axetaldehyt. Bào tử nấm mốc trong quá trình bảo quản ở 50°F (10 °C) ở độ ẩm cao sẽ nảy mầm nhanh tạo ra các hệ sợi nấm và lây lan bên trong tạo ra màu xanh lục. Sự sinh trưởng của chúng tiếp tục trong quá trình hoá rắn. Các lỗ chích ở bên trong phomat sẽ giúp loại bỏ CO₂ và đưa không khí vào giúp cho sinh trưởng của nấm.

6.3.9.4. Hoá sinh học, di truyền học và các vấn đề

Các loài *Lactococcus* chủ yếu sinh axit lactic từ lactose trong khi các loài *Leuconostoc* sinh axit lactic, diacetyl, CO₂ và axetat. Sự thủy phân protein khá bị giới hạn bởi các giống khởi động lactic. Nấm mốc tạo ra các lipase và proteinase ngoại bào

gây ra sự thủy phân lipid và protein trong quá trình hoá rắn. Các axit béo vừa bị oxi hoá vừa bị khử để tạo ra methyl keton và ô-lactose. Các chất này cùng với các axit béo bay hơi sẽ đóng góp vào vị gắt của phomat xanh lam. Các kiểu gen mong muốn của các vi khuẩn lactic khởi động được sử dụng đã được mô tả ở trên. Một biến chủng màu trắng của nấm mốc đã được phân lập và để sản xuất loại phomat này mà không có màu xanh lam. Các chủng *Pen. roquefortii* sinh mycotoxin đã được xác định, cần phải lựa chọn các chủng không sinh mycotoxin. Sự làm chín kéo dài có thể dẫn đến sự tạo thành các amin hoạt động sinh học từ một số amino axit (ví dụ histamin từ histidin).

6.3.10. Phomat được làm chín nhanh

Trong khi hoá rắn các loại phomat cứng và bán cứng, các thành phần sữa được phân giải nhờ các phản ứng enzym (từ các giống khởi động và khu hệ thứ cấp) và các phản ứng không enzym. Điều này là cần thiết để tạo ra hương thơm mong muốn đối với các loại phomat này. Tuy nhiên, do sự bảo quản lâu ngày điều đó là không thật tinh tế. Do vậy các

phương pháp làm tăng nhanh quá trình chín đang được nghiên cứu. Một số trong các phương pháp này sẽ được mô tả ngắn dưới đây.

6.3.10.1. Hoá rắn ở nhiệt độ cao

Vì rằng, các phản ứng enzym (và cả không enzym) sẽ xảy ra nhanh khi nhiệt độ tăng, các nghiên cứu đã được tiến hành nhằm hong khô phomat trên các nhiệt độ thông thường khoảng từ 5 đến 6 °C (40°F). Sự làm chín một số loại phomat ở nhiệt độ từ 13 đến 16°C (55-61°F) sẽ làm giảm thời gian hoá rắn tới 50% hoặc hơn. Tuy nhiên, ở nhiệt độ cao, sinh trưởng của các vi khuẩn gây hư hỏng đã là một vấn đề ở một số loại phomat và đã có một sự lo lắng nhất định về sự sinh trưởng của các tác nhân gây bệnh phát sinh từ thực phẩm.

6.3.10.2. Việc bổ sung enzym

Vì rằng, các enzym nội bào của các giống khởi động có một vai trò quan trọng trong quá trình hoá rắn, nên các enzym nhận được từ các dịch tan tế bào của các vi khuẩn khởi động đã được thêm vào để làm tăng tốc độ hoá rắn. Trong phomat cheddar, thời gian hoá rắn đã được giảm đáng kể song lại dẫn đến vị đắng.

6.3.10.3. Phương pháp dịch nhão

Dịch nhão phomat cheddar đã được chuẩn bị bằng cách trộn lẫn nước với phomat tối 40% chất rắn (thông thường là 60%). Dịch nhão sẽ được ủ ở 30°C từ 4 đến 5 ngày, vừa ủ vừa lắc. Phương pháp này làm tăng hương thơm đáng kể và sản phẩm có thể được sử dụng để sản xuất các loại phomat chế biến. Nhược điểm chủ yếu là tính bất lực trong việc kiểm soát thích hợp các phản ứng enzym nhằm tạo ra các sản phẩm đồng nhất và sự sinh trưởng có thể xảy ra của các vi khuẩn gây hư hỏng và các vi khuẩn gây bệnh. Các phương pháp mới trong những năm gần đây được ứng dụng một loại bacteriocin thích hợp (từ vi khuẩn lactic) cho phomat và để phomat tiếp xúc với áp suất thủy tĩnh cao nhằm dung giải các tế bào của giông khởi động đang được nghiên cứu để tăng cường sự làm chín nhờ các enzym nội bào được giải phóng ra.

6.4. Các sản phẩm thịt lên men

6.4.1. Loại thịt

Các sản phẩm thịt lên men được tạo ra bằng cách trước hết trộn thịt, mỡ, đường, các tác nhân hong khô và gia vị; đổ hỗn hợp vào trong một bể; rồi lên men nó một cách tự nhiên hoặc nhờ các vi khuẩn hoạt động chọn lọc được thêm vào bằng cách trộn lẫn. Axit sinh ra bởi giông khởi động trong quá trình lên men và các tác nhân hong khô sử dụng sẽ giúp kiểm soát sinh trưởng của các vi khuẩn gây bệnh và các vi khuẩn gây hư hỏng có thể có mặt trong thịt. Tùy thuộc vào loại thịt, các sản phẩm lên men có thể được làm khô để giảm A_w , hoặc được hun khói, hoặc xử lý nhiệt để đảm bảo độ an toàn và tuổi thọ của sản phẩm. Lên men thịt có lẽ được bắt nguồn từ các nước vùng Địa Trung Hải và sau đó phát triển sang các nước Châu Âu và Bắc Mỹ. Ở Mỹ, các loại xúc xích bán khô gặp phổ biến nhất, mặc dầu một số loại xúc xích khô đã được sản xuất. Sau lên men, xúc xích bán khô sẽ được xử lý nhiệt (và đôi khi cũng được hun khói) trước khi tiêu thụ. Đối với xúc xích khô sau khi nấu, sản phẩm được làm khô để giảm A_w . Thậm chí vào thời gian hiện tại, những lượng tương đối lớn xúc xích lên men tại Mỹ vẫn được sản xuất bằng lên men tự nhiên, đặc biệt là các loại do các nhà sản xuất nhỏ tiến hành. Tuy nhiên, nhiều nhà chế biến ngày nay sử dụng các giông khởi động chọn lọc và lên men có kiểm soát. Các giông khởi động bán trên thị trường nằm dưới cả dạng

đông lạnh lẫn các chế phẩm cô đặc đông khô có thể ủ trực tiếp vào hỗn hợp thịt. Xúc xích khô và bán khô gồm nhiều loại pepperoni, genoa salami, salami cứng, xúc xích mùa hè, bit tết, thuringer, cervelat và salami Ý. Hầu hết được làm từ thịt bò và thịt lợn, nhưng những năm gần đây, một số đã được làm từ gà và gà tây. Vi sinh vật học của xúc xích bán khô được mô tả dưới đây.

6.4.2. Vi sinh vật học của các xúc xích bán khô

6.4.2.1. Đặc điểm

Xúc xích bán khô gồm xúc xích mùa hè, xúc xích salami, thuringer và salami bán khô. Thành phần trung bình khoảng 30% mỡ, 20% protein, 3% muối khoáng (muối) và 47% nước. Chúng có mùi thơm nồng với hương thơm mong muốn nhờ sự tham gia của hoạt động tổ hợp của lactat, axetat và diacetyl, cũng như một số thành phần phân giải bắt nguồn từ sự thủy phân protein và thủy phân lipid. Việc dùng các gia vị cũng đóng góp vào hương thơm. Các loại chất gia vị chứa nitrit sẽ có màu hồng nhạt tương phản với màu xám nhạt trong các sản phẩm không chứa nitrit.

6.4.2.2. Chế biến

- 1) Thịt, muối, glucose, chất hoá rắn, gia vị và giống khởi động được trộn đều.
- 2) Đưa vào bể, lên men ở 85 - 110°F (29,4 - 43,3°C), với 80 đến 90% độ ẩm tương đối.
- 3) Ủ cho đến khi pH giảm xuống tới khoảng 5,2 - 4,6, nấu ở 140°F (60°C), nhiệt độ bên trong, làm nguội tới 50°F.
- 4) Bảo quản ở 40 - 50°F (4,4 - 10°C), từ 3 - 4 ngày, đóng gói bằng chân không và ăn trực tiếp. Các chất hoá rắn gồm nitrit có nồng độ cuối cùng khoảng 100 ppm. Lên men có thể thực hiện ở một phòng được hun khói. Thời gian lên men thông thường từ 8 đến 12 giờ, trong thời gian này, pH sẽ giảm tới giá trị mong muốn.

6.4.2.3. Giống khởi động (lên men có kiểm soát hoặc lên men tự nhiên)

Trong lên men có kiểm soát chế phẩm cô đặc làm lạnh hoặc làm khô được sử dụng trực tiếp ở nồng độ 106-107 tế bào/g hỗn hợp. Giống khởi động cần phải không được trộn lẫn với muối, chất hoá rắn hoặc gia vị bởi các tế bào bị tổn thương có thể giết chết. Ngược lại, chúng cần phải được làm tan và đưa trực tiếp vào thịt. Tùy thuộc vào lên men và pH cuối cùng của sản phẩm mong muốn, giống khởi động có thể thay đổi. Đối với

nhệt độ cao và pH thấp thì các chủng *Pediococcus acidilactici* là thích hợp; đối với nhiệt độ thấp và pH cao thì các chủng *Lab. plantarum* là thích hợp. Các chủng *Ped. pentosaceus* có thể được sử dụng dưới cả hai điều kiện. Một số giống khởi động có thể chứa cả các loài *Pediococcus* lẫn *Lactobacillus*. Ngoài ra, các chủng *Micrococcus* spp. hoặc *Sta. carnosus* sẽ được bổ sung vào dưới dạng khu hệ thứ cấp để gây hiệu quả của chúng trong việc tạo màu mong muốn cho sản phẩm. Ở các loại xúc xích lên men tự nhiên, *Lab. sake*, *Lab. curvatus* và *Leuconostoc* spp. có mặt trong nguyên liệu thô là những vi khuẩn quan trọng đặc biệt khi quá trình lên men diễn ra ở nhiệt độ thấp (60 đến 70°F [15,6 đến 21,1°C]) trong một vài ngày và pH cuối cùng đạt được nằm không dưới 5,0.

6.4.2.4. Sinh trưởng

Vì rằng, thịt nguyên liệu được sử dụng có thể chứa các tác nhân gây bệnh và các vi khuẩn gây hư hỏng nên điều cực kỳ quan trọng là giống khởi động phải sinh trưởng nhanh và tạo ra một lượng lớn axit để làm giảm pH từ 5,7 lúc ban đầu đến khoảng 5,3 thật nhanh để làm chậm sự sinh trưởng của chúng. Điều này có thể đạt được bằng cách thêm những lượng lớn các tế bào khởi động hoạt động, thêm glucose vào hỗn hợp và tạo nhiệt độ lên men tối ưu cho giống khởi động. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu đối với *Ped. acidilactici*, *Ped. pentosaceus* và *Lab. plantarum* là vào khoảng 40, 35 và 30°C (104, 95, 86°F). *Micrococcus* spp. và *Sta. carnosus* sinh trưởng tốt ở 32,2°C (90°F). Việc nấu tới nhiệt độ bên trong là 60°C (140°F) sẽ giết chết *Lab. plantarum* và có thể cả *Ped. pentosaceus*, nhưng có lẽ không thể giết chết được *Ped. acidilactici*, *Micrococcus* hoặc *Sta. carnosus*. Tuy nhiên, pH thấp và *Aw* thấp sẽ ngăn ngừa sinh trưởng của chúng trong các sản phẩm cuối cùng.

6.4.2.5. Hoá sinh học

Cả hai loại *Pediococcus* đều là bọ lên men lactic đồng hình và đều chuyển hoá glucose thành axit lactic (DL), với một lượng nhỏ axetat và diacetyl. *Lab. plantarum*, vi khuẩn lên men lactic dị hình không bắt buộc, chuyển hoá glucose thành axit lactic (DL); tuy nhiên, có thể tạo nên những lượng đáng kể axetat, ethanol và diacetyl. Các chủng của cả ba loài này đều có thể sinh H₂O chất này có thể làm mất màu sản phẩm bằng cách oxi

hoá myoglobin trong khi lên men. *Micrococcus* spp. hoặc *Sta. carnosus* có thể chứa catalase là enzym có thể phá huỷ H_2O_2 . *Micrococcus* sp. hoặc *Sta. carnosus* và một số chủng *Lab. plantarum* cũng có thể khử nitrat thành nitrit. Nếu nitrat được sử dụng thay nitrit trong sự hoá rắn, thì các vi khuẩn này có thể sinh nitrit và giúp tạo nên màu hồng nhạt được ưa chuộng của sản phẩm. Nếu các sản phẩm được hoá rắn và được bảo quản trong những thời gian dài, thì một số enzym nội bào từ các tế bào giống khởi động đã bị dung giải sẽ có khả năng gây ra sự thủy phân protein, thủy phân lipid và tạo nên các amin hoạt động sinh học (như histamin).

6.4.2.6. Di truyền học

Các chủng vi khuẩn lactic tạo axit nhanh ở các nhiệt độ lên men và những vi khuẩn không sinh H_2O_2 là những chủng mong muốn. Sự lựa chọn chủng có thể được tiến hành cả với những vi khuẩn không sinh các amin có nguồn gốc sinh học. Các chủng sinh bacteriocin có thể được sử dụng để kiểm soát các tác nhân gây bệnh và các vi khuẩn gây hư hỏng. Các chủng *Ped. acidilactici* không thể thủy phân saccarose (Sac-) có thể được sử dụng để tạo ra các sản phẩm ngọt và chua nhờ việc bổ sung cho hỗn hợp thịt cả đường saccarose lẫn đường glucose. Các chủng sinh polysaccarit ngoại bào có thể cải thiện cấu trúc của sản phẩm.

6.4.2.7. Các vấn đề vi sinh vật

Sự sinh axit chậm có thể là vấn đề nghiêm trọng nếu giống khởi động được sử dụng không hoạt động mạnh về mặt chuyển hoá, hoặc có số tế bào sống thấp hoặc do các yếu tố khác như glucose thấp và muối cao trong hỗn hợp. Chua hoặc không có hương thơm có thể xảy ra nếu giống khởi động, đặc biệt là *Ped. acidilactici* sinh trưởng rất nhanh và làm giảm pH xuống dưới 4,5. Sự tạo thành khí có thể xảy ra do sự sinh trưởng của *Leuconostoc* spp. trong lên men và trong bảo quản ở các túi chân không. *Leuconostoc* spp. thường có mặt trong thịt nguyên liệu. Các tác nhân gây bệnh khi có mặt trong thịt có thể sinh trưởng nếu việc sinh axit xảy ra chậm trong lên men. Các tác nhân gây bệnh kháng axit cũng có thể tồn tại trong sản phẩm và gây ra những rủi ro về sức khỏe. Trong quá trình bảo quản hoặc hoá rắn dài ngày, các amin có nguồn gốc sinh học

cũng có thể được hình thành. Tương tự, nấm mốc sinh mycotoxin có thể sinh trưởng trên bề mặt sản phẩm trong quá trình hoá rắn.

6.5. Các sản phẩm rau lên men:

Hầu như tất cả các loại rau đều có thể lên men nhờ các quá trình tự nhiên, vì rằng, chúng chứa rất nhiều vi khuẩn lactic. Trên phạm vi toàn cầu, nhiều loại rau đã được lên men hầu hết ở phạm vi nhỏ. Tuy nhiên, một số được sản xuất thương mại. Sự lên men rau được bắt đầu vào những năm đầu tiên của văn minh nhân loại và thậm chí hiện nay vẫn được sử dụng rộng rãi trong nhiều nền văn hoá. Ví dụ về một số sản phẩm lên men và rau hiện được sử dụng cho lên men là dưa chua (từ bắp cải), o liu, dưa chuột, cà rốt, celery, đậu, ngũ cốc, cà chua, hạt tiêu, hành, chanh,... Hầu hết được sản xuất bằng lên men tự nhiên. Tuy nhiên, một số* như dưa chuột hiện được sản xuất với số lượng hạn chế bởi lên men có kiểm soát. Việc sản xuất dưa chua nhờ lên men tự nhiên sẽ được mô tả ở đây như là một ví dụ.

6.5.1. Vi sinh vật học của dưa chua

6.5.11 Đặc điểm

Dưa chua được sản xuất nhờ lên men bắp cải thái nhỏ. Sản phẩm có vị chua và hương thơm chua sạch.

6.5.1.2. Chế biến

- 1) Bắp cải rửa sạch, thái nhỏ và đều.
- 2) Nén chặt ở trong bể thành từng lớp và rắc muối theo từng lớp (2,25%). Đậy kín để tách biệt với không khí và lên men ở 18°C (64,4°F) trong 2 tháng. Việc cắt nhỏ sẽ giúp cho đường (3 đến 6%) chiết ra khỏi tế bào bắp cải. Nén chặt giúp tạo điều kiện kỵ khí do vậy ngăn ngừa được sự sinh trưởng của các vi sinh vật hiếu khí. Muối sẽ kích thích sinh trưởng của một số vi khuẩn lactic và hạn chế ở một số vi khuẩn không mong muốn cũng như tác dụng của pectinase có trong bắp cải. Việc đậy kín sẽ loại bỏ không khí và ngăn ngừa sự sinh trưởng của một số vi khuẩn hiếu khí. Lên men ở 18°C (64,4°F) sẽ cản trở sự sinh trưởng nhanh của một số vi khuẩn không mong muốn (kỵ khí hoặc kỵ khí không bắt buộc) nhưng lại kích thích sinh trưởng của một số vi khuẩn lactic mong muốn. Các chất

kìm hãm tự nhiên có trong bắp cải cũng cản trở sinh trưởng của các vi khuẩn Gram âm và Gram dương không mong muốn.

6.5.1.3. Giông khởi động (tự nhiên) và sinh trưởng

Nguyên liệu ban đầu chứa một số lượng lớn các vi sinh vật không mong muốn và một quần thể nhỏ vi khuẩn lactic (dưới 1%). Trong số các vi khuẩn lactic hầu hết là *Lactococcus* spp. và *Leuconostoc* spp. và một lượng nhỏ *Lactobacillus* spp. cũng như *Pediococcus* spp. Trong quá trình lên men, sinh trưởng tuần tự của các vi khuẩn lactic này sẽ diễn ra. Sự góp mặt của 2,25% muối, những lượng lớn các loại đường có thể lên men được (saccharose, các hexose và pentose), sự vắng mặt oxi và nhiệt độ lên men thấp sẽ kích thích *Leuconostoc* spp., mà trước hết là *Leu. mesenteroides* sinh trưởng nhanh. Khi độ axit đạt tới 1% (dưới dạng axit lactic) thì sinh trưởng của *Leu. mesenteroides* sẽ chậm dần. Sau đó *Lab. brevis* sẽ bắt đầu sinh trưởng nhanh cho đến khi lượng axit sinh ra đạt khoảng 1,5%. Sau đó *Ped. pentosaceus* sẽ kiểm soát và làm tăng độ axit tới 1,8%. Cuối cùng, *Lab. plantarum* bắt đầu sinh trưởng và đưa nồng độ axit lên khoảng 2%.

6.5.1.4. Hoá sinh học

Leuconostoc spp. chuyển hoá saccharose, các hexose và một số pentose trong nguyên liệu thô thành axetat, ethanol, CO₂ và diacetyl. *Lab. brevis* (lên men lactic dị hình bắt buộc, giống như *Leuconostoc* spp.) sẽ lên men saccharose, các hexose và một số pentose thành các sản phẩm giống như các sản phẩm của *Leuconostoc* spp. *Ped. pentosaceus* sẽ chuyển hoá các hexose để tạo thành chủ yếu là axit lactic và một số đường pentose để tạo thành axit lactic, axetat và ethanol. *Lab. plantarum* cũng tạo thành các sản phẩm từ saccharose, các hexose và pentose tương tự như các sản phẩm của *Ped. pentosaceus*. *Leuconostoc* spp. sản sinh D(-)-lactat, trong khi ba loài kia tạo ra DL-lactat. Hương vị đặc trưng của dưa chua là kết quả của sự kết hợp giữa lactat, axetat, ethanol, CO₂ và diacetyl ở liều lượng phù hợp.

6.5.1.5. Di truyền học

Nếu giông khởi động được tạo ra trong tương lai trong sự lên men có kiểm soát thì một số đặc tính quan trọng sẽ là: sinh axit nhanh, tạo hương vị tồi, sinh CO₂ thấp (để giảm

lượng khí) và khả năng sinh các hợp chất kháng vi sinh vật, đặc biệt là để chống lại các tác nhân gây bệnh.

6.5.1.6. Các vấn đề về vi sinh vật

Mất hương thơm, cấu trúc mềm và mất màu dưa chua có thể xảy ra do sự sinh trưởng của nấm mốc và nấm men khi không khí không bị loại bỏ hoàn toàn. Một cấu trúc nhầy của dưa có thể xuất hiện do sự sinh trưởng thái quá của *Leuconostoc* spp. khi có mặt đường saccharose; chúng chuyển hoá fructose nhưng lại tổng hợp các dextran từ glucose.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 7

1. Định nghĩa và thảo luận những ưu điểm của các phương pháp khác nhau sử dụng trong sản xuất các sản phẩm lên men.
2. Thảo luận ngắn gọn về các yếu tố cần được lưu ý khi chọn sữa để sản xuất các sản phẩm sữa lên men.
3. Kể các đặc tính của sữa bơ và mô tả bằng cách nào chúng giúp chọn lọc các giống khởi động đặc thù?
4. Mô tả sinh trưởng cộng sinh của các giống khởi động trong việc sản xuất yogurt. Sự cải thiện di truyền nào sẽ có tầm quan trọng đối với các chủng này?
5. Hầu hết các loại yogurt thương mại đều chứa *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium* cùng với các vi khuẩn thường gặp khác của yogurt. Tuy nhiên, chúng được thêm vào yogurt sau khi lên men. Thảo luận ngắn gọn nguyên nhân vì sao.
6. Trong loại phomat đồng quê chứa kem, kem được làm chín với các giống khởi động lactic sản xuất diacetyl thường được sử dụng thay cho việc sử dụng giống khởi động này trong lên men. Thảo luận nguyên nhân vì sao?
7. Thảo luận cơ sở hoá sinh của hương vị điển hình của phomat cheddar. Cơ sở của sự tạo thành hương vị đắng là gì? Bằng cách nào nó có thể được giảm đi nhờ sự cải thiện di truyền giống khởi động?
8. Thảo luận vai trò của giống khởi động trong sự tạo ra các đặc tính mong muốn của phomat Thụy Sĩ.
9. Mô tả vai trò của nấm mốc trong việc sản xuất phomat xanh lam. Những điều gì cần phải lưu ý khi chọn các chủng nấm mốc?

CHƯƠNG 7: VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

Tóm tắt:

Bản thân vi khuẩn, nấm men và nấm mốc được coi là thực phẩm và được sử dụng trong các tổ hợp khác nhau để sản xuất hàng nghìn loại thực phẩm nhờ lên men tự nhiên hay lên men có kiểm soát từ sữa, thịt, cá, trứng, quả, rau và các loại khác. Các loài và các chủng được sử dụng làm giống khởi động trong lên men kiểm soát không những cần phải an toàn mà còn phải được điều chỉnh để có khả năng tạo ra các đặc tính mong muốn trong các loại thực phẩm lên men. Các đặc tính này là kết quả của sự phân giải sinh học hydrat cacbon, protein, lipid có mặt trong thực phẩm.

7.1. Mở đầu:

Các vi sinh vật có ích được sử dụng trong thực phẩm theo một số cách. Chúng bao gồm các tế bào vi sinh vật sinh trưởng mạnh, các tế bào vi sinh vật không sinh trưởng và các sản phẩm chuyển hoá phụ cũng như các thành phần tế bào của vi sinh vật. Một ví dụ về sự sử dụng các tế bào vi sinh vật đang sinh trưởng là sự chuyển hoá sữa thành yogurt nhờ vi khuẩn. Các tế bào không sinh trưởng của một số vi khuẩn được sử dụng để làm tăng tuổi thọ của sữa tươi hoặc thịt tươi được bảo quản trong phòng lạnh. Nhiều sản phẩm phụ như axit lactic, axit axetic, một số amino axit không thay thế và các bacteriocin do các vi sinh vật khác nhau sinh ra, được sử dụng trong nhiều loại thực phẩm. Cuối cùng, các thành phần của tế bào vi sinh vật như protein đơn bào (SCP), dextran, cellulose và nhiều enzym được sử dụng trong thực phẩm với các mục đích khác nhau. Các vi sinh vật này hoặc các sản phẩm phụ cũng như các thành phần tế bào của chúng phải an toàn, chính là một loại thực phẩm và được phê duyệt bởi các cơ quan điều hành. Khi các tế bào vi sinh vật được sử dụng theo cách mà chúng được ăn sống với thực phẩm (như trong yogurt) thì điều rất quan trọng là chúng và các chất chuyển hoá của chúng phải không gây hậu quả có hại lên sức khỏe người tiêu dùng. Khi một sản phẩm phụ (như một amino axit) hay một thành phần tế bào (như một enzym) được sử dụng trong một loại thực phẩm, thì các vi sinh vật sản sinh ra nó phải được điều hành và phê duyệt và sản phẩm phụ cũng như thành phần tế bào phải được coi là an toàn. Nếu một vi sinh vật dùng làm chính thực phẩm bị cải biến về mặt di truyền thì sự sử dụng nó trong

thực phẩm cần phải được phê duyệt, đặc biệt, nếu nguyên liệu di truyền được sử dụng thu được từ một nguồn khác hoặc được tổng hợp. Do vậy, vi sinh vật được sử dụng cho các mục đích này phải đáp ứng một số tiêu chí về thương mại và điều hành. Trong chương này, các đặc tính của một số vi sinh vật được sử dụng trong chế biến các loại thực phẩm (thực phẩm lên men) sẽ được thảo luận. Nhiều trong số các vi sinh vật này được sử dụng để sản xuất một số sản phẩm phụ và thành phần tế bào sử dụng trong thực phẩm.

7.2. Vi sinh vật học của thực phẩm lên men:

Sự lên men thực phẩm bao gồm một quá trình mà ở đó nguyên liệu thô được chuyển hoá thành thực phẩm lên men nhờ sự sinh trưởng và các hoạt động chuyển hoá của các vi sinh vật mong muốn. Vi sinh vật sẽ sử dụng một số thành phần có mặt trong nguyên liệu thô làm cơ chất để sinh năng lượng và các thành phần tế bào nhằm tăng số lượng trong quần thể và nhằm sản xuất ra nhiều sản phẩm phụ có thể dùng được (cũng được gọi là các sản phẩm cuối cùng) được tiết vào môi trường. Các thành phần không sử dụng được trong nguyên liệu thô và các sản phẩm phụ từ vi sinh vật (và đôi khi bản thân các tế bào vi sinh vật, hợp lại sẽ tạo nên các sản phẩm lên men). Các nguyên liệu thô có thể là sữa, thịt, cá, rau, quả, hạt ngũ cốc, hạt và đậu được lên men riêng biệt hoặc kết hợp. Trên toàn thế giới, hơn 3,500 loại sản phẩm lên men đã được sản xuất. Nhiều loại thực phẩm dân tộc được sản xuất và sử dụng trong những địa phương nhỏ bởi những nhóm dân cư nhỏ. Nhiều loại thực phẩm lên men được tiêu thụ hiện nay đã được sản xuất và tiêu thụ bởi con người từ hàng nghìn năm nay. Các nền văn minh cổ kể từ năm 3000 đến năm 5000 trước Công nguyên ở thung lũng Indus, Mesopotamia và Ai Cập đã tạo ra những kỹ năng hoàn hảo trong việc sản xuất các thực phẩm lên men từ sữa, quả, hạt ngũ cốc và rau. Quá trình không chỉ tạo ra các sản phẩm mới mà cũng giúp bảo quản những lượng nguyên liệu thô dư thừa có cả nguồn gốc động vật lẫn thực vật.

Những nguyên tắc cơ sở được tạo ra bởi những nền văn minh cổ xưa này đã được sử dụng, thậm chí trong thời gian hiện tại để sản xuất nhiều loại thực phẩm lên men được biết với tên gọi là lên men tự nhiên. Trong phương pháp này, quần thể vi sinh vật mong muốn có mặt một cách tự nhiên trong nguyên liệu thô, hoặc một số sản phẩm chứa các vi sinh vật mong muốn từ một quá trình lên men trước đó (được gọi là sự lên men kế tiếp)

đã được bổ sung vào nguyên liệu thô. Sau đó, các điều kiện lên men đã được thiết kế sao cho sự sinh trưởng của các loài mong muốn được Ưu tiên nhưng sinh trưởng của các loại không mong muốn có mặt tiềm tàng trong nguyên liệu thô bị ngăn cản, hoặc bị làm chậm lại. Trong một kiểu lên men khác, được gọi là lên men có kiểm soát hoặc lên men bởi giông thuần khiết, vi sinh vật có liên quan tới quá trình lên men một loại thực phẩm trước hết được thuần khiết từ thực phẩm, được nhận dạng và được giữ trong phòng thí nghiệm, Lúc cần cho lên men một loại thực phẩm đặc thù, loài vi khuẩn có liên quan tới quá trình lên men này sẽ được nuôi với thể tích lớn trong phòng thí nghiệm và sau đó được bổ sung vào nguyên liệu thô với số lượng rất cao. Sau đó, các điều kiện lên men sẽ được thiết lập sao cho vi sinh vật này sinh trưởng thuận lợi để tạo ra sản phẩm mong muốn. Đặc tính của một số vi sinh vật được sử dụng trong lên men sẽ được thảo luận ở đây, Các loài vi sinh vật này, khi được sử dụng trong lên men có kiểm soát cũng được gọi là các giống khởi động. Nhiều trong số các loài vi sinh vật này có mặt trong nguyên liệu thô được lên men tự nhiên cùng với các vi sinh vật khác mà nhiều trong số đó có thể đóng góp vào các đặc điểm mong muốn của sản phẩm.

7.3. Các giống vi khuẩn lactic khởi động:

Hiện nay, các loài vi khuẩn thuộc 12 chi được xếp vào một nhóm có tên là vi khuẩn lactic do khả năng của chúng tạo thành được một lượng tương đối lớn axit lactic từ hydrat cacbon. Các chi này bao gồm *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* và *Oenococcus*. Nhiều trong số các chi này đã được tạo ra gần đây từ các chi đã tồn tại trước đó và bao gồm một hoặc vài loài. Chẳng hạn *Lactococcus* và *Enterococcus* trước đây được phân loại là *Streptococcus* nhóm N và nhóm D, theo thứ tự. *Vagococcus* không khác biệt với *Lactococcus*, trừ một điều là những vi khuẩn này có thể di động. *Weissella* và *oenococcus* được tách khỏi *Leuconostoc*. *Tetragenococcus* chỉ gồm một loài duy nhất trước đây nằm trong chi *Pediococcus* (*Pediococcus halophilus*). *Carnobacterium* gồm một vài loài trước đây nằm trong chi *Lactobacillus* và là những vi khuẩn lên men đồng hình bắt buộc. Tuy nhiên, các loài thuộc 5 chi đầu tiên, tức là *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*

và *Lactobacillus*, được sử dụng làm giống khởi động trong lên men thực phẩm và sẽ được thảo luận ở đây. Vai trò của các loài khác, trừ *Tetragenococcus halophilus* và *Oenococcus oeni*, về phương diện ứng dụng trong thực phẩm hiện còn chưa rõ ràng.

7.3.1. *Lactococcus*

Chi này bao gồm một số loài, nhưng chỉ có một loài *Lactococcus lactis* là đã được sử dụng rộng rãi trong lên men sữa. Có ba dưới loài (ssp.): ssp. *lactis*, ssp. *cremoris* và ssp. *hordniae*, nhưng chỉ hai dưới loài đầu được sử dụng trong lên men sữa. Biovar *Lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* cũng được sử dụng trong lên men sữa. Các tế bào có hình trứng tròn, đường kính khoảng từ 0,5 đến 1,0 μm , đứng thành cặp hoặc thành chuỗi ngắn không di động, không sinh bào tử, từ kỵ khí không bắt buộc đến vi hiếu khí. Nói chung chúng sinh trưởng tốt giữa 20 và 30°C nhưng không sinh trưởng ở 6,5% NaCl hoặc ở pH 9,6. Trong môi trường thích hợp chúng có thể tạo ra khoảng 1% axit lactic L(+) và làm giảm pH tới khoảng 4,5. Dưới loài *cremoris* có thể được phân biệt với dưới loài *lactis* ở tính bất lực sinh trưởng ở 40°C, trong NaCl 4%, lên men đường ribose và thủy phân arginin để tạo ra NH_3 . Biovar *diacetylactis*, nếu so với các biovar khác, sinh nhiều CO_2 và diacetyl từ citrat hơn. Nói chung chúng có khả năng thủy phân lactose và casein. Chúng cũng lên men galactose, saccharose và maltose. Nơi sống tự nhiên của chúng là cây xanh, cỏ ủ chua, môi trường sữa và sữa tươi.

7.3.2. *Streptococcus*

Chỉ có một loài, *Streptococcus thermophilus* đã được sử dụng trong công nghiệp sữa. Một sự đổi tên thành *Str. salivarius* ssp. *thermophilus* đã được đề nghị nhưng chưa được thực hiện. Chúng được sử dụng trong lên men sữa. Các tế bào vi khuẩn Gram dương hình cầu tới hình trứng tròn, đường kính từ 0,7 đến 0,9 μm và đứng thành cặp hoặc thành chuỗi dài. Các tế bào sinh trưởng tốt ở 37 tới 40°C, nhưng cũng có thể sinh trưởng ở 52°C. Chúng là các vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc và trong môi trường chứa glucose có thể làm giảm pH xuống 4,0 và tạo thành axit lactic L(+). Chúng lên men fructose, mannose và lactose, nhưng nói chung không lên men galactose và saccharose. Tế bào sống được ở 60°C trong 30 phút. Nơi sống tự nhiên của chúng còn chưa rõ mặc dù chúng gặp trong sữa.

7.3.3. *Leuconostoc*

Các tế bào Gram dương có tế bào hình cầu đến hình hạt đậu được sắp xếp thành cặp hoặc chuỗi ngắn, không di động, không sinh bào tử, catalase âm tính và kỵ khí không bắt buộc. Các loài sinh trưởng tốt giữa 20 và 30°C, với một phạm vi từ 1 tới 37°C, Glucose được lên men thành axit lactic D(—), CO₂, ethanol, hoặc axit axetic, với pH bị giảm tới 4,5 đến 5,0. Các loài sinh trưởng trong sữa nhưng không thể làm đông sữa. Tương tự, arginin không bị thủy phân. Nhiều loài tạo thành dextran khi sinh trưởng trên saccharose. Citrat được sử dụng để sản sinh diacetyl và CO₂. Một số loài có thể tồn tại ở 60°C trong 30 phút. Các loài *Leuconostoc* gặp ở thực vật, rau, củ chua, sữa và một số sản phẩm sữa, thịt tươi và thịt đã chế biến. Hiện nay đã biết 5 loài *Leuconostoc*: *mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides*, *Leu. iactis*, *Leu. carnosum* và *Leu. gelidum*. *Leu. mesenteroides* có 3 dưới loài subsp, *mesenteroides*, ssp. *dextranicum*, và ssp. *cremoris*. *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* và *Leu. lactis* được sử dụng trong một số lên men sữa và lên men rau. Nhiều trong số các loài này đặc biệt là *Leu. carnosum* và *Leu. gelidum*, có liên quan tới sự gây hư hỏng các sản phẩm thịt đóng gói chân không giữ trong phòng lạnh. Các *Leuconostoc* khác biệt nhau về mặt hình thái và có thể chứa các nhóm vi khuẩn đa dạng về mặt di truyền. Gần đây, hai chi mới đã được tạo ra từ đó: *Weissella* và *Oenococcus*. *Oen.* gặp trong rượu vang và được sử dụng cho lên men malolactic trong rượu vang.

7.3.4. *Pediococcus*

Các tế bào hình cầu và tạo thành bốn tế bào một, nhưng chúng có thể đứng thành cặp. Không gặp các tế bào đơn độc hoặc chuỗi. Chúng là các vi khuẩn Gram dương, không di động, không sinh bào tử, kỵ khí không bắt buộc. Chúng sinh trưởng tốt giữa 25 và 40°C. Một số loài sinh trưởng ở 50°C. Chúng lên men glucose, tạo thành axit lactic L(+) hoặc DL, một số loài làm giảm pH xuống 3,6. Tùy thuộc loài, chúng có thể lên men saccharose, arabinose, ribose và xylose. Nói chung lactose không được lên men, đặc biệt là trong sữa và sữa không bị làm đông. Một số chủng có thể có năng lực thủy phân lactose yếu, đặc biệt trong môi trường chứa lactose là nguồn cacbon. Tùy thuộc vào loài, chúng gặp trong thực vật, rau, củ chua, bia, sữa, rau lên men, thịt và cá. Chi này có 7 đến 8

loài trong đó *Ped. pentosaceus* và *Ped. acidilactici* được sử dụng trong rau, thịt, ngũ cốc lên men và các loại thực phẩm lên men khác. Chúng cũng tham gia vào sự chín và sự tạo thành hương vị của một số loại phomat dưới dạng các giống thứ cấp. Hai loài này khó phân biệt nhưng so với *Ped. acidilactici* thì *Ped. pentosaceus* lên men maltose, không sinh trưởng ở 50°C và bị giết chết ở 70°C trong 5 phút. *Ped. halophilus*, được sử dụng trong lên men các sản phẩm chứa nồng độ muối cao, hiện nay được phân loại thành *Tet halophilus*.

7.3.5. *Lactobacillus*

Chi *Lactobacillus* gồm một nhóm không đồng nhất của các vi khuẩn Gram dương hình que, thường không di động, không sinh bào tử, kỵ khí bắt buộc, rất thay đổi về mặt hình thái và về các đặc điểm sinh trưởng và trao đổi chất. Tế bào thay đổi từ trực khuẩn rất ngắn (giống hình gậy cầu) đến trực khuẩn rất dài, mảnh và tương đối dày, thường uốn cong và có thể có mặt dưới dạng các tế bào đơn độc hoặc đứng thành chuỗi từ ngắn đến dài. Khi sinh trưởng trên glucose, tùy loài chúng có thể sản sinh hoặc là axit lactic [L(+), D(-), hoặc DL], hoặc một hỗn hợp của axit lactic, ethanol, axit axetic và CO₂. Một số cũng tạo thành diacetyl. Nhiều loài sử dụng lactose, saccarose, fructose, hoặc galactose và một số loài có thể lên men các đường pentose. Nhiệt độ sinh trưởng có thể dao động từ 1 đến 50°C. Nhưng hầu hết những loài được sử dụng làm giống khởi động trong lên men thực phẩm có kiểm soát sinh trưởng tốt trong khoảng từ 25 tới 40°C. Một số loài tham gia vào sự lên men tự nhiên của một số loại thực phẩm ở nhiệt độ thấp, có thể sinh trưởng tốt ở 10 đến 25°C. Khi sinh trưởng trên một nguồn hydrat cacbon có thể chuyển hoá, tùy loài, có thể làm giảm pH tới giữa 3,5 và 5,0. Chúng được phân bố rộng và có thể tìm thấy trong thực vật, rau, ngũ cốc, hạt, các sản phẩm sữa tươi và được chế biến, các sản phẩm thịt thô được chế biến và được lên men, các loại rau lên men, một số gặp trong đường tiêu hoá của người, động vật và chim. Nhiều loài có liên quan đến sự gây hư hỏng thực phẩm. Trong số các loài này, một số đã được sử dụng trong lên men có kiểm soát (sữa, thịt, rau và ngũ cốc), một số đã được biết là có liên quan đến sự lên men tự nhiên các loại thực phẩm, một số được ăn sống do hiệu quả có ích đối với sức khỏe đường ruột và một số khác gây hiệu quả không mong muốn lên thực phẩm. Trên cơ sở

các mô hình trao đổi chất của chúng đối với các hexose và pentose, các loài có thể được chia thành ba nhóm.

Nhóm I, lên men các hexose (và các disaccarit như lactose và saccrose) chủ yếu tạo ra axit lactic và không lên men các pentose (như ribose, xylose, hoặc arabinose). Là bọn lên men lactic đồng hình (tạo thành chủ yếu axit lactic) và lên men dị hình (tạo thành axit lactic và nhiều sản phẩm khác).

Nhóm II, tùy thuộc vào loại hydrat cacbon và số lượng có thể nhận được chủ yếu tạo ra axit lactic hoặc một hỗn hợp gồm các axit lactic, axetic và formic, ethanol và CO₂.

Nhóm III, lên men hydrat cacbon thành một hỗn hợp của lactat, axetat, ethanol và CO₂. Ba dưới loài của *Lactobacillus delbrueckii* được sử dụng trong lên men các sản phẩm sữa như một số loại phomat và yogurt. Chúng sinh trưởng tốt ở 45°C và lên men lactose để tạo thành những lượng lớn axit lactic D(-). P-galactosidase ở các dưới loài này là một enzym cấu trúc. *Lab. acidophilus* và *Lab. reuteri* được coi như những vi sinh vật đường ruột có ích (probiotic) và có mặt trong ruột non. *Lab. acidophilus* được sử dụng để sản xuất các sản phẩm sữa lên men và cũng được bổ sung vào sữa đã khử trùng Pasteur, hoặc để đóng thành viên hoặc viên nén dùng như các chế phẩm probiotic. Nó chuyển hoá lactose và tạo ra những lượng lớn axit lactic D(-). Tuy nhiên, ở *Lab. acidophilus*, P-galactosidase thường là một enzym cảm ứng. *Lab. helveticus* được sử dụng để sản xuất một số loại phomat và lên men lactose thành axit lactic (DL). *Lab. casei* ssp. *casei* được sử dụng trong một số sản phẩm sữa lên men. Nó lên men lactose và tạo ra axit lactic L(+). Một số chủng cũng được sử dụng làm các vi khuẩn probiotic. Các chủng của *Lab. casei* ssp. *ramnosus* (cũng được gọi là *Lab. ramnosus*) hiện được sử dụng làm một vi khuẩn probiotic. Một số chủng *Lab. johnsonii* cũng được sử dụng trong các chế phẩm probiotic. *Lab. plantarum* được sử dụng trong lên men rau và thịt. Nó tạo ra axit DL. *Lab. curvatus* và *Lab. sake* có thể sinh trưởng ở nhiệt độ thấp (2 đến 4°C) và lên men các sản phẩm rau và thịt. *Lab. sake* được sử dụng để lên men rượu sake. *Lab. kefir* quan trọng trong lên men kefir, một loại sữa chua dân tộc lên men. *Lab. sanfrancisco* kết hợp với các vi sinh vật khác trong lên men bánh mì, được dùng để làm bột chua San Francisco. *Lab.*

uiridescens, Lab. curvatus và Lab sake có liên quan đến sự gây hư hỏng các sản phẩm thịt đông ở phòng lạnh.

7.3.6. Oenococcus

Oen. oeni, trước đây được gọi là Leu. oeni, mang các đặc điểm chung của Leuconostoc spp. Nó gặp trong môi trường rượu vang. Đôi khi nó được sử dụng để tăng cường sự lên men malolactic trong rượu vang. Tế bào vận chuyển malat trong rượu vang và chuyển hoá nó thành axit lactic và CO₂. Quá trình này làm giảm độ chua của rượu vang.

7.4. Các loại giống khởi động khác:

7.4.1. Bifidobacterium

Về mặt hình thái, chúng giống như một số Lactobacillus spp. và trước đây được xếp vào chi Lactobacillus. Tế bào là các trực khuẩn Gram dương có hình dạng và kích thước khác nhau, đứng đơn độc hoặc thành chuỗi dài ngắn khác nhau. Chúng không sinh bào tử, không di động và kỵ khí, mặc dù một số có thể chịu được (X khi có mặt CO₂). Các loài sinh trưởng tối ưu ở 37 đến 41°C với một biên độ nhiệt độ sinh trưởng từ 25 đến 45°C. Chúng thường không sinh trưởng được ở pH trên 8 hoặc dưới 4,5. Chúng lên men glucose để tạo ra axit lactic và axetic theo tỷ lệ phân tử 2 : 3 và không sinh CO₂, cũng lên men lactose, galactose và một số pentose. Chúng đã được phân lập từ phân người, động vật, chim và được coi là có ích đối với sức khỏe bình thường của đường tiêu hoá. Chúng có mặt với số lượng lớn trong phân của trẻ sơ sinh 2 đến 3 ngày tuổi và thường có mặt với số lượng lớn ở trẻ đang bú mẹ. Chúng thường gặp trong ruột già. Nhiều loài thuộc chi này đã được phân lập từ phân của người và động vật. Một số trong đó là Bifidobacterium bifidum, Bif. longum, Bif. brevis, Bif. infantis và Bif. adolescentis. Tất cả đã phân lập được ở người, tuy nhiên, một số loài thích hợp sống ở trẻ em hơn là ở người lớn. Một số trong các loài này đã được thêm vào các sản phẩm sữa để cung cấp các tế bào sống với số lượng cao để phục hồi và duy trì sự lành mạnh của ruột người.

7.4.2. Propionibacterium

Chi này gồm các loài trong nhóm Propionibacterium cổ điển, có trong sữa và trong nhóm Propionibacterium của da và của trứng cá. Ở đây chỉ thảo luận nhóm có trong sữa.

Tế bào là những trực khuẩn Gram dương đa hình, dày, dài từ 1 đến 1,5 μ m, đứng đơn độc thành cặp hoặc chuỗi ngắn với các hình dạng khác nhau. Chúng không di động, không sinh bào tử, kỵ khí (cũng có thể chịu khí), catalase dương tính và lên men glucose để tạo ra những lượng lớn axit propionic và axit axetic. Tùy loài, chúng cũng lên men lactose, saccarose, fructose, galactose và một số pentose. Chúng sinh trưởng tối ưu ở 30 đến 37°C. Một số loài tạo thành sắc tố. Chúng đã được phân lập từ sữa tươi, một số loại phomat, sản phẩm sữa và cốm chua. Hiện nay, có 4 loài *Propionibacterium* sữa nằm trong chi này: *Propionibacterium freudenreichii*, *Pro. jensertii*, *Pro. thoenii* và *Pro. acidipropionici*. Cả 4 loài đều liên quan tới sự lên men tự nhiên các loại phomat kiểu Thụy Sĩ, riêng *Pro. freudenreichii* đã được sử dụng làm giống khởi động trong lên men có kiểm soát.

7.4.3. *Brevibacterium*

Chi này chứa một hỗn hợp các loài vi khuẩn hình chùy, một số trong chúng có tầm ứng dụng quan trọng trong sản xuất phomat và trong các quá trình lên men công nghiệp khác. *Brevibacterium linens* được sử dụng trong quá trình làm chín phomat vì nó sinh các protease ngoại bào. Tế bào không di động, Gram dương, có khả năng sinh trưởng ở độ muối cao và phạm vi pH rộng.

7.4.4. *Acetobacter*

Một loài trong chi này *Ace. aceti*, được sử dụng để sản xuất axit axetic từ rượu. Tế bào là những trực khuẩn (0,5 đến 1,5 μ m), Gram dương, hiếu khí, đứng đơn độc, thành cặp hoặc thành chuỗi, có thể di động hoặc không. Chúng là bội hiếu khí bắt buộc, catalase dương tính và oxy hóa ethanol thành axit axetic; oxy hóa axit lactic thành CO_2 và H_2O . Chúng sinh trưởng tốt ở 25 đến 30°C. Chúng gặp tự nhiên trong quả, rượu sake, rượu vang cọt, rượu quả, bia, dịch, nước ép mía và đất. Một số loài tổng hợp được những lượng lớn cellulose.

7.5. Nấm men và nấm mốc

Nhiều nấm men và nấm mốc có tầm quan trọng trong thực phẩm nhưng hầu hết tham gia vào sự gây hư hỏng thực phẩm và sinh mycotoxin (bởi nấm mốc). Tuy nhiên, một số được sử dụng trong chế biến sinh học thực phẩm. Hiện nay, những sự cải thiện di

truyền đang được tiến hành để cải thiện các đặc tính mong muốn của chúng. Sau đây là một số nấm men và nấm mốc được sử dụng trong lên men thực phẩm.

7.5.1. Nấm men

Trong số nhiều loại nấm men, chỉ có một số có liên quan tới lên men các loại thực phẩm và lên men rượu, sản sinh enzym dùng trong thực phẩm, sản xuất SCP và được dùng dưới dạng các chất điều vị, tạo hương vị mong muốn trong một số loại thực phẩm. Chi và loài quan trọng nhất được sử dụng là *Saccharomyces cerevisiae*. Nó được dùng để làm nở bánh mì và sản xuất bia, rượu vang, rượu cất và cồn công nghiệp; sản xuất enzym invertase và làm hương vị cho một số loại thực phẩm (xúp). Nhiều chủng đã được tạo ra nhằm phục vụ cho các nhu cầu đặc biệt. Các tế bào có hình tròn, hình oval hoặc kéo dài. Chúng sinh sản bằng cách nảy chồi đa cực, hoặc bằng cách tiếp hợp và tạo thành các bào tử túi. Các chủng thường được xếp thành nấm men đáy và nấm men nổi. Nấm men nổi sinh trưởng rất nhanh ở 20°C, tạo ra rượu và CO₂, chúng cũng kết đám, nổi trên bề mặt, do sự tạo thành CO₂ nhanh. Ngược lại, nấm men đáy sinh trưởng tốt hơn ở 10 đến 15°C, sinh CO₂ chậm (cũng sinh trưởng chậm), không kết đám và thường lắng xuống đáy. Nấm men nổi và nấm men đáy được sử dụng cho từng quá trình lên men đặc thù tùy theo yêu cầu. *Candida utilis* đã được sử dụng để sản xuất SCP. Nó là một nấm men giả và sinh sản nhờ nảy chồi (không nhờ tiếp hợp). Tế bào hình oval tới kéo dài và tạo thành các sợi nấm với số lượng lớn các tế bào đang nảy chồi. Chúng cũng tham gia gây hư hỏng thực phẩm. *Kluyveromyces marxianus* và *K. marxianus* var. *lactis* có thể thủy phân lactose và cùng với các nấm men và vi khuẩn lactic khác có liên quan tới lên men tự nhiên các sản phẩm sữa chứa rượu như kefir. Chúng cũng có liên quan tới sự hư hỏng một số sản phẩm sữa. Hiện tại, chúng được sử dụng để sản xuất p-galactosidase (lactase) nhằm sử dụng trên thị trường để thủy phân lactose. Hiện nay enzym này cũng được sử dụng để sản xuất sữa chứa hàm lượng lactose thấp.

7.5.2. Nấm mốc

Mặc dù đa số nấm mốc có liên quan đến sự gây hư hỏng thực phẩm và nhiều loài sinh mycotoxin khi sinh trưởng trong thực phẩm, song các loài và chủng khác cũng được sử dụng trong chế biến thực phẩm và để sản xuất các chất điều vị cũng như các enzym

dùng trong thực phẩm. Nói chung, nấm mốc là các nấm sợi đa bào. Sợi (hyphae) của chúng có thể có vách ngăn hoặc không và chứa nhân, chúng phân chia bằng cách kéo dài ở đầu sợi nấm (sinh sản dinh dưỡng), hoặc bằng cách tạo thành các bào tử hữu tính hoặc vô tính trên một thể mang bào tử. Trong số' nhiều chi, một số" loài thuộc các chi *Aspergillus* và *Penicillium*, cũng như một số loài *Rhizopus* và *Mucor*, đã được sử dụng cho các mục đích có lợi trong thực phẩm. Các chủng được sử dụng với các mục đích như vậy cần không sinh mycotoxin. Rất khó xác định các chủng không sinh mycotoxin trong trường hợp lên men tự nhiên nhưng cần phải có sự quan tâm đặc biệt khi lựa chọn chủng để sử dụng trong lên men có kiểm soát. *Aspergillus oryzae* được sử dụng trong một số loại thực phẩm Phương Đông như sake, tương và moso. Nó cũng được sử dụng làm một nguồn enzym thực phẩm. *Asp. niger* được sử dụng để sản xuất axit citric và axit gluconic từ đường saccarose. Nó cũng được sử dụng như một nguồn enzym pectinase và amylase. *Penicillium roquefortii* được sử dụng để làm chín các loại phomat Roquefort, Gorgonzola và xanh lam. Một số' chủng có thể sản xuất độc tố thần kinh roquefortin. Khi chọn lọc và tạo ra các chủng để sử dụng trong sản xuất phomat, những đặc điểm này cần phải được xem xét kỹ lưỡng. *Pen. camembertii* được sử dụng để sản xuất phomat Camembert. Còn *Pen. caseicolum* được sử dụng sản xuất phomat Brie. Chúng cũng được sử dụng để sản xuất enzym glucose oxidase.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 7

1. Thảo luận về các tiêu chí được sử dụng để chọn lựa một vi sinh vật theo các mục đích có lợi trong thực phẩm.
2. Kể các cách khác nhau vi sinh vật được sử dụng theo hướng có lợi trong thực phẩm.
3. Kể các chi hiện được xếp vào nhóm các vi khuẩn lactic. 4. Kể các chi hiện đang được sử dụng làm giông khởi động trong lên men thực phẩm.
5. Kể 1 loài từ mỗi chi *Lactococcus* và *Streptococcus*, 2 loài từ các chi *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* và *Propionibacterium* được sử dụng trong lên men thực phẩm.
6. Các loài trong chi *Lactobacillus* được chia thành các nhóm dựa trên cơ sở nào? Mỗi nhóm kể tên hai loài.

7. Khi nào các thuật ngữ sau đây được sử dụng: lactococci và Lactococcus; streptococci và Streptococcus', leuconostocs và Leuconostoc; pediococci và Pediococcus; lactobacilli và Lactobacillus?
- 8 . Kể tên 3 loài vi khuẩn hiện được sử dụng làm các vi khuẩn probiotic.
9. Trong lên men các loại thực phẩm và đồ uống khác nhau nhờ nấm men, chỉ có một loài được sử dụng. Nói tên loài này và thảo luận một loài có thể có hiệu quả trong rất nhiều quá trình lên men như thế nào? Thảo luận về các đặc điểm của nấm men nổi và nấm men đáy. Kể tên một loài hiện được sử dụng để sản xuất thương mại p-galactosidase (lactase).
10. Bằng cách nào nấm mốc được sử dụng theo các cách khác nhau trong thực phẩm? Kể tên 2 loài và liệt kê các ứng dụng của chúng. Điều gì cần đề phòng khi sử dụng 1 chủng nấm mốc trong lên men thực phẩm.