BÀI GIẢNG
MÔN HỌC VI SINH THỰC PHẨM

Số đvht: 4 (3LT + 1TH)

Phần Lý Thuyết

Chương I: MỞ ĐẦU (2t)

I.1. Giới thiệu môn vi sinh thực phẩm

I.1.1. Một số khái niệm

Vi sinh vật là tên gọi chung của những sinh vật có kích thước nhỏ bé mà mắt thường không nhìn thấy được, chỉ có thể quan sát chúng bằng kính hiển vi. Vi sinh vật gồm rất nhiều nhóm khác nhau: virus, vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, protozoa, tảo...

Thực phẩm là những chất mà con người có thể nuốt và tiêu hoá được để cung cấp các chất dinh dưỡng và năng lượng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cơ thể. Thực phẩm bao gồm nhiều loại và tồn tại ở nhiều dạng khác nhau như: nước, thịt, cá, trứng, sữa, rau quả… Thực phẩm có thể là các vật thể sống hoặc các sản phẩm đã qua chế biến từ các nguyên liệu ban đầu.

Vi sinh vật học thực phẩm là một môn khoa học nghiên cứu về những hoạt động sinh lý của vi sinh vật có ảnh hưởng đến chất lượng của lương thực thực phẩm, tìm hiểu các quy luật phát triển của vi sinh vật trên thực phẩm để có những biện pháp ngăn ngừa tác động tiêu cực và phát huy tác động tích cực của chúng trong quá trình bảo quản và chế biến thực phẩm. Không phải tất cả các nhóm vi sinh vật đều được các nhà vi sinh thực phẩm quan tâm ngang nhau.

I.1.2. Yêu cầu của môn vi sinh thực phẩm

Sau khi học xong môn học này học viên phải hình thành được các năng lực cơ bản sau:

a. Về kiến thức

- Nhận thức được vai trò của vi sinh vật trong chế biến cũng như trong bảo quản thực phẩm. Cũng như tác hại của vi sinh vật khi chúng nhiễm vào thực phẩm
- Nắm vững một số nhóm vi sinh vật chính có ý nghĩa trong sản xuất thực phẩm, cơ chế hoạt động của chúng, những ứng dụng chính trong sản xuất, chế biến và bảo quản thực phẩm.

b. Về kỹ năng

Biết liên hệ, vận dụng được vào thực tế sản xuất và cuộc sống trong chế biến và bảo quản thực phẩm. Có các kỹ năng cơ bản trong công tác kiểm nghiệm các chỉ tiêu vi sinh của thực phẩm.

c. Về thái độ

- Yêu thích môn vi sinh thực phẩm với mong muốn khám phá những đặc tính còn tiềm ẩn của thế giới vi sinh vật kỳ diệu ảnh hưởng lên thực phẩm.

- Có năng lực tự học, tự nghiên cứu để nâng cao hiểu biết và ứng dụng của vi sinh vật trong ngành thực phẩm.

I.1.3. Nội dung môn học:

Môn Vi sinh vật học thực phẩm gồm có 6 chương với các nội dung chính như sau:

- Chương 1: Mở đầu (Giới thiệu tổng quan về môn học)
- Chương 2: Các quá trình vi sinh quan trọng liên quan đến chế biến và bảo quản thực phẩm (Cung cấp những kiến thức cơ bản nhất về các hoạt động của vi sinh vật trong thực phẩm: các quá trình lên men kỵ khí, hiếu khí và thối rữa. Các ứng dụng quan trọng trong thực phẩm như lên men rượu, lên men lactic, acetic,...)
- Chương 3**:** Ảnh hưởng của các yếu tố của thực phẩm đến sự phát triển của vi sinh vật và các phương pháp bảo quản (Phân tích sự ảnh hưởng của các yếu tố bên trong thực phẩm: pH, độ ẩm, hàm lượng oxy, thành phần hóa học của thực phẩm cũng như các yếu tố bên ngoài: nhiệt độ, độ ẩm không khí, nồng độ các chất khí, hệ vi sinh vật hiện diện trong thực phẩm…)
- Chương 4: Hệ vi sinh vật thực phẩm (Giới thiệu hệ vi sinh vật trên các loại thực phẩm quan trọng: thịt, cá, trứng, sữa, nông sản, rau quả, bột bánh mì... và các sản phẩm của chúng)
- Chương 5: Vi sinh vật gây bệnh và ngộ độc thực phẩm (Giới thiệu các vi sinh vật gây nên các bệnh thường gặp như tả, lỵ, thương hàn, nhiệt thán, bruxella, lao,... và các dạng ngộ độc do nấm, tảo, vi khuẩn)
- Chương 6: Các phương pháp kiểm nghiệm vi sinh trong thực phẩm (Giới thiệu về các chỉ tiêu vi sinh trong kiểm nghiệm thực phẩm, các phản ứng sinh hóa của vi sinh vật, các phương pháp truyền thống và hiện đại thường được sử dụng trong công tác kiểm phẩm)

I.1.4. Tài liệu tham khảo:

1. Lương Đức Phẩm – 2001 – Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm – NXB Nông nghiệp – Hà Nội
2. Lê Xuân Phương – Vi sinh công nghiệp – NXB xây dựng.
3. Nguyễn Đức Lượng, Phạm Minh Tâm – Vệ sinh và an toàn thực phẩm – Đại học Kỹ thuật – Thành phố Hồ Chí Minh.
4. Trần Linh Thước – Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mĩ phẩm – NXB Giáo Dục.

I.2. Lịch sử phát triển ngành vi sinh thực phẩm

Các quá trình hư hỏng thực phẩm và những phương pháp bảo quản và lên men thực phẩm đã được con người biết đến từ rất lâu, khi mà người ta chưa hiểu vi sinh vật là gì. Người ta đã biết nấu rượu, làm mắm, lên men sữa…nhưng đây chỉ là những ứng dụng ngẫu nhiên. Mãi sau này khi mà Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) chế tạo ra được kính hiển vi mới phát hiện ra được những vi sinh vật nhỏ bé mà lâu nay vẫn là điều bí ẩn đối với nhân loại.

Mãi đến năm 1800 thì mối liên quan giữ thực phẩm và vi sinh vật mới được phát hiện. Sau những khám phá của Pasteur và một số nhà vi sinh vật khác là thời kỳ phát triển mạnh mẽ của ngành công nghiệp lên men. Ta có thể xem xét một số giai đoạn sau:

Giai đoạn trước Pasteur (1860): phát hiện và ứng dụng một số quá trình lên men thực phẩm như: làm mắm, làm nước tương, muối chua rau quả, làm bánh mì… Cuối giai đoạn này con người đã biết lên men hiếu khí để sản xuất giấm. Từ đó đã phát triển một bước lớn trong lĩnh vực nuôi cấy vi sinh vật và vệ sinh thực phẩm.

Giai đoạn 1806-1900: phát hiện thêm quá trình lên men lactic và ứng dụng rộng rãi quá trình này vào đời sống thực tiễn. Phát triển nuôi cấy thu sinh khối bằng cách thổi không khí vào môi trường lỏng.

Giai đoạn 1900-1920: công nghiệp sản xuất glyxerin, axeton, butanol phát triển mạnh mẽ.

Giai đoạn 1920-1940: các thiết bị lên men được hoàn thiện dần. Phát hiện một số quá trình lên men khác như sản xuất sorboza, gluconic. Trong giai đoạn này người ta đã biết khử trùng không khí trước khi cung cấp cho các quá trình lên men hiếu khí.

Giai đoạn 1940-1950: quá trình sản xuất kháng sinh được phát hiện, đặc biệt là quá trình sản xuất penicillin. Bên cạnh đó đã sản xuất được vitamin B_{12} và riboflavin.

Giai đoạn 1950-1960: là giai đoạn hoàn thiện công nghệ sản xuất kháng sinh và bắt đầu công nghệ sản xuất axit amin và enzyme.

Giai đoạn 1960 đến nay: là giai đoạn phát triển mạnh mẽ việc sản xuất axit amin, enzyme, đồng thời hoàn thiện toàn bộ thiết bị lên men. Quá trình lên men được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm, y học, nông nghiệp…

I.3. Tác động của vi sinh vật trong thực phẩm:

I.3.1. Gây hư hỏng thực phẩm:

Hệ vi sinh vật thực phẩm được phát sinh từ nhiều nguồn khác nhau:

- Thực phẩm bị nhiễm vi sinh vật từ môi trường bên ngoài, tay công nhân, dụng cụ, quá trình chuyên chở, bảo quản…
- Thực phẩm bị nhiễm vi sinh vật từ bản thân nguyên liệu.

Do thực phẩm thường là những chất chứa nhiều nước, nhiều chất dinh dưỡng, vitamin và khoáng chất nên đây là môi trường thuận lợi cho nhiều loài vi sinh vật có hại phát triển. Mỗi loại thực phẩm thường có một hệ vi sinh vật riêng và hoạt động của chúng gây nên những biến đổi sinh hoá, cơ lý trong thực phẩm và làm giảm chất lượng hoặc hư hỏng thực phẩm. Ta phải nghiên cứu để hiểu thật rõ về hệ vi sinh vật thực phẩm và những biến đổi do chúng gây nên nhằm mục đích bảo quản thực phẩm trong thời gian dài nhất với số lượng và chất lượng hao hụt của thực phẩm là ít nhất.

I.3.2. Thực phẩm mang vi sinh vật gây bệnh

Khi chúng ta ăn phải các loại thực phẩm mang vi sinh vật gây bệnh hoặc độc tố của chúng sẽ gây ra nhiều bệnh cho cơ thể người là động vật có thể để lại

hậu quả nghiêm trọng thậm chí dẫn đến tử vong. Các bệnh thường gặp là thương hàn do vi khuẩn *Salmonella*, tả do *Shigella,* lao do *Micobacterium*,... Ngoài ra còn có thể dẫn đến các triệu chứng ngộ độc nghiêm trọng nếu chúng ta ăn phải độc tố của vi khuẩn như độc tố botulin của vi khuẩn độc thịt *Clostridium botulinum*, độc tố của vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus.*

I.3.3. Ứng dụng có lợi của vi sinh vật trong chế biến thực phẩm

Trong thực tế đời sống hiện nay người ta đã biết lợi dụng những biến đổi có lợi của vi sinh vật để tạo ra những sản phẩm thực phẩm có chất lượng và phù hợp hơn cho nhu cầu dinh dưỡng ngày càng cao của con người. Như sử dụng sinh khối vi sinh vật làm nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng, ứng dụng các quá trình lên men rộng rãi trong việc sản xuất các loại thực phẩm quan trọng như: rượu, bia, nước giải khát, bánh mì, nước mắm, mì chính,…cũng như làm gia tăng giá trị dinh dưỡng của các loại thực phẩm như tempeh, natto… được lên men từ đậu nành.

Câu hỏi chương I:

1. Vi sinh vật thực phẩm là gì? Yêu cầu, nội dung của môn học?
2. Lịch sử phát triển của vi sinh vật thực phẩm?
3. Những tác động của vi sinh vật trong thực phẩm?

Chương II: CÁC QUÁ TRÌNH VI SINH QUAN TRỌNG LIÊN QUAN ĐẾN CHẾ BIẾN VÀ BẢO QUẢN THỰC PHẨM (11t)

Trong quá trình sống của mình, vi sinh vật gây ra những quá trình hóa sinh làm ảnh hưởng lớn đến vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên và những quá trình này được ứng dụng trong hàng loạt ngành sản xuất cũng như làm cơ sở khoa học để chọn các phương pháp bảo quản và chế biến thực phẩm.

Những quá trình hóa sinh này chia thành hai loại: lên men và thối rữa.

Lên men là quá trình chuyển hóa vật chất hữu cơ không chứa nitơ (hydrat cacbon, chất béo) dưới tác dụng của vi sinh vật. Thông qua quá trình này mà cung cấp nguyên vật liệu để tạo nên các cấu tử của tế bào. Lên men lại chia thành hai kiểu chính là: lên men kỵ khí và lên men hiếu khí.

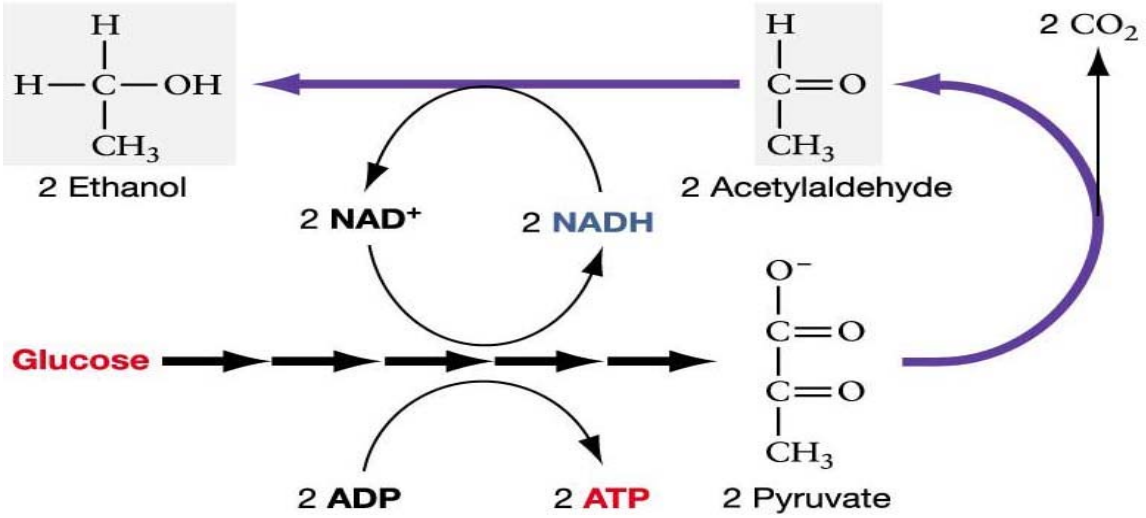
II.1. QUÁ TRÌNH LÊN MEN KỴ KHÍ

Lên men kỵ khí do các vi sinh vật kỵ khí hoặc kỵ khí tùy tiện gây ra.

II.1.1. Lên men rượu:

Lên men rượu là quá trình phân giải đường thành rượu và khí cacbonic dưới tác dụng của vi sinh vật. Trong tất cả các quá trình chuyển hóa glucid do vi sinh vật gây ra, sự lên men rượu được ứng dụng rộng rãi nhất trong công nghiệp, ứng dụng này đã có từ thời xưa sơ bộ để sản xuất rượu vang, bia và các nước uống giải khát lên men khác.

II.1.1.1. Cơ chế của quá trình lên men rượu



Phương trình tổng quát của quá trình này như sau:

$C_6H_{12}O_6 + 2(P) + 2ADP = 2C_2H_5OH + 2CO_2\uparrow + 2ATP$

(glucoza) (rượu etylic)

Đường và các chất dinh dưỡng khác của môi trường lên men, trước tiên được hấp thụ trên bề mặt và sau đó khuếch tán qua màng bán thấm và vào bên trong tế bào nấm men, sự phân hủy đường thành rượu trong tế bào nấm men xảy ra bằng hàng loạt các phản ứng với sự tham gia rất phức tạp của nhiều loại enzyme

khác nhau, bước cuối cùng của quá trình lên men là sự chuyển hóa axit pyruvic thành rượu etylic và khí CO_2.

Phương trình tổng quát nêu ở trên chỉ cho thấy nguyên liệu đầu và sản phẩm chính còn thực ra quá trình lên men rất phức tạp qua nhiều giai đoạn và tạo thành nhiều sản phẩm phụ: glyxerin, aldehyt axetic, các axit xucsinic, axetic, lactic và xitric, các este và rượu bậc cao.

Sự lên men thông thường: khi môi trường có pH từ 4 đến 5, nó chia thành từng thời kỳ khác nhau:

- Thời kỳ cảm ứng:
  - Lượng acetaldehyt ($CH_3CH=O$) được tạo thành còn ít.
  - Ion H^+ được chuyển từ $NADH_2$ đến glyxeraldehyt-3-photphat để tạo thành glyxerin 3-photphat.
  - Sau đó glyxerin 3-photphat bị mất gốc photphat để tạo thành glyxerin.

$$\textbf{Glyxeracetaldehyt–3–photphat} \xrightarrow[NAD^+]{NADH_2} \textbf{Glyxeryl–3–photphat} \xrightarrow{-P} \textbf{Glyxeryl}$$

- Thời kỳ tĩnh:
  - Khi lượng acetaldehyt ($CH_3CH=O$) tạo thành đạt được một lượng nhất định,
  - Axetaldehyt bị khử tạo thành rượu etylic.

Glyxerin chỉ được tạo thành từ thời kỳ cảm ứng do đó nó chỉ là sản phẩm phụ trong khi lên men trong môi trường axit.

Phương trình tổng quát của quá trình này như sau:

$$C_6H_{12}O_6 + 2(P) + 2ADP = 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$$

Sự lên men trong điều kiện kiềm yếu:

- Nếu tiến hành kiềm hoá môi trường bằng Na_2CO_3, K_2CO_3 hay $(NH4)_2CO_3$ thì axetaldehyt vừa bị khử vừa bị oxi hoá, vì vậy chất nhận H_2 từ NADH là glyxeraldehit 3-photphat và kết quả sẽ tạo thành glyxerin. Như vậy trong môi trường kiềm ta thu được glyxerin, axit axetic và rượu etylic.

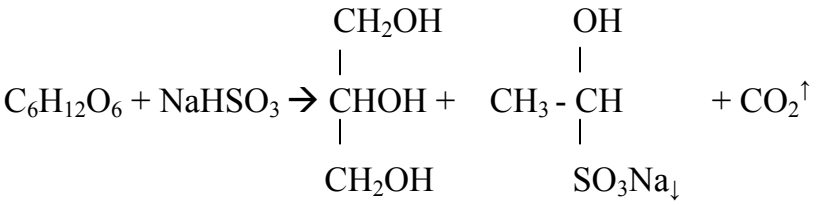
  Phương trình tổng quát như sau:

$$2C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} + CH_3COOH + C_2H_5OH + 2CO_2$$

  (glucoza) (glyxerin) (axit acetic)

- Nếu thêm $NaHSO_3$ vào môi trường thì nó sẽ kết hợp với axetaldehyt thành acetaldehitbisulfitnatri khó tan. Khi đó không có axetaldehyt làm chất nhận H_2, vì vậy lúc này chất nhận H_2 là Dioxyacetonphotphat. Kết quả là tạo thành glyxerin .

Phương trình tổng quát của quá trình này như sau:



Trong thực tế người ta có thể thu được 40% glyxerin so với nguyên liệu ban đầu.

Nếu trong môi trường lên men có các axit amin thì rượu bậc cao (propanol, izobutanol và izoamylic) được tạo thành do các axit amin bị khử amin.

II.1.1.2.Vi sinh vật lên men rượu

a. Nấm men

Nấm men là tác nhân cơ bản gây nên quá trình lên men rượu, tuy nhiên không phải loài nào cũng lên men đường thành rượu được mà chỉ có một số loài có khả năng này. Trong sản xuất hiện nay người ta thường dùng một số loài thuộc họ *Saccharomycesaceae.*

Theo đặc tính lên men người ta chia nấm men thành hai nhóm: nấm men lên men nổi và nấm men lên men chìm.

Nấm men nổi: là những nấm men có cường lực lên men rất nhanh và mạnh. Nhiệt độ thích hợp cho nấm men này sinh trưởng từ 20 ÷ 28^oC, có tốc độ lên men rất lớn, lượng đường tiêu thụ rất nhiều. Do sinh ra nhiều khí CO_2 nên các tế bào nấm men ở dưới sẽ theo CO_2 nổi lên trên bề mặt, vì vậy nấm men hoạt động mạnh hơn và lên men cả các phân tử đường trên bề mặt. Người ta thường sử dụng để sản xuất cồn và bánh mì. Tiêu biểu là loài *Saccharomyces cerevisiae.*

Nấm men chìm: là những nấm men có cường lực lên men yếu, nhiệt độ thích hợp từ 5 ÷ 10^oC. Trong quá trình lên men lượng khí CO_2 tạo ra ít và do nhiệt độ thấp nên nó được giữ lại trong dung dịch lên men. Nấm men tiếp xúc ít và sau khi lên men chúng tạo thành váng cặn dưới đáy thùng. Quá trình lên men chậm và xảy ra từ từ. Tiêu biểu là loài *Saccharomyces ellipsoideus*. Nấm men chìm thường dùng trong sản xuất bia, rượu vang, sâmpanh.

b. Nấm mốc

Nếu sản xuất rượu từ tinh bột thì chúng ta phải qua bước đường hoá tức là giai đoạn chuyển tinh bột thành đường. Ngày nay người ta thường sử dụng nấm mốc cho giai đoạn này. Nấm mốc cho enzyme amylase để chuyển tinh bột thành đường.

Hiện nay người ta thường sử dụng một số loài nấm mốc sau:

Aspergillus oryzae: là nấm mốc có màu vàng, bào tử hở. Đặc điểm của nó là có hệ enzyme amilase và protease. Được sử dụng rộng rãi trong sản xuất tương và nước chấm.

Aspergillus usamii: là nấm mốc có màu xám trắng, rất giàu enzyme amylase. Được sử dụng rất rộng rãi trong công nghiệp sản xuất rượu.

Aspergillus awamori: là nấm mốc có màu xám đen giàu enzyme amylase. Được ứng dụng rất rộng rãi trong công nghiệp sản xuất rượu.

Mucor rouxii: thường có màu xám trắng, được sử dụng rộng rãi trong các nhà máy rượu sản xuất theo phương pháp amilo. Khác với cả 3 loài trên phải nuôi cấy trên môi trường đặc, *Mucor* phát triển tốt trong môi trường lỏng và tạo nhiều enzyme amylase.

c. Vi khuẩn:

Một số vi khuẩn có khả năng lên men chuyển hóa đường thành rượu như: *Sasina ventriculi*, *Zymononas mobylis*, ngoài ra còn có vi khuẩn lactic dị hình, vi khuẩn đường ruột hay *Clostridium* cũng có khả năng lên men đường thành rượu etylic, butylic…Tuy nhiên, trong công nghiệp thực phẩm người ta chủ yếu sử dụng nấm men trong lên men rượu.

Trong sản xuất một số nhà máy sản xuất còn sử dụng vi khuẩn lactic để tạo pH môi trường thích hợp cho quá trình lên men rượu. Tức là sau khi đường hoá xong người ta cho vi khuẩn lactic vào môi trường, chúng sẽ phát triển và tạo lượng axit nhất định, độ axit này thích hợp nấm men phát triển và tiến hành lên men. Thường người ta sử dụng vi khuẩn *Thermobacterium cereale* và vi khuẩn *Denbrue*.

II.1.1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu

Nấm men đòi hỏi phải có những điều kiện nhất định mới có thể lên men. Trong sản xuất ngoài việc lựa chọn chủng nấm men còn phải nghiên cứu tạo điều kiện thích hợp nhất để đạt hiệu suất lên men cao.

a. Nồng độ đường

Tất cả nấm men chỉ có khả năng lên men các đường đơn giản như đường đơn (glucose, fructose) và đường đôi (maltose, saccarose) riêng đường lactose chỉ có nấm men *Saccharomyces lactic* sử dụng được. Nấm men hoàn toàn không có khả năng thủy phân các loại đường đa.

Nồng độ đường thích hợp nhất cho quá trình lên men rượu từ 8 ÷ 20%. Khi nồng độ đường lớn hơn 30% sẽ ức chế quá trình lên men rượu. Tuỳ thuộc vào sản phẩm của quá trình lên men mà người ta sử dụng nồng độ đường thích hợp. Trong sản xuất cồn người ta sử dụng nồng độ đường từ 14 ÷ 20%, quá trình lên men xảy ra mạnh và hết lượng đường sau đó người ta chưng cất để thu cồn. Đối với việc sản xuất rượu vang người ta sử dụng nồng độ đường từ 16 ÷ 25% và dùng nấm men chìm, nên quá trình lên men chậm và sau khi lên men vẫn còn một lượng đường trong rượu vì vậy rượu vang thường có vị ngọt. Còn trong sản xuất bia thường dùng nồng độ đường từ 9 ÷ 12%.

b. Oxy

Nấm men là loại vi sinh vật hô hấp tùy tiện. Trong điều kiện hiếu khí với sự có mặt của oxy sẽ xảy ra phương trình phản ứng sau:

$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6H_2O + 6CO_2 + Q_1 \rightarrow$ gia tăng sinh khối

Chỉ trong điều kiện yếm khí nó mới tiến hành lên men rượu theo phương trình: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + Q_2$

Vì vậy khi có mặt của oxy sẽ kiềm hãm quá trình lên men rượu.

Hiệu ứng Pasteur: là sự ức chế quá trình lên men rượu khi có mặt của oxy. Sự chuyển từ lên men sang hô hấp ngoài việc giảm hiệu suất tạo thành rượu và khí cacbonic còn giảm hiệu suất sử dụng đường.

Vì vậy giai đoạn đầu của quá trình lên men cần thông khí vào môi trường để kích thích nấm men sinh trưởng tăng sinh khối sau đó không cần oxy nữa để tạo điều kiện kỵ khí cho quá trình lên men rượu đạt hiệu suất cao nhất.

c. Độ rượu

Rượu được tích tụ dần trong dịch lên men và chính nó lại là chất độc kìm hãm các nấm men. Nấm men chịu nồng độ cồn từ 8 ÷ 12%, từ 16 ÷ 18% đại đa số nấm men bị ức chế. Nếu nồng độ cồn quá cao sẽ ức chế tất cả các nấm men.

Khả năng chịu cồn của nấm men là nồng độ cồn ức chế sự phát triển và hoạt động của nấm men sau 72 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 30^{o}C.

Tuỳ theo khả năng chịu được nồng độ cồn khác nhau mà người ta sản xuất ra các sản phẩm khác nhau.

d. Độ pH

Độ pH môi trường có ý nghĩa rất quan trọng trong quá trình lên men rượu. Tuỳ thuộc vào sản phẩm thu được mà người ta điều chỉnh pH môi trường cho thích hợp.

- pH môi trường axit thì sản phẩm thu được là rượu etylic.
- pH môi trường axit yếu thì sản phẩm thu được là rượu etylic và glyxerin.
- pH môi trường kiềm yếu thì sản phẩm thu được là rượu etylic, axit axetic và glyxerin.

Bình thường lên men rượu được thực hiện ở pH= 4 ÷ 4,5. Để axit hóa môi trường người ta thường dùng H_2SO_4 hoặc axit lactic để tạo pH thích hợp bằng cách cấy vi khuẩn lactic vào sau đó thanh trùng rồi mới cấy nấm men vào.

e. Nhiệt độ

Tuỳ thuộc vào nấm men nổi hay nấm men chìm mà điều chỉnh nhiệt độ môi trường cho thích hợp. Đối với nấm men nổi nhiệt độ thích hợp từ 20 ÷ 28^{o}C, nấm men chìm nhiệt độ thích hợp từ 5 ÷ 10^{o}C. Ngoài ra khi nhiệt độ từ 28 ÷ 30^{o}C thì rượu bay hơi làm cho quá trình lên men xảy ra nhanh hơn.

II.1.1.4. Ứng dụng

a. Sản xuất rượu và cồn

Sản xuất từ các nguyên liệu chứa tinh bột như gạo, sắn, ngô… Người ta thuỷ phân tinh bột thành đường bằng axit, kiềm hay enzyme sau đó lên men đường thành rượu nhờ nấm men.

Sản xuất từ nguyên liệu rỉ đường thường có từ 35 ÷ 40% là đường. Trước khi lên men phải pha loãng xuống từ 14 ÷ 20%.

Người ta có thể sử dụng đường sữa là nước thải của công nghiệp sản xuất phomat. Nguyên liệu này chứa nhiều đường lactose nên phải dùng nấm men *Saccharomyces lactis*.

Sản xuất từ nước thải nhà máy giấy, nguyên liệu này chứa nhiều cenlulose, hemi cenlulose, dextrin. Trước khi lên men phải thuỷ phân chúng thành đường.

Nếu đi từ nguyên liệu là tinh bột thì tuỳ theo cách sử dụng nấm mốc để thuỷ phân tinh bột thành đường mà phương pháp sản xuất rượu có thể chia làm 3 cách.

Phương pháp Amylo: thuỷ phân tinh bột bằng enzyme amylase của nấm mốc *Mucor hay Rhizopus*. Sau 24h thuỷ phân thì cho nấm men vào, hai quá trình đường hoá và lên men rượu được diễn ra song song, sau 3 ngày nấm mốc sẽ bị chết vì nồng độ rượu tăng cao, sau 7 ngày thì quá trình lên men kết thúc.

Phương pháp Mycos-Malt: nguyên liệu chứa bột được thuỷ phân bằng enzyme amylase của nấm mốc *Aspergillus niger* hay *Aspergillus oryzea* dưới dạng malt. Để sản xuất amylase của các loại nấm mốc này người ta sử dụng các nong, khay đựng cám, bổ sung thêm thức ăn vô cơ và axit hoá cho môi trường có pH từ 4 ÷ 5, độ ẩm khoảng 55%, nhiệt độ môi trường từ 28 ÷ 30^{o}C, với độ ẩm môi trường là 100%. Sau 2 ngày nấm mốc phát triển rất mạnh và sinh bào tử, như vậy ta thu được chế phẩm mycos-malt từ nấm mốc. Malt này được dùng để thuỷ phân tinh bột với tỷ lệ 10%, thời gian thuỷ phân là 4 ÷ 6h. Sau đó đem tiệt trùng và cho nấm men vào, lên men trong vòng 48h rồi đem chưng cất. Như vậy phương pháp này sẽ rút ngắn được thời gian lên men.

Phương pháp men thuốc bắc: men thuốc bắc là một chế phẩm có môi trường cơ bản là tinh bột, bài thuốc cái và men gốc (bao gồm hai hệ vi sinh vật cộng sinh với nhau).

Quá trình sản xuất rượu theo phương pháp này được tóm tắt như sau: nguyên liệu tinh bột đem nấu chín → cấy men thuốc bắc → Đường hoá → rượu hoá → cất rượu.

Rượu sản xuất theo phương pháp này có tính chất thủ công với qui mô hộ gia đình. Rượu sau khi chưng cất còn được gọi là rượu gạo có mùi vi thơm ngon nhưng độ tinh khiết không cao và còn lẫn nhiều tạp chất như aldehit nên thường làm cho người uống bị đau đầu.

b. Sản xuất bia

Bia là một loại thức uống giải khát thơm ngon, có độ rượu nhẹ từ 4 ÷ 5%, có vị đắng dễ chịu của hoa hublong.

Nguyên liệu là malt đại mạch, cao hoa hublong và nước. Trong malt có sẵn enzyme amilase để thuỷ phân tinh bột thành đường cung cấp cho quá trình lên men.

Người ta thường sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* dạng biến chủng chuyên dụng để lên men bia. Quá trình lên men bia gồm hai giai đoạn:

- **Giai đoạn lên men chính**: giai đoạn này thực hiện ở nhiệt độ cao, thường từ 8 ÷ 16^{o}C. Dịch đường ban đầu có nồng độ từ 9 ÷ 12%, sau khi lên men thì còn khoảng 2 đến 3%. Nếu lên men cổ điển thì nhiệt độ từ 8 ÷ 10^{o}C thì thời gian lên men lâu, lên men nhanh ở nhiệt độ từ 14 ÷ 16^{o}C và sau 8 ngày nồng độ đường còn lại từ 2 ÷ 3%.
- **Giai đoạn lên men phụ**: giai đoạn này thực hiện ở nhiệt độ từ 0 ÷ 5^{o}C, phương pháp lên men cổ điển ở nhiệt độ từ 0 ÷ 1^{o}C, phương pháp lên men

nhanh ở nhiệt độ từ 3 ÷ 5^{o}C. Ở nhiệt độ lạnh CO_2 được giữ lại làm cho bia trong hơn.

Sau khi dịch lên men "chín" đem lọc và bão hòa CO_2. Sản phẩm thu được đem bán trực tiếp làm bia hơi đóng hoặc đóng chai, lon cần phải hấp Pasteur.

c. Sản xuất rượu vang và sâmpanh

Rượu vang theo nghĩa hẹp là từ dùng để chỉ rượu được lên men từ dịch ép của quả nho. Ngày nay rượu được lên men từ các dịch quả táo, dâu, mận, chuối… cũng được gọi là rượu vang kèm theo tên của loại quả lấy nước ép. Các loại quả ngoài đường lấy từ dịch quả còn phải chứa các axit hữu cơ, các chất màu, chất thơm…Vào mùa nho chín người ta hái nho, đem nghiền nát và cho nấm men vào, sau đó ủ ở nhiệt độ 25 ÷ 30^{o}C, đường nho sẽ lên men thành rượu đồng thời các chất chát và sắc tố từ quả cũng trích ly vào dịch lên men tạo nên mùi, vị cho rượu vang. Nho có vỏ màu tím dùng làm vang đỏ, quả có vỏ màu xanh dùng làm vang trắng.

Dịch chiết dùng $NaHSO_3$ để xử lý các vi sinh vật tạp nhiễm. Nồng độ SO_2 cho phép là 200ppm còn lại trong dịch sẽ ức chế các vi sinh vật khác nhưng không ức chế nấm men.

Thường dùng nấm men *Saccharomyces ellipsoideus* là loài tiêu biểu cho nấm men chìm. Dùng chủng có khả năng chịu nồng độ đường cao, CO_2 cao và kháng SO_2 ở nồng độ 200ppm.

Quá trình lên men gồm hai giai đoạn:

Giai đoạn lên men chính: dùng dịch nước hoa quả để lên men thành rượu, độ rượu từ 12 ÷ 15%. Sau đó chuyển sang giai đoạn ủ làm cho protein, pectin, tanin lắng xuống làm cho rượu trong hơn.

Giai đoạn lên men thứ cấp (giai đoạn ủ): từ 3 đến 4 tháng đối với rượu vang và hàng năm đối với sâmpanh. Trong giai đoạn ủ sẽ tích tụ CO_2 và chất thơm.

- Ủ thông thường: sẽ tạo ra rượu vang non sau đó ủ trong thùng gỗ sồi để tạo ra hương thơm đặc trưng.
- Ủ chính trong thùng hay trong chai lượng CO_2 cao tạo ra sâmpanh.

Rượu vang trong dùng để sản xuất rượu mạnh bằng phương pháp chưng cất.

d. Sản xuất bánh mì

Sử dụng chủng nấm men nổi có khả năng sử dụng chất khô cao. Bột mì, đường, nấm men bánh mì và những thành phần khác trộn đều. Quá trình lên men bánh mì gồm quá trình lên men phụ (lên men lactic) và quá trình lên men chính (lên men rượu). Quá trình lên men tạo ra CO_2 tích tụ thành các túi khí, khi nướng sẽ phồng lên tạo độ xốp cho bánh mì và các sản phẩm lên men như: rượu, ester, axit lactic… sẽ tạo ra mùi thơm đặc trưng cho bánh mì.

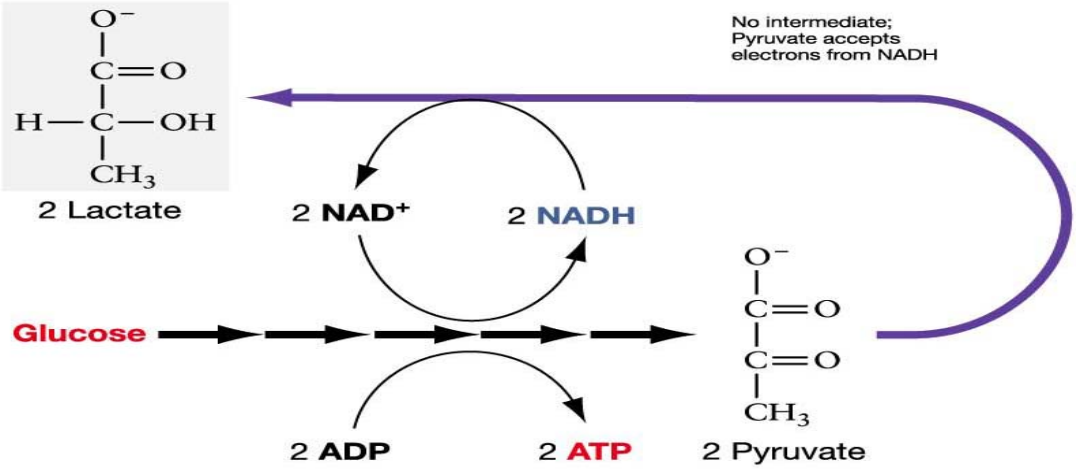
II.1.2. Lên men lactic

II.1.2.1. Cơ chế lên men lactic

Lên men lactic là quá trình chuyển hóa đường thành axit lactic nhờ vi sinh vật, điển hình là vi khuẩn lactic. Lên men lactic là một trong những loại hình lên

men phát triển nhất trong thiên nhiên, có hai kiểu lên men lactic chính là lên men đồng hình và lên men dị hình.

a. Lên men lactic đồng hình (điển hình)



Trong trường hợp này axit pyruvic được tạo thành theo sơ đồ Embden-Mayerhorf-Parnas (EMP). Sau đó axit pyruvic sẽ tạo thành axit lactic dưới tác dụng của enzyme lactatdehydrogenase.

Lượng axit lactic tạo thành chiếm hơn 90%. Chỉ một lượng nhỏ pyruvat bị khử cacbon để tạo thành axit axetic, etanol, CO_2 và axeton. Lượng sản phẩm phụ tạo thành phụ thuộc vào sự có mặt của oxy.

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

Xảy ra trong trường hợp vi khuẩn lactic không có các enzyme cơ bản của sơ đồ Embden – Mayerhorf – Parnas (aldolase và triozophotphatizomerase), vì vậy xilulose 5-photphat sẽ được tạo thành theo con đường pento-photphat (PP).

Trong trường hợp này chỉ có 50% lượng đường tạo thành axit lactic, ngoài ra còn có các sản phẩm phụ khác như: axic axetic, etanol, CO_2. Các sản phẩm phụ tương tác với nhau tạo thành ester có mùi thơm.

Phương trình tổng quát:

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3COOH + C_2H_5OH + COOH(CH_2)_2COOH + CO2$

Glucose axit lactic (40%) axit acetic etanol axit sucxinic

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

II.1.2.2. Vi khuẩn lên men lactic

a. Đặc điểm

Vi khuẩn lên men lactic thuộc họ *Lactobacterium*. Đây là những trực khuẩn, cầu khuẩn không tạo bào tử và hầu hết không di động, hô hấp tuỳ tiện. Chúng có khả năng lên men nhiều loại đường đơn và đường đôi nhưng không có khả năng lên men các loại glucid phức tạp và tinh bột. Sự phát triển của nó cần có sự có mặt của peptone, axit amin hay muối amôn. Chúng có yêu cầu đặc biệt về chất dinh dưỡng là giàu vitamin, axit amin và khoáng chất. Quá trình lên men xảy

ra tốt nhất trong môi trường axit pH từ 5,5 ÷ 6, khi pH nhỏ hơn 5,5 quá trình lên men bị dừng lại. Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men từ 15 ÷ 50^{o}C. Tuy nhiên, mỗi loài có khoảng nhiệt độ thích hợp khác nhau, nếu nhiệt độ lớn hơn 80^{o}C vi khuẩn lactic bị tiêu diệt hoàn toàn.

b. Phân loại

Người ta dựa vào quá trình lên men chia vi khuẩn lactic thành hai loại: vi khuẩn lactic lên men đồng hình và dị hình.

- **Lên men đồng hình:**

+ *Lactobacterium casei*: đây là những trực khuẩn rất ngắn gây chua sữa tự nhiên. Yếm khí tuỳ tiện, lên men tốt glucose, maltose, lactose tạo ra môi trường có từ 0,8 ÷ 1% axit lactic. Ở điều kiện bình thường gây chua sữa trong vòng 10 đến 12 giờ. Nguồn nitơ cho vi khuẩn này là peptone. Nhiệt độ tối thiểu cho chúng phát triển là 10^{o}C, tối ưu là 35^{o}C và tối đa là 45^{o}C, chúng thuỷ phân cazein và gelatin rất yếu.

+ *Streptococcus cremoris*: thường tạo thành chuỗi dài, thường phát triển ở nhiệt độ thấp hơn *Lactobacterium casei*, tối ưu từ 25^{o}C ÷ 30^{o}C, lên men glucose, galactose.

+ *Lactobacterium bulgaricus*: đây là trực khuẩn rất dài, nhiệt độ phát triển tối ưu là 20^{o}C, có khả năng lên men glucose, lactose. Có khả năng tạo độ axit cao (3,7% axit lactic).

+ *Lactobacterium delbruckii*: thường gặp trên hạt đại mạch, đây là trực khuẩn lớn. Trong quá trình phát triển của mình chúng có khả năng tạo thành sợi. Nhiệt độ tối ưu cho chúng phát triển từ 45 ÷ 50^{o}C, khác với các loài khác chúng không có khả năng lên men đường lactose vì vậy chúng không được dùng trong chế biến sữa.

+ *Lactobacterium cueumeris fermenti*: thường tìm thấy chúng trong sữa ủ chua. Là trực khuẩn không chuyển động, thường tạo thành tế bào đơn và có khi tạo thành chuỗi. Thường chúng tạo thành chuỗi trong quá trình lên men. Khả năng tạo axit tối đa trong môi trường từ 0,9 ÷ 1,2%.

- **Lên men dị hình:**

+ *Streptobacterium hassice fermentatae*: thường thấy chúng trong các dịch lên men chua rau cải. Chúng tồn tại từng tế bào riêng biệt hoặc ghép thành từng đôi, hoặc chuỗi ngắn có khi ghép thành từng chuỗi dài hình sợi. Khi lên men rau cải chua tạo thành axit lactic, axit axetic, rượu etylic và CO_2. Lên men đường saccarose tốt hơn lên men đường lactose.

+ *Lactobacterium lycopersici*: là trực khuẩn gram dương, sinh hơi, tế bào tạo thành chuỗi hay đơn, có khi ghép thành đôi một. Khi lên men chúng tạo thành axit lactic, rượu êtylic, axit axetic và CO_2. Chúng có khả năng tạo bào tử, tế bào sinh dưỡng thường chết ở nhiệt độ 80^{o}C.

II.1.2.3. Ứng dụng

a. Sản xuất axit lactic

Nguyên liệu dùng để sản xuất axit lactic là: rỉ mật, đường, tinh bột đã được đường hoá. Nồng độ đường sử dụng cho quá trình lên men lactic từ 8 đến 20%. Nếu nguyên liệu là rỉ mật phải làm trong để loại bỏ các hợp chất chứa nitơ.

Quá trình lên men lactic xảy ra rất tốt trong môi trường axit, tuy nhiên vi khuẩn lactic không có khả năng chịu được nồng độ axit quá cao. Khi nồng độ axit quá cao sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn, vì vậy cần phải điều chỉnh độ pH của môi trường từ 6,3 ÷ 6,5. Trong thực tế sản xuất người ta thường xuyên bổ sung vôi tôi hoặc cacbonat canxi để giữ pH của môi trường không thay đổi. Axit lactic thu được sẽ ở dạng muối canxilactat.

Nhiệt độ tối ưu cho quá trình lên men lactic là 50^oC, trong quá trình lên men lactic có nhiều vi khuẩn tham gia vì vậy sản phẩm thu được ngoài axit lactic còn có CO_2 và một số sản phẩm phụ khác.

Người ta sản xuất axit lactic theo cách lên men đồng hình sau đó tinh chế thành axit lactic tinh khiết để ứng dụng vào trong ngành công nghệ thực phẩm, thay thế axit citric trong sản xuất bánh kẹo, đồ hộp…

Trong công nghiệp nhẹ, axit lactic là dung môi cho công nghiệp sản xuất sơn, vecni, nhuộm và thuộc da.

Trong công nghiệp rượu, axit lactic được dùng dưới dạng muối của canxi.

b. Chế biến các sản phẩm sữa

Trong sữa chứa đường, cazein và các loại muối khoáng khác nên là môi trường thuận lợi cho vi sinh vật phát triển. Trong sữa bình thường chứa khá nhiều vi sinh vật (khoảng 300 đến 400tb/1ml), vi sinh vật xâm nhập vào sữa bằng nhiều con đường khác nhau. Để sản xuất các sản phẩm sữa khác nhau người ta dùng các giống vi khuẩn lactic khác nhau. Ứng dụng vi sinh vật vào trong chế biến sữa được biết từ rất lâu.

- Sản xuất sữa chua: nguyên tắc làm sữa chua là do sự phát triển của vi khuẩn lactic làm pH giảm mạnh, cazein trong sữa bị đông tụ. Sữa từ dạng lỏng chuyển sang dạng keo sệt và có mùi vị thơm ngon. Quá trình làm sữa chua người ta phải sử dụng hai chủng vi khuẩn lactic đồng hình và dị hình. Vi khuẩn lactic đồng hình lên men nhanh làm giảm pH, vi khuẩn lactic dị hình lên men chậm và tạo thành mùi thơm đặc trưng của sữa chua.

- Sản xuất phomat: để sản xuất phomat người ta dùng enzyme đông kết thu cazein trong sữa, sau đó tiếp tục cho lên men với nồng độ muối loãng. Tuỳ loại phomat mà trong quá trình ủ chín người ta sử dụng các loài vi sinh vật khác nhau. Các loại vi sinh vật thường được sử dụng để làm chín phomat là: vi khuẩn *propionic*, nấm mốc…

c. Muối chua rau quả

Muối chua rau quả nhằm hai mục đích cơ bản sau đây: bảo quản nguyên liệu và làm tăng giá trị dinh dưỡng, giá trị cảm quan của rau quả. Nguyên tắc để muối chua rau quả là tạo điều kiện để phát triển vi khuẩn lactic đồng thời hạn chế tác dụng của vi khuẩn gây thối rữa.

Hiện nay có rất nhiều sản phẩm rau quả muối chua được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam cũng như trên thế giới.

Quá trình muối chua rau quả được tiến hành như sau:

- Lựa chọn rau quả
- Xử lý sơ bộ
- Phơi nắng
- Cho thêm đường, muối, nước
- Lên men
- Muối chua.

Thông thường muối chua rau quả người ta sử dụng 3% lượng muối so với rau quả. Nếu nồng độ muối thấp thì rau quả dễ bị thối. Nếu nồng độ muối quá cao thì quá trình lên men chậm, sự tạo thành axit lactic giảm.

Tác dụng của một số quá trình cơ bản trong muối chua rau quả.

- Quá trình phơi nắng: làm giảm lượng nước có trong nguyên liệu.
- Cho thêm muối, đường: tạo áp suất thẩm thấu, làm nguyên liệu dễ nén chặt, không bị nát và trở nên giòn. Làm tăng nhanh quá trình lên men.

Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men là 26 ÷ 35^{o}C. Tuy nhiên, ở nhiệt độ này vi khuẩn butyric có thể phát triển mạnh nên trên thực tế người ta khống chế ở nhiệt độ trong khoảng 20 ÷ 25^{o}C. Thông thường vi khuẩn lactic chịu được nhiệt độ thấp hơn so với vi khuẩn khác, vì vậy trong muối chua cần tăng nhanh độ axit để loại trừ khả năng nhiễm của một số loài vi sinh vật khác.

d. Ủ chua thức ăn gia súc

Từ lâu người ta đã biết sử dụng quá trình lên men lactic để ủ chua thức ăn gia súc. Phương pháp ủ chua thức ăn gia súc đặc biệt cần thiết đối với các trại chăn nuôi gia súc.

Nguyên liệu dùng làm thức ăn cho gia súc nếu đem phơi khô sẽ làm giảm 50% giá trị của chúng. Nhưng nếu ta đem ủ chua thì chỉ giảm khoảng 10% giá trị. Đặc biệt bằng phương pháp ủ chua sẽ tăng nhiều chỉ số dinh dưỡng khác của thức ăn.

Một trong những phương pháp phổ biến là ủ chua thức ăn thủ công. Các loại thức ăn gia súc là thực vật được băm nhỏ rồi cho vào vật chứa, cho thêm một ít nước vo gạo. Sau đó ủ kín 1 đến 2 ngày và cho gia súc ăn. Quá trình ủ chua thức ăn gia súc thường qua 3 giai đoạn sau:

Giai đoạn 1: là giai đoạn phát triển hỗn hợp nhiều loài vi sinh vật khác nhau có trong thành phần của nguyên liệu, từ nước hoặc từ không khí.

Giai đoạn 2: quá trình lên men lactic đồng hình xảy ra mạnh. Các loài vi khuẩn lactic chỉ phát triển trong điều kiện yếm khí, nếu có oxy vi khuẩn gây thối phát triển sẽ tạo thành mùi khó chịu và ảnh hưởng đến thức ăn ủ chua. Chất lượng khối ủ phụ thuộc rất nhiều vào sự phát triển của vi khuẩn lactic.

Giai đoạn 3: khi ủ tới thời kỳ chín thì chính vi khuẩn lactic cũng bị tiêu diệt do lượng axit lactic tạo thành nhiều trong môi trường. Trong giai đoạn này nếu khối ủ không sạch mà bị lẫn đất cát, vi khuẩn butyric sẽ phát triển, gây cho khối ủ có vị đắng và mùi khó chịu.

Nhiệt độ thích hợp cho khối ủ là 25 ÷ 30^{o}C. Hiện nay trong quá trình ủ chua người ta còn còn cho thêm muối với nồng độ từ 0,1 ÷ 0,5% so với nguyên liệu. Cho thêm muối để làm tăng khả năng trích ly các chất và tăng cường khả năng trao đổi chất của vi sinh vật.

1.3. Lên men propionic

II.1.3. 1. Cơ chế lên men

Lên men propionic là quá trình chuyển hoá axit lactic và muối lactate thành axit propionic dưới tác dụng của vi sinh vật. Ngoài axit propionic còn có các sản phẩm khác như: axit axetic, khí cacbonic và nước.

Từ nguyên liệu đường:

$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O + Q$

Glucose *axit propionic* *axit axetic*

Từ axit lactic:

$3CH_3CHOHCOOH \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O + Q$

Axit lactic *axit propionic* *axit axetic*

Theo quá trình này thì tỉ lệ giữa hai loại axit propionic và axit acetic là 2:1 (Trong thực tế thu được là 1,5:1).

II.1.3. 2. Vi sinh lên men propionic

Chủ yếu là các vi khuẩn propionic, trong đó loài hoạt động nhất là *Bacterium acidipropionic*, chúng thường sống chung với vi khuẩn lactic trong sữa. Chúng được tìm thấy nhiều trong sữa, trong đất và trong khoang miệng một số động vật nhai lại, tham gia quá trình tạo axit hữu cơ trong đó. Là loài trực khuẩn Gram dương, không chuyển động, không tạo bào tử, hô hấp kỵ khí bắt buộc, nhiệt độ thích hợp từ 14 ÷ 35^{o}C, pH thích hợp trung tính. Vi khuẩn này lên men dễ dàng axit lactic, muối lactate, đường thành axit propionic. Trong quá trình sống chúng cần bổ sung thêm nitơ hữu cơ phức tạp dưới dạng protein.

II.1.3. 3. Ứng dụng

a. Sản xuất phomat

Dưới tác dụng của vi khuẩn *Bacterium acidipropionic* và vi khuẩn lactic người ta tiến hành sản xuất phomat gồm 4 giai đoạn sau đây.

- Sản xuất phomat khối: cho men chua vào sữa chua đã thanh trùng Pasteur, khi đó sẽ có quá trình lên men và tích tụ một lượng axit latic khá lớn. Casein của sữa bị biến đổi thành paracazein lắng xuống và ta thu được phomat khối.
- Tách đường: là giai đoạn tách sữa trong, đun nóng ở nhiệt độ từ 55 ÷ 58^{o}C trong 30 phút để phá huỷ enzyme rồi đem ép khối phomat trong vòng 20 ÷ 24h ở nhiệt độ từ 25 ÷ 30^{o}C, trong thời gian này quá trình lên men vẫn tiếp tục.
- Muối phomat: phomat sau khi tách đường đem muối với dung dịch muối ăn 24% trong vài ngày. Khối phomat muối này được chuyển vào hầm lên men ở nhiệt độ 18 ÷ 20^{o}C, độ ẩm 80 ÷ 90%. Trong khi ép tách sữa trong hầu như đường lactose không còn nên quá trình lên men lactic không xảy ra. Lúc này trong khối phomat vi khuẩn propionic bắt đầu hoạt động mạnh và chuyển axit lactic thành axit propionic và axit axetic, khí cacbonic. Hai axit này làm cho

phomat có vị chua và hăng đặc biệt, khí cabonic làm cho phomat xốp. Sự lên men kết thúc sau 2 ÷ 2,5 tháng.

- Ủ chín phomat: sau khi muối phomat được chuyển vào các hầm lên men nhiệt độ 18 ÷ 22^{o}C, độ ẩm 80 ÷ 90%. Trong thời gian này cazein tiếp tục được phân giải dưới tác dụng của men đông tụ và vi khuẩn lactic *Lactobaterium casei*, khi phomat chín thì có 2/3 cazein phân giải thành peptone, aminoaxit và một ít ammoniac.

b. Sản xuất vitamin

Ở thực vật hầu như không có vitamin B_{12} còn người và động vật tuy rất cần vitamin B_{12} nhưng lại không thể tự tổng hợp được. Chính vi khuẩn đường ruột đã tạo nên vitamin B_{12} và thỏa mãn phần lớn nhu cầu cho vật chủ. Một số vi khuẩn propionic cũng có khả năng tạo vitamin B_{12} như loài *Bacterium acidipropionic*. Lợi dụng khả năng này người ta thường điều chế vitamin B_{12} trong các nhà máy chế biến sữa.

II.1.4. Lên men butyric

Quá trình lên men butyric là quá trình phân giải yếm khí đường cho axit butyric và một số sản phẩm phụ dưới tác dụng của vi sinh vật.

II.1.4.1. Cơ chế của quá trình lên men

Xét về cơ chế phản ứng đây là một phản ứng sinh hoá phức tạp. Ngoài axit butyric còn có rượu etylic, rượu butylic, axeton, axit axetic…Sau khi axit pyruvic được tạo thành, axit này bị loại cacboxy thành axetaldehit, cứ hai phân tử axetaldehit kết hợp tạo thành axetaldola và sau đó tạo thành axit butyric:

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3COCOOH \rightarrow 2CH_3CHO \rightarrow CH_3CHOHCH_2CHO$

Glucose *axit pyruvic* *axetaldehit* *axetaldola*

$\rightarrow$ $CH_3CH_2CH_2COOH$

Axit butyric

Đặc điểm của quá trình này là H^+ không chuyển đến cho chất nhận mà tạo thành H_2, trong quá trình này có quá trình tổng hợp từ hợp chất hai cacbon thành hợp chất 4 cacbon.

Quá trình lên men butyric phổ biến trong tự nhiên có thể gặp quá trình này ở đất bùn dưới đáy ao hồ, sông ngòi…

II.1.4.2. Vi sinh vật lên men butyric

Chủ yếu là các vi khuẩn butyric, chúng rất phổ biến trong tự nhiên như đất, nước bẩn, sữa, phomat…Chúng là trực khuẩn chuyển động do có tiên mao xung quanh, chúng có khả năng sinh bào tử, hô hấp yếm khí bắt buộc, nhiệt độ tối ưu là 30 ÷ 40^{o}C, có khả năng lên men không chỉ đường đơn giản mà cả đường phức tạp như dextran, tinh bột. Khả năng dinh dưỡng nitơ của vi khuẩn này rất rộng, chúng có khả năng sử dụng protein, peptone, muối amôn, muối nitrat, một số còn sử dụng cả nitơ phân tử. Một số loài thường gặp:

- *Clostridium saccharobutyricum*
- *Clostridium pasteurianum*
- *Clostridium butyricum*.

Đây là những loài có khả năng lên men đường thành axit butyric và rượu butylic được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp.

II.1.4.3. Ứng dụng để sản xuất axit butyric

Axit butyric là một axit lỏng không màu, có vị hắc khó chịu. Trong tự nhiên thường tồn tại trong chất béo động vật, thực vật, nhất là trong bơ. Trong công nghiệp được dùng làm hương liệu ở dạng ester như butyrat metan có mùi táo, butyrat etan có mùi lê, butyrat amin có mùi dứa… đây là những chất thơm dùng để sản xuất bánh kẹo, nước hoa, nước giải khát…

Nguyên liệu để sản xuất axit butyric là các loại đường bột như khoai tây, khoai lang… Trong quá trình sản xuất axit butyric ta không cần đường hoá tinh bột trước vì vi khuẩn butyric có men amylase hoạt động mạnh, tuy nhiên để rút ngắn thời gian lên men người ta thuỷ phân sơ bộ bằng H_2SO_4 với nồng độ 0,4 ÷ 0,5% so với nguyên liệu. Sau đó trung hoà axit bằng $CaCO_3$ hoặc $Ca(OH)_2$, đồng thời cho $CaCO_3$ dư để trung hoà axit butyric sinh ra. Cho vào môi trường khoảng 1÷1,5% bột đậu lạc để làm thức ăn Nitơ. Đun sôi dịch lên men, để nguội đến 40^oC thì cho vi khuẩn butyric vào. Sự lên men kéo dài từ 8÷10 ngày ở nhiệt độ 40^oC, trong khi lên men nên tạo pH hơi kiềm bằng cách cho $CaCO_3$ dư. Sau khi lên men thu được axit butyric ở dạng muối canxibutyrat, đem đun sôi để kết tủa protein, lọc, cô đặc. Sau đó cho tác dụng với HCl, axit butyric tự do sẽ nổi lên trên, đem chiết và tinh chế.

Ngoài tác dụng để sản xuất axit butyric, trong thực tế quá trình lên men butyric có nhiều mặt gây hại cho công nghiệp thực phẩm. Chúng cản trở sự hoạt động của nấm men, gây mùi khó chịu và cay trong sản phẩm sữa, làm hư hỏng đồ hộp rau quả và thịt cá. Trong thực tế muốn tiêu diệt vi khuẩn này rất khó vì nó có mặt ở bất kỳ nguyên liệu thực phẩm nào bào tử của nó lại rất bền. Vì vậy biện pháp đề phòng lây nhiễm vi khuẩn butyric tại các xưởng chế biến thực phẩm là rất quan trọng.

II.1.5. Lên men acetone – butanol

II.1.5. 1. Cơ chế lên men

Sự lên men axeton-butanol là quá trình lên men phức tạp, thực hiện trong điều kiện yếm khí nghiêm ngặt. Quá trình này giống quá trình lên men butyric nhưng chỉ khác ở quá trình lên men butyric sản phẩm chủ yếu là axit butyric còn ở quá trình lên men axeton-butanol sản phẩm chủ yếu là axeton và butanol.

$12C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_3OH + 4CH_3COCH_3 + CH_3(CH_2)_2COOH + C_2H_5OH + H_2 + CO_2 + H_2O + Q$

(butanol) (axetone) (axit butyric) (etanol)

Sự lên men axeton-butanol được chia làm hai giai đoạn:

- **Giai đoạn đầu** là giai đoạn tích tụ axit, trong giai đoạn này vi khuẩn bắt đầu sinh sản rất mạnh, axit butyric tích tụ nhiều trong môi trường làm pH môi trường giảm xuống.
- **Giai đoạn hai** là giai đoạn axeton-butanol, giai đoạn này axeton-butanol được tạo thành trong môi trường axit. Do pH giảm mạnh làm vi khuẩn chết nhiều và bắt đầu tích lũy cồn (butylic và etylic) trong môi trường. Càng về cuối, càng

thấy tạo thành nhiều sản phẩm khí, rượu butylic và axetone. Ngoài các sản phẩn trên hydro, khí cacbonic và một lượng nhỏ axit axetic cũng được tạo thành**.**

Nếu như cho vào môi trường lên men axit axetic thì thấy hiệu suất của quá trình lên men tăng đến 72% so với lý thuyết.

II.1.5. 2. Vi sinh vật lên men

Vi khuẩn lên men axeton-butanol thuộc nhóm vi khuẩn butyric, chúng có khả năng lên men dịch tinh bột mà không cần qua giai đoạn đường hoá. Trong môi trường kiềm chúng tạo thành axit butyric dưới dạng muối butyrate, trong môi trường axit chúng tạo thành axeton và butanol. Các loài điển hình như: *Clostridium acetobutylicum, Clostridium saccharobutylicum,…*

Các vi khuẩn này hô hấp yếm khí, có hình dạng không ổn định mà thay đổi theo thành phần dinh dưỡng của môi trường và theo lứa tuổi, có khả năng sinh bào tử, có hệ enzyme amylase, di chuyển được nhờ tiêm mao.

II.1.5. 3. Ứng dụng của sự lên men axeton - butanol

Đây là hai sản phẩm có giá trị cao trong các ngành công nghiệp. Axeton được làm dung môi trong các ngành công nghiệp, đặc biệt là sản xuất thuốc nổ. Butanol dùng để sản xuất sơn các loại trong công nghiệp xe hơi, máy bay, điều chế butadien để sản xuất cao su tổng hợp…

Nguyên liệu để sản xuất axeton-butanol là đường và tinh bột, cần bổ sung thêm nitơ và photpho. Dịch lên men gồm nước và khoảng 8÷10% bột ngô, bột ngô thường có trung bình 70% là glucid, như vậy dịch lên men có khoảng 5÷6% glucid. Dịch sau khi lên men có khoảng 1,5% là butanol, đây là mức giới hạn vì các sản phẩm lên men đều rất độc chúng sẽ ức chế rất mạnh vi khuẩn.

Dịch lên men sau khi thanh trùng được cấy vi khuẩn *Clostridium acetobutylicum* vào. Lên men tiến hành ở nhiệt độ từ 36÷38^{o}C trong vòng 48÷72h.

II.2. QUÁ TRÌNH LÊN MEN HIẾU KHÍ

II.2.1. Lên men acetic

II.2.1.1. Cơ chế lên men axetic

Để chuyển hoá thành axit axetic, rượu phải thẩm thấu qua thành tế bào. Ở đây sẽ xảy ra quá trình chuyển hoá rượu thành axit axetic rồi thẩm thấu ra ngoài môi trường bên ngoài.

Quá trình chuyển hoá như sau:

$CH_3CH_2OH + O_2 \rightarrow CH_3CHO + H_2O$

$CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3CH(OH)_2$

$CH_3CH(OH)_2 + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O$

$CH_3CH_2OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O + Q$

ATP cung cấp cho hoạt động sống của tế bào và thải ra ngoài dưới dạng nhiệt. Ngoài khả năng oxi hoá rượu etylic thành axit axetic, vi khuẩn axetic còn có khả năng oxi hoá một số rượu khác thành axit tương ứng.

Ví dụ như: Propylic → axit propionic

Butylic → axit butyric

Glyxerin → dioxiaxeton

Ngoài ra chúng có thể oxi hoá glucose thành axit gluconic.

II.2.1.2. Vi khuẩn lên men axetic

Hiện nay người ta biết đến hàng chục loài vi khuẩn axetic thuộc họ *Acetobacte*r. Chúng có những đặc điểm chung sau đây:

- Là những trực khuẩn gram âm, không sinh bào tử, hô hấp hiếu khí bắt buộc, xếp đôi hay tạo thành từng chuỗi, thường tạo thành lớp màng trên bề mặt, có loài có khả năng chuyển động và có loài không.
- Có nhiều trong rau quả.
- Nguồn dinh dưỡng cacbon: oxi hoá rượu etylic hay các rượu khác thành axit tương ứng. Có khả năng sử dụng glucose.
- Nguồn dinh dưỡng nitơ: sử dụng muối amôn hay peptone.
- Có hai ngưỡng pH: pH thích hợp từ 5,4 đến 6,8, pH thích ứng cho sự lên men từ 3,5 đến 4,5.

Chúng gồm các loài sau đây:

Acetobacter aceti: là trực khuẩn ngắn, không chuyển động và chúng có khả năng liên kết với nhau thành chuỗi dài. Chúng bắt màu vàng với iot và có khả năng chịu nồng độ cồn khá cao (11%) và tích tụ được 6% axit axetic. Nhiệt độ phát triển tối ưu của chúng là 35^oC, nếu nhiệt độ lên quá 40^oC sẽ xảy ra hiện tượng co tế bào và sẽ tạo ra hình quả lê. Thường thấy chúng phát triển trong bia.

Acetobacter pasteurianum: là trực khuẩn ngắn, hình thái gần giống loài trên, chỉ khác là chúng bắt màu xanh thẫm với iot. Tạo thành khuẩn lạc hình nhăn nheo trên môi trường đặc. Có khả năng tích tụ 6,2% axit axetic.

Acetobacter orleanense: là trực khuẩn không chuyển động, có kích thước trung bình. Khi tăng nhiệt độ chúng tạo thành tế bào hình dài hoặc hình sợi hoặc không tạo hình. Thường thấy chúng phát triển trong dịch nho loãng. Có khả năng tồn tại ở nồng độ cồn từ 11 ÷ 12% và tích luỹ axit axetic đến 9,5%.

Acetobacter xylinum: là trực khuẩn không chuyển động, bắt màu xanh với iot. Chỉ có thể chịu được và tích tụ tối đa 4 ÷ 5% axit axetic và sau đó chúng oxi hoá axit axetic tạo thành CO_2 và H_2O. Chúng được sử dụng trong ngành sản xuất nước uống lên men có ga.

II.2.1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men

a. Nồng độ rượu

Tuỳ thuộc vào từng loài, nồng độ rượu phù hợp cho quá trình lên men từ 6÷15%, thường trung bình là 13%. Khi hết rượu chúng oxi hoá axit axetic thành CO_2 và H_2O để cung cấp năng lượng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Để tránh trường hợp này cần phải kiểm tra nồng độ rượu thường xuyên để dừng quá trình lên men khi nồng độ rượu còn 0,3÷0,5%.

b. Nhiệt độ

Tuỳ theo từng loài mà nhiệt độ tối ưu cho quá trình oxi hoá khác nhau. Trong sản xuất người ta thường dùng những loài vi khuẩn có nhiệt độ thích ứng cho quá trình oxi hoá rượu thành axit axetic từ 30÷34^oC.

c. Nồng độ axit

Tuỳ thuộc từng loài, đa số quá trình lên men bị ức chế khi nồng độ axít đạt hơn 8% và khi nồng độ axit axetic từ 12÷14% thì quá trình lên men hoàn toàn bị ngừng hoạt động.

d. Oxi

Quá trình lên men axetic là quá trình oxi hoá không hoàn toàn vì vậy bắt buộc phải cung cấp vừa đủ lượng oxi để oxi hoá rượu thành axit axetic. Tránh trường hợp oxi hoá axit axetic thành CO_2 và H_2O nếu thừa oxi hoặc không oxi hoá hết rượu thành axit axetic nếu thiếu oxi.

Trong thực tế sản xuất cần cung cấp 2,5m^3 không khí khi oxi hoá 1 kg rượu khan thành axit axetic. Cần thông gió và vô trùng không khí khi cung cấp oxi cho quá trình lên men.

e. Môi trường dinh dưỡng

Nếu chỉ có rượu thì vi khuẩn axetic không thể sống được nên cần bổ sung một số chất dinh dưỡng khác. Trong 100 lít rượu 10% cồn cần 500g đường glucose hay tinh bột đã thuỷ phân, 25g superphotphat, 25g sunfat amôn, ngoài ra còn bổ sung thêm một số chất sinh trưởng khác.

II.2.1.4. Ứng dụng

a. Sản xuất giấm

Sản xuất giấm hiện nay theo hai phương pháp cơ bản:

- **Phương pháp lên men chậm**

Đây là phương pháp Orland hay phương pháp của Pháp và là phương pháp thủ công đã có từ lâu. Phương pháp này chủ yếu sản xuất từ rượu vang, nguyên liệu gồm khoảng 3÷4% rượu và từ 2÷3% axit axetic. Người ta cho axit axetic trước để tạo điều kiện cho vi khuẩn axetic phát triển, mặt khác ngăn ngừa bị nhiễm các loài vi khuẩn khác.

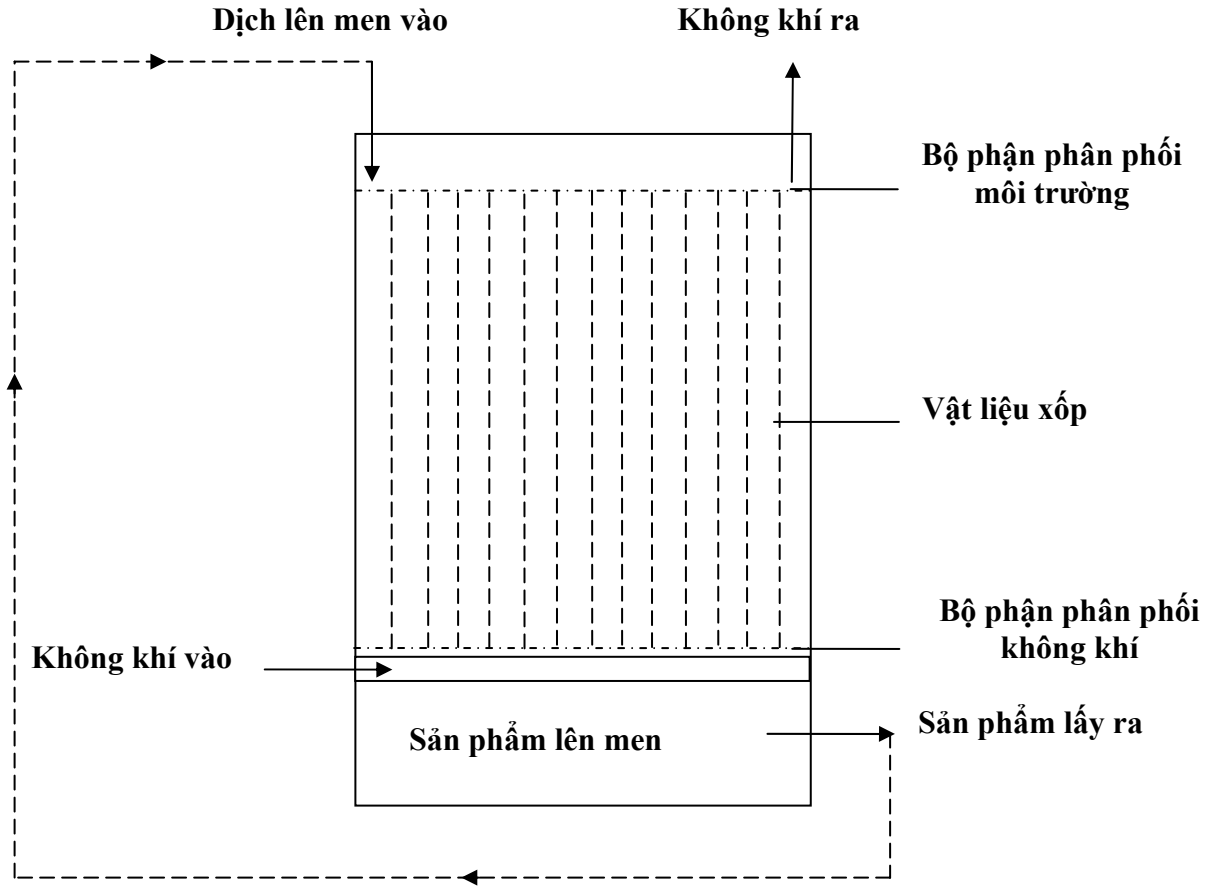
Dịch sau khi được chuẩn bị xong được đổ vào các thùng bằng gỗ và để ngoài không khí. Sau một thời gian trên bề mặt sẽ tạo thành váng chứa nhiều axit

axetic. Vì thế quá trình oxi hoá chậm và chỉ kết thúc sau vài tuần. Sau khi kiểm tra nồng độ rượu còn từ 0,3÷0,5 thì lấy giấm ra và cho dịch mới vào. Không nên để quá lâu chất lượng giấm sẽ giảm nhanh do quá trình oxi hoá axit axetic thành CO_2 và H_2O.

Bằng phương pháp này giấm thu được có nồng độ axit axetic từ 5 đến 6%. Nếu muốn bảo quản giấm được lâu phải thanh trùng.

- **Phương pháp lên men nhanh**

Đây là phương pháp của Đức hay phương pháp công nghiệp. Thiết bị sản xuất là một thùng gỗ có chiều cao từ 2,5 đến 6m, đường kính từ 1,2 đến 3m. Nguyên tắc cơ bản của phương pháp này là làm tăng tiết diện tiếp xúc với không khí làm cho quá trình lên men xảy ra nhanh hơn.



Thùng thường là hình trụ, phía trên có một lỗ cho dịch môi trường vào và một lỗ cho không khí thoát ra. Dưới là một miếng gỗ có nhiều lỗ tròn để phân phối đều dịch môi trường. Phía dưới là những vật liệu xốp đã được thanh trùng. Dưới cùng là một tấm sàn có nhiều lỗ nhỏ cho dịch dấm thoát ra và phân phối đều không khí.

Dịch được pha chế như sau: Trong 100 lít rượu 10% cồn cần 500g đường glucose hay tinh bột đã thuỷ phân, 25g superphotphat, 25g sunfat amon, 0,9g K_2CO_3, axit axetic 3kg.

Dịch được đổ từ trên xuống và chảy đều trên các màng xốp đã cấy sẵn vi sinh vật. Ở đây sẽ xảy ra quá trình oxy hoá rượu thành axit axetic nhờ oxi không khí đi từ dưới lên. Có thể tiến hành lên men lại bằng cách cho dịch giấm thu được qua màng xốp nhiều lần để nồng độ rượu còn khoảng 0,3 đến 0,5% là được. Dịch giấm thu được thường có nồng độ khoảng 9% axit axetic, sau đó đem lọc và thanh trùng.

b. Một số ứng dụng khác của vi khuẩn axetic

Ngoài khả năng chuyển hoá cồn thành axit axetic, một số vi khuẩn axetic còn có khả năng oxy hoá một số chất khác. Một số sản phẩm quan trọng như: axit gluconic, sorbose…

II.2.2. Lên men citric

II.2.2. 1. Cơ chế lên men

Trong quá trình này glucose được chuyển hoá thành axit pyruvic theo con đường EMP (Embden-Mayerhof-Parnas), sau đó axit pyruvic tiếp tục chuyển hoá thành axit citric.

Phương trình tổng quát của quá trình này như sau:

$$2C_6H_{12}O_6 + 3O_2 \rightarrow 6C_6H_8O_7 + 4H_2O$$

Glucose *Axit citric*

Có nhiều loài nấm mốc có khả năng oxy hóa gluxit thành axit citric như *Rhizopus, Aspergillus, Penicillium.* Trong đó quan trọng nhất là *Aspergillus niger.*

II.2.2. 3. Các yếu tố ảnh hưởng

a. Môi trường dinh dưỡng

Nấm mốc cần đường, tinh bột và các muối vô cơ. Môi trường lên men axit citric không phải là môi trường phát triển bình thường của *Aspergillus niger.* Trong điều kiện thường nấm mốc chỉ phát triển sinh khối tạo ra rất ít axit citric. Trong trường hợp môi trường nhiều cabon và ít nitơ (lượng đường 4 ÷ 20%, nitơ 0.07%, ngoài ra còn bổ sung thêm nguyên tố khoáng như P, Fe, Zn…) thì quá trình tổng hợp axit citric xảy ra mạnh.

b. pH môi trường

pH thích hợp cho *Aspergillus niger* tạo thành axit citric từ 3 ÷ 4, tùy thuộc vào chủng nấm mốc sử dụng. Ta có thể axit hoá môi trường bằng HCl, pH môi trường phụ thuộc vào nguồn nitơ. Nếu sử dụng NH_4NO_3 thì pH thích hợp là 3, nếu sử dụng NH_4Cl thì pH thích hợp là 4. Trong quá trình lên men do sự tạo thành axit citric nên pH giảm mạnh, vì vậy cần phải điều chỉnh pH của môi trường cho thích hợp.

c. Sự thoáng khí

Quá trình oxi hoá cần một lượng lớn oxy, vì vậy cần phải cung cấp không khí cho quá trình lên men bằng cách thông thoáng khí môi trường. Ngoài ra sự thông thoáng khí còn giảm lượng khí cacbonic trong môi trường.

Trong thực tế sản xuất người ta thường thổi không khí vô trùng vào dịch lên men.

d. Nhiệt độ:

Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men tạo axit citric là 31 – 37^{o}C. Thấp hơn thì tạo axit gluconic, cao hơn thì việc tạo axit citric bị kìm hãm. Thời gian lên men khoảng 7 – 10 ngày.

II.2.2. 4. Ứng dụng sản xuất axit citric

Trong quá trình sản xuất axit citric người ta sử dụng nấm mốc *Aspergillus niger*. Hiện nay người ta sử dụng hai phương pháp sau:

- Phương pháp lên men trên bề mặt (lên men nổi)

Nấm là một hệ sợi vì vậy người ta sử dụng các khay có diện tích lớn và dịch lên men khoảng 8 ÷ 12cm. Nấm mốc sẽ phát triển trên bề mặt môi trường. Phương pháp này đơn giản, hiệu suất cao nhưng do dễ bị nhiễm các vi sinh vật khác nên ít được sử dụng.

- Phương pháp lên men chìm

Dùng những thiết bị để giữ nấm mốc trên cơ chất ở giữa dịch lên men và có hệ thống thông khí oxy vô trùng. Dùng phương pháp này hiệu suất lớn, thời gian nhanh và tạo ra axit citric với nồng độ cao.

Mỗi phương pháp lên men có hai kiểu lên men

- Lên men thay thế: dùng hai loại môi trường, đầu tiên dùng môi trường phù hợp cho sự phát triển sinh khối của nấm mốc sau đó thay môi trường này bằng dịch lên men.
- Lên men không thay thế: chỉ dùng một loại môi trường trong suốt quá trình lên men.

Quá trình sản xuất axit citric bằng con đường vi sinh vật gồm 3 giai đoạn:

- Chuẩn bị dịch lên men.
- Lên men.
- Xử lý dịch lên men để thu axit citric.

Trong ngành công nghiệp sản xuất axit citric hiện nay người ta sử dụng phương pháp lên men bề mặt có thay thế. Theo phương pháp này quá trình lên men được tiến hành trong 3 phân xưởng chính:

- Phân xưởng bào tử: nuôi cấy *Aspergillus niger* để thu bào tử, bào tử thu được ở dạng huyền phù trong dịch nước để chuyển vào dịch lên men.
- Phân xưởng lên men: gồm một số phòng đóng kín trong đó có những chậu dẹt. Bào tử nấm mốc được phát triển trên bề mặt thức ăn dinh dưỡng trong những chậu này ở nhiệt độ 34^{o}C, sau khoảng 2 ngày màng mốc được tạo thành. Thay dung dịch thức ăn bằng dịch lên men, giữ ở nhiệt độ 32^{o}C trong 4 ngày.
- Phân xưởng hoá học: dung dich đã lên men là hỗn hợp các axit, đường chưa bị lên men và các tạp chất hữu cơ. Dựa vào độ hoà tan khác nhau của các muối tạo thành để tách muối canxicitric.

II.2.3. Phân hủy hiếu khí cenlulose & pectin

a. Cơ chế

Phân hủy cenlulose và các chất pectin ở điều kiện hiếu khí dưới tác dụng của những vi sinh vật có hoạt tính enzyme pectinase và cenlulase. Đầu tiên, chúng thủy phân những chất này thành đường và axit, sau đó oxy hóa tiếp thành những sản phẩm thủy phân.

b. Vi sinh vật phân giải cenlulose và pectin

Những nấm khác nhau, một số vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng này. Trong số vi khuẩn ta thấy vi khuẩn nhầy *Mixococcus Hutchínonii* có khả năng phân giải hiếu khí cenlulose mạnh mẽ. Nó có dạng hình que, dài 4÷6µm, đường kính 0,3÷0,4µm nó phát triển tốt trên môi trường chỉ có cenlulose, không thể sử dụng được các nguồn glucid khác, hơn nữa còn bị ức chế sinh trưởng. Ngoài ra còn có một số xạ khuẩn và một số nấm cũng oxy hóa được cenlulose như: *Tricoderma.*

c. Ứng dụng

Phân hủy hiếu khí cenlulose rất phổ biến trong tự nhiên và có một ý nghĩa rất lớn trong quá trình khoáng hóa xác thực vật. Kết quả là cenlulose và các chất hữu cơ trong đất bị vi sinh vật phân hủy tạo thành chất mùn – chất có màu thẫm – làm dự trữ dinh dưỡng cho cây trồng.

Vi sinh vật phân giải cenlulose – pectin có thể làm giảm chất lượng đáng kể các nguồn nguyên liệu thực phẩm là thực vật (rau quả). Thủy phân các chất pectin dẫn tới làm tơi thịt quả và rau cho tới khi các mô bị rã rời (xuất hiện "thối mục ẩm") còn thủy phân cenlulose – dẫn tới phá hỏng thành tế bào của thịt quả và làm cho vi sinh vật lọt vào bên trong các tổ chức mô thực vật.

II.2.4. Phân hủy chất béo và axit béo

a. Cơ chế

Chất béo là hỗn hợp các este của glyxerin và các axit béo bậc cao. Dưới tác dụng của các tác nhân vật lý – hóa học của môi trường bên ngoài, cũng như của vi sinh vật, chất béo có thể có những thay đổi đáng kể.

Tác động của vi sinh vật bắt đầu là sự thủy phân chất béo thành glyxerin và axit béo tự do. Quá trình này xảy ra dưới tác dụng xúc tác của enzyme lipaza.

Axit béo tích tụ trong cơ chất, vì vậy kèm theo là giảm chất lượng của chất béo, thể hiện ở chỗ làm thay đổi "chỉ số axit" – hàm lượng các axit béo tự do. Sản phẩm thủy phân lại tiếp tục bị chuyển hóa. Glyxerin được nhiều vi sinh vật sử dụng và có thể bị oxy hóa hoàn toàn tới CO_2 và H_2O. Các axit béo bị phân hủy chậm hơn, trước hết là các axit béo không bão hòa bị oxy hóa dần dần. Một số vi sinh vật, ngoài enzyme lipaza còn có enzyme oxy hóa lipoxygenaza – xúc tác quá trình peoxyt của axit béo được tạo thành. Các peoxyt này dễ dàng bị oxy hóa tiếp theo để tạo thành những sản phẩm trung gian – oxy axit, aldehyt, xeton và …làm cho chất béo có những mùi vị khó chịu. Những sản phẩm trung gian của quá trình oxy hóa chất béo và axit béo lần lượt được vi sinh vật sử dụng trong trao đổi chất của chúng và cuối cùng tạo thành CO_2 và H_2O.

b. Vi sinh vật phân hủy chất béo và axit béo

Vi sinh vật phân hủy chất béo và axit béo mạnh mẽ nhất là *Pseudomonas fluorescens* là các trực khuẩn nhỏ, không sinh bào tử có tạo sắc tố màu xanh nhạt. Ngoài ra còn có các vi khuẩn: *Micrococcus*, *Chromobacterium, Prodigioscens;* nhiều loài nấm, xạ khuẩn và một số nấm men. Trong số nấm có hoạt tính này ta thấy đáng chú ý là *Oidium lactis, Clasdosporium hebarium,* nhiều loài thuộc *Aspergilus* và *Penicillium.*

c.Ứng dụng

Phân hủy chất béo do vi sinh vật trong điều kiện tự nhiên (ở đất và nước) xảy ra thường xuyên và có ý nghĩa rất lớn trong vòng tuần hoàn vật chất nói chung.

Trong bảo quản dầu mỡ dài ngày ở điều kiện không cho phép vi sinh vật phát triển thì sự làm hỏng chất béo có thể là do tác động của ánh sang hoặc oxy không khí.

Trong quá trình lên men hiếu khí còn có lên men axit amin, lên men các chất kháng sinh, enzyme và nhiều dạng lên men khác. Các axit amin ngày nay được sản xuất nhờ vi sinh vật là axit glutamic và lizin. Các vi sinh vật dùng ở đây chủ yếu là vi khuẩn thuộc các giống *Micrococcus, Brevibacterium và Corynerbacterium.* Các vi khuẩn này oxy hóa đường thành axit glutamic hoặc lizin và một số sản phẩm phụ. Nguyên liệu chủ yếu là đường glucoza, saccaroza, rỉ đường, dịch đường thủy phân từ tinh bột… cũng có giống lên men được axetat, rượu etylic, dầu hỏa hoặc parafin. Các công đoạn của quá trình lên men các chất kháng sinh, vitamin, enzyme về đại thể giống như lên men axit amin.

II.3. QUÁ TRÌNH THỐI RỮA

Thối rữa là quá trình phân hủy các chất protein dưới tác dụng của vi sinh vật. Protein là hợp chất hữu cơ phức tạp nhất, có mặt trong tất cả các cơ thể sống. Nó cũng có nhiều trong xác các sinh vật, trong các loại thức ăn và nhiều loại vật liệu hàng hóa công nghiệp khác. Quá trình này rất quan trọng trong vòng tuần hoàn vật chất. Quá trình này được tiến hành thường xuyên trong tự nhiên, đất, nước, trong cả điều kiện yếm khí và hiếu khí. Sản phẩm thối rữa có thể làm ô nhiễm môi trường sống và các vi sinh vật gây thối là nguyên nhân làm hỏng thực phẩm giàu protein.

II.3.1.Cơ chế

Quá trình phân giải protein dưới tác dụng của enzyme phân giải có trong tế bào vi sinh vật có có thể chia ra làm 3 giai đoạn:

- **Giai đoạn 1:**

Bắt đầu giai đoạn này là sự thuỷ phân do enzyme protease ngoại bào. Quá trình này chỉ xảy ra đối với các vi sinh vật có enzyme ngoại bào, còn các vi sinh vật không có enzyme ngoại bào chúng không có khả năng này.

Quá trình thuỷ phân xảy ra từ từ và chúng tạo thành các sản phẩm trung gian khác nhau. Các axit amin là sản phẩm cuối cùng của giai đoạn này.

$$\text{Protid} \xrightarrow{+H_2O} \text{peptone} \xrightarrow{+H_2O} \text{polypeptit} \xrightarrow{+H_2O} \text{axit amin}$$

Đối với các nucleoprotid sẽ bị phân huỷ thành axit nucleotic và protid đơn giản. Sau đó protid bị phân huỷ như sơ đồ trên, còn axit nucleotic bị phân huỷ thành axit photphoric, pentose và hỗn hợp các bazơ nitơ.

- **Giai đoạn 2:**

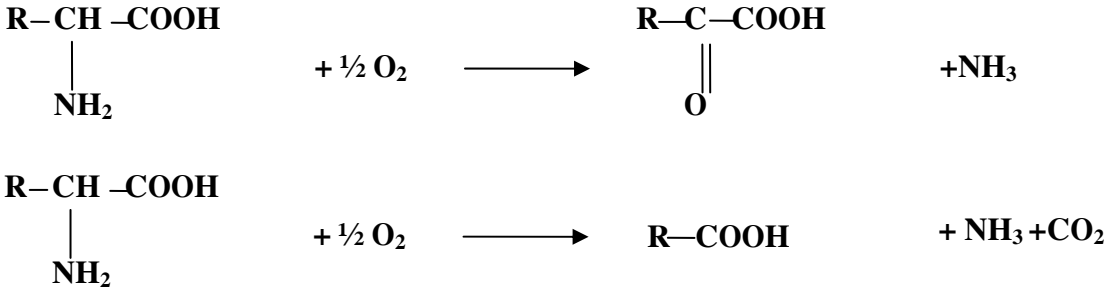
Các axit amin sau khi được tạo thành do quá trình thủy phân trên sẽ khuếch tán vào trong tế bào vi sinh vật và được phân hủy tiếp bằng cách khử nhóm amin hoặc khử nhóm cacboxyl hoặc đồng thời khử cả hai nhóm để tạo thành NH_3, CO_2 và các hợp chất hữu cơ tương ứng. Quá trình khử amin có thể xảy ra theo nhiều cách khác nhau:

Khử amin bằng thuỷ phân có kèm theo decacboxyl hoá hoặc không:

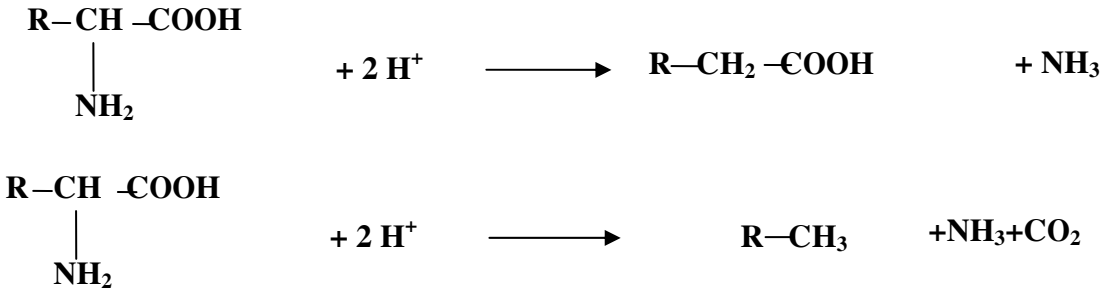
$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + H_2O \longrightarrow R-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-COOH + NH_3$$

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + H_2O \longrightarrow R-CH_2-OH + NH_3 + CO_2$$

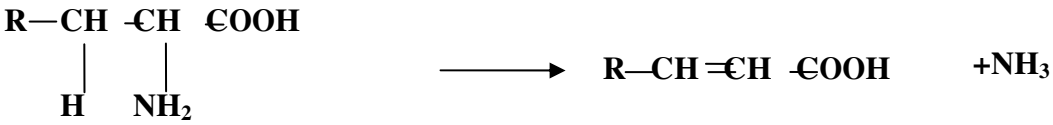
Khử amin do do oxi hoá có kèm theo decacboxyl hoá hoặc không:



Khử amin do vi khuẩn yếm khí có kèm theo decacboxyl hoá hoặc không:



Khử amin do mất NH_3 trực tiếp (Khử amin nội phân tử)



Trong bốn dạng trên, khử amin bằng cách oxy hóa là dạng phổ biến hơn cả. Đó là con đường tạo thành các xetoaxit, chất trung gian quan trọng của quá trình trao đổi chất. Từ các phản ứng trên ta thấy rằng ngoài NH_3 còn tạo thành nhiều phân tử axit, rượu, oxyaxit, cetoaxit…Tuỳ theo gốc R của axit amin các axit thường được tạo thành là axit formic, axit axetic, axit propionic, axit butyric. Các rượu được tạo thành là propiolic, butylic, amylic, izoamylic…

Trong protein ngoài monoaminoaxit còn có các diaminoaxit, chúng bị phân huỷ để tạo thành diamin:

$NH_2(CH_2)_4CHNH_2COOH \rightarrow NH_2(CH_2)_5NH_2 + CO_2$

Lizin → *Cadaverin*

Cadaverin là chất rất độc, còn có tên là chất độc xác chết.

Khi phân huỷ protid có chứa lưu huỳnh tạo thành H_2S:

$HSCH_2CHNH_2COOH \rightarrow CH_3CHNH_2COOH + H_2S$

Xistein

Nhiều trường hợp tạo thành dẫn xuất của H_2S là các mercaptan có mùi tanh và hôi thối với một lượng rất nhỏ.

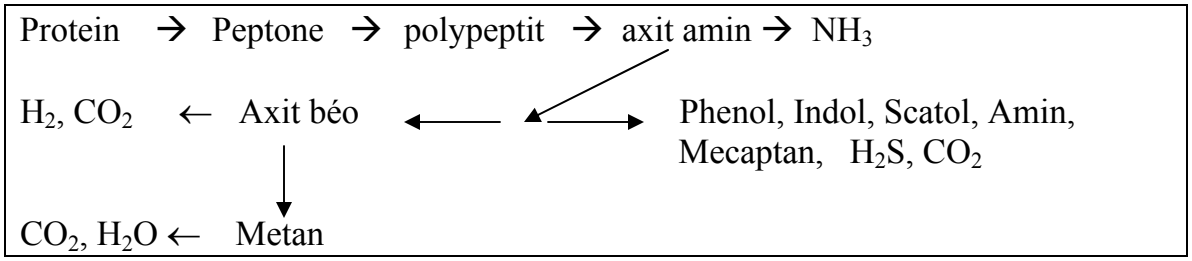
Khi phân huỷ các amin thơm (có vòng bezen) sẽ tạo thành các sản phẩm đặc trưng của quá trình thối rữa. Khi phân huỷ phenilalamin ta được axit benzoic, tirozin → crezol, trytophan → indol và scatol. Indol và scatol có mùi hôi thối rất khó chịu (mùi phân) và có khả năng gây độc.

- **Giai đoạn 3:**

Các chất hữu cơ được hình thành do quá trình phân giải sơ bộ aminoaxit sẽ tiếp tục chuyển hoá, sự chuyển hoá này tuỳ thuộc vào loài vi sinh vật và tuỳ thuộc vào điều kiện môi trường mà rất khác nhau.

- Trong điều kiện hiếu khí các chất này được oxi hoá và có thể được vô cơ hoá hoàn toàn. Sản phẩm cuối cùng là: NH_3, CO_2, H_2O, H_2S, H_3PO_4.
- Trong điều kiệm yếm khí các sản phẩm không được oxi hoá hoàn toàn, trong môi trường sẽ tích tụ các axit hữu cơ, rượu, amin, trong đó có nhiều chất độc và gây mùi hôi thối.

Ta có thể tóm tắt quá trình phân giải protein như sau:



II.3.2.Vi sinh vật gây ra quá trình phân giải

Tham gia quá trình phân giải protein có nhiều loài vi sinh vật có kiểu hô hấp khác nhau. Ta có thể xem xét đại diện một số loài như sau:

- **Vi sinh vật hiếu khí**

Bacillus mycoides (trực khuẩn đất): đây là trực khuẩn có kích thước không lớn lắm, có bào tử hình bầu dục, trên môi trường đặc chúng tạo thành khuẩn lạc giống như khuẩn ty thể của nấm.

Bacillus subtilis: phân bố rộng rãi trong thiên nhiên, phân huỷ protid rất mạnh mẽ. Là trực khuẩn hai đầu tròn, khi tạo thành bào tử có hình bầu dục hoặc hình dài. Chúng có thể tồn tại riêng biệt từng tế bào hay liên kết với nhau thành chuỗi. Chúng thường phát triển trên xác thực vật rơm rạ nên còn có tên là trực khuẩn cỏ khô.

Bacillus mensentericus: là những trực khuẩn chuyển động có tiên mao xung quanh, tạo bào tử hình bầu dục, tế bào có thể tạo thành chuỗi. Chúng có hoạt lực protease khá cao, bào tử chịu nhiệt độ cao, có thể tìm thấy chúng trong đồ hộp đã qua tiệt trùng ở 120^oC. Khi phân giải protid chứa S chúng tạo thành H_2S.

Bacillus cereus: là trực khuẩn thường tồn tại từng tế bào riêng lẻ. Tế bào có không bào và chuyển động. Có khả năng tạo bào tử hình oval hay hình elip. Thường thấy chúng ở đất, nước, cây. Chúng phát triển tốt ở nhiệt độ từ 37 - 48^{o}C.

Pseudomonas fluorescens: là trực khuẩn tạo bào tử, di động được nhờ chùm tiêm mao ở đầu, khi phân giải protein tạo sắc tố màu vàng lục.

Cromobacterium prodigiosum: là trực khuẩn không sinh bào tử, có thể hình thành sắc tố màu đỏ, khuẩn lạc của vi khuẩn này trông giống vết máu.

- **Vi sinh vật hô hấp tuỳ tiện**

Proteus vulgaris: là trực khuẩn nhỏ, không tạo bào tử, có tiêm mao, và chuyển động rất mạnh. Chúng có khả năng thay đổi hình dạng và kích thước trên môi trường thức ăn khác nhau. Thường gặp chúng ở đường ruột người và động vật, trong nước, trong đất. Phát triển tốt ở nhiệt độ từ 25 đến 37^{o}C, có hoạt lực protease rất cao. Khi phân giải protid tạo thành indol và H_2S làm thay đổi pH của môi trường.

Bacterium coli: còn gọi là vi khuẩn đại tràng, chúng luôn luôn có trong ruột người và động vật, rồi đi vào nước, đất và phân. Chúng là trực khuẩn ngắn chuyển động được và không tạo bào tử. Không có có khả năng phân giải protein mà chỉ phân giải được các sản phẩm thuỷ phân protein.`

- **Vi sinh vật yếm khí**

Bacillus putrificum: là trực khuẩn nhỏ, có bào tử tương đối lớn ở một đầu, không có khả năng lên men glucid, khi phân giải protein tạo nhiều khí. Thường gặp trong đất, trong miệng, trong ruột người và động vật, có khi chúng tồn tại trong đồ hộp. Chúng thường tạo thành chuỗi hoặc từng tế bào riêng lẻ. Nhiệt độ phát triển tối ưu là 37^{o}C, bào tử chịu nhiệt độ cao.

Clostridium sporogenes (Bacillus sporogenes): là trực khuẩn lớn, thường tạo thành chuỗi, có khả năng chuyển động và tạo bào tử hình oval, nhiệt độ phát triển tối ưu là 37^{o}C. Khác với loài trên, chúng có khả năng lên men glucid, khi phân giải protein tạo thành nhiều H_2S.

Ngoài các loài vi khuẩn trên ra còn thấy một vài loài xạ khuẩn, nấm mốc tham gia phân huỷ protid như: *Penicillium, Aspergillus, Mucor, Trichoderma* cũng có khả năng phân giải protein mạnh mẽ.

Vi sinh vật thối rữa đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên. Chúng phân hủy các chất protein có trong xác động thực vật và khoáng hóa các hợp chất này để tạo thành amoniac, làm giàu cho đất, cung cấp nguồn nitơ dinh dưỡng cho cây trồng.

Song, dưới tác dụng của vi sinh vật gây thối các loại thực phẩm thịt, cá và các sản phẩm từ thịt, cá, trứng, sữa cũng như các sản phẩm giàu protein khác bị hư hỏng. Một trong những chỉ tiêu của sự hư hỏng là có mặt các sản phẩm của quá trình phân hủy protein (hàm lượng cao các amin, NH_3, H_2S và các acid béo).

Tài liệu tham khảo chương II:

1. Vi sinh vật công nghiệp – Lê Xuân Phương – NXB Xây Dựng
2. Công nghệ vi sinh – Lương Đức Phẩm – NXB Nông nghiệp
3. Vi sinh vật học và vệ sinh an toàn thực phẩm – Lương Đức Phẩm – NXB Nông nghiệp
4. Hóa học thực phẩm – Lê Ngọc Tú – NXB Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.

Câu hỏi ôn tập chương II:

1. Thế nào là quá trình lên men? Lên men kỵ khí, hiếu khí?

2. Lên men rượu: cơ chế, tác nhân vi sinh vật, các nhân tố ảnh hưởng và các ứng dụng trong công nghệ sản xuất rượu cồn, bia, rượu vang và sâm panh?

3. Lên men lactic: cơ chế, tác nhân vi sinh vật, các ứng dụng trong sản xuất axit lactic, các sản phẩm sữa, muối chua rau quả và thức ăn gia súc?

4. Lên men propionic: cơ chế, tác nhân vi sinh vật, ứng dụng trong công nghệ sản xuất phomat?

5. Lên men butyric và lên men acetone – butanol?

Chương III: ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ CỦA THỰC PHẨM ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VI SINH VẬT (5t)

Nguyên liệu trong sản xuất, thực phẩm chủ yếu là động vật và thực vật. Đặc tính vật lý và hóa học của động vật và thực vật dùng làm nguyên liệu thực phẩm hay là sản phẩm thực phẩm có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của vi sinh vật khi chúng có mặt trong thực phẩm. Các ảnh hưởng này có thể theo chiều hướng có lợi, có thể có chiều hướng có hại đối với vi sinh vật. Các yếu tố gây ảnh hưởng tới vi sinh vật được chia làm 2 nhóm:

- Nhóm các yếu tố nội sinh
- Nhóm các yếu tố ngoại sinh

III.1. Nhóm các yếu tố nội sinh

Là những yếu tố thuộc về bản chất của thực phẩm, các yếu tố này nằm trong mô bào của thực vật và động vật mà ta sử dụng làm nguyên liệu chế biến thực phẩm. Các yếu tố đó bao gồm:

1. pH
2. Độ ẩm
3. Oxy
4. Hàm lượng chất dinh dưỡng hay thành phần hóa học

III.1.1. Ảnh hưởng của pH trong thực phẩm

Tác động pH của nguyên liệu lên tế bào vi sinh vật chủ yếu vào hai hướng:

- Tác động lên hoạt tính enzyme trên thành tế bào của vi sinh vật
- Tác động lên tính thấm của màng tế bào của vi sinh vật.

Mỗi loài vi sinh vật có một khoảng pH nhất định để phát triển và sinh sản. Ở khoảng pH này, các loài vi sinh vật có các giới hạn $pH_{cực\ tiểu}$, $pH_{tối\ thích}$ và $pH_{cực\ đại}$.

Dựa vào nhu cầu của vi sinh vật đối với pH người ta chia vi sinh vật thành ba nhóm:

- Nhóm ưa axit $pH_{tối\ thích} = 3$
- Nhóm ưa trung tính $pH_{tối\ thích} = 7$
- Nhóm ưa kiềm $pH_{tối\ thích} = 9 - 10$

Bảng III.1. khoảng pH phát triển của một số loài vi sinh vật thực phẩm

pH

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nấm mốc									
	Nấm men								
		Vi khuẩn lactic							
				Staphylococcus aureus					
				E.coli					
				Y. enterocolitica					
				C. botulinum					
				Bacillus cereus					
				V. parahaemolyricus					
					Campylobacter sp				
						Vibrio sp			

(nguồn: Jemes M.Jay, 1997)

Tên vi sinh vật	$pH_{cực\ tiểu}$	$pH_{tối\ thích}$	$pH_{cực\ đại}$
Thiobaccillus thiooxidant	0,5	2,0 – 2,8	4,0 – 6,0
Bacillus acidocaldarius	2,0	4,0	6,0
Lactobacilus acidophilus	4,0	5,2	6,8
Staphylococcus aureus	4,2	7,0 – 7,5	9,3
Echerichia coli	4,4	6,0 – 7,0	9,0
Clostridium sporogenes	5,0 – 5,8	6,0 – 7,6	8,5 – 9,0
Erwinia caratovora	5,6	7,1	9,3
Pseudomonas aeruginosa	5,6	6,6 – 7,0	8,0
Nấm mốc	1,2	1,7 – 7,7	9,2 – 11,1
Saccharomyces cerevisiae	4	5,8	6,8

pH ảnh hưởng như thế nào đến tế bào vi sinh vật?

Ở hầu hết vi sinh vật pH ở bên trong tế bào được duy trì ở pH gần bằng 7, ở pH này tế bào thực hiện trao đổi chất tốt nhất. Màng tế bào chất không thấm ion H^+ và ion OH^-, ngoài ra tế bào còn có cơ chế bơm ion H^+ ra ngoài tế bào khi ion này vượt quá giới hạn.

- Khi tế bào bị đặt trong môi trường có pH bên ngoài đạt gần giá trị $pH_{tối\ thích}$ ion H^+ và ion OH^- không thể xâm nhập qua màng tế bào và không làm ảnh hưởng đến pH bên trong tế bào chất.
- Khi tế bào được đặt trong môi trường có pH cực cao (quá axit hay quá kiềm), màng tế bào sẽ bị tổn thương, khi đó ion H^+ và ion OH^- từ môi trường ngoài có thể rò rỉ vào bên trong tế bào, hậu quả là enzyme và axit nucleic sẽ bị biến tính dẫn đến tế bào sẽ chết.

Axit hữu cơ yếu có những tác dụng khác với axit vô cơ. Axit hữu cơ yếu bị phân ly như sau:

$$RCOOH \rightleftharpoons RCOO^- + H^+$$

Độ phân ly của axit hữu cơ còn tùy thuộc vào pH môi trường. Trong dung dịch axit, có nồng độ ion H^+ cao hơn, cân bằng phản ứng sẽ thiên về dạng không phân ly. Tỷ lệ % của axit yếu được phân ly ở một giá trị pH đặc biệt là giá trị pK. Giá trị pH mà ở đó 50% axit bị phân ly là pKa. Axit không phân ly hòa tan trong lipit và chúng có thể khuyếch tán qua màng tế bào nơi mà các ion không thể đi qua. Điều này có nghĩa là môi trường càng axit thì càng có nhiều axit không phân ly và chúng có thể đi vào bên trong màng tế bào chất nơi đây trong điều kiện trung tính hay axit nhẹ của tế bào, các phân tử không phân ly sẽ phân ly trở thành các ion $RCOO^-$ và H^+. Tế bào khi ấy sẽ bơm ion H^+ ra ngoài khi ion này vượt quá giới hạn. Nhưng cuối cùng điều này trở nên không hiệu quả, pH bên trong tế bào giảm, hoạt động của enzyme và axit nucleic trong tế bào bị ảnh hưởng, tế bào sẽ chết.

Ảnh hưởng của axit yếu lên tế bào vi khuẩn là phụ thuộc vào môi trường. Ở nồng độ ức chế sự tăng trưởng, gây chết của tế bào, chúng sẽ có hiệu quả kém hơn khi nhiệt độ môi trường thấp hơn.

Ảnh hưởng kháng khuẩn của acid hữu cơ được xếp theo thứ tự sau đây:

Axit Propionic > axit axetic > axit citric >axit phosphoric > axit hydrochloric

pH của các loại thực phẩm khác nhau thì khác nhau. Hầu hết tính axit của thực phẩm thay đổi từ rất axit cho đến gần trung tính.

Thực phẩm hiếm khi có phản ứng kiềm, trứng gia cầm thuộc một trong số ít thực phẩm có tính kiềm. Sau đây là pH của một số thực phẩm thông dụng:

Thực phẩm	**pH**
Chanh	2,2 – 2,4
Dâu	3,1 -3,9
Cà chua	3,9 – 4,6
Chuối	4,5 – 4,7
Cà rốt	5 – 6
Khoai tây	5,3 -5,6
Thịt	5,4 – 6,9
Rau diếp	6,0
Sữa	6,3 -6,6
Lòng trắng trứng	8,6 – 8,9

Các axit hữu cơ yếu như axit malic, axit citric và axit tartaric thường có sẵn trong thực phẩm là các loại trái cây. Ở một số loại trái cây như dâu và chanh thì độ pH thấp của chúng giới hạn được sự phát triển của vi sinh vật như nấm mốc và nấm men.

Hoạt động của các vi sinh vật thường sẽ làm cho độ pH của thực phẩm thay đổi. Thí dụ:

- *Streptococi* và *Lactobacili* sẽ sản xuất ra axit lactic làm cho sữa bị chua

- Các loại vi khuẩn Gram âm hình que như *Pseudomonas spp* sẽ làm cho thịt bị hư hỏng và có tính kiềm lí do chúng sử dụng các axit amin như nguồn cacbon dẫn tới việc sản sinh ra chất amôn.
- Một vài loại thực phẩm có chứa một lượng khá cao chất duy trì pH (dung dịch đệm), chất này sẽ ngăn cản sự thay đổi pH. Ví dụ như thịt sẽ có một lượng chất khá cao chất duy trì pH trái lại rau cải thì không có.

- Ứng dụng của ảnh hưởng của pH trong chế biến và bảo quản thực phẩm:
  - Thêm vi khuẩn lactic vào dung dịch lên men, làm hạ thấp pH môi trường tạo điều kiện thuận lợi cho nấm men phát triển và tiến hành lên men rượu trong công nghệ sản xuất rượu cồn.
  - Ứng dụng trong chế biến: tiến hành muối chua rau quả.
  - Trong sản xuất thực phẩm ngâm dấm, dầm dấm để hạ thấp pH môi trường, ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây thối và các loại vi sinh vật gây hư hỏng thực phẩm, làm tăng thời gian bảo quản của sản phẩm.

III.1.2. Ảnh hưởng của độ ẩm trong thực phẩm

Một trong những phương pháp bảo quản thực phẩm cổ điển nhất của loài người là phương pháp sấy khô thực phẩm. Sấy khô thực phẩm là biện pháp tách nước (chủ yếu nước ở dạng tự do) ra khỏi nguyên liệu thực phẩm và thực phẩm, tạo ra trạng thái môi trường bất lợi cho vi sinh vật.

Mọi hoạt động sống của vi sinh vật đều liên quan đến nước, tỉ lệ của nước trong tế bào vi sinh vật khá cao: vi khuẩn: 75 – 85%, nấm men: 78 – 82%, nấm mốc: 84 – 90%.

Phần nước có thể tham gia vào các hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật được gọi là nước tự do. Nước liên kết là phần nước liên kết với các chất hữu cơ cao phân tử trong tế bào (protein, lipit, hydratcacbon,…). Nước liên kết mất khả năng hòa tan và lưu động.

Vi sinh vật cần nước ở trạng thái tự do, do đó nếu thiếu nước sẽ xảy ra hiện tượng loại nước ra khỏi tế bào làm cho tế bào bị co nguyên sinh và có thể sẽ chết. Sức đề kháng của vi sinh vật đối với trạng thái khô hạn là khác nhau:

- Sức đề kháng của xạ khuẩn > vi khuẩn > nấm mốc
- Sức đề kháng của bào tử > tế bào sinh dưỡng

- **Hoạt độ nước của thực phẩm:** a_w

Nhu cầu về nước của vi sinh vật được biểu thị một các định lượng bằng hoạt độ của nước (water activity) viết tắt là a_w.

Hoạt độ của nước được xác định là tỉ lệ áp suất hơi nước của thực phẩm và áp suất hơi nước nguyên chất trong cùng một nhiệt độ.

$$\text{Hoạt độ của nước } a_w = \frac{\text{Áp lực bốc hơi của một chất hoặc dung dịch}}{\text{Áp lực bốc hơi nước tinh khiết ở cùng nhiệt độ}}$$

Nước nguyên chất có $a_w = 1$, nước biển $a_w = 0,98$, máu người: $a_w = 0,995$; cá muối: $a_w = 0,75$.

Để vi sinh vật có thể tồn tại và phát triển thì a_w ở trong khoảng 0,93 – 0,99.

Mặt khác a_w liên quan rất chặt chẽ với nồng độ muối, đường cũng như các chất hòa tan khác trong thực phẩm.

Ví dụ: Thịt tươi chứa 75% là nước nhưng hoạt độ nước là 0,98. Protein cơ và mỡ là một khối rắn, chúng không tan trong nước, có ảnh hưởng bề mặt thấp và vì vậy chúng không tham gia vào các hoạt động của nước. Những chất tan được trong nước (glucose, aminoacid, muối khoáng, vitamin) hiện diện với lượng quá nhỏ trong thịt, làm cho độ hoạt động của nước trong thịt tươi rất cao.

Thực phẩm có thể có thành phần muối thấp nhưng thường thì không có hoạt độ nước thấp.

Ví dụ: Bơ mặn, nước trong nhũ tương dầu, có thành phần muối 2 – 3%, theo tính toán phải có hoạt độ nước a_w khoảng 0,993 – 0,989. Tuy nhiên, muối phân cực vì vậy chỉ tan được trong nước làm cho nồng độ muối trong pha này lên đến 18% làm cho hoạt độ nước thực tế có liên quan đến sự phát triển của vi sinh vật ở pha này là 0,86.

Nồng độ muối trong thực phẩm 3 - 5% làm chậm sự phát triển của vi sinh vật, 10 - 12% hầu như tất cả hoạt động sống của vi sinh vật ngừng lại. Tuy nhiên một số vi sinh vật có thể sinh trưởng được trong nồng độ muối cao hơn.

Một số vi sinh vật có thể phát triển trong môi trường có a_w rất thấp, người ta gọi chúng là các vi sinh vật chịu áp (osmophiles).

Ví dụ: *Saccharomyces rouxii*: a_w=0,85

Saccharomyces bailii: a_w=0,80

Penicillium: a_w=0,80

Haloacterium = Halococcus: a_w = 0,75 (vi sinh vật ưa mặn)

Xeromyces bisporus: a_w = 0,70 (vi sinh vật ưa khô).

Sự giảm a_w ảnh hưởng gì đến đường cong sinh trưởng?

- Làm chậm tốc độ sinh trưởng
- Làm kéo dài pha lag
- Làm giảm sinh khối, kích thước tế bào ở pha ổn định
- Làm tế bào chết nhanh hơn ở pha suy vong

- a_w và sự bảo quản thực phẩm:

Việc giảm a_w trong thực phẩm là một trong những phương pháp bảo quản thực phẩm quan trọng và lâu đời nhất. Làm giảm hoạt tính nước trong thực phẩm ảnh hưởng đến sự phát triển của vài loại vi sinh vật hiện diện trong nguyên liệu thô hay xâm nhập vào trong suốt quá trình chế biến gây hư hỏng hay ngộ độc thực phẩm.

Chất hút ẩm là chất có thể tan được trong nước được cho thêm vào thực phẩm để làm giảm a_w. Mặc dù giống như chất bảo quản nhưng chất hút ẩm không hấp thu vào cơ thể con người và vì vậy chúng không có giá trị dinh dưỡng. Ví dụ sorbitol được thêm vào như một chất hút ẩm để phòng bệnh đái đường hay làm giảm độ ngọt của mứt dẻo.

Các phương pháp bảo quản có liên quan đến a_w của thực phẩm là:

- Sấy khô, phơi khô để làm giảm độ ẩm nguyên liệu. Có thể sấy thực phẩm bằng ánh sáng mặt trời, máy sấy khô, máy làm đông khô.

- Thêm muối: nồng độ muối trong sản phẩm 3 – 5% làm chậm sự phát triển của vi sinh vật. Đa số vi sinh vật gây thối bị ức chế ở nồng độ muối 10 – 12%. Muối thịt: 30% muối, dưa chuột muối: 15% muối, cá: 20% muối.
- Thêm đường, khi ướp đường để bảo quản thực phẩm thì cần nồng độ cao hơn muối, khoảng 60 - 70% mới có thể hạn chế được hoạt động của vi sinh vật. Tuy nhiên vẫn có một số nấm mốc vẫn phát triển được ở nồng độ đường 70 – 80%. Chúng có thể gây hư hỏng mật, mứt. Nồng độ đường cao chỉ sử dụng trong sản xuất kẹo, mứt. Nhưng trong sản xuất hoa quả đồ hộp, độ đường thường chỉ từ 20 – 30%. Để bảo quản tốt thường phải khử trùng sản phẩm ở nhiệt độ thích hợp sau khi đã đóng trong hộp kín.
- Sấy thăng hoa là phương pháp sấy hiện đại làm giảm độ ẩm của nguyên liệu mà không ảnh hưởng nhiều đến chất lượng thực phẩm.
- Đông lạnh: tinh thể hóa nước tự do trong thực phẩm làm cho vi sinh vật không thể hấp thụ.

III.1.3. Ảnh hưởng của oxy

Sự phản ứng của vi sinh vật đối với oxy:

Các vi sinh vật sẽ thay đổi nhu cầu và phản ứng của chúng đối với oxy và khi có sự hiện diện của oxy trong môi trường. Môi trường có sự hiện diện của oxy là môi trường hiếu khí, không có oxy là môi trường kỵ khí. Các nhóm vi sinh vật sau được phân lập theo từng loại đối với sự hiện diện của oxy trong môi trường:

- Vi sinh vật hiếu khí bắt buộc: những vi sinh vật này cần oxy. Hầu hết các loại nấm, tảo, nhiều loại vi khuẩn, nguyên sinh động vật thuộc nhóm này. Các loài hiếu khí bắt buộc quan trọng được tìm thấy trong thực phẩm là: *Pseudomonas fluorescens,* nấm mốc *Penicillium spp* và một số loại nấm men: *Pichita spp.*
- Hiếu khí bắt buộc có giới hạn: giống như hiếu khí bắt buộc sinh vật cần oxy cho sự sống nhưng không thể phát triển ở nồng độ oxy là 20%. Ví dụ như *Campylobacter spp* sẽ phát triển ở nồng độ oxy từ 1 – 10%, tối thích là 6%, nồng độ oxy trên 10% thì nó không thể sống được.
- Vi sinh vật kỵ khí tùy ý: những vi sinh vật này có thể phát triển được trên môi trường có hoặc không có oxy. Năng lượng và chất hữu cơ trung gian được giải phóng ít hơn so với sinh vật hô hấp hiếu khí. Một loài vi sinh vật được biết đến nhiều nhất là nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, khi có oxy chúng sẽ phân giải glucose tạo ra ATP, khi không có oxy chúng sẽ sản xuất rượu ethanol. Nhiều vi khuẩn và nấm men quan trọng trong thực phẩm thuộc loại này.
- Vi sinh vật kỵ khí bắt buộc: các vi sinh vật loại này sẽ chỉ phát triển trong môi trường không có oxy và giải phóng năng lượng qua con đường lên men. Oxy là chất độc và sẽ làm cho vi sinh vật chết đi. Một vài loài vi

khuẩn và nguyên sinh động vật thuộc nhóm này, loại quan trọng trong thực phẩm là *Clostribium* như *C. botulinum...*

- Aetolerant: là loại vi sinh vật kỵ khí bắt buộc có thể chịu đựng được một lượng oxy nhất định trong môi trường. Vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm *Clostribium perfingens* là thuộc loại này.
- Vi sinh vật độc lập với oxy: hầu hết vi khuẩn lên men lactic có thể phát triển trong môi trường có hay không có oxy nhưng vẫn sản xuất ra một lượng chất trung gian và năng lượng, và vì vậy chúng được gọi là độc lập với oxy. Đôi khi, vi khuẩn lên men lactic được xem là kỵ khí bắt buộc hay hiếu khí bắt buộc có giới hạn.

- Thế oxy hóa khử của thực phẩm: Các chất oxy hóa và các chất khử tạo thành thế oxy hóa khử trong môi trường. Thực tế thế oxy hóa khử của thực phẩm phụ thuộc một số nhân tố sau:
  - Nồng độ oxy trong thực phẩm
  - Cấu trúc thực phẩm ảnh hưởng đến khả năng xuyên qua thực phẩm của oxy môi trường.
  - Nồng độ và loại chất biến đổi trong thực phẩm chống lại những thay đổi của sự oxy hóa khử trong thực phẩm
  - Cách thực phẩm được chế biến
  - pH của thực phẩm, pH giảm một đơn vị thì điện thế oxy hóa khử tăng 58mV.

Bề mặt thực phẩm rắn tiếp xúc với không khí sẽ có thế oxy hóa khử lớn (giá trị dương), trái lại phía bên trong thực phẩm có thế oxy hóa khử nhỏ (giá trị âm). Ví dụ thịt để lâu bề mặt tiếp xúc với không khí bị oxy hóa khử ở điện thế 200mV trái lại bên trong thịt bị oxy hóa khử ở điện thế -150mV.

Quá trình chế biến có thể biến đổi thế oxy hóa khử của thực phẩm. Việc băm nhỏ thịt làm gia tăng diện tích bề mặt tiếp xúc làm gia tăng sự oxy hóa khử. Ví dụ: thịt bò băm nhỏ thế oxy hóa khử hoàn toàn ở điện thế 200mV so với bên trong thịt thế oxy hóa khử ở điện thế -150 đến -200mV.

Đóng gói có thể ngăn chặn oxy và duy trì sự oxy hóa khử thấp vốn có trong thực phẩm hoặc sản phẩm bởi sự phát triển của vi sinh vật trong môi trường kín. Trường hợp đóng gói bên trong vẫn có thể có khí do sự tích lũy CO_2 sinh ra từ sự trao đổi chất của vi sinh vật.

Sự phát triển của vi sinh vật trong thực phẩm có liên quan tới thế oxy hóa khử. Vi sinh vật rất nhạy cảm với thế oxy hóa khử trong môi trường mà chúng đang phát triển. Bề mặt của thực phẩm tiếp xúc với không khí sẽ giúp cho sự phát triển của vi sinh vật hiếu khí bắt buộc vi sinh vật kỵ khí tùy ý hoặc vi sinh vật độc lập với không khí. Nấm mốc nói chung chỉ mọc trên bề mặt thực phẩm tiếp xúc với oxy khí quyển, ngoại trừ *Rhizopus spp* sẽ mọc ở nơi nồng độ oxy thấp nhưng sẽ không hình thành bào tử nếu không tiếp xúc với không khí. Thế oxy hóa khử còn làm thay đổi chiều hướng của các quá trình hóa sinh của vi sinh vật, nhất là loài kỵ khí tùy tiện. Thí dụ: nấm men rượu ở

môi trường không có oxy tiến hành lên men rượu, trong môi trường có đủ oxy lại tiến hành quá trình oxy hóa và tăng sinh khối.

Ứng dụng ảnh hưởng của ảnh hưởng của oxy cũng như thế oxy hóa khử của thực phẩm đối với vi sinh vật mà người ta có những phương pháp chế biến và bảo quản phù hợp. Để phòng tránh những vi sinh vật hiếu khí người ta thường dùng phương pháp bao gói, bao gói chân không và đóng hộp sản phẩm.

III.1.4. Ảnh hưởng của thành phần hóa học của thực phẩm

Thành phần hóa học của thực phẩm có ảnh hưởng đến sự phát triển của các nhóm vi sinh vật.

- Ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng trong thực phẩm:

Để phát triển bình thường vi sinh vật cần một số yếu tố dinh dưỡng trong thực phẩm như: nước, nguồn năng lượng, nguồn nitơ, vitamin và muối khoáng,... Vi sinh vật có sự ưa thích khác nhau đối với các loại thực phẩm khác nhau. Nấm mốc có nhu cầu dinh dưỡng ít nhất, tiếp đó là nấm men, vi khuẩn gram âm, sau cùng là vi khuẩn gram dương.

Từ những yếu tố trên người ta phân loại thực phẩm ra làm 2 loại:

Vi sinh vật thích (thực phẩm dễ hư): đạm ở hàm lượng cao, ít axit, đường và chất béo ở hàm lượng thấp, nước.

Vi sinh vật kỵ (thực phẩm khó hư): đường, muối, mỡ chiếm tỷ lệ cao, cồn, hóa chất diệt khuẩn (thuốc trừ sâu, kháng sinh... ở dạng dư lượng). Nói tóm lại là *các thực phẩm quá ngọt, quá mặn, quá chua, quá khô*.

Ví dụ:

- Thực phẩm giàu đạm (thịt cá tươi) có a_w = 0,99 thường bị hư hỏng bởi vi khuẩn
- Thực phẩm giàu vitamin, đạm là môi trường tốt cho các vi khuẩn gây bệnh, vi khuẩn lactic.
- Thực phẩm giàu đường bột có a_w = 0,8 thường bị hư hỏng bởi nấm mốc.

Dựa vào đặc tính dinh dưỡng của từng loại thực phẩm mà ta có các phương pháp bảo quản thích hợp.

- Ảnh hưởng của các chất ức chế trong thực phẩm

Các chất độc hóa học có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế hoạt động của các vi sinh vật. Chúng có ý nghĩa rất lớn trong công nghiệp thực phẩm. Các chất hóa học này có 2 nguồn gốc:

- Có thể có sẵn một cách tự nhiên trong thực phẩm, thí dụ: tannin, acid hữu cơ trong trái cây còn xanh, chất lyzozym trong lòng trắng trứng, kháng thể có trong sữa non, chất HCN có trong khoai mì, chất kháng khuẩn hay là các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật...
- Có thể do con người chủ ý hay vô tình cho vào trong thực phẩm: chất bảo quản thực phẩm, chất bảo vệ thực vật, các kim loại nặng...

Cơ chế tác dụng của chúng lên vi sinh vật nói chung không đồng nhất, phụ thuộc vào bản chất hóa học của chất đó cũng như từng loại vi sinh vật.

- Ester, alcol, dung dịch kiềm yếu có tác dụng làm tan chất lipoit có trong thành phần tế bào.
- Muối kim loại nặng, kiềm, axit, phormalin làm đông tụ protein, làm thay đổi thành phần nguyên sinh chất của tế bào vi sinh vật.
- Axit nitric, clo, bột clo, kali permanganate các chất hữu cơ oxy hóa mạnh có khả năng phá hủy hẳn tế bào vi sinh vật, còn các chất khác như glyxeryl, nồng độ muối, nồng độ đường cao gây áp suất thẩm thấu.

Ứng dụng: trong bảo quản thực phẩm người ta thường bổ sung vào thực phẩm các hóa chất sau:

- Chất hóa học vô cơ: gồm chủ yếu các axit vô cơ và muối của chúng, chất kiềm và các muối kiềm, kim loại, halogen, peroxit và các khí. Các loại axit vô cơ và các muối của chúng thường dùng gồm có: NaCl (muối ăn), hypoclorit, nitrat, nitrit, sunfit và axit sunfuric, axit boric và borat,…
- Các chất hóa học hữu cơ gồm có các axit hữu cơ và các muối của chúng: axit citric, axit lactic, axit axetic, axit benzoic (natri benzoate), axit salixilic và salixilat, axit socbic, các loại đường như glucoza, saccaroza, các loại cồn như cồn etylic, propylenglycol, kháng sinh tố như oreomyxin (clotetraxiclin), teramyxin (oxytetraxyclin), cloromyxetin (cloramphenicol), khói củi và gia vị…

Ví dụ:

- Nitrat, nitrit được dùng để bảo quản thịt, cố định màu đỏ cho thịt trong sản xuất lạp xưởng mà người ta ưa thích, chúng có thể có tác dụng kiềm chế vi khuẩn trong dung dịch axit, đặc biệt đối với vi khuẩn yếm khí.
- Axit benzoic được dùng dưới dạng natri benzoate để bảo quản nước ép quả chua làm ngừng sự lên men. Axit benzoic là chất sát trùng mạnh đối với nấm men và nấm mốc và có tác dụng yếu đối với vi khuẩn.
- Axit sorbic được dùng để kiềm chế nấm trong bánh mì và phomat.
- Dùng khói củi để hun thực phẩm thịt, cá vừa để thêm mùi vị mong muốn vừa để bảo quản hay hỗ trợ bảo quản. Do khói củi chứa một lượng lớn các hợp chất bay hơi có tác dụng ức chế vi khuẩn và diệt khuẩn gồm có formon và các andehyt khác, các axit hữu cơ, cồn,…
- Gia vị không có tác dụng ức chế vi khuẩn ở liều lượng thường dùng trong thực phẩm nhưng có thể hỗ trợ các chất và tác nhân sát trùng khác trong việc ức chế sự phát triển của vi sinh vật trong thực phẩm. Các gia vị thường sử dụng là: húng lìu (gồm 4 loại gia vị là quế chi, đinh hương, hồi hương và thảo quả) để làm lạp xưởng, ngoài ra còn có bột ngọt (natri glutamate), tỏi, hành…

Ngoài ra các yếu tố trên ra thì cấu trúc vật lý của thực phẩm cũng như trạng thái sinh lý của thực phẩm cũng có ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của vi sinh vật gây hư hỏng thực phẩm.

Cấu trúc vật lý của thực phẩm như trạng thái cứng mềm, vỏ dày, mỏng cũng là một yếu tố quan trọng trong việc bảo quản chống lại các vi sinh vật gây hại mà các nhà chế biến bảo quản cần quan tâm.

Ví dụ

- Trái cây có vỏ cứng (táo, sầu riêng, dừa,...) lâu hư do vi sinh vật hơn trái cây có vỏ quả mềm (cà chua, nho, dâu,...)
- Thịt gia súc lâu hư hơn thịt cá do cấu trúc sợi cơ và hàm lượng nước trong cá cao hơn
- Giáp xác có vỏ cứng thịt lâu hư hơn, thịt tôm phần thân lâu hư trừ phần đầu dễ hư do có nội tạng ở đầu và vỏ ở phần đầu lỏng lẻo hơn.
- Cá thân tròn mau ươn hơn cá thân dẹt
- Cá có vảy lâu ươn hơn cá không vảy...

Ảnh hưởng của trạng thái sinh lý của động vật:

Thịt gia súc, thịt cá bị stress trước khi giết mổ mau hư hơn lý do là do lượng glycogen bị tiêu hao nhiều, hàm lượng axit lactic sinh ra ít hơn hiện tượng co cứng cơ kéo dài ngắn hơn, pH axit của thịt, cá không hạ thấp làm cho thực phẩm dễ bị vi sinh vật tấn công.

Gia súc, gia cầm, nhịn đói trước khi bị giết có thịt chất lượng hơn vì thế bảo quản được lâu hơn. Lí do nội tạng không còn thức ăn nên ít vi sinh vật hơn, khi giết mổ hạn chế được một phần vi sinh vật trong nội tạng nhiễm vào cơ thịt (trường hợp bị vỡ ruột).

III.2. Nhóm các yếu tố ngoại sinh

Nhóm các yếu tố bên ngoài nguyên liệu và sản phẩm thực phẩm bao gồm tất cả các yếu tố môi trường không phải nằm trong nguyên liệu và sản phẩm mà là bên ngoài có ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật. Các yếu tố đó bao gồm:

- Nhiệt độ bảo quản thực phẩm
- Độ ẩm môi trường liên quan
- Ánh sáng
- Sự có mặt của các loại khí
- Sự có mặt và sự hoạt động của các vi sinh vật khác

III.2.1. Nhiệt độ môi trường

Mỗi một vi sinh vật có khả năng phát triển trong một khoảng nhiệt độ nhất định. Ngoài khoảng nhiệt độ đó ra vi sinh vật sẽ bị ức chế. Theo mức độ chịu nhiệt của chúng mà người ta có một số khái niệm như sau:

- Nhiệt độ tối ưu: là nhiệt độ ở đó vi sinh vật phát triển thuận lợi nhất
- Nhiệt độ tối thiểu: nhiệt độ thấp nhất mà vi sinh vật vẫn tồn tại và phát triển nhưng rất yếu.
- Nhiệt độ tối đa: là nhiệt độ giới hạn tối đa, nếu quá giới hạn đó thì vi sinh vật sẽ bị tiêu diệt.

Theo quan hệ của vi sinh vật với nhiệt độ người ta phân vi sinh vật ra làm ba nhóm:

- Nhóm ưa nóng (thermophiles) có thể tìm thấy ở bất cứ nơi nào có nhiệt độ cao: suối nước nóng, nước ở cửa biển nơi nhiệt độ có thể lên tới 100^{o}C. Một vài thermophiles quan trọng trong thực phẩm như: *Bacillus*

stearothermophilus, Clostridium thermosaccharoliticum,... là vi khuẩn gây hư hỏng thực phẩm đóng hộp ở nhiệt độ cao.

- Nhóm ưa ấm (Mesophiles) Đại diện là vi khuẩn, nấm men và nấm mốc. Hầu hết vi sinh vật gây bệnh và ngộ độc thực phẩm là mesophile. Ví dụ: *Samonella, Staphylococcus, Clostridium*,...
- Nhóm ưa lạnh (Psychrophiles). Trong nhóm ưa lạnh lại được chia thành hai nhóm nhỏ là nhóm ưa lạnh bắt buộc (obligate psychrophiles) và nhóm ưa lạnh không bắt buộc (facultative psychrophiles).
    - Nhóm ưa lạnh bắt buộc có mặt ở vùng Bắc và Nam cực và những vùng đất quanh năm lạnh giá.
    - Nhóm ưa lạnh không bắt buộc (tùy ý) có khả năng phát triển ở nhiệt độ thấp và nhiệt độ tương đối cao. Nhiệt độ thấp nhất mà vi khuẩn có thể phát triển bình thường là -12^{o}C, tối ưu là 25 -30^{o}C, tối đa là 30 - 42^{o}C. Chúng gồm một số vi khuẩn, nấm men và nấm mốc. Đây là nhóm gây hư hỏng thực phẩm đóng hộp ở nhiệt độ đông lạnh, hoặc thực phẩm trong tủ lạnh (từ -1 – 5 hoặc 7^{o}C). Ví dụ: *Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum E...*

Bảng VI.3. phân loại vi sinh vật theo ảnh hưởng của nhiệt độ

Stt	Nhóm vi sinh vật	$T_{tối\ thiểu}$ ^{o}C	$T_{tối\ thích}$ ^{o}C	$T_{tối\ đa}$ ^{o}C
1	Ưa nóng	40 – 45	55 - 85	>100
2	Ưa ấm	5 -15	30 – 40	40 – 47
3	Ưa lạnh			
3.1	Ưa lạnh bắt buộc	-5 – 5	12 -15	15-20
3.2	Ưa lạnh không bắt buộc	-5 – 5	25 – 30	30 -35

Nhiệt độ thường gây cho vi sinh vật những chiều hướng sau:

- Đối với nhiệt độ thấp thường không gây chết vi sinh vật ngay mà nó tác động lên khả năng chuyển hóa các hợp chất, làm ức chế hoạt động của enzyme làm thay đổi khả năng trao đổi chất của chúng, vì thế làm cho vi sinh vật mất khả năng phát triển và sinh sản. Nhiều trường hợp vi sinh vật sẽ chết. Khả năng gây chết của chúng hết sức từ từ chứ không đột ngột như nhiệt độ cao. Dựa vào đặc tính này người ta tiến hành cất giữ thực phẩm ở nhiệt độ thấp như làm lạnh, ướp lạnh, ướp đông.
- Đối với nhiệt độ cao: thường gây chết vi sinh vật một cách nhanh chóng. Đa số vi sinh vật chết ở nhiệt độ 60 – 80^{o}C. Một số chết ở nhiệt độ cao hơn. Đặc biệt bào tử của vi sinh vật có thể tồn tại ở nhiệt độ lớn hơn 100^{o}C. Nhiệt độ cao thường gây biến tính protit, làm hệ enzyme lập tức không hoạt động được, vi sinh vật dễ dàng bị tiêu diệt. Lợi dụng đặc điểm này người ta tiến hành các phương pháp sấy khô thực phẩm, phương pháp thanh trùng như thanh trùng Pasteur, tiệt trùng Tyndal, đun sôi, khử trùng đồ hộp ở nhiệt độ cao áp suất cao…

III.2.2. Ảnh hưởng của độ ẩm không khí

Độ ẩm không khí có ảnh hưởng đến hoạt độ của nước a_w trong thực phẩm theo định luật Raoult. Vì vậy độ ẩm không khí có ảnh hưởng đến sự phát triển của các hệ vi sinh vật trên thực phẩm.

$$a_w \times 100 = EHR\%$$

Hơi nước trong không khí và nước hoạt động trong thực phẩm có khuynh hướng di chuyển qua lại để đạt đến sự cân bằng trên.

Ví dụ: Thịt tươi có $a_w = 0,99$ để trong môi trường có không khí khô hanh có EHR= 80%, bề mặt thịt khô hạn sẽ hạn chế sự phát triển của vi khuẩn, nhưng tạo điều kiện tốt cho nấm mốc phát triển. Đường được sấy khô có $a_w < 0,6$ nhưng để trong điều kiện không khí bão hòa hơi nước có EHR= 90%, đường sẽ hút nước trong không khí và bị chảy, tạo điều kiện cho nấm men phát triển. Tương tự, ngũ cốc được sấy khô nhưng bảo quản trong điều kiện kho chứa ẩm ướt thì dễ phát sinh nấm mốc.

Lợi dụng đặc điểm này người ta tiến hành những phương pháp sấy khô, phơi khô để làm giảm độ ẩm nguyên liệu, độ ẩm không khí để hạn chế sự phát triển của vi sinh vật hay để những vật liệu cần bảo quản ở điều kiện khô ráo cho vi sinh vật ít phá hoại.

III.2.3. Ảnh hưởng của ánh sáng

Ánh sáng mặt trời có tác dụng trực tiếp đối với đại đa số vi sinh vật (trừ vi sinh vật quang tổng hợp phát triển tốt ngoài ánh sáng). Ánh sáng trực tiếp tiêu diệt vi sinh vật sau vài phút hay vài giờ. Ánh sáng khuếch tán ức chế một số vi sinh vật, nó chỉ gây chết khi tác dụng kéo dài. Các loài vi sinh vật khác nhau chịu tác dụng của ánh sáng khác nhau. Vi khuẩn gây bệnh nhạy cảm với ánh sáng: trực khuẩn lao chết sau 20 – 30 phút ngoài ánh sáng.

Phần có tác dụng mạnh với vi sinh vật là tia tử ngoại. Tất cả các tia tử ngoại có bước sóng 2000 – 3000 A^o đều có tác dụng sát trùng, nhưng có hiệu quả nhất là bước sóng 2650 – 2660 A^o. Tia tử ngoại có tác dụng làm phân hủy một số chất hữu cơ trong tế bào, làm đông tụ protit, làm mất hoạt tính enzyme phá hủy tế bào vi sinh vật. Tuy nhiên với một lượng nào đó tia này có thể tác dụng lên bộ gen làm ảnh hưởng đến tính di truyền và gây biến đổi.

Bào tử của vi khuẩn, nấm cũng bị tiêu diệt bởi tia tử ngoại nhưng sức chịu đựng của bào tử cao hơn. Muốn tiêu diệt bào tử phải tăng liều lượng lên gấp 4 – 5 lần so với thể sinh dưỡng.

Tia hồng ngoại ít có tác dụng với vi sinh vật, chỉ làm tăng nhiệt độ môi trường và thường dùng để sấy khô sản phẩm.

Từ lâu nhân dân đã biết dùng ánh sáng mặt trời để khử trùng thực phẩm, đồ dùng bằng cách đem phơi ngoài nắng và mở cửa cho ánh sáng lọt vào nhà. Ngày nay người ta thường sử dụng đèn tử ngoại để khử trùng không khí, thanh trùng thực phẩm, nước uống, bao bì, thiết bị,…Ngoài ra, vi sóng cũng được dùng để thanh trùng thực phẩm trong công nghệ đồ hộp các loại thực phẩm hoa quả (vi sóng có thể đi qua thủy tinh nhưng không thể đi qua kim loại).

III.2.4. Ảnh hưởng của siêu âm

Siêu âm được tạo thành do những dao động có tần số cao trên 200000 dao động/giây (héc), siêu âm tác dụng mạnh lên tế bào vi sinh vật. Nhiều vi sinh vật bị chết chỉ sau khi bị tác dụng của siêu âm trong 1 phút. Siêu âm gây nên những chấn động trong dung dịch làm vi sinh vật bị ép và va chạm mạnh có thể làm vỡ vỏ tế bào đồng thời tạo nên trong môi trường những chất độc đối với vi sinh vật như H_2O_2, nitơ oxit. Siêu âm còn tạo nên những bọt khí hòa tan trong nguyên sinh chất và môi trường làm ảnh hưởng lớn đến hoạt động của vi sinh vật.

Hiện nay người ta đã ứng dụng ảnh hưởng này của siêu âm trong thanh trùng nước uống, rượu, nước giải khát…

III.2.5. Thành phần khí quyển

Thực phẩm được bảo quản trong môi trường chân không sẽ ức chế sự phát triển của nấm mốc và các vi sinh vật hiếu khí bắt buộc. Đã có nhiều nghiên cứu về việc kết hợp giữa tồn trữ lạnh rau quả với việc điều chỉnh không khí trong phòng tồn trữ. Sự kiểm soát này bao gồm sự điều chỉnh đơn thuần nồng độ oxy, và khí trong không khí hoặc có thể bao gồm sự bổ sung hoặc bớt lại khí CO_2 hay O_2 hoặc bổ sung thêm ozone.

Kiểm soát khí (CA: control atmosphere) biểu hiện sự thay đổi của nhiều loại khí khác với nồng độ không khí bình thường. Thông thường điều này được thực hiện bằng cách tăng nồng độ CO_2 hay giảm nồng độ O_2.

Một thuật ngữ liên hệ đến sự thay đổi thành phần khí trong không khí (MA: modify atmosphere). Phương pháp MAP (modify atmosphere packing) là phương pháp đóng gói thực phẩm trong bao PE có chứa thành phần hỗn hợp các khí (CO_2+ N_2+O_2) hạn chế sự phát triển của vi sinh vật hiếu khí, nấm mốc.

III.2.5. Ảnh hưởng qua lại của hệ vi sinh vật hiện diện trong thực phẩm

Thực phẩm tươi thường bị nhiễm một hỗn hợp các vi sinh vật bao gồm cả vi sinh vật tự nhiên có nguồn gốc động vật hay thực vật và kể cả sự lây nhiễm từ môi trường. Trong khi phát triển ở thực phẩm, các loài vi sinh vật không chỉ tác động với nhau theo kiểu cộng sinh mà còn theo kiểu cạnh tranh, hiện tượng này luôn xảy ra, đan chéo vào nhau tạo ra một bức tranh sinh thái phong phú và còn được gọi là hiện tượng giao thoa vi sinh vật.

Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm:

- Vi khuẩn lactic sản sinh ra acid lactic trong sữa ngăn chặn sự phát triển của các vi khuẩn gây hư hỏng sữa và gây bệnh
- Nấm men hiện diện trong hạt Kefir sẽ cung cấp vitamin B kích thích sự tăng trưởng của vi khuẩn lactic
- Vi sinh vật có thể cho thấy sự tương tác hỗ trợ khi có sự kích thích phát triển qua lại và hiệu quả của hoạt động chung của 2 vi sinh vật được tăng cường. Điều này xảy ra trong việc lên men yoghourt trong đó sự tương tác giữa *Streptococcus salivarius spp thermophilus* và *Lactobacillus delbreukii spp bulgaricus*.

III.3. Tác động qua lại của các yếu tố trong thực phẩm:

Trong thực phẩm các yếu tố không tác động độc lập lên vi sinh vật. Chúng luôn luôn tương tác lẫn nhau. Điều này làm tăng hiệu quả ức chế vi sinh vật của các yếu tố giới hạn (tối thiểu và tối đa). Các nhân tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của vi sinh vật như độ ẩm, nhiệt độ, pH, thế oxy hóa khử,...có tác động hỗ trợ nhau.

Ví dụ 1: dòng vi khuẩn *Clostridium botolinum* phân giải protein, có thể phát triển trong môi trường có chứa NaCl lên tới 10%, trong điều kiện thực phẩm có pH tối ưu là 7,2 và nhiệt độ tối ưu là 35^{o}C. Nếu giảm pH xuống còn 5,2 thì nồng độ NaCl tối đa chỉ còn 5%.

Ví dụ 2: hoạt độ nước tối thiểu của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là 0,86 trong điều kiện hiếu khí, nhưng trong điều kiện kỵ khí là 0,90.

Mỗi một tham số của yếu tố thực phẩm thay đổi xa giá trị tối ưu sẽ trở thành một rào cản làm chậm sự phát triển của vi sinh vật và gia tăng thời gian bảo quản thực phẩm. Vì vậy sự kết hợp của các rào cản sẽ thật sự ngăn chặn tốc độ phát triển của vi sinh vật và kéo dài thời gian bảo quản của thực phẩm hơn nhưng không làm thay đổi nhiều các tính chất hóa lý khi phải xử lý nhiệt hay ướp muối với nồng độ quá cao.

Khái niệm rào cản là rất quan trọng đối với hệ thống bảo quản được sử dụng trong thực phẩm, sự tác động qua lại của các tham số tăng trưởng sẽ có liên quan đến sự chậm đi hoặc ngăn ngừa sự hư hỏng và sự phát triển của vi sinh vật gây ngộ độc thực phẩm. Hệ thống bảo quản có sử dụng chất hóa học thì sự ảnh hưởng qua lại sẽ liên quan đến: chất bảo quản, pH, a_w, nhiệt độ. Để xác định liệu một loài vi sinh vật có đặc biệt phát triển hay không. Chất bảo quản sẽ trở thành 1 rào cản được tăng cường đối với sự phát triển của bất cứ sinh vật nào hiện diện trong thực phẩm.

Tài liệu tham khảo:

1. Lương Đức Phẩm – Vi sinh vật học và vệ sinh an toàn thực phẩm – NXB Nông nghiệp Hà Nội.
2. M. R. ADAMS , M. O. MOSS - Microbiology of food

Câu hỏi ôn tập chương III:

1. Thế nào là các nhân tố nội sinh, ngoại sinh?
2. Ảnh hưởng của các nhân tố nội sinh lên vi sinh vật? ứng dụng của chúng trong chế biến và bảo quản thực phẩm?
3. Ảnh hưởng của các nhân tố nội sinh lên vi sinh vật? ứng dụng của chúng trong chế biến và bảo quản thực phẩm?
4. Rào cản là gì? Tác dộng qua lại của các yếu tố trong thực phẩm và ứng dụng của chúng trong chế biến và bảo quản thực phẩm?

Chương IV: HỆ VI SINH VẬT THỰC PHẨM TRÊN MỘT SỐ THỰC PHẨM QUAN TRỌNG VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN (15t)

Thực phẩm nhất là những sản phẩm tươi sống như thịt, cá, sữa, rau quả,.. chứa nhiều nước, là môi trường rất tốt cho vi sinh vật sinh sống và phát triển. Những vi sinh vật có ở thực phẩm gây thiệt hại lớn về giá trị dinh dưỡng, chất lượng của sản phẩm có thể làm thức ăn hoặc nguyên liệu cho sản xuất công nghiệp đồ ăn thức uống. Ngoài ra, trong đó còn có những vi sinh vật có thể gây bệnh cho người.

IV.1. VI SINH VẬT CỦA THỊT

IV.1.1. Đặc điểm của thịt

Hàm lượng nước từ 50 ÷ 70%, độ ẩm cao rất thích hợp cho vi sinh vật phát triển. Hàm lượng dinh dưỡng: độ pH từ 5,8 ÷ 6,2 gần như trung tính. Trong thành phần có đầy đủ các chất như: protein, lipid, các loại axit amin không thay thế, nhiều khoáng chất, vi lượng rất cần thiết do đó tất cả các loại vi sinh vật đều sinh trưởng và phát triển mạnh mẽ trên thịt, vì vậy cần có phương pháp bảo quản và chế biến thịt cho thích hợp.

Bảng1: thành phần các chất dinh dưỡng của thịt

Chất dinh dưỡng	Thịt bò	Thịt heo nạc
Nước(%)	70,5	60,9
Protein(%)	18	16,5
Lipid(%)	10,5	21,5
Canxi(mg/100g)	10	9
Photpho(mg/100g)	191	178
Sắt(mg/100g)	2,7	2,5
VitaminA(mg/100g)	0,01	0,01
VitaminB_1(mg/100g)	0,17	0,93
VitaminB_2(mg/100g)	0,17	0,16
VitaminPP(mg/100g)	4,22	2,7
VitaminC(mg/100g)	1	2

Theo thành phần hoá học của thịt ta thấy thịt không những là thức ăn tốt cho con người mà còn là môi trường thuận lợi cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển. Trong nghiên cứu vi sinh vật người ta thường lấy nước cao thịt bò bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn và một số vi sinh vật khác.

IV.1. 2. Hệ vi sinh vật của thịt

a. Nguồn lây nhiễm

Sản phẩm thịt tươi lấy từ mô khoẻ được coi là vô trùng và sự lây nhiễm vi sinh vật có hai nguồn chính:

- Do bản thân vật: do vật bị ốm, bị bệnh… vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật kí sinh phát triển trên vật đó nên khi mổ xẻ thì lây sang mô thịt. Thức ăn mà

các gia súc ăn trước khi giết mổ cũng là nguồn lây nhiễm vi sinh vật từ bên trong cho thịt.

- Do môi trường bên ngoài: trong quá trình giết mổ, pha chế, vận chuyển, chế biến. Da và lông có lượng vi sinh vật lớn, ngoài ra có hệ vi sinh vật đường ruột (10^6-10^8 tb/kg), khi giết mổ thì vi sinh vật lây nhiễm vào cơ thịt. Trong quá trình vận chuyển vi sinh vật trong đất, không khí, nước, dụng cụ, áo quần công nhân lây nhiễm sang thịt. Trong quá trình sơ chế, chế biến nếu thanh trùng không kỹ thì dạng bào tử vi sinh vật vẫn còn trong sản phẩm thịt, nếu môi trường tốt và có đủ điều kiện bào tử sẽ phát triển thành sợi dinh dưỡng vì vậy thịt cũng bị lây nhiễm. Hay do nguyên liệu ban đầu đã bị nhiễm vi sinh vật.

b. Hệ vi sinh vật của thịt

Vi sinh vật gây hư hỏng thịt gồm: nhiều loại vi khuẩn gây thối rữa, bào tử nấm mốc, tế bào nấm men và nhiều vi sinh vật gây bệnh cho người và gia súc như: *Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Clostridium sporogenes*… Trong đó nguy hiểm nhất là *Clostridium botulinum* gây ngộ độc, đây là loài vi khuẩn kỵ khí, có hoạt tính phân huỷ protein cao và trong quá trình sống của nó tạo ra chất độc rất nguy hiểm là botulin, thường được gọi là chất độc thịt.

Hệ vi sinh vật gây bệnh truyền qua thịt: vi sinh vật gây bệnh, vi sinh vật từ da, lông, ruột động vật. Có một số loài nguy hiểm từ hệ vi sinh vật đường ruột như: *Coliform, Ecoli, Salmonella*…

IV.1. 3. Sự hư hỏng thịt

a. Tốc độ xâm nhiễm của vi sinh vật vào thịt

Bình thường vi sinh vật ở bề mặt bên ngoài nhưng nếu số lượng lớn phát triển nhanh chóng thì vi sinh vật sẽ xâm nhiễm vào bên trong mô thịt qua mạch máu, ống xương, tốc độ ăn sâu phụ thuộc vào các điều kiện môi trường. Nhiệt độ, độ ẩm không khí khi bảo quản là điều kiện cho vi sinh vật phát triển. Sau khi giết mổ tảng thịt được đem đi bảo quản, về mặt lí hoá của thịt ổn định. Lúc này nếu nhiệt độ, độ ẩm không khí thích hợp vi sinh vật sẽ phát triển nhanh và ảnh hưởng trực tiếp đến tốc đô xâm nhiễm. Ví dụ ở điều kiện bình thường sau 12 giờ vi sinh vật sẽ xâm nhiễm vào thịt sâu 3cm, còn ở 0^oC sau 3 ngày chỉ xâm nhiễm sâu 1cm.

b. Các dạng hư hỏng thịt

Thịt bị hoá nhầy: Hiện tượng hoá nhầy chỉ xảy ra trên bề mặt thịt khi ta ướp lạnh ở độ ẩm cao hơn 90%. Thực chất đây là giai đoạn đầu của sự hư hỏng thịt, trên bề mặt thịt hình thành một lớp dày đặc gồm nhiều loài vi sinh vật. Các vi sinh vật gây ra sự hoá nhầy gồm: *Lactobacillus, Proteus, Pseudomonas, Achromobacter*, nấm men. Tốc độ hoá nhầy phụ thuộc vào độ ẩm của thịt và nhiệt độ bảo quản. *Ví dụ*: ở nhiệt độ 0^oC, ẩm độ 100% thì sau 20 ngày thịt bị hoá nhầy, ở nhiệt độ 0^oC, ẩm độ 85% thì sau 2 tháng thịt sẽ hoá nhầy. Sau khi bị hoá nhầy thịt bị bốc hơi nước mạnh, khối lượng hao hụt lớn, chất dinh dưỡng và chất lượng thịt giảm xuống. Vì vậy cần bảo quản thịt ở nhiệt độ tối ưu là 0-2^oC và độ ẩm tương đối từ 85-90%. Ở điều kiện này, thịt không có các dấu hiệu hư hỏng trong 3 tuần lễ.

Thịt bị chua: Do sự chọc tiết gia súc không kỹ hay do bảo quản thịt lâu mà không làm lạnh nên vi khuẩn lactic hoạt đông mạnh tạo ra các axit: butyric, axetic, formic gây chua làm cho thịt mất chất dinh dưỡng, thịt có màu xám và có mùi khó chịu, đây là thời kỳ trước của quá trình thối rữa. Khi thịt bị chua nấm mốc sẽ phát triển mạnh và làm tăng độ pH tạo điều kiện cho các vi sinh vật gây thối phát triển.

Thịt bị biến màu: do các loại vi khuẩn sinh sắc tố phát triển trên bề mặt làm cho thịt thay đổi màu. Ví dụ: vi khuẩn *Bacterium prodigiosun* tạo thành màu đỏ, *Micrococcus* tạo thành màu vàng, *Pseudomonas pyocyanes* tạo thành vết xanh… Do các loại vi khuẩn này chỉ phát triển trên bề mặt nên tẩy rửa dễ dàng.

Thịt bị phát quang: do có các vi khuẩn *Photobacterium* phát triển trên bề mặt thịt gây ra. Đặc biệt khi bảo quản thịt chung với cá. Trong thịt thối rữa không phát quang.

Thịt bị mốc: Do sự phát triển của các loài nấm mốc trên bề mặt của thịt, những bào tử nhờ chất dinh dưỡng phát triển thành sợi nấm tạo thành những vết đốm sau đó lan ra khắp bề mặt thịt. Làm cho thịt giảm các chất hòa tan, tăng tính kiềm do phân hủy protein và lipid tạo thành các axit bay hơi. Các loại nấm mốc thường phát triển trên bề mặt thịt gồm: *Mucor, Penicillium, Aspergillus*… Để tránh hiện tượng này thì ta phải rửa sạch thịt và đem vào bảo quản lạnh, không được tăng thêm độ ẩm. Nếu tăng thêm độ ẩm hoặc thay đổi độ ẩm sẽ tạo ra hơi nước trên bề mặt thịt, thuận lợi cho nấm mốc phát triển.

Sự thối rữa thịt: do enzyme protease ngoại bào của vi sinh vật thuỷ phân chất dinh dưỡng thành phân tử thấp dần có mùi hôi thối như NH_3, indol, scatol, mercaptan. Thịt của những con vật bị bệnh hay mệt yếu thường dễ bị thối rữa. Trong thịt nếu chứa nhiều glycogen thì quá trình lên men lactic dễ xảy ra và tạo môi trường axit sẽ ức chế các loại vi sinh vật gây thối phát triển. Vi sinh vật gây hư hỏng gồm: vi sinh vật hô hấp yếm khí và vi sinh vật hô hấp hiếu khí. Vi sinh vật hô hấp hiếu khí gồm: *Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Bacillus megatherium, Proteus vulgaris*... Vi sinh vật hô hấp kỵ khí như: *Clostridium perfingens, Clostridium putrificum*… Đầu tiên các cầu khuẩn hô hấp hiếu khí gây hư hỏng bên ngoài, sâu hơn bên trong có các trực khuẩn hiếu khí. Quá trình thối rữa càng sâu sắc thì có các trực khuẩn yếm khí. Vi sinh vật trong thịt phát triển mạnh mẽ làm cho chất lượng thịt thay đổi. Nhìn cảm quan ta thấy chất lượng thịt không còn tươi ngon, thịt có màu xám, màu xanh xám hay màu đặc trưng do các vi sinh vật có sắc tố như: vàng, đỏ tía… Thịt bị mất tính đàn hồi và mềm nhũn. Về mặt dinh dưỡng: lipid, protein bị thuỷ phân tạo thành các chất khí có mùi khó chịu và sinh nhiều độc tố. Độ pH thay đổi ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật, pH từ axit yếu đến trung tính sau đó đến kiềm do sự thuỷ phân tạo thành NH_3 làm cho pH tăng kích thích vi sinh vật phát triển mạnh làm cho thịt bị thối rửa. Quá trình thối rữa chỉ xảy ra khi nhiệt độ từ 5^oC trở lên và dưới 5^oC vi sinh vật gây thối rữa ngừng hoạt động hay bị chết đi. Ở nhiệt độ bình thường từ $25\text{-}30^0C$ vi sinh vật phát triển mạnh do đó thịt dễ bị thối rữa.

IV.1. 4. Các phương pháp bảo quản thịt

a. Bảo quản ở nhiệt độ thấp

Bảo quản lạnh: sử dụng nhiệt độ thấp để ức chế, hạn chế vi sinh vật gây hại phát triển và thịt vẫn giữ nguyên trạng thái, tính chất ban đầu. Ví dụ ở nhiệt độ $0 \div 2^oC$, ẩm độ 85÷90% bảo quản thịt bò được 20 ngày và thịt lợn được 50 ngày. Tuy nhiên có những loại vi khuẩn ưa lạnh còn sống sót sẽ gây hư hỏng thịt như: *Pseudomonas, Lactobacillus, Micrococcus*.

Bảo quản đông lạnh: bảo quản thịt ở nhiệt độ từ $-20 \div -18^0C$, bảo quản bằng phương pháp này thì thời gian bảo quản lâu và có thể kiềm hãm gần hết vi sinh vật gây hại, vi sinh vật ưa lạnh cũng giảm đáng kể. Chỉ còn dạng bào tử của vi khuẩn chịu lạnh. Thời gian bảo quản lâu nhưng hạn chế là làm thay đổi chất lượng thịt. Khi sử dụng cần phải phá đá nên làm thành tế bào bị vỡ ra và chất dinh dưỡng sẽ theo nước ra ngoài. Đặc biệt là không bảo quản đông lạnh hai lần, nếu bảo quản lần hai thì bào tử vi sinh vật chịu lạnh đã thích ứng và phát triển thành vi sinh vật sẽ gây hư hỏng thịt.

b. Muối thịt

Dùng muối có nồng độ cao để hạn chế sự phát triển của vi sinh vật gây hư hỏng. Nồng độ muối cao làm cho nước từ trong tế bào vi sinh vật ra ngoài (do sự chênh lệch nồng độ) dẫn đến hiện tượng co nguyên sinh, vi sinh vật mất nước và chết. Tuy nhiên nấm mốc và vi khuẩn gây bệnh cũng không chết. Khi muối thịt phải bổ sung thên $NaNO_3$, đường saccaro làm cho sản phẩm thịt có màu tươi và mềm. Ngoài ra việc bổ sung thêm đường sẽ làm cho vi khuẩn lactic phát triển tạo thành một lượng axit lactic nhỏ làm độ pH giảm nên sẽ ức chế vi khuẩn gây thối rữa phát triển.

c. Sấy khô

Sấy khô: Làm giảm độ ẩm của sản phẩm thịt bằng nhiệt độ sẽ hạn chế sự phát triển của vi sinh vật hay làm chết vi sinh vật. Một số vi sinh vật sẽ chuyển sang dạng bào tử. Nếu để sản phẩm thịt hút nước thì bào tử sẽ phát triển thành vi sinh vật và gây hư hỏng thịt. Vì vậy để bảo quản tốt thịt cần kết hợp giữa sấy khô và muối sơ bộ.

Xông khói: Làm cho một phần nước mất đi, ngoài ra trong khói có chất sát khuẩn là andehit formic nên thời gian bảo quản lâu hơn. Nên xông khói những sản phẩm thịt có kích thước 1÷2cm để bảo quản lâu hơn. Ta nên kết hợp muối sơ bộ và xông khói.

d. Đóng hộp

Nhiệt độ cao làm cho 90% vi sinh vật chết đi, bào tử cũng bị chết. Thường sử dụng nhiệt độ cao để khử trùng vi sinh vật từ $115 \div 121^oC$ trong khoảng thời gian từ 45 đến 60 phút. Sau đó kiểm tra bằng cách giữ ở 37^oC trong vòng 7 ngày nếu hộp nào bị phồng lên thì ta loại ra. Một trong những loài vi sinh vật chịu nhiệt độ cao: *Clostridium botulinum, Bacillus subtilis*…

IV..2. HỆ VI SINH VẬT CÁ

V.2. 1. Đặc điểm của cá

Thành phần hoá học của cá gần giống thịt: hàm lượng nước từ 65÷85%, nhiều chất dinh dưỡng như lipid: 0,1÷33%, protein: 12÷23%, vitamin... Cá thường được bảo quản nguyên con, do có lớp nhớt nên chứa nhiều vi sinh vật sẽ gây hư hỏng khi bảo quản. Ngoài ra cá còn có hệ vi sinh vật đường ruột, khi vi sinh vật đường ruột phát triển mạnh sẽ thuỷ phân màng ruột, sau đó chúng theo ống xương đến những lớp thịt. Vi sinh vật ở mang cá rất nhiều, mang cá có nhiều mạch máu nên vi sinh vật xâm nhiễm đến thịt dễ dàng. Mặt khác khi đánh bắt cá không biết con nào mắc bệnh, khi bảo quản cả khối cá thì vi sinh vật nhiễm từ những con bị bệnh sang những con khác làm cho cả khối cá bị hư hỏng. Cá có nhiều protein đơn giản hơn thịt nên cá dễ bị thối rữa hơn thịt.

IV.2. 2. Hệ vi sinh vật của cá

Hệ vi sinh vật trên bề mặt cá từ $10^3 \div 10^6$ tế bào trên $1cm^2$. Hệ vi sinh vật ở cá thường phụ thuộc vào loài cá, thành phần lớp nhầy trên da cá và phụ thuộc vào các điều kiện khác như thời gian đánh bắt cá. Những loài cá sống ở tầng đáy, lớp bùn có nhiều vi sinh vật nên hệ vi sinh vật đa dạng hơn cá sống ở tầng mặt. Cá sống ở nước mặn ít vi sinh vật hơn cá sống ở nước ngọt. Lượng vi sinh vật trên bề mặt cá cũng phụ thuộc vào lượng vi sinh vật trong nước. Khi trời mưa vi sinh vật trong đất theo nước xuống ao hồ làm cho lượng vi sinh vật trên cá cũng tăng cao.

Hệ vi sinh vật trên cá rất phong phú và đa dạng gồm: vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc… Tuy nhiên vi khuẩn là chủ yếu: *Micrcoccus cereus, Micrcoccus flavus, Pseudomonas fluorescen, Proteus vulgaris*… và phụ thuộc vào môi trường.

Trong mang cá có nhiều mạch máu, O_2, pH trung tính nên ở mang cá chủ yếu là vi sinh vật hô hấp hiếu khí, thích hợp pH trung tính nhiều nhất là *Pseudomonas fluorescen.*

Trong ruột cá có nhiều vi sinh vật trực khuẩn đường ruột hô hấp kỵ khí như: *Clostridium sporogenes, Clostridium putrificum, Salmonella, Ecoli…*

Sự thối rữa cá

Cá tươi sẽ không bảo quản được lâu nếu không xử lý sơ bộ như móc mang cá, ruột cá vì đây là những bộ phận chứa nhiều vi sinh vật có thể làm hư hỏng cá. Cũng như tất cả sinh vật khác, tế bào cá cũng có khả năng miễn dịch tự nhiên ức chế đối với các vi sinh vật khi còn sống. Khi bị chết khả năng này mất đi. Khi cá chết các vi sinh vật trong mang, ruột và trên da cá phát triển mạnh và xâm nhập vào các mô làm cho cá bị ươn, sau đó protein bị thuỷ phân làm cho cá bị thối rữa, cá bắt đầu bị thối rữa khi tế số lượng vi sinh vật lên tới $10^7 \div 10^8$ tế bào/ 1g.

Sự ươn cá không những chỉ có quá trình vi sinh mà còn có cả quá trình sinh hoá do sự hoạt động của các enzyme, quá trình sinh hoá gọi là hiện tượng tự phân. Trước hết sự thối rữa bắt đầu từ ngoài rồi xâm nhập vào bên trong. Protein bị phân huỷ tạo thành các hợp chất có chứa nitơ làm cho thịt cá có tính kiềm sẽ tạo điều kiện cho các vi sinh vật hoại sinh phát triển. Thịt cá thay đổi màu sắc, có mùi khó ngửi do sự phân huỷ protein tao thành ammoniac, sulfuahydro, indol,

cadaverin…Quá trình thối rữa cá rất phức tạp và phụ thuộc vào các điều kiện ngoại cảnh và thành phần vi sinh vật có mặt.

Các vi khuẩn thường thấy là: *Bacillus mycoides, Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Chromobacterium progodiosum, Proteus vulgaris, Clostridium putrificus, Clostridium sporogenes*. Các nấm mốc có khả năng phân huỷ thịt cá là: *Aspergillus, Penicilium, Mucor*...Đặc biệt nguy hiểm là loài vi khuẩn *Clostridium botulinum* trong quá trình phân huỷ protein thành chất độc botulin.

Vi sinh vật gây bệnh cá

Các vi sinh vật trong đất, xác động vật nhiễm vào nước là nguyên nhân gây nên các bệnh cho cá. Khi gặp điều kiện thuận lợi những vi sinh vật này phát triển mạnh và chúng xâm nhập và cơ thể cá qua đường da, miệng, mang, ruột. Bình thường cá có sức đề kháng nhưng khi gặp điều kiện thuận lợi chúng xâm nhập vào các tổ chức hay tế bào thịt cá gây nên một số bệnh cho cá. Ví dụ như: bệnh đinh nhọt ở cá hồi do *Bacterium salmonicida*, bệnh lao do *Mycobacterium piseium*…

Ngoài ra cá còn một số bệnh do virus, nấm, *Branchiomyces sangui*nis gây thối mang, một số nấm mọc thành sợi trên da cá. Thỉnh thoảng cá truyền bệnh cho nhau bằng các vật ký sinh trên da hoặc mang.

Những vi khuẩn gây bệnh phát triển trên cá tương đối nhiều và đa dạng, khi số lượng nhiều chúng tạo ra độc tố, khi con người ăn phải những con cá này có thể sẽ bị ngộ độc.

IV.2. 3. Các phương pháp bảo quản và hệ vi sinh vật một số sản phẩm từ cá

a. Cá ướp lạnh

Bảo quản lạnh thường từ -1.6 ÷ -1.2^{o}C đối với cá nước ngọt và -2^{o}C đối với cá nước mặn. Thành phần và số lượng vi sinh vật của cá bảo quản lạnh không khác gì cá tươi. Thời gian bảo quản phụ thuộc vào mật độ vi sinh vật ban đầu. Mặt khác nếu người ta dùng kết hợp hoá chất với phương pháp bảo quản lạnh thì thời gian sẽ bảo quản lâu hơn. Hoá chất thông dụng thường dùng là: tetraxilin1-2ppm, $NaNO_2$ 0.15%, khí CO_2 hoặc SO_2 dạng tuyết từ 20-70% so với cá.

Bảo quản ở nhiệt độ thấp được dùng rộng rãi để giữ chất lượng ban đầu của cá. Những vi sinh vật nhiễm vào cá gồm các nhóm ưa lạnh, ưa ấm và ưa nhiệt. Một trong số chúng chịu được nhiệt độ lạnh và phát triển ở nhiệt độ 0^{o}C hoặc thấp hơn, tuy rằng sự phát triển có hơi chậm và các vi sinh vật không bị chết hoàn toàn ở nhiệt độ đông lạnh.

Ướp lạnh cá chủ yếu làm ức chế các quá trình hoạt động của enzyme và các vi sinh vật gây thối. Trong khi ướp thân nhiệt của cá chưa đến điểm đóng băng của dịch tế bào cá. Đây cũng là điểm khác nhau cơ bản giữa phương pháp ướp lạnh và phương pháp đông lạnh. Ướp lạnh không làm ngừng quá trình phân huỷ cá mà chỉ làm quá trình này chậm lại.

Hệ vi sinh vật của cá ướp lạnh về nguyên tắc không khác gì so với cá tươi. Nhưng trong cá ướp lạnh nhóm vi sinh vật ưa lạnh ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng và thời gian bảo quản cá.

Trong bảo quản lạnh cá thường gặp các loài vi khuẩn hiếu khí ưa lạnh như *Pseudomonas fluorescens, Bacterium putrifaciens*… và một số loài nấm mốc như *Mucor, Aspergillus, Penicilium*…

b. Cá đông lạnh

Bảo quản đông lạnh từ -18÷-12^{o}C tuỳ thuộc vào kích thước cá. Độ tươi phụ thuộc vào số lượng vi sinh vật có trên cá và thời gian bảo quản, sau 2 đến 3 tháng thì cá bắt đầu thay đổi chất lượng do quá trình oxi hoá tự nhiên của mỡ và quá trình tự phân huỷ của protein cá.

Cá bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ rất thấp nên hầu hết các vi sinh vật đều bị ức chế.

Cá trước khi bảo quản đông lạnh được rửa bằng nước sạch có pha chất sát khuẩn. Cá càng tươi và làm đông lạnh càng sớm thì chất lượng cá sẽ ít thay đổi. Đông lạnh là phương pháp giữ giá trị dinh dưỡng và hương vị ban đầu của cá tốt nhất. Ngày nay trong quá trình đánh bắt người ta bảo quản cá trong buồng đông lạnh của tàu nên chất lượng cá rất tươi ngon.

Cần chú ý là ở nhiệt độ đông lạnh hầu hết các vi sinh vật không chết mà chỉ bị ức chế, về thành phần hệ vi sinh vật của cá coi như không đổi. Trên bề mặt da cá biển đông lạnh thấy có nhiều loại trực khuẩn, cầu khuẩn, nấm mốc…

Trong khi bảo quản nếu nhiệt độ tăng lên trên 0^{o}C sẽ làm tan băng, các tổ chức của cá sẽ bị vỡ ra làm mất dịch tế bào, giảm chất lượng dinh dưỡng, khi đó vi sinh vật sẽ phát triển mạnh. Vì vậy trong trường hợp này cá sẽ rất dễ bị hư và không nên bảo quản đông lạnh hai lần đối với cá tươi.

c. Cá muối

Từ xa xưa con người đã biết dùng muối để chượp cá. Ướp cá có thể dùng muối khô, muối ướt hay ngâm vào dịch nước muối, lượng muối ăn thường từ 15÷20%. Nhờ áp suất thẩm thấu của nước muối làm cho các tế bào vi sinh vật bị co nguyên sinh. Ở trạng thái này quá trình trao đổi chất của chúng không thực hiện được và hoạt động sống của tế bào vi sinh vật bị dừng lại, tế bào vi sinh vật bị chết hay chuyển sang dạng sống tiềm sinh.

Bảng 2: Ảnh hưởng của muối ăn đến sự phát triển của một số vi sinh vật gây thối

STT	Tên vi sinh vật	Nồng độ muối(%) làm ngừng phát triển
1	*Bacillus mesentericus*	10-15
2	*Bacillus subtilis*	10-15
3	*Escherichia coli*	6-8
4	*Clostridium botulinum*	6-7.5
5	*Bacterium typhimurium*	8-10
6	*Proteus vulgaris*	7.5-10
7	*Sarcina flava*	10
8	Cầu khuẩn gây thối	15
9	Vi khuẩn cá muối	25

10	*Aspergilus niger*	17
11	*Penicilium glaucum*	19-20

Khi muối cá chúng ta cần chú ý một số vi khuẩn gây bệnh và gây ngộ độc như *Clostridium botulinum*, *Salmonella* bị ngừng hoạt động trong nồng độ muối không cao nhưng sống được rất lâu trong nồng độ muối cao.

Một số loài vi khuẩn thích nghi dần và vẫn phát triển bình thường trong môi trường nước muối, vì vậy trong chượp muối cá vẫn thấy một lượng lớn vi sinh vật sống trong dịch ngâm.

Một số vi sinh vật ưa mặn như: *Serracia salinaria, Micrococcus roseus* khi lẫn trong muối sẽ làm tổn thất nặng cho cá chượp muối. Chúng phát triển ở nồng độ muối khá cao làm cho cá muối bị hư hỏng. Thịt cá chuyển từ axit nhẹ sang kiềm, xuất hiện các sản phẩm phân huỷ từ protein như amoniac, tiếp nữa là có mùi khó ngửi.

Hệ vi sinh vật của cá muối phụ thuộc vào cá nguyên liệu, số lượng vi sinh vật trong nước và trong muối, điều kiện vệ sinh và quá trình bảo quản.

Trong cá muối có các biến đổi phức tạp liên quan đến các enzyme protease và phản ứng oxi hoá khử trong thịt cá, cũng như sự hoạt động của hệ vi sinh vật vì vậy chất lượng cá muối rất khác xa với cá tươi. Cá muối có thể dùng làm thức ăn mà không cần chế biến vì quá trình muối đã làm cá "chín" tự nhiên. Nhóm vi khuẩn lactic và vi khuẩn sinh hương đóng vai trò rất lớn trong quá trình tự chín của cá.

d. Cá khô

Vi sinh vật thường phát triển được khi môi trường có ẩm độ nhất định, độ ẩm tới hạn cho sinh trưởng của vi khuẩn là 30%, nấm mốc là 15%. Khi môi trường có ẩm độ thấp hơn ngưỡng này thì chúng không thể phát triển được. Vì vậy để hạn chế vi sinh vật phát triển hư hại cho cá người ta thường phơi sấy khô cá. Nhiều vi sinh vật bị chết hay bị yếu đi khi ta sấy khô cá. Khi sấy khô cá không thể tiêu diệt hết tất cả các tế bào vi sinh vật, nhất là các bào tử vi khuẩn và nấm mốc rất bền với trạng thái khô hạn. Những bào tử này sống được hàng năm và khi gặp điều kiện thuận lợi chúng sẽ phát triển và gây hư cá khô.

Để thời gian bảo quản lâu hơn người ta thường ướp muối trước khi sấy khô, muối ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Chất lượng cá khô phụ thuộc vào cá nguyên liệu, phương pháp sấy, cũnh như mức độ vệ sinh ở nơi sản xuất.

Hiện nay người ta dùng phương pháp sấy chân không ở nhiệt độ thấp, sản phẩm sấy sẽ không bị thay đổi màu sắc, giữ nguyên giá trị dinh dưỡng, vitamin và khoáng chất được ổn định.

e. Một số phương pháp khác

Làm chua cá: thịt cá được ngâm trong dung dịch axit axetic từ 4÷6% làm cho độ pH giảm sẽ hạn chế được vi sinh vật gây hư hỏng và bảo quản ở nhiệt độ thấp từ -2 đến 6^{o}C.

Đồ hộp: thịt cá đóng hộp sau đó thanh trùng ở nhiệt độ từ 105÷115^{0}C trong thời gian từ 45÷60 phút, ngoài ra còn dùng thêm mỡ lợn để hạn chế sự phát triển của vi sinh vật.

g. Cách chượp cá

Đây là một khâu quan trong trong quá trình sản xuất nước mắm. Đem cá đã rửa sạch không bỏ ruột cho vào chum ướp với muối, để cho cá ngấu, protein sẽ bị thuỷ phân thành axit amin. Đến đây người ta phải cho đủ lượng muối (20-30%) để ức chế các vi sinh vật gây thối và để các axit amin không bị thuỷ phân.

Thành phần chính của nước mắm là axit amin, ngoài ra còn có muối khoáng, vitamin…

Biến đổi hoá sinh trong khi chượp cá là do hệ ezyme protease của thịt cá và vi sinh vật. Cá bắt đầu mềm và chuyển sang rữa nát, protein bị thuỷ phân thành các peptit, peptone rồi axit amin. Hoạt tính protease ở đây chủ yếu có trong ruột cá và từ các vi sinh vật ưa mặn có sẵn trong cá, trong nước, trong muối… Có nhiều vi sinh vật ưa mặn hay quen dần với môi trường sẽ phát triển mạnh trong môi trường muối thấp. Trong số đó có những vi khuẩn có hoạt lực protease cao như vi khuẩn gây thối. Vì vậy khi ướp chượp cá nên cho muối dần dần và kết hợp với đánh khuấy để rút ngắn thời gian.

Trong ướp chượp cá thường thấy một lượng lớn vi sinh vật, các vi khuẩn thường gặp ở đây là *Micrococcus*, các trực khuẩn gram âm, nhóm sinh axit lactic…

Sự tạo hương nước mắm đến nay vẫn chưa được giải thích rỏ ràng. Nhiều người cho rằng các sản phẩm trong quá trình thuỷ phân protein kết hợp với nhau tao thành chất sinh hương. Có người laị cho rằng do hoạt động của vi khuẩn *lactis* hoặc *Clostridium*.

Các vi sinh vật trong chượp cá chủ yếu là các vi khuẩn gây thối có hoạt lực protease cao là những vi khuẩn ưa nóng, vì vậy cần giữ nhiệt độ từ 36-44^{o}C trong quá trình chượp cá. Vi sinh vật phát triển làm nước chượp ban đầu đục và sủi bọt, cá thay đổi màu sắc dần.

Để đánh giá chất lượng nước mắm người ta dựa vào độ đạm. Nước mắm là nước chượp có nồng độ muối cao được rút ra đem lọc, nấu rồi pha chế. Vì vậy số lượng vi sinh vật trong nước mắm ít hơn nhiều so với nước chượp.

IV.3.HỆ VI SINH VẬT CỦA TÔM, MỰC, ĐỘNG VẬT THÂN MỀM

IV.3. 1. Hệ vi sinh vật của tôm

a. Đặc điểm của tôm

Tôm là động vật giáp xác phân bố rộng rãi, có nhiều giống khác nhau nhưng có chung đặc điểm là cơ thể được bao bọc bởi lớp kitin nên sự lây nhiễm của vi sinh vật vào tôm còn sống cũng như sau đánh bắt khó hơn thịt, cá. Tuy nhiên thành phần dinh dưỡng của thịt tôm rất thích hợp cho vi sinh vật phát triển.

Thành phần dinh dưỡng của thịt tôm gồm: protein 19-23%, lipid 0,6-1,6%, nước 73%, nhiều nguyên tố vi lượng và các viatamin nhóm B. Trong protein của tôm gồm từ 18-20 axit amin và hầu như gần đủ các axit amin không thay thế. Cấu tạo của thịt tôm rất lỏng lẻo, lượng đạm hoà tan nhiều. Với những thành phần dinh dưỡng như vậy thịt tôm là một thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao. Tuy nhiên thịt tôm sau khi đánh bắt rất dễ bị hư, ươn, thối do vi sinh vật. Đầu tôm tập trung các cơ quan nội tạng và chứa nhiều đạm hoà tan nên sự hư hỏng tôm tập trung chủ yếu ở đầu sau đó lan dần ra.

b. Hệ vi sinh vật của tôm và các dạng hư hỏng

Hệ vi sinh vật của tôm bao gồm hai nguồn gốc: có sẵn trong tôm trước khi đánh bắt và lây nhiễm từ không khí, nước, đất… sau khi đánh bắt, vận chuyển, sơ chế…Nhìn chung hệ vi sinh vật trên tôm cũng như cá gồm chủ yếu các vi sinh vật gây thối rữa. Trong đầu tôm thường chứa nhiều vi khuẩn *Pseudononas flourescens, Clostridium sporogenes, Clostridium putrificus, Proteus vugaris…* Hệ vi sinh vật của tôm phụ thuộc vào điều kiện sống, điều kiện đánh bắt, vận chuyển, bảo quản và sơ chế.

Qua nghiên cứu người ta thấy tôm sau khi đánh bắt từ 4÷8h thường xảy ra sự biến đen và biến đỏ. Khi tôm bị biến đỏ thì bao giờ cũng kèm theo sự thối rữa.

Sự biến đỏ của tôm: khi tôm bị ươn, thối bao giờ cũng kèm theo sự biến đỏ. Biến đỏ cũng xảy ra khi tôm bị gia nhiệt hay bảo quản trong môi trường axit. Cơ chế của sự biến đỏ được giải thích như sau: tôm tươi trong vỏ và thịt chứa chất astaxanthin có màu xanh tím, bình thường astaxanthin kết hợp với protein tạo thành phức bền nhưng dưới tác dụng của nhiệt, axit, sự phân huỷ của thịt tôm làm cho astaxanthin bị tách ra khỏi protein. Astaxnthin sẽ bị oxi hoá tạo thành astaxin có màu đỏ gạch.

Tôm sau khi đánh bắt từ 8÷12h, bảo quản ở nhiệt độ 30÷40^{0}C thì sự biến đỏ xảy ra rất nhanh. Kèm theo sự biến đỏ là sự thối rữa protein làm cho chất lượng tôm giảm.

Cơ chế của quá trình thối rửa:

Protein→ peptone→ axit amin→ ammoniac, sunfuahydro, indol, cadaverin, mercaptal…

Sự biến đen của tôm: hiện tượng biến đen của tôm do hai nguyên nhân khác nhau. Thứ nhất là do vi khuẩn phát triển mạnh trên tôm sau khi đánh bắt tạo thành các khuẩn lạc màu đen. Thứ hai là do triozin bị oxi hoá tạo thành melanin, sự tích tụ melanin làm cho tôm có màu đen. Sự biến đen của tôm chỉ làm giảm giá trị cảm quan còn chất lượng dinh dưỡng vẫn đảm bảo.

c. Phương pháp bảo quản tôm

Để đảm bảo chất lượng tôm sau khi đánh bắt người ta dùng các biện pháp bảo quản sau đây:

- Dùng nhiệt độ thấp như ướp đông.
- Dùng nhiệt độ thấp kết hợp với các hoá chất trong điều kiện môi trường axit.
- Sấy khô.

IV.3. 2. Hệ vi sinh vật trên mực

a. Đặc điểm của mực

Mực là động vật chân đầu phân bố rộng trong biển, toàn bộ cơ thể mực có lớp da bao phủ bên ngoài, vì vậy mực ít bị nhiễm vi sinh vật trong quá trình sống. Tuy nhiên trên da mực lại có chất nhớt rất thích hợp cho vi sinh vật phát triển sau khi mực chết. Về thành phần dinh dưỡng thì mực cũng là thực phẩm giàu dinh dưỡng: protein 17÷19%, lipid 0,2÷0,5%, nước 80%, nhiều các chất khoáng và vitamin…Cấu tạo của thịt mực chặt chẽ hơn cá, tôm nên sau khi đánh bắt mực lâu hư, thối hơn.

b. Hệ vi sinh vật của mực và các dạng hư hỏng

Dạng hư hỏng phổ biến ở mực chủ yếu là dạng thối rữa. Về cơ chế của sự thối rữa và vi sinh vật gây thối rữa giống ở tôm. Các vi khuẩn gây thối rữa chủ yếu là *Pseudononas flourescens, Clostridium sporogenes, Clostridium putrificus, Proteus vulgaris…*

Mực khô bị các vết màu là do nấm mấn mốc phát triển tạo thành các khuẩn lạc có màu đen, vàng, trắng…

c. Phương pháp bảo quản mực

Mực chủ yếu được bảo quản đông lạnh và phơi khô.

IV.3. 3. Hệ vi sinh vật của động vật thân mềm

a. Đặc điểm của động vật thân mềm

Động vật thân mềm có vỏ cứng bằng đá vôi bao phủ, phần mềm ăn được chỉ chiếm từ 30÷40%, lượng nước chiếm tới 80%, protein chiếm 17÷19%, gluxid từ 2÷10%, lipid từ 0,2÷0,4%. Cấu tạo cơ của động vật thân mềm lỏng lẻo nên rất dễ tiêu hoá. Vì vậy chúng cũng dễ bị vi sinh vật gây thối phân huỷ.

b. Hệ vi sinh vật của thân mềm và các dạng hư hỏng

Sự hư hỏng của động vật thân mềm chủ yếu là quá trình thối rữa, ngoài các sản phẩm cấp thấp như ở cá, tôm, mực còn có các axit nên tạo thành mùi hôi thối khó chịu.

Ngoài ra khi ướp đông thịt động vật thân mềm thường có màu vàng do quá trình oxi hoá.

c. Phương pháp bảo quản động vật thân mềm

Người ta thường bảo quản thịt của động vật thân mềm bằng phương pháp đông lạnh, sấy khô.

IV.4. HỆ VI SINH VẬT SỮA

IV.4. 1. Đặc điểm của sữa

Có thành phần dinh dưỡng thấp nhưng đều ở dạng hoà tan, dễ tiêu hoá và cân bằng. Protein chiếm 3,5 % gồm các dạng protein dễ hoà tan, các axit amin rất đa dạng kể cả các axit amin không thay thế. Lipid chiếm 3,8% gồm các axit béo của bơ. Glucid chứa nhiều đường lactose đây là loại đường đôi rất dễ tiêu hoá. Ngoài ra còn có chứa nhiều loại vitamin, khoáng chất, pH trung tính từ 6,8÷7,2.

Protein trong sữa tồn tại dưới 3 dạng sau: Casein chiếm 2,7% và không bị thay đổi khi đun sôi sữa, nó là thành phần quan trọng nhất trong chế biến sữa chua. Albumin chiếm 0,4% và bị động tụ khi đun nóng sữa đến 80^0C. Globulin chiếm 0,2% và cũng bị đông tụ khi đun nóng sữa đến 80^0C.

Trong 1 lít sữa có khoảng 35g lipid, trong đó lipid đơn giản chiếm 99,5% và 0,5% là lipid phức tạp. Lipid đơn giản là những lipid trong thành phần hoá học chỉ có C, H, O. Lipid phức tạp ngoài các nguyên tố trên còn chứa S, P, N.

Glucid trong sữa chủ yếu là lactose hay còn gọi là đường sữa. Trung bình mỗi lít sữa chứa 50g lactose, lactose trong sữa đóng vai trò quan trọng vì chúng dễ bị các vi sinh vật lên men tạo thành axit lactic, axit propinic và một số chất tạo hương cho các sản phẩm của sữa.

Các muối khoáng trong sữa hầu hết dễ bị đồng hoá, trong 100g sữa bò có khoảng 125mg Kali, 85mg Photpho, 40g Natri, 15g Magiê, 0,15mg Sắt, ngoài ra còn có các nguyên tố vi lượng khác như: Kẽm, Nhôm, Thiếc, Bạc, Mangan…

Vitamin gồm các loại tan trong chất béo như: vitamin nhóm A, D, E và nhóm tan trong nước như: B, PP, C.

IV.4. 2. Hệ vi sinh vật của sữa

a. Nguồn lây nhiễm

Sữa sau khi vắt có hàm lượng vi sinh vật nhất định do đó sữa rất dễ bị hư hỏng. Ngoài ra vi sinh vật còn có thể lây nhiễm từ bên ngoài trong quá trình vắt, vận chuyển, bảo quản hay quá trình sơ chế. Trong quá trình vắt sữa vi sinh vật lây nhiễm từ chuồng trại, dụng cụ, tay chân và quần áo công nhân, muốn hạn chế thì phải vệ sinh tốt. Trong quá trình bảo quản và vận chuyển sữa vi sinh vật xâm nhiễm từ không khí, bụi đất, dụng cụ đựng sữa. Để tránh lây nhiễm phải hạn chế tối đa tiếp xúc với môi trường. Thiết bị chế biến cần được vệ sinh bằng nước nóng ở 82^oC.

b. Hệ vi sinh vật của sữa bình thường

- Nhóm vi khuẩn lactic: là nhóm vi khuẩn quan trọng nhất trong sữa có khả năng phân giải protein kém, lên men đường lactose thành axit lactic, ngoài ra còn tạo ra các sản phẩm phụ như: axit axetic, axit formic…và được chia thành hai nhóm nhỏ.

+ Cầu khuẩn:

Streptococcus lactis: ghép đôi và tạo thành chuỗi dài, nhiệt độ thích hợp là 30÷35^{o}C, có khả năng lên men đường lactose, glucose, dextrin… làm cho sữa đông tụ sau 10÷12 giờ, đóng vai trò quan trọng trong việc làm sữa chua đặc, bơ, phomat.

Streptococcus cremoris: tạo thành chuỗi dài, có nhiệt độ thích hợp từ 20÷25^{o}C, có khả năng tạo độ chua thấp và ứng dụng sản xuất sữa chua.

Cầu khuẩn sinh hương: cũng lên men lactic sản phẩm là axit lactic, axit propionic, các ester hay diaxetyl. Có hai dang la: *Streptococcus citroborus* và *Streptococcus diacetilactis* tạo hương đặc trưng cho sữa chua hay phomat.

+ Trực khuẩn:

Trực khuẩn lactic ưa nhiệt: là những tế bào hình que lớn có thể đứng riêng hay xếp thành chuỗi. Phát triển tốt ở nhiệt độ từ 40÷45^{o}C, làm đông tụ sữa sau 12 giờ, gồm: *Lactobacillus bulgaricum, Lactobacillus lactis…*

Trực khuẩn lactic ưa ấm: là những tế bào hình que nhỏ thường xếp thành hình chuỗi, phát triển tốt ở nhiệt độ từ 20÷30^{o}C, có cơ chế sinh trưởng và phát triển chậm, khả năng làm đông tụ sữa kém, thời gian từ 2÷3 ngày. Gồm các loại sau: *Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum*, ứng dụng làm chín phomat Hà lan, lên men sữa chua Kefia.

- Nhóm vi khuẩn propionic: tồn tại phổ biến trong sữa, đây là loại trực khuẩn không hình thành bào tử, không di động, hô hấp tuỳ tiện nhưng phát triển tốt trong điều kiện yếm khí. Nhiệt độ tối thích từ 30÷35^{o}C. Sử dụng cơ chất là đường lactose tạo thành axit propionic, đây là sản phẩm chủ yếu, ngoài ra còn tạo ra một lượng nhỏ axit axetic, axit formic, CO_2. Ứng dụng để làm chín phomat, làm cho sữa chua đông tụ sau thời gian từ 7 đến 10 ngày khi để tự nhiên.

- Nhóm vi khuẩn gây thối rữa: sử dụng nguyên liệu là protein tạo ra sản phẩm H_2S, NH_3 gây mùi khó ngửi. Ngoài ra những vi khuẩn này còn có khả năng sinh ra enzyme lipase thuỷ phân lipid. Nhóm vi khuẩn này có loài sinh bào tử và có loài không sinh bào tử, sinh trưởng và phát triển tốt ở nhiệt đô nhỏ hơn 25^{o}C. Sự phân giải protein sâu sắc tạo thành NH_3 nên sữa có tính kiềm. Thường gặp các dạng sau đây: *Bacillus subtilis, Bacillus putrificum, Clostridium botulinum, Proteus vulgaris.*

- Nhóm vi khuẩn butyric thường nhiễm vào sữa từ chuồng trại hay thức ăn trong quá trình vắt sữa.

- Nhóm trực khuẩn đường ruột: thường xâm nhập vào sữa trong quá trình vắt sữa, có loài làm đông sữa và có loài không làm đông sữa. Hoạt động không theo cơ chế nào cả và sản phẩm cuối cùng là axit propionic, axit axetic, axit butyric, H_2, CO_2. Có các loài sau đây: *Colifom, Ecoli, Salmonella..*

- Nấm mốc: có khả năng phân giải protein, lipid tạo ra vị đắng, chúng phát triển sau nấm men vì vậy chỉ có trong sữa đã hư hỏng nặng. Chỉ có một số loài được ứng dụng trong sản xuất phomat như: Mucor, Pinicillium, Aspergillus.

- Nấm men gây ra phản ứng lên men đường lactose tạo thành rượu, đây là phản ứng trong quá trình hình thành một số sản phẩm trong sữa chua. Có những nấm men không phân huỷ đường lactose được nhưng khi vi khuẩn chuyển đường lactose thành glucose thì chúng lên men glucose và tạo thành các sản phẩm cần thiết cho sữa chua.

c. Hệ vi sinh vật làm xấu sữa: xuất hiện khi sữa bị giảm phẩm chất, thay đổi chất lượng, thay đổi tính chất lý hoá. Những tật của sữa xuất hiện trong thời gian bảo

quản liên quan đến sự có mặt của vi sinh vật và hoạt động của chúng ở trong sữa. Những vi sinh vật này người ta gọi là hệ vi sinh vật làm xấu sữa. Chúng nhiễm vào sữa do vệ sinh kém, làm cho sữa chóng hỏng và giảm phẩm chất.

Sữa bị axit hoá: do sự chuyển hoá mạnh đường lactose thành axit lactic bởi các loài vi khuẩn sau: *Streptococcus, Micrococcus, Lactobacillus*.

Sữa có mùi ôi: vị này xuất hiện khi bảo quản lạnh sữa dài ngày, do sự phân giải lipid, protein tạo thành axit butyric, các aldehit, axetone, este và một số chất khác. Thường gặp các loài sau : *Bacterium fluorescens,* nấm mốc có hệ enzyme protease, lipase làm cho sữa có mùi ôi thối.

Sữa có vị đắng: có thể do dư vị của một số thức ăn chăn nuôi hoặc chủ yếu do một số vi khuẩn có khả năng phân thuỷ phân protein thành peptone. Gồm *Micrococcus, Monococcus*.

Sữa có mùi xà phòng: xuất hiện trong sữa có nhiễm vi khuẩn đường ruột, vi khuẩn huỳnh quang như *Bacterium fluorescens, Bacterium lactis* từ rơm, cỏ khô. Chúng thuỷ phân protein thành NH_3 và tồn tại trong sữa dạng muối amôn của các axit béo làm cho pH tăng lên sữa có tính kiềm mạnh và độ lầy nhầy.

Sữa bị biến đổi màu sắc: sữa và các sản phẩm sữa bảo quản trong thời gian dài có thể sinh màu do một số vi sinh vật phát triển, lúc đầu có trên bề mặt sau đó lan dần ra và ăn sâu vào trong sữa.

- Sữa có màu xanh là do trong sữa có các loại vi khuẩn: *Pseudomonas cyanogenes, Bacillus cyanogenes*...

- Sữa có màu vàng là do *Sarcina, Saccharomyces*…

- Sữa có màu đỏ là do *Bacillus lactis* kết tủa casein sau đó peptone hoá chất này tạo thành màu đỏ

Sữa bị sủi bọt do sự hoạt động nhiều của vi sinh vật tạo thành bọt khí. Ta thường thấy nấm men và vi khuẩn đường ruột gây ra tật này trong sữa nguyên liệu.

Vi sinh vật gây bệnh trong sữa: sữa có thể bị nhiễm vi sinh vật gây bệnh cho người từ bò mẹ sang, từ không khí, nước, ruồi nhặng hoặc do công nhân vắt sữa. Các vi sinh vật gây bệnh trong sữa chia làm hai nhóm chính. Nhóm thứ nhất gây bệnh cho người và động vật là các vi sinh vật gây bệnh lao, sẩy thai do *Brucella*, nhiệt thán, lở mồm long móng, nhiễm độc *Coli*…Nhóm thứ hai là các vi sinh vật gây bệnh của người truyền cho người qua sữa như: thương hàn, phó thương hàn, ly, thổ tả, nhiễm độc *Streptococcus, Staphylococcus*…

IV.4. 3. Sự thay đổi hệ vi sinh vật của sữa trong quá trình bảo quản

Sữa sau khi vắt hàm lượng vi sinh vật thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ, thời gian bảo quản và phụ thuộc vào hệ vi sinh vật ban đầu có sẵn trong sữa.

Bảng 3: Sự phát triển của vi sinh vật trong sữa

Thời gian bảo quản (h)	Lượng vi sinh vật (10^3tb/lít)	Tỷ lệ (%)		
		Vk lactic	Vk gây thối	Vk đường ruột
3	195	6,2	86,2	7,6
24	59	37,4	57,5	5,1
36	528	90,2	4,8	5
72	687	95,4	2,3	2,3

Hệ vi sinh vật sữa sau khi vắt chia làm 4 pha:

Pha ức chế vi khuẩn lactic: do kháng sinh lyzozim của sữa tươi có khả năng diệt khuẩn, ức chế vi sinh vật phát triển. Trong thời gian lyzozim còn tác dụng nếu bảo quản ở 0^oC trong 40h hoặc 15^oC trong 12h, phụ thuộc vào nhiệt độ bảo quản.

Pha phát triển hỗn hợp: sau 24h vi khuẩn latic tăng lên nhanh chóng, vi sinh vật hoạt động mạnh. Vi khuẩn gây thối chiếm tỉ lệ cao sau đó giảm dần và vi khuẩn lactic tăng lên. Do vi khuẩn lactic hoạt động mạnh, số lượng tăng lên nên pH sẽ giảm làm cho vi khuẩn gây thối sữa giảm mạnh. Cuối pha này vi khuẩn lactic phát triển mạnh.

Pha phát triển vi khuẩn lactic: cuối giai đoạn trên và đầu giai đoạn này vi khuẩn lactic chiếm ưu thế chủ yếu là cầu khuẩn lactic, cuối pha này chủ yếu là trực khuẩn. Kết thúc pha này vi khuẩn lactic phát triển đỉnh điểm nên lượng axit lactic cao, độ pH giảm mạnh làm sữa đông tụ, xuất hiện những cụm đông hoặc khối đông.

Pha phát triển nấm men và nấm mốc: khi nồng độ axit bằng 2% chính vi khuẩn lactic cũng bị ức chế, lúc này chỉ có nấm mốc và nấm men phát triển được. Trước nồng độ axit lactic 2% vi khuẩn gây thối bị ức chế hay tiêu diệt là thời kỳ bảo quản sữa tốt nhất (làm sữa chua), sau nồng độ axit lactic 2% nấm men phát triển mạnh, axit lacic giảm nấm men phát triển mạnh và pH tăng dần. Lúc này vi khuẩn gây thối phát triển mạnh, sản phẩm sữa bị ôi thiu và không dùng được nữa.

IV.4. 4. Các phương pháp bảo quản sữa

a. Bảo quản lạnh

Sử dụng nhiệt độ thấp để bảo quản sữa sau khi vắt và tới nơi chế biến. Lúc này vi sinh vật phát triển nhanh nên dùng phương pháp bảo quản lạnh để hạn chế, ức chế vi sinh vật phát triển.

Đối với sữa đã thanh trùng dùng phương pháp bảo quản lạnh để bảo quản lâu hơn**.**

b. Phương pháp thanh trùng

Do đặc tính lý hoá có thành phần protein cao nên phải bảo quản sữa ở nhiệt độ thấp hơn so với thịt nên chi phí sản xuất cao và thời gian bảo quản có hạn vì vậy rất ít dùng phương pháp bảo quản lạnh. Phương pháp thanh trùng có thể tiêu diệt được một phần hay gần hết vi sinh vật trong sữa. Nhiệt độ nhỏ hơn 100^oC không làm thay đổi trạng thái vật lý và tính chất hoá học của sữa (không mất

enzyme, trạng thái lỏng…). Đặc biệt phương pháp này có thể tiêu diệt được trực khuẩn gây bênh lao, vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật hoại sinh.

Đối với trực khuẩn bệnh lao: thanh trùng ở 63^{o}C trong 20 phút hay 71÷72^{o}C trong 15 phút.

Đối với vi sinh vật hoại sinh: thời gian và cường độ phụ thuộc vào mức độ nhiễm khuẩn của sữa. Nếu ít trong quá trình tiêu diệt trực khuẩn bệnh lao đã tiêu diệt được loại này. Nhưng nếu là loại có bào tử thì sử dụng nhiệt độ từ 80÷85^{o}C trong 20 phút. Thường gia nhiệt ở nhiệt độ cao thì thời gian gia nhiệt giảm nhưng làm biến tính protein, enzyme. Còn ở nhiệt độ 71-72^{0}C là phù hợp vì không làm biến đổi sâu sắc chất lượng và cảm quan của sữa.

Ta có thể gia nhiệt kèm theo phương pháp ly tâm (75÷80^{o}C trong vòng 10 phút) sẽ loại được 99% vi sinh vật có trong sữa. Để tăng và giảm nhanh nhiệt độ trong thời gian ngắn dùng dây chuyền là máng nghiêng. Trong thực tế chỉ dùng trong nhà máy sữa thanh trùng để sản xuất sữa chua và phomat…

c. Phương pháp tiệt trùng

Tiêu diệt tất cả lượng vi sinh vật có trong sữa với nhiệt độ lớn hơn 100^{o}C trong thời gian 30 phút sau đó bảo quản ở nhiệt độ thường, phương pháp này làm cho sữa thay đổi trạng thái và cảm quan. Do đó nên dùng phương pháp tiệt trùng Tyndal: thanh trùng 3 hoặc 4 lần liên tiếp, mỗi lần nhiệt độ lớn hơn 100^{o}C sau đó ủ lại 24h, sau 24h lại tăng nhiệt đô lớn hơn 100^{o}C, tiếp tục lặp lại 3 hoặc 4 lần.

Đối với sữa thì ở nhiệt độ 137^{o}C trong 10 giây và lặp lại 4 lần hoặc 110^{o}C trong 30 giây và lặp lại 4 lần. Thanh trùng 2 đến 3 lần thì vi sinh vật bị tiêu diệt gần hết. Ơ nhiệt độ 137^{o}C trong 10 giây enzyme không mất hoạt tính nhưng làm thay đổi trang thái và chất lượng cảm quan. Tuy nhiên sữa sau khi tiệt trùng dễ tiêu hoá hơn.

d. Phương pháp cô đặc

Giảm hàm lượng nước trong sữa tạo nên dạng sữa đặc hay sữa bột. Đun sôi sữa trong nồi chân không, sữa sẽ bốc hơi nước nhưng không bị biến tính và tiết kiệm nhiên liệu. Thường đun sữa ở áp suất 700mmHg và nhiệt độ sôi từ 40÷ 53^{o}C.

Thông thường sữa dùng để cô đặc phải có chất lượng tốt, không biến tính, enzyme hoàn hảo, chất khoáng tốt, độ axit thấp để không gây đông tụ sữa.

Sữa đặc không đường khử khuẩn: là sữa được thanh trùng ở nhiệt độ 115÷118^{o}C trong thời gian từ 15÷20 phút và có thể bảo quản trên 18 tháng. Sau khi cô đặc sữa được chuyển đến thiết bị đồng hoá và làm lạnh ở 10÷12^{o}C trước khi đóng hộp. Sau đó xếp các hộp sữa vào thiết bị thanh trùng chứa nước và nâng đến nhiệt độ cần thiết, sau đó phải làm lạnh ngay bằng cách xả nước nóng và ngâm trong nước lạnh.

Sữa đặc có đường không khử khuẩn: cho thêm đường vào sữa đặc ta có sữa đặc có đường, sản phẩm này không cần thanh trùng vì lượng đường trong sữa tao ra một áp suất thẩm thấu rất cao làm cho vi sinh vật không thể phát triển được, vi sinh vật rơi vào tình trạng tiềm sinh. Người ta cô sữa đã có đường ở nhiệt độ 50^{o}C với áp suất 70mmHg, cô đến khi sữa đạt tỷ trọng khoảng 1,28÷1,3 là được. Sau đó làm lạnh sữa ở nhiệt độ từ 15÷30^{0}C và đóng hộp.

e. Làm sữa bột

Hạn chế tối đa lượng nước có trong sữa. Tuy nhiên do hàm lượng axit béo cao nên dễ bị oxi hoá làm sữa bị ôi thiu. Thường dùng hai phương pháp sấy sau:

Phương pháp sấy trụ just Hamaster: sấy ở nhiệt độ 137^{o}C, áp suất 1atm. Nguyên liệu đưa vào nhờ hệ thống phân phối đều trên hai ống trụ quay ngược chiều nhau, sữa sẽ tạo thành bột hay dạng mảng mỏng, sau đó ta nghiền thành bột sữa.

Phương pháp sấy phun: phun sữa ra dưới sức nóng của nhiệt độ cao làm cho những hạt sương sữa bị mất nước tạo thành bụi rơi xuống và người ta thu hồi bột sữa.

IV.4. 5. Hệ vi sinh vật một số sản phẩm sữa

a. Bơ

Bơ có hai loại chính, một loại thu từ váng sữa tươi đã thanh trùng bằng phương pháp Pasteur gọi là bơ ngọt, một loại thu từ váng sữa đã qua làm chua sơ bộ gọi là bơ chua. Thanh trùng váng sữa theo phương pháp Pasteur ở 85^{o}C nhằm giết chết các vi sinh vật và giảm hoạt lực của enzyme và sau đó giảm nhiệt độ xuống 6^{o}C và giữ ở nhiệt độ này trong vòng 8÷10h, rửa và xử lý cơ học tạo thành bánh. Đối với bơ chua, sau khi làm nguội phải tiến hành axit hoá trước khi xử lý cơ học.

Bơ có hàm lượng nước từ 15 đến 16%, dễ bị hư hỏng do vi sinh vật. Bơ bị ôi do vi sinh vật hay sự oxi hoá thông thường bởi oxi , nhiệt độ, ánh sáng. Vi sinh vật thuỷ phân các axit béo như nấm mốc *Aspergillus, Penicillium*, vi khuẩn *Pseudomonas.*

Bơ có vị đắng do vi sinh vật thuỷ phân protein thành peptone, có vị chua do vi sinh vật thuỷ phân đường thành axit lactic và axit axetic.

b. Phomat

Là sản phẩm đông tụ của sữa, trong phomat chín có protein, lipid, các muối khoáng, vitamin… Đây là thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, phomat có mùi vị thơm ngon, kích thích tiết các dịch tiêu hoá.

Đầu tiên người ta dùng vi khuẩn lactic để làm đông tụ casein và tách đường sữa. Sau đó làm chín phomat nhờ nấm mốc, vi khuẩn propionic...

Các vi sinh vật làm hỏng phomat: phomat bị trương do *Colifom*, vi khuẩn *Butyric*, phomat đắng *do Monococcus, Micrococcus*.

c. Sữa đặc

Hàm lượng đường cao ức chế vi sinh vật phát triển, gây hư hỏng sản phẩm này chủ yếu do vi sinh vật chịu hàm lượng đường cao và chịu áp suất thẩm thấu cao nên thường có thành tế bào chắc chắn.

Sữa bị đặc quánh lại do nhiệt độ cao, ngoài ra còn do vi sinh vật: *Micrococcus* lên men đường thành axit lactic, thuỷ phân protein thành cục bột. Sữa bị mốc do nấm mốc *Penicillium*, *Aspergillus*…

IV.5. HỆ VI SINH VẬT CỦA TRỨNG GIA CẦM

IV.5. 1. Đặc điểm của trứng

Trứng là môi trường đầy đủ chất dinh dưỡng cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển. Trứng có nhiều protein, lipid, glucid, vitamin và khoáng chất. Trứng là một tế bào sống được bảo vệ bên ngoài bằng lớp vỏ cứng nên hạn chế được vi sinh vật xâm nhập từ bên ngoài. Ngoài ra trứng còn chứa lyzozim nên có khả năng miễn dịch.

IV.5. 2. Hệ vi sinh vật của trứng

a. Sự lây nhiễm trước khi đẻ

Do vi sinh vật gây bệnh hay trực khuẩn đường ruột của cơ thể gia cầm mẹ lây nhiễm sang. Bình thường có khoảng 10% trứng lây nhiễm trước khi đẻ. Thường gặp là: *Staphycoccus, Salmonella*.

b. Sự lây nhiễm sau khi đẻ

Trên bề mặt một quả trứng có khoảng $10 \div 10^6$ tế bào vi sinh vật, liên quan đến hệ vi sinh vật chuồng trại, phương pháp thu nhận trứng. Trên vỏ trứng thường gặp nấm mốc *Mucor, Cladosporium, Sporotrichum, Pinicillium* và vi khuẩn *Archomobacter, Micrococcus, Proteus, Pseudomonas.*

IV.5.3. Sự hư hỏng trứng

a. Do vi khuẩn

Vỏ trứng có nhiều lỗ nhỏ giúp cho quá trình trao đổi khí, đây cũng là con đường cho những vi khuẩn có thích thước nhỏ chui qua. Nếu cơ thể gia cầm mẹ thiếu canxi vỏ trứng mỏng thì vi khuẩn sẽ xâm nhập dễ dàng. Ngoài ra nấm mốc sinh trưởng sẽ tạo ra những lỗ nhỏ tạo điều kiện cho vi khuẩn có thể chui vào trứng.

Qua màng tế bào vi khuẩn sẽ xâm nhập vào lòng trắng hoạt động sinh ra enzyme làm cho lòng trắng giảm độ nhớt sau dó vi sinh vật xâm nhập vào lòng đỏ phá vỡ màng làm cho lòng đỏ và lòng trắng trộn lẫn vào nhau. Do trứng chứa nhiều axit amin chứa lưu huỳnh nên sẽ tạo ra H_2S, NH_3 tạo thành mùi thối.

Tuỳ vi sinh vật gây thối trứng thối có các màu khác nhau: màu lục do *Pseudomonas fluorescens*. Màu đen do *Proteus, Pseudomonas*. Mặt khác một số vi sinh vật không có enzyme làm trứng có mùi tanh…

b. Do nấm mốc

Nấm mốc có những hệ sợi khí sinh chui qua những lỗ nhỏ trên lớp vỏ vào bên trong trứng. Sau đó sử dụng cơ chất tiết ra enzyme thuỷ phân lòng trắng và lòng đỏ làm cho chúng trộn lẫn vào nhau. Mặt khác sợi khí sinh bên ngoài cũng phát triển mạnh tạo ra các lỗ lớn tạo điều kiện cho vi khuẩn chui vào bên trong trứng dễ dàng. Nấm mốc khi vào trong trứng sẽ phát triển tạo thành các khuẩn lạc: *Pinicillium* có màu xanh, *Cladosporium* có màu lục đen.

c. Do vi sinh vật gây bệnh

Trứng có thể nhiễm vi khuẩn đường ruột như *Salmonella* từ bên trong bộ máy sinh dục của gia cầm mắc bệnh hoặc trong ống dẫn trứng hoặc nhiễm từ phân của gia cầm. Trứng gia cầm thường nhiễm các vi sinh vật gây bệnh sau: khuẩn tả, thương hàn, lao.

IV.5.4. Bảo quản trứng

a. Bảo quản ở nhiệt độ thấp

Thông thường bảo quản trứng ở nhiệt độ -2^{o}C, ẩm độ từ 82÷85% hay ở nhiệt đô từ 0 ÷ 5^{o}C. Nhiệt độ bảo quản trứng giới hạn là -3,5^{o}C ở nhiệt độ này lòng trắng trứng chưa bị đông đặc.

Trứng rửa sạch để khô, xếp vào khay và xếp vào giá, cần thông khí thường xuyên. Tránh thay đổi nhiệt độ, nếu không sẽ tạo ra lớp nước trên bề mặt trứng vi khuẩn sẽ phát triển. Ngoài ra còn trám một lớp dầu mỏng trên bề mặt trứng (parafin) để bịt kín những lỗ nhỏ tránh hiện tượng hô hấp và vi sinh vật chui qua.

b. Bảo quản ở nhiệt độ cao

Làm ngừng hoạt động enzyme, vi sinh vật trên vỏ và trứng ngừng hoạt động những phản ứng tự nhiên sẽ bảo quản được lâu hơn.

Thông thường gia nhiệt ở nhiệt độ 57,5^{o}C trong 13 phút hoặc 60^{o}C trong 6 phút (thông dụng nhất) hoặc 62,5^{o}C trong 2 phút. Thường người ta giữ nhiệt độ này bằng cách đun nước hay dầu ăn.

c. Làm bột trứng

Nguyên liệu phải là trứng tốt, tươi, không nhiễm vi sinh vật, chưa hư hỏng. Bảo quản ở nhiệt độ 4 ÷ 5^{o}C trong 72h để ổn định đặc tính enzyme. Sau đó đập vỡ và trộn lẫn vào nhau, đem đi sấy phun. Để đảm bảo vệ sinh nên sấy ở nhiệt độ cao.

d. Bảo quản bằng hoá chất

Phương pháp này được dùng rộng rãi để ức chế vi sinh vật trên bề mặt và xâm nhập vào bên trong. Thường dùng là khí SO_2, muối benzoat, axit benzoic. Trong gia đình thường dùng hỗn hợp: tro bếp, nước muối 10%, bột mì chính, sau đó lăn trứng vào trong hỗn hợp đó tạo lớp màng dính hạn chế vi sinh vật xâm nhập.

IV.6.HỆ VI SINH VẬT CỦA RAU QUẢ

IV.6.1. Đặc điểm của rau quả

Là thành phần thức ăn không thể thiếu trong khẩu phần ăn, cung cấp nhiều chất dinh dưỡng, hợp chất hữu cơ, đường, tinh bột, vitamin và muối khoáng. Sản phẩm tươi hay qua chế biến có nhiều dạng: lá, thân, củ, quả, hạt. Mỗi loại rau có đặc điểm sinh lý khác nhau. Nước chiếm phần lớn trong rau quả từ 85 ÷ 90%. Trong dịch tế bào có đường, axit hữu cơ, vitamin, khoáng chất sử dụng dễ dàng. pH trong quả nhỏ hơn 4,5, rau từ 4,5÷5.

Rau quả sau khi hái vẫn còn sống, còn quá trình trao đổi chất và hô hấp sẽ tác động xấu đến quá trình bảo quản như héo, mềm , dập làm cho vi sinh vật dễ xâm nhập.

Quả và rau tươi có khả năng miễn dịch trong thời gian nhất định do mô và thành tế bào còn nguyên lớp bảo vệ. Có tinh dầu, tanin ức chế hay tiêu diệt vi sinh vật.

IV.6.2. Hệ vi sinh vật của rau quả

a. Nguồn lây nhiễm

Do hạt giống hay quá trình chăm bón phân bón hữu cơ hay do vi sinh vật trong đất, trong không khí, nước. Do quá trình thu hái, vận chuyển và chế biến vi sinh vật xâm nhiễm vào rau quả.

Thành phần và số lượng vi sinh vật nhiễm vào rau quả phụ thuộc vào từng loại, điều kiện địa lý và thu hái, tình trạng rau quả.

b. Hệ vi sinh vật của rau qủa

Thường gặp vi khuẩn, nấm men, nấm mốc. Hoa quả tươi lành lặn bên trong coi như vô trùng. Các hệ vi sinh vật xâm nhiễm vào rau quả làm hư hỏng, hư hỏng quả do nấm, hư hỏng rau do vi khuẩn. Hệ vi sinh vật rau quả gồm hai loại:

Vi sinh vật hoại sinh: liên quan đến điều kiện trồng, thu hoạch rau qủa. Gồm vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm: vi khuẩn lactis, vi khuẩn axetic, vi khuẩn gây thối rữa. Ngoài ra còn có nấm men, nấm mốc dạng bào tử. Vi sinh vật hoại sinh từ $10^3 \div 10^6$ tế bào trên 1 cm^2 không gây hư hại rau quả lành lặn trong điều kiện thu hái, vận chuyển tốt.

Vi sinh vật gây bệnh: xuất hiện trên rau quả trong điều kiện nhất định như: chăm bón, thu hái, vận chuyển, giống…Đây là vi sinh vật không tìm thấy trực tiếp trên rau quả nhưng làm giảm sức đề kháng rau quả và tấn công cây mẹ tạo điều kiện cho vi sinh vật khác tấn công rau quả sau thu hoạch.

IV.6.3. Sự hư hỏng của rau quả

Nấm mốc là nguyên nhân đầu tiên gây hư hỏng rau quả, do pH của rau quả nhỏ hơn 4,5 tạo điều kiện cho nấm mốc phát triển nhanh cho đến khi pH tăng lên vi khuẩn khác sẽ tấn công rau quả. Nấm mốc tồn tại dạng sợi và phát triển nhanh do rau quả có nhiều cenlulose, hemicenlulose, pectin. Vi sinh vật thường bắt đầu từ rau quả bị dập nát sau đó lan sang rau quả khác và làm hư hỏng rau quả. Nếu độ dập nát rau quả càng cao thì vi sinh vật xâm nhiễm và phát triển càng nhiều và phong phú. Chúng tiêu thụ nhiều chất khô và dịch tế bào do nấm mốc xâm hại phá huỷ thành tế bào chảy ra.

Sự hư hỏng do vi khuẩn: Do nấm men phá vỡ thành tế bào làm cho vi khuẩn xâm nhập và phát triển mạnh làm pH giảm nên vi khuẩn gây thối chậm phát triển. Cuối cùng làm cho rau quả có vị chua và giảm chất lượng cảm quan.

IV.6.4. Bảo quản rau qủa

a. Bảo quản tươi

Sư hư hỏng thường do một số quả quá chín vì vậy cần loại những quả đó ra. Rau quả không thể bảo quản ở nhiệt độ thường mà phải bảo quản ở nhiệt độ lạnh và cho thêm hoá chất bảo quản. Các hoá chất bảo quản thường dùng là: khí SO_2, axit benzoic, muối benzoat… những chất này tốt cho bảo quản và không độc hại.

Ngoài ra còn dùng một số hợp chất hữu cơ như: nizin, axit sorbic, muối sorbat… Nizin là chất sinh ra từ kháng sinh hoặc độc tố của vi khuẩn lactic vì vậy chúng tiêu diệt được vi khuẩn gây thối và không độc hại đối với con người.

b. Sấy khô

Người ta thường sấy khô đến độ ẩm khoảng 15 đến 20% đối với rau và 8 đến 10% đối với quả. Ngày nay trên thị trường có rất nhiều sản phẩm sấy khô từ rau quả.

c. Chế biến

Rau quả qua chế biến thành nhiều sản phẩm phù hợp khẩu vị, tạo ra sự phong phú đa dạng thức ăn và giúp bảo quản lâu hơn. Phương pháp thường dùng là ngâm đường để chiết suất dịch bào sau đó đem ra sử dụng. Tuy nhiên trong dịch bào thường có vi khuẩn lên men nên sản phẩm thường có mùi rượu.

d. Muối chua

Phương pháp này giúp ta giữ rau quả lâu hơn, khoảng 1 đến 2 tháng. Bản chất của quá trình này là quá trình lên men lactic.

e. Đóng hộp

Phương pháp này bảo quản rau quả được khá lâu, khoảng 6 tháng. Trước hết tiêt trùng rau quả bằng nhiệt độ cao, sau đó đóng hộp và thanh trùng.

IV.6.5. Hệ vi sinh vật một số sản phẩm rau quả

a. Đồ hộp

Bị lây nhiễm do các nguyên nhân sau đây:

Do nguyên liệu: quá trình rửa, ngâm, muối, thanh trùng sẽ diệt được khoảng 90% lượng vi sinh vật, tuy nhiên còn 10% vi sinh vật sẽ phát triển nhanh và gây hư hại đồ hộp.

Do khâu chuẩn bị đóng hộp: lượng vi sinh vật trong không khí do ruồi giấm mang đến, do vi sinh vật nhiễm từ công nhân.

Nguyên nhân gây nhiễn đặc biệt quan trọng đối với đồ hộp gia nhiệt không cao do đựng trong các dụng cụ bằng nhựa.

Ngoài ra còn có nguyên nhân do tiệt trùng hoặc thanh trùng không kỹ vì vậy lượng vi sinh vật còn lại sẽ ảnh hưởng đến quá trình bảo quản. Hay do yếu tố chủ quan của con người, ở những giai đoạn trước đã tiệt trùng kỹ nên những giai đoạn sau không thanh trùng vì vậy vi sinh vật mới xâm nhập sẽ phát triển và gây hư hại cho sản phẩm đồ hộp.

Nhóm vi sinh vật đặc trưng là những vi khuẩn ưa nóng, chịu axit và có bào tử: *Baccilus sporogenes, Baccilus subtilus, Clostridium botulinum*…

Sau khi đóng hộp vẫn còn hiện tượng hư hỏng là do vi khuẩn lactisc, vi khuẩn axetic dùng đường có trong quả lên men tạo thành rượu, axit axetic, axit lactic tạo thành mùi rượu hay vị chua. Hay do vi khuẩn thuỷ phân thành khí H_2S làm đồ hộp phồng lên. Ngoài ra vỏ đồ hộp thường làm bằng vỏ thiếc vì vậy trong môi trường axit hộp sẽ bị gỉ làm ảnh hưởng đến chất lượng rau quả.

b. Muối chua

Khi muối chua pH giảm nên môi trường có tính axit cao vì vậy sẽ ức chế các vi khuẩn gây thối rữa. Tuy nhiên trong môi trường axit nấm mốc và nấm men vẫn phát triển và gây hư hỏng sản phẩm. Khi nấm mốc phát triển làm giảm độ pH môi trường tạo điều kiện cho vi khuẩn gây thối rữa phát triển và làm hư hỏng sản phẩm muối chua.

IV.7. HỆ VI SINH VẬT HẠI NÔNG SẢN

IV.7. 1. Đặc điểm của nông sản

Nông sản thường có độ ẩm và hàm lượng đường tự do thấp, tuy nhiên chúng có nhiều tinh bột. Các loại hạt thường có lớp vỏ cứng bảo vệ. Khi ẩm độ tăng lên các bào tử vi sinh vật trên bề mặt phát triển thành tế bào vi sinh và quá trình hô hấp của hạt xảy ra mạnh làm tinh bột chuyển hoá thành đường tự do là nguồn thức ăn cho vi sinh vật phát triển.

IV.7. 2. Hệ vi sinh vật hại nông sản

a. Nguồn lây nhiễm

Trên bề mặt các loại nông sản thường các bào tử nấm mốc, nấm men và các vi sinh vật hoại sinh hay kí sinh có nguồn gốc đồng ruộng, các vi sinh vật bệnh cây. Thành phần vi sinh vật thường phụ thuộc vào từng loại hạt, từng vùng khí hậu khác nhau.

Trong quá trình thu hoạch, vận chuyển, bảo quản cũng có thể làm tạp nhiễm nhiều loài vi sinh vật có hại.

b. Hệ vi sinh vật hại nông sản

Hệ vi sinh vật nông sản gồm các loai ký sinh như *Fusarium* hay hoại sinh. Vi sinh vật hoại sinh trên bề mặt hạt thường bao gồm các loài thuộc họ *Pseudomonadaceae*, các đơn cầu khuẩn, vi khuẩn sinh bào tử, bào tử một số nấm men, nấm mốc.

Các vi sinh vật bệnh cây có thể ảnh hưởng đến chất lượng nông sản như bệnh than làm hạt đen, ảnh hưởng gián tiếp như bệnh gỉ sắt, mốc sương…

Nông sản không phải là cơ chất thích hợp cho vi sinh vật phát triển, tuy nhiên khi ẩm độ và nhiệt độ cao sẽ tạo điều kiện cho nhiều vi sinh vật phát triển gây hư hỏng các loại nông sản.

Các loại nông sản thường nhiễm các loại nấm sợi trong điều kiện hiếu khí hoặc nhiễm các loại nấm men trong điều kiện yếm khí như vi khuẩn lên men rượu, vi khuẩn lên men axit lactic.

Sự phát triển các loại nấm có chứa độc tố bao gồm các giống *Aspergillus, Penicilium, Fugarium* có thể gây nên nhiều vấn đề quan trọng về sức khoẻ con người như các bệnh ung thư. Các loại nấm có chứa độc tố thường phát triển nhiều trên lạc và một số loại nông sản khác. Nấm *Penicilium islandicum* tạo ra độc tố luteoskyrin gây nên bệnh ung thư gan. Một số độc tố khác nguy hiểm cho con người như: aflatoxin được tạo ra bởi *Aspergillus flavus*, OTA được tạo ra bởi *Aspergillus ochraceus, Aspergillus niger, Aspergillus carbonarius, Penicilium verrucosum*

IV.7. 3. các phương pháp bảo quản nông sản

a. Phơi khô

Để hạn chế tối đa sự phát triển của các loài vi sinh vật gây hại nông sản, phương pháp tối ưu nhất hiện nay là làm giảm ẩm độ bằng cách phơi, sấy.

Trước khi được đưa vào bảo quản người ta thường làm khô hạt đến một ẩm độ nhất định mà ở đó hạt ở trạng thái nghỉ, tức là hạt ngưng các quá trình trao đổi chất. Sau đó người đưa vào kho để bảo quản.

b. Dùng các chất bảo quản

Hiện nay để bảo quản một số loại nông sản làm thức ăn cho con người như lúa gạo, người ta thường bảo quản trong các túi ni lông kín có chứa CO_2. Trong các túi này sẽ hạn chế tối đa các quá trình trao đổi chất của hạt và sự phát triển của các loại vi sinh vật. Mặt khác bằng phương pháp bảo quản này người ta giữ được chất lượng cảm quan do màu sắc của hạt hầu như không bị thay đổi và bảo quản lâu trong điều kiện khí hậu thời tiết thay đổi.

IV.8. HỆ VI SINH VẬT CỦA BỘT VÀ BÁNH MÌ

IV.8. 1.Vi sinh vật trong bột

Vi sinh vật trong bột do hai nguồn nhiễm chính là từ hạt (chủ yếu) và từ không khí, nước, dụng cụ xay xát, các đồ chứa đựng…

Hạt dùng để xay bột bao giờ cũng chứa một số lượng vi sinh vật nhất định nào đó. Trong quá trình nghiền phần lớn các vi sinh vật trên bề mặt hạt chuyển vào trong bột. Số lượng vi sinh vật có trong bột ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng của bột vi sinh vật thường nhiều nhất là ở cám và bột có chất lượng cao thì ít vi sinh vật.

Trong bột thường có vi khuẩn và nấm mốc. Trong các loài vi khuẩn có thể thấy các tế bào sinh dưỡng hay bào tử của trực khuẩn khoai tây (*Bacillus mesentericus*) và trực khuẩn cỏ khô *(Bacillus subtilis*). Những trực khuẩn này lẫn trong bột và sau này gây ra bệnh khoai tây ở bánh mì. Ngoài ra còn có thể gặp *E.coli* nếu nước dùng để nghiền bột không hợp vệ sinh.

IV.8. 2. Ảnh hưởng của vi sinh vật đến phẩm chất của bột trong bảo quản

Bột tương đối đủ các chất dinh dưỡng và vi sinh vật có thể dễ sử dụng các chất dinh dưỡng này để phát triển. Hơn nữa bột không có tính chất bảo vệ như hạt nguyên vẹn. Vì vậy chỉ cần nâng ẩm độ và nhiệt độ lên một ít cũng đủ tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển và gây hư hỏng bột.

Trong điều kiện độ ẩm không khí dưới 79% và nhiệt độ dưới 20^{o}C, ẩm độ của hạt dưới 15% vi sinh vật trong bột sẽ không tăng lên mà dần dần chết đi khi bảo quản bột trong thời gian dài. Nếu ẩm độ của bột chỉ cần tăng lên 1-2% thì vi khuẩn và nấm mốc trong bột sẽ phát triển mạnh.

Tuỳ thuộc vào mức độ nhiễm vi sinh vật trong bột mà bột có thể bị những hư hỏng sau: mốc, tự bốc nóng, chua, ôi…

Mốc là hiện tượng hay gặp ở bột hơn cả. Ở đây ta thấy các loài nấm mốc như: *Aspergillus, Penicilium* mọc ở trong bột trong điều kiện ẩm độ thấp hơn vi khuẩn. Bột bị mốc ở điều kiện ẩm độ không khí cao hơn 80%, bột mốc sẽ bị giảm phẩm chất nhanh chóng vì mốc tạo cho bột hôi không thể khử được. Mùi hôi chủ yếu do *Penicilium* gây ra. Mốc làm tăng độ axit của bột, do mốc phân huỷ các chất béo tạo thành axit tự do, đồng thời làm giảm chất lượng gluten, bị mất tính đàn hồi và thẩm màu.

Mốc bắt đầu từ bên ngoài rồi lan dần vào bên trong sau đó gây ra hiện tượng tự bốc nóng. Mốc và tự bốc nóng làm cho bột giảm chất lượng cảm quan và bột bị kết vón.

Bột chua thường bắt đầu từ những lớp bên trong khác với hiện tượng mốc. Nguyên nhân gây ra bột chua là do vi khuẩn lactic và một số vi khuẩn khác lên men đường có trong bột thành những axit khác nhau. Kết quả là tạo cho bột có độ chua và độ axit trong bột tăng lên rõ rệt. Đường có trong bột là do enzyme amylase của bản thân bột và vi khuẩn phân huỷ tinh bột tạo thành đường.

Bột bị ôi là do sự oxi hoá các chất béo trong bột bằng oxi không khí tạo thành các chất có vị ôi.

Để bảo quản bột tốt cần bảo quản bột ở ẩm độ không khí dưới 79%, ẩm độ của bột không quá 14÷15% trong điều kiện nhiệt độ ổn định. Ở điều kiện này giữ bột được 3÷5 tháng, ở điều kiện ẩm độ bột từ 12÷13% giữ được 1 năm.

IV.8. 3. Vi sinh vật trong sản xuất bánh mì

Quá trình làm bánh mì dựa trên hàng loạt các phản ứng hoá sinh do nấm men gây ra trong khi chuẩn bị nhào bột và nướng bánh. Nấm men biến đổi đường của bột thành rượu và khí cacbonic. Khí này làm phồng gluten của bột làm bánh nở. Ngoài nấm men còn có vi khuẩn lactis. Những vi khuẩn này hoạt động tạo ra axit làm giảm pH của môi trường tạo điều kiện cho nấm men phát triển.

Những giai đoạn quan trọng của quá trình làm bánh mì: chuẩn bị nguyên liệu→ hỗn hợp bột→ lên men→ nặn bánh→ nướng→ bánh thành phẩm.

Bột mì làm bánh được đánh giá phẩm chất dựa vào hai chỉ số chính là tạo khí và giữ khí. Ngoài ra cò chú ý đến độ mịn, màu sắc, độ axit…

Vi sinh vật dùng trong sản xuất bánh mì chủ yếu là *Saccharomyces cerevisiae.*

a. Vi sinh vật làm nở bột nhào và tạo hương bánh mì

Trong khi nhào bột có hai quá trình xảy ra là lên men rượu etylic tạo khí cacbonic nhờ nấm men bánh mì *Saccharomyce cerevisiae,* cùng với quá trình tạo ra axit hữu cơ (chủ yếu là axit lactic) nhờ vi khuẩn lactic có trong bột, sau đó axit hữu cơ tác dụng với rượu tao ra este có mùi vị thơm ngon.

Để làm bánh mì người ta dùng các loại men nước, men khô, men ép từ loài *Saccharomyce cerevisiae.*

Những vi sinh vật tạo hương của bánh mì: trong bột nhào còn có các vi khuẩn lactic lên men điển hình và không điển hình. Ngoài axit lactic nhóm lên men không điển hình còn tạo ra các axit bay hơi, khí hydro, khí cacbonic, rượu etylic. Các vi khuẩn này tạo ra các este và axit làm cho bánh mì có mùi thơm đặc biệt.

Một số vi sinh vật khác: trong bột còn có thể có một số nấm men tạo màng lẫn vào như *Candida, Torulopsis*. Những nấm men này có sẵn trong bột hoặc lẫn vào nấm men ướt hoặc men ép. Những nấm men này có áp lực nở thấp, khi lên men chúng tạo ra sản phẩm phụ làm cho bánh mì có vị cay. Đây là những nấm men tạp làm giảm chất lượng bột nhào và bánh mì.

Đôi khi còn thấy *Escherichia aerogenes*, một dạng của trực khuẩn đường ruột phát triển trong bột nhào, ngoài ra còn có thể gặp trực khuẩn khoai tây và trực khuẩn cỏ khô. Các vi khuẩn có trong bột nhào làm xấu bánh mì, các bào tử của chúng trong ruột bánh không bị chết khi nướng, gặp điều kiện thuận lợi chúng nẩy mầm và phát triển làm hỏng bánh mì.

b. Các chất bổ sung trong bột nhào và ảnh hưởng của chúng đến hoạt động của vi sinh vật

Trong khi làm bột nhào người ta thường thêm một số nhất như muối, đường, chất béo. Những chất này đếu có ảnh hưởng đến sự hoạt động của nấm men bánh mì và vi khuẩn lactis.

Muối ăn: nồng độ muối ăn trên 0,8% kiềm hãm hoạt lực tạo khí của nấm men, làm giảm hoạt lực tạo axit của vi khuẩn lactic.

Đường: khi thêm trên 5% đường sẽ làm tăng hoạt lực của nấm men và vi khuẩn lactic, khí tao thành nhiều hơn, nhưng khi thêm đường trên 10% thì hoạt lực của nấm men và vi khuẩn lactic bị giảm. Khi thêm trên 20% đường thì hoạt lực của nấm men và vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn.

Chất béo: lượng chất béo cho vào bột nhào dưới 5% không ảnh hưởng đến hoạt lực của nấn men. Khi nồng độ cao hơn 10% thì khả năng tạo khí của nấm men và hoạt lực của vi khuẩn bị giảm. Điều này có thể giải thích như sau khi các chất béo bao phủ tế bào nấm men và vi khuẩn lactic làm trở ngại cho quá trình trao đổi chất.

IV.8.4. Hệ vi sinh vật bánh mì

Hệ vi sinh vật bánh mì bắt nguồn từ bột mì, men bánh mì và tạp nhiễm. Khi làm bột nhào men bánh mì hoạt động mạnh tao ra rượu và khí cacbonic làm nở bột nhào. Khi nắn bánh và đem nướng hầu hết vi sinh vật đều bị tiêu diệt trừ một số bào từ chịu nhiệt còn tồn tại.

Khi nướng bánh nhiệt độ bên ngoài tới 180÷200^{o}C, các vi sinh vật ngoài vỏ bánh chết hết và trong ruột bánh nóng dần lên nhưng ở giữa không quá 95÷98^{o}C. các tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật bị chết nhưng bào tử của chúng vẫn còn sống. Khi gặp điều kiện thuận lợi các bào tử của trực khuẩn khoai tây và trực khuẩn cỏ khô phát triển làm hỏng bánh mì.

Trong quá trình vận chuyển và bảo quản còn bị tạp nhiễm các vi sinh vật trong đó có cả trực khuẩn đường ruột rất nguy hiểm. Vì vậy khi vận chuyển và bảo quản cần đảm bảo vệ sinh an toàn.

IV.8.5. Hư hỏng bánh do vi sinh vật

Do bánh mì thành phẩm còn một số bào tử của các trực khuẩn không bị tiêu diệt khi nướng bánh hay các tế bào sinh dưỡng của một số vi sinh vật tạp nhiễm trong quá trình vận chuyển và bảo quản. Đó chính là nguyên nhân gây hư hỏng bánh mì.

Bệnh nhớt ruột bánh mì do vi khuẩn *Bacillus*: bệnh này do trực khuẩn khoai tây và trực khuẩn cỏ khô gây ra. Bệnh này còn gọi là hỏng nhớt bánh mì. Trong bột mì có chất lượng kém có nhiễm các bào tử của hai loại trực khuẩn này. Khi chúng phát triển sẽ tiết ra enzyme protease thuỷ phân protein làm ruột bánh mì bị dính nhớt, thẫm màu và có mùi khó chịu. Để hạn chế bệnh này cần tăng độ axit của bột nhào, làm pH giảm xuống khoảng 4,5÷5 sẽ kiềm hãm trực khuẩn *Bacillus mesentericus* và *Bacillus subtilis* phát triển.

Ruột bánh mì bị đỏ: có một số vi khuẩn và nấm sinh sắc tố phát triển trong ruột bánh mì và làm ruột bánh mì có màu đỏ. Bệnh này không nguy hiểm đối với người, thường gặp vi khuẩn *Bacillus prodigiosum*.

Mốc bánh mì: bánh mì thường bị mốc bên ngoài do tạp nhiễm các bào tử nấm mốc và bảo quản trong điều kiện nóng ẩm cũng như ẩm độ của bánh mì cao và xếp quá chặt.

Bệnh say bánh mì: bệnh này do nấm *Fusarium sporotrichioides* có lẫn trong bột mì từ những hạt lúa mì ở những cây có nấm này ký sinh trên đồng ruộng. Nấm này chịu nhiệt cao và không bị chết khi nướng bánh. Khi chúng phát triển trên bánh mì không thấy dấu hiệu hư rỏ rệt nhưng chúng tiết ra độc tố khi ăn phải người bị ngộ độc thấy ngây ngất như say rượu.

Tài liệu tham khảo chương IV:

1. Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm – Lương Đức Phẩm – NXB nông nghiệp
2. Vi sinh công nghiệp – Lê Xuân Phương – NXB xây dựng

Câu hỏi ôn tập chương IV:

1. Hệ vi sinh vật thịt, sự hư hỏng thịt và các phương pháp bảo quản thịt?
2. Hệ vi sinh vật cá, sự hư hỏng cá và các phương pháp bảo quản cá?
3. Hệ vi sinh vật trứng, sự hư hỏng trứng và các sản phẩm trứng?
4. Sữa, hệ vi sinh vật sữa, sự hư hỏng sữa và các phương pháp bảo quản?
5. Hệ vi sinh vật rau quả
6. Hệ vi sinh vật tôm, mực và các động vật thân mềm?
7. Hệ vi sinh vật hại nông sản?
8. Hệ vi sinh vật bột và bánh mì?

Chương V: VI SINH VẬT GÂY BỆNH VÀ NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM (5t)

Con người, động vật, thực vật và vi sinh vật có mối liện hệ qua lại đa dạng và phức tạp. Trong đó quan hệ với nhóm vi sinh vật gây bệnh có ý nghĩa cực kỳ quan trọng. Những vi sinh vật gây bệnh ở người và động vật được chú ý nhiều hơn cả, vì chúng là mầm bệnh chung cho cả hai giới trong nhiều trường hợp.

Các loài vi sinh vật gây bệnh phần nhiều là thể ký sinh và thể hoại sinh. Hai thể này trong một số trường hợp chuyển từ thể hoại sinh sang ký sinh. Ví dụ trực khuẩn hoại sinh đường ruột trong trường hợp đặc biệt có thể gây viêm thận, bàng quang và một số tổ chức khác.

Mỗi loài vi sinh vật chỉ gây một bệnh xác định và thể hiện triệu chứng lâm sàng đặt trưng, ta gọi đó là tính đặc hiệu. Đặc tính này rất quan trọng, nó cho ta biết được quá trình nhiễm khuẩn, vị trí khu trú của mầm bệnh, những cơ quan của cơ thể bị ký sinh, đặc điểm diễn biến bệnh, cơ chế tách mầm bệnh ra khỏi cơ thể vật chủ và sự hình thành tính miễn dịch của cơ thể.

V.1. VI SINH VẬT GÂY BỆNH

Bệnh lây qua thực phẩm là những bệnh có liên quan tới việc sử dụng thức ăn kém chất lượng, trong đó có thức ăn nhiễm vi sinh vật và mang mầm bệnh. Những mầm bệnh này nhiễm vào thực phẩm từ các nguồn khác nhau như từ không khí, nước, đất, từ chân tay và quần áo công nhân… Các bệnh qua đường thức ăn là: lỵ, tả, thương hàn, phó thương hàn, lao, nhiệt thán… Trong đó phổ biến hơn cả là các bệnh về đường tiêu hoá.

Các bệnh nhiễm khuẩn thực phẩm phát sinh khi vi sinh vật phát triển mạnh mẽ và tạo thành độc tố trong cơ thể vật chủ. Những bệnh này lây lan chủ yếu qua đường ăn uống.

Đối với một số mầm bệnh như như thương hàn, tả, lỵ… thực phẩm không phải là môi trường thuận lợi cho chúng phát triển song ở đây chúng có thể sống được thời gian dài, thức ăn là cầu nối cho chúng xâm nhập vào cơ thể.

Nhiễm khuẩn thực phẩm khá nguy hiểm vì con người sử dụng thực phẩm hằng ngày, vì vậy có khả năng phát triển thành dịch hay nhiễm trên diện rộng.

Từ khi mầm bệnh vào cơ thể đến khi phát bệnh cần một thời gian để chúng thích ứng với cơ thể rồi sinh sản và phát triển và lan rộng trong cơ thể nhưng chưa có dấu hiệu của bệnh, thời gian này là thời gian ủ bệnh. Thời gian ủ bệnh thường phụ thuộc vào sức đề kháng của cơ thể từng người.

V.1.1. Bệnh truyền nhiễm do thực phẩm nhiễm vi khuẩn

a. Bệnh thương hàn

Đây là bệnh nhiễm khuẩn nặng ở người, bệnh này vừa có tính truyền nhiễm vừa là bệnh nhiễm khuẩn-độc tố.

Mầm bệnh là một vài loài thuộc nhóm vi khuẩn *Salmonella*, một số loài không gây bệnh và một số loài gây bệnh có điều kiện. Tất cả các vi khuẩn nhóm này đều giống nhau về hình dáng và đặc tính sinh lý, nhưng có một đặc điểm khác

nhau là những loài không gây bệnh lên men được đường lactose, còn các loài gây bệnh không có khả năng này.

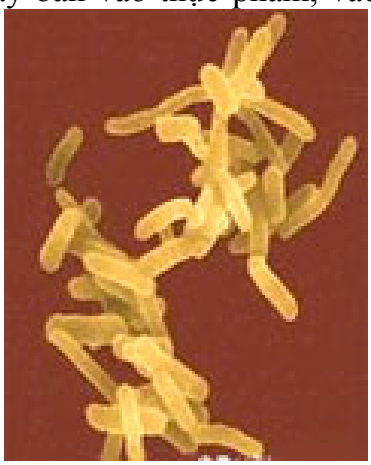
Salmonella có hình que, uốn thành các vòng tròn, chuyển động và không tạo thành các bào tử và kỵ khí tuỳ tiện. Nhiệt độ tối ưu là 37^{o}C, pH thích hợp là môi trường kiềm nhẹ. Ở 5^{o}C chúng không phát triển được, ở 70^{o}C chúng chết sau 10 phút. Chúng thường có trong ruột bánh mì, bơ, mỡ, thực phẩm bảo quản lạnh…

Mầm bệnh theo thức ăn vào đường tiêu hoá, khu trú ở ruột non rồi vào hạch bạch huyết và các tổ chức khác. Vi khuẩn phát triển trong cơ thể con người gây bệnh sốt thương hàn và sốt phó thương hàn. Một lượng lớn tế bào sinh nội độc tố và khi chết sẽ giải phóng ra gây ngộ độc, thời gian ủ bệnh là 2 tuần. Bệnh xảy ra ở ruột non gây ỉa chảy dữ dội, kèm theo sốt, người suy nhược mệt mỏi, một số ca nặng dẫn đến tử vong.

Mầm bệnh cò lưu lại trên cơ thể người bệnh một thời gian dài và phát tán vào môi trường xung quanh. Phân của người và vật bị bệnh thương hàn có rất nhiều vi khuẩn *Salmonella* và đây là nguồn lây nhiễm sang những đối tượng khác.

b. Bệnh lỵ

Bệnh lỵ gây ra do vi khuẩn *Shigella shiga*, bệnh thường phát trên diện rộng, nguồn nhiễn là từ người bệnh cấp tính hay mãn tính. Bệnh truyền nhiễm đa số qua tay bẩn vào thực phẩm, vào nước. Ở môi trường bên ngoài như nước ao hồ, rau quả, bát đũa vi khuẩn lỵ sống được vài tuần.



Shigella shiga là trực khuẩn đường ruột, không có tiêm mao, hô hấp tuỳ tiện, nhiệt độ phát triển tối ưu là 37^{o}C và môi trường trung tính. Ở nhiệt độ 60^{o}C chúng chết sau 10-15 phút.

Phân của người hay vật bị bệnh là nguồn mầm bệnh nguy hiểm, mầm bệnh có thể truyền sang sữa, các sản phẩm từ thịt, nước uống và rau quả.

Thường ủ bệnh trong vòng 5 đến 7 ngày, vi khuẩn gây viêm loét ruột già và gây nhiễm độc nhẹ toàn thân do độc tố.

c. Bệnh Bruxella

Là bệnh truyền nhiễm ở người và tất cả các động vật kể cả ở gia cầm nhưng nhiều nhất là ở các gia súc có sừng.

Vi khuẩn gây bệnh có tên là *Brucella*, có hình tròn hay hình hơi dài, gram âm, không có tiêm mao và bào tử, hô hấp tuỳ tiện, nhiệt độ phát triển tối ưu là 37^{o}C, trong đất vi khuẩn này sống được 3-4 tuần, trên quần áo khoảng 30 ngày,

trong sữa 8 ngày. Vi khuẩn này chịu hạn, chịu nhiệt, nhưng nhanh chết ở nhiệt độ cao, ở nhiệt độ 100^{o}C sẽ chết sau vài giây.

Vi khuẩn này gây sẩy thai, đẻ non ở động vật những vi khuẩn ở dê và cừu là nguy hiểm nhất đối với người, đó là loài *Brucella melitensis*. Mầm bệnh xâm nhập qua sữa, đặc biệt là uống sữa tươi bị nhiễm khuẩn. Ngoài ra mầm bệnh dễ rơi vào niêm mạc miệng, mắt, qua da mà không cần vết trầy xước. Sau đó mầm bệnh vào hạch bạch huyết, vào máu và đi vào khắp cơ thể đến nhiều cơ quan như gan, thận, lách, xương, tuỷ, phổi…

Thời gian ủ bệnh là 4 đến 20 ngày, lúc đầu thì bệnh nhân cảm thấy mệt mỏi, sau dần đau các khớp và cơ bắp, phát ban trên da. Bệnh nhân nặng gây sốt từng cơn từ nhiệt độ cao về nhiệt độ bình thường, thời gian kéo dài từ vài tuần đến hàng năm. Hậu quả của bệnh là làm teo dịch hoàn ở nam và gây sẩy thai, đẻ non đối với phụ nữ.

d. Bệnh lao

Bệnh lao gây ra do trực khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* do Robert Koche tìm ra năm 1882. Chúng có hình que ngắn hoặc dài, mảnh hơi uốn cong, có khi có hình sợi phân nhánh, không chuyển động, không sinh bào tử, hiếu khí điển hình. Nhiệt độ tối ưu là 37^{o}C, pH thích hợp là trung tính hay kiềm nhẹ. Ở môi trường ngoài vi khuẩn lao sống khá lâu, trên quần áo 2 tháng, trong đất ẩm vài tuần, trong sữa chua 20 ngày…

Vi khuẩn lao có thể chịu đựng được môi trường axit, nhạy cảm với ánh sáng mặt trời và nhiệt độ cao.

Nguồn lây nhiễm là từ người và động vật mắc bệnh. Mầm bệnh phát tán vào trong không khí bởi các hạt dịch nước bọt do khạc nhổ, hắt hơi. Bệnh truyền chủ yếu qua đường hô hấp nhưng có trường hợp qua đường tiêu hóa.

Hiện nay ngươi ta đã có thuốc điều trị bệnh này nhưng bắt đầu xuất hiện nhiều biến thể có thể kháng lại thuốc kháng sinh.

e. Bệnh than

Bệnh than gây ra do vi khuẩn *Bacterium anthracis*, là trực khuẩn lớn có bào tử, không chuyển động, tế bào thường kết thành chuỗi, hô hấp hiếu khí, bào tử có sức đề kháng cao thường thấy xuất hiện ở trâu, bò, cừu, ngựa vì thế thường lây sang người qua đường tiêu hoá.

Mầm bệnh than từ động vật chuyển sang người do ăn phải thức ăn, tiếp xúc với thịt hoặc chăm sóc con vật bị bệnh, do vận chuyển, giết mổ các con vật bị bệnh. Tuỳ thuộc vào con đường xâm nhập của vi khuẩn vào cơ thể, bệnh than ở người thể hiện với 3 dạng: ruột, phổi và da.

Ở ruột do ăn phải thịt, sữa các con vật bị bệnh, sẽ gây choáng váng đầu, chóng mặt quay cuồng, nôn mửa, ỉa ra máu và sau 5-7 ngày thì chết.

Ở phổi do nhiễm qua đường hô hấp.

Trên da do tiếp xúc với các con vật bị bệnh, mầm bệnh ở da sau đó vào máu và phát bệnh.

f. Bệnh tả

Đây là bệnh nhiễm trùng đường ruột do vi khuẩn *Vibrio* gây tiêu chảy nặng và mất nước nếu không điều trị sẽ gây tử vong. Vi khuẩn *Vibrio* có hình uốn cong giống dấu phẩy nên còn gọi là phẩy khuẩn tả. Chúng không sinh bào tử và có thể chuyển động, sinh nội và ngoại độc tố. Mầm bệnh phát tán vào đất, nước, không khí, dụng cụ, bát đũa và thực phẩm. Mầm bệnh từ các đống phân, rác và được ruồi nhặng mang đến các đối tượng trên.

Phẩy khuẩn tả bền với môi trường bên ngoài, trong đất có thể sống đến 25 tuần, trong cá, cua, hàu sống tới 40 ngày. Người ta còn tìm thấy chúng ở các nguồn nước ao hồ.

Ở nhiệt độ sôi của nước phẩy khuẩn tả chết sau vài giây. Chúng rất nhạy cảm với các chất sát khuẩn và môi trường axit. Đặc tính của vi khuẩn này chúng làm rối loạn trao đổi dịch muối-nước, rối loạn điều hoà thân nhiệt và sự hoạt động của hệ tim mạch.

Triệu chứng lâm sàng là đi ngoài nhiều lần làm cơ thể mất nước, phá vỡ vòng tuần hoàn máu, giảm thân nhiệt tới 35^{o}C, gây co giật, xuất hiện hiện tượng không có nước giải, tỉ lệ tử vong khá lớn.

g. Bệnh lợn đóng dấu

Bệnh do trực khuẩn *Erysipelothix insidion* gây ra ở lợn, nhiều loài động vật có vú, gia cầm và cá.

Vi khuẩn này có thể sống được trong thịt muối đến 10 tuần và dăm bông hun khói tới 3 tháng. Thịt lợn ốm chứa nhiều mầm bệnh, khi đun nấu không kỹ vẫn có thể tồn tại trong thịt.

Người tiếp xúc với các vật bị bệnh cũng như ăn phải thit có nhiễm trực khuẩn này có thể mắc bệnh. Những chỗ tiếp xúc với vi khuẩn sẽ bị sưng tấy, có dấu đỏ trên da. Bệnh phát ra có dấu hiệu cục bộ hoặc toàn thân, có thể bại huyết nặng dẫn đến tử vong**.**

V.1.2. Bệnh truyền nhiễm do thực phẩm nhiễm vi rút

a. Bệnh sốt lở mồm long móng

Bệnh này do một loại virus gây ra ở gia súc và có thể truyền sang người. Virus lở mồng long móng là loại virus nhỏ nhất, không chịu được nhiệt độ cao, môi trường kiềm, các chất sát khuẩn mạnh. Khi tách ra khỏi cơ thể động vật nó có thể sống được 2 tháng. Nó tồn tại trong sữa từ 30-45 ngày và bị chết khi đun nóng trên 50^{o}C.

Người mắc bệnh khi tiếp xúc với con vật bị bệnh như chăm sóc, giết mổ, sơ chế và ăn phải thịt, uống sữa có mầm bệnh. Thời gian ủ bệnh khoảng 1 tuần.

Khi phát hiện bệnh người thấy mệt mỏi, viêm niêm mạc miệng, uống phải sữa có mầm bệnh bị viêm dạ dày, ruột. Bệnh thường nhẹ nhưng cũng có trường hợp chết vì bệnh này.

b. Bệnh cúm gia cầm

Bệnh cúm gà do virus H_5N_1 gây ra trên gia cầm và chim. Khi tiếp xúc với các vật bị bệnh con người sẽ bị sốt cao, suy hô hấp và dẫn đến tử vong. Hiện nay virus cúm gia cầm có nhiều biến thể khác nhau và rất nguy hiểm. Chưa thấy có dấu hiện virus cúm truyền từ người qua người. Để phòng tránh không nên tiếp xúc với gia cầm bị bệnh. Cách ly những người có biểu hiện của bệnh, khi nghi ngờ bị cúm nên đến các cơ sở y tế để xét nghiệm và có biện phát điều trị kịp thời.

Thời gian gần đây tại một số nước châu Âu xuất hiện bệnh bò điên rất nguy hiểm. Người bị nhiễm virus này sẽ bị tử vong.

V.2. BỆNH NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM

Ngộ độc thực phẩm hay còn gọi là trúng độc thực phẩm, có thể gây ra bởi nhiều nguyên nhân. Có thể do ta ăn phải những chất độc từ nguồn vô cơ hoặc từ nguồn các chất hữu cơ. Nhưng phần lớn ngộ độc thực phẩm do các vi sinh vật khác nhau gây nên. Có thể do trong thực phẩm có vi sinh vật hay độc tố của chúng.

V.2.1. Ngộ độc do nấm

Ngộ độc thực phẩm do vi sinh vật có thể xảy ra khi ta ăn phải ngũ cốc có nhiều nấm. Trong ngủ cốc thường có nhiều loài nấm phát triển, độc tố của chúng chịu được nhiệt độ rất cao. Khi chế biến thực phẩm chúng vẫn có khả năng tồn tại. Triệu chứng là sau vài giờ ăn phải thức ăn có độc tố thì người nóng, đau trong họng và miệng, trường hợp nặng giống trường hợp ngộ độc do vi khuẩn.

Độc tố mycotoxin do nấm mốc sinh ra rất đa dạng và phức tạp về cấu trúc cũng như bệnh lý. Thông thường nhiễm mycotoxin là gan, thận bị tổn thương, có thể thêm là túi mật, nặng sẽ tác động đến hệ tuần hoàn, đến hệ thần kinh, bị sẩy thai…

Vấn đề ngộ độc thức ăn do nấm rất phức tạp và khó khắc phục, nó đòi hỏi điều kiện sống phải được nâng cao, phải nâng cao trình độ dân trí để người tiêu dùng hiểu biết về vấn đề này.

V.2.2. Ngộ độc do tảo

Trong vài chục năm gần đây chúng ta mới quan tâm đến các loài tảo độc, đặc biệt là việc ô nhiễm các thuỷ vực làm tần suất xuất hiện các loài tảo độc ngày càng tăng.

Sự nguy hại của tảo độc đối với con người là độc tố của tảo phycotoxin, độc tố của tảo gồm 3 nhóm chính:

- Độc tố gây hại cho gan.
- Độc tố gây hại cho hệ thần kinh.
- Độc tố gây dị ứng da và tiêu chảy.

Tảo là thức ăn quan trọng của các loài thuỷ sản như tôm, cá, nhuyễn thể. Tảo độc xuất hiện sẽ làm giảm sản lượng cũng như chất lượng của thuỷ sản. Từ những sản phẩm làm thức ăn bị nhiễm độc tố tảo, người ăn phải cũng bị ngộc độc cấp tính, mãn tính rất nguy hiểm. Khi các độc tố phycotoxin nhiễm vào nước nếu con người dùng nước này cho sinh hoạt sẽ ảnh lớn đến sức khoẻ.

V.2.3. Ngộ độc thức ăn do độc tố của vi khuẩn

a. Ngộ độc do độc tố của vi khuẩn độc thịt

Đây là dạng ngộ độc rất nặng và có tỷ lệ tử vong cao. Vi khuẩn độc thịt có tên là *Clostridium botulinum*, chúng sinh ra độc tố botulin, vì vậy vi khuẩn này gọi là vi khuẩn độc thịt.

Vi khuẩn có hình que và sinh bào tử lớn hơn kích thước của tế bào. Trực khuẩn này sống kỵ khí rất nghiêm ngặt, sinh trưởng mạnh ở nhiệt độ từ 20-37^{o}C, dưới 15^{o}C nó vẫn phát triển nhưng ít tạo độc tố.

Lên men được một số đường và tạo axit, chịu lạnh tốt, nhạy cảm với môi trường axit, pH dưới 4,5 không phát triển được. Trong môi trường có từ 6-8% NaCl sẽ không phát triển được. Nhưng không phá huỷ được độc tố đã được tạo thành trong thực phẩm.

Tế bào sinh dưỡng bị chết ở nhiệt độ 80^{o}C trong vòng 30 phút, nhưng bào tử rất bền với nhiệt.

Clostridium botulinum phổ biến rộng rải trong đất, bùn ao hồ, phân chuồng, trong ruột cá và các động vật máu nóng.

Trong đồ hộp chúng phát triển sinh hơi làm cho đồ hộp bị phồng lên.

Độc tố vi khuẩn *Clostridium botulinum* là ngoại độc tố botulin, đây là loại độc tố mạnh nhất, nó độc gấp 7 lần so với độc tố vi khuẩn uốn ván, chỉ cần một lượng khoảng 0,035mg là có thể giết chết người.

Đặc điểm của độc tố này là không phân huỷ trong môi trường axit, chịu nhiệt độ thấp, nhưng bị phân huỷ ở nhiệt độ cao và môi trường kiềm.

Sau khi ăn phải độc tố botulin sẽ bị ngộ độc, thời gian từ vài giờ đến vài ngày, có khi đến 10 ngày tuỳ thuộc vào lượng độc tố. Độc tố này hầu như không ảnh hưởng đến hê tiêu hoá mà tác dụng lên hệ thần kinh.

b. Ngộ độc do độc tố của tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*)

Hiện nay ngộ độc do độc tố của tụ cầu khuẩn hay gặp hơn cả. Tụ cầu khuẩn *Staphylococcus* phổ biến rộng rãi trong thiên nhiên: trong không khí, đất, nước, trong dịch mũi, trong khoang miệng, họng của người và động vật, trên da ở các mụn lở và đặt biệt trên vú của bò sữa bị viêm.

Staphylococcus có hình cầu kết thành chùm hoặc thành từng đám, không tạo thành bào tử và chịu được khô hạn, sinh sắc tố trên môi trường nuôi cấy. Nhiệt độ thích hợp cho chúng phát triển là 37^{o}C, trên 4^{o}C là chúng có thể tạo thành độc tố. Tụ cầu khuẩn chịu được nhiệt độ đến 70^{o}C, ở nhiệt độ 75-80^{o}C chúng bị chết sau 20 phút. Chúng là vi sinh vật hiếu khí tuỳ tiện, môi trường thích hợp là ẩm và pH trung tính, axit hay kiềm nhẹ. pH dưới 4 chúng ngừng phát triển, chịu nồng độ muối đến 12% và đường đến 50%, vì vậy chúng có thể tồn tại trong bánh ngọt, phomat mặn.

Tụ cầu mủ vàng *Staphylococcus aureus* sinh ra một loại độc tố gây ngộ độc khác nhau: gây viêm họng, viêm da mưng mủ. Tụ cầu khuẩn phát triển trên thực phẩm sinh ra ngoại độc tố ruột. Độc tố này bền với nhiệt, chịu được môi trường axit có pH là 5.

Con người rất nhạy cảm với độc tố của tụ cầu khuẩn vàng, có đến 90% người khi ăn phải độc tố này bị ngộ độc. Thời gian phát bệnh từ 1-6 giờ tuỳ thuộc vào lượng độc tố trong thức ăn. Người bệnh lợm giọng, quặn bụng, nôn mửa, ỉa chảy, co giật, nhứt đầu, toát mồ hôi…

c. Ngộ độc do độc tố của *Bacillus cereus*

Vi khuẩn *Bacillus cereus* có nhiều trong đất, hiếu khí, sinh bào tử và chuyển động yếu, nhiệt độ thích hợp cho chúng phát triển là 37^0C. Phát triển tốt trên môi trường trung tính hay kiềm nhẹ, bào tử chịu được nhiệt độ cao

Nếu 1g thực phẩm chứa trên 100 ngàn tế bào trực khuẩn này thì thực phẩm này nguy hiểm cho con người. Trong thực phẩm trực khuẩn sinh độc tố và gây ngộ độc. Triệu chứng ngộ độc là nôn mửa, ỉa chảy, suy nhược toàn thân.

Thường bị ngộc độc do ăn phải thịt, cá, sữa, bánh kẹo bị tạp nhiễm.

d. Ngộ độc do nhiễm khuẩn - độc tố

Đây là nhóm bệnh do ngộ độc có nguồn gốc vi sinh vật ở vị trí trung gian giữa nhiễm khuẩn gây bệnh điển hình và ngộ độc do độc tố thực phẩm. Các bệnh này có triệu chứng giống với các bệnh ngộ độc do độc tố ở đường tiêu hoá nhưng khác là bệnh có thể lây truyền và ngộ độc xảy ra với điều kiện là ăn phải một số lượng vi khuẩn sống tương đối lớn. Vì vậy ngộ độc dạng này còn gọi là dạng ngộ độc do nhiễm khuẩn-độc tố hay ngộ độc thức ăn có điều kiện.

Các vi khuẩn mầm bệnh phát triển được trên cả thực phẩm và cơ thể con người. Bệnh phát triển với các triệu chứng gần với nhiễn độc tố cũng như nhiễm khuẩn. Ngộc độ dạng này phần lớn là do vi sinh vật tự nhiên có trong thực phẩm.

Nhiễm khuẩn-độc tố có thời gian ủ bệnh ngắn khoảng vài giờ. Thông thường phát bệnh khi ăn phải thức ăn có số lượng vi sinh vật với số lượng lớn, từ 10^5 đến 10^6 tế bào/1g thức ăn. Ở trong cơ thể vi khuẩn xâm nhập vào trong cơ thể qua màng ruột non hay thành dạ dày hoặc khu trú ở màng ruột non. Nói chung là chúng tiếp tục sinh trưởng và phát triển trong cơ thể và đồng thời sinh ra nội độc tố. Khi chúng phát triển làm tổn hại đến các cơ quan trong cơ thể, có thể gây sốt và khi chúng chết nội độc tố giải phóng ra ngoài gây ngộ độc giống như triệu chứng ngộ độc đường tiêu hoá.

Phổ biến nhất hiện nay là ngộc độc do vi khuẩn *Salmonella*: Trực khuẩn đường ruột bao gồm các giống như *Salmonella,* trực khuẩn lỵ *Shigella*, và các vi khuẩn hoại sinh không gây bệnh sống trong ruột như trực khuẩn đại tràng và một số vi khuẩn hoại sinh khác. *Salmonella* là một giống bao gồm nhiều loài vi khuẩn có tính chất gần giống nhau gây nên những bệnh thương hàn, viêm ruột non và ngộ độc thức ăn. Một số loài gây ngộ độc sau đây:

Salmonella entertedis là trực khuẩn ngắn, gram âm, chuyển động được nhờ tiêm mao, chúng không có bào tử. Có khả năng lên men glucose, mantoza để tạo thành các axit và khí. Chúng không phân giải được lactose, saccaroza. Nhiệt độ phát triển tối ưu của chúng là 37^oC. Nếu đun nóng ở 60^oC thì chúng bị chết sau một giờ. Sống rất lâu ở nhiệt độ thấp, chúng gây ra bệnh đau ruột non.

Salmonella typhimurium thường gây bệnh thương hàn ở chuột và ngộ độc thực phẩm ở người.

Các loài *Salmonella* có thể sống và tồn tại trong thịt ướp muối dưới 29% tronh nhiệt độ từ 6 - 12^{o}C và phần lớn chúng sinh ra nội độc tố. Nội độc tố của chúng có hai loại: nội độc tố gây xung huyết, mụn loét trên ruột và nội độc tố gây rối loạn thần kinh. Thời kỳ ủ bệnh từ vài giờ đến vài ngày. Triệu chứng đầu tiên là buồn nông, nhức đầu, nhiệt độ cao từ 38 - 30^{o}C . Sau đó nôn mửa, đi ngoài phân lỏng. Thường sau 2 đến 3 ngày là khỏi, tỷ lệ chết tuỳ thuộc vào khu vực. Đông Nam Á khoảng 1%, châu Âu cao hơn.trúng độc *Salmonella* thường do các nguồn thực phẩm từ thịt cá đem lại (70-90%) như thịt gà, thịt lợn, cá sữa, trứng. Các loại thực phẩm gây ngộ độc thường có nhiệt độ cao, trong thời kỳ *Salmonella* phát triển có mùi chua.

Ngộ độc do *Proteus*: đây là loài trực khuẩn thấy phổ biến rất nhiều trong thiên nhiên. Thấy phát triển nhiều trên thịt, cá, máu, gan. Chúng thường gây bệnh nguy hiểm ở đường ruột.

Ngộ độc do *E.coli*: *E.coli* còn có tên là *Bacterium coli commune*, chúng thường thấy ở phần sau của ruột, ít khi tìm thấy trong dạ dày. *E.coli* có dạng hình cầu, đứng riêng lẻ, đôi khi xếp thành chuỗi ngắn. Có lông ở xung quanh nên có thể chuyển động được. Chúng thuộc loài hiếu khí và hiếu khí tuỳ tiện, nhiệt độ sinh trưởng từ 15 - 24^{o}C, thích hợp ở 37^{o}C, pH thích hợp là 7,4. có khả năng lên men glucose, mantose sinh ra H_2S. *E.coli* bị tiêu diệt ở 55^{o}C trong vòng một giờ và ở 60^{o}C trong vòng 15 đến 30 phút.

E.coli có sẵn trong ruột, chỉ gây bệnh khi cơ thể suy yếu và sức đề kháng của cơ thể kém. Thường gây cho bệnh nhân tăng nhiệt, đi ngoài có máu theo phân.

V.3. CÁC BIỆN PHÁP NGĂN NGỪA BỆNH QUA ĐƯỜNG THỰC PHẨM

V.3.1. Đối với nhà sản xuất

Nhiều bệnh do thực phẩm đem lại chủ yếu do chúng ta mắc phải một số sai lầm sau:

- Không tuân thủ đúng qui trình sản xuất các mặt hàng thực phẩm, trong vận chuyển và bảo quản thiếu vệ sinh.
- Không sử dụng các biện pháp thích hợp trong sản xuất như thanh trùng, xử lý bằng hoá chất, bằng áp suất, bằng nhiệt độ.

Để tránh các bệnh do thực phẩm gây ra cần có các biện pháp sau đây:

- Tôn trọng các yêu cầu về vi sinh trong nhà máy như nguyên liệu, qui trình chế biến, bảo quản và vận chuyển.
- Tôn trọng kỷ luật vệ sinh cá nhân. Tuyệt đối không cho công nhân bị bệnh vào làm việc trong các nhà máy chế biến thực phẩm. Cần có chế độ khám chữa bệnh định kỳ cho công nhân.
- Có chế độ vệ sinh kho tàng, nhà máy thường xuyên.
- Kiểm tra nguyên liệu, bán thành phẩm , thành phẩm thường xuyên và tìm biện pháp thiết thực để khắc phục hư hỏng và nhiễm trùng.
- Nâng cao mức độ tự động hoá và cơ giới hoá trong chế biến thực phẩm.
-Áp dụng các biện pháp quản lý chất lượng thực phẩm như HACCP, GMP, SSOP, ISO…

V.3.2. Đối với người làm bếp: tuân thủ 10 nguyên tắc vàng sau đây:

- *Chọn thực phẩm an toàn.* Chọn thực phẩm tươi. rau, quả ăn sống phải được ngâm và rửa kỹ bằng nước sạch. Quả nên gọt vỏ trước khi ăn. Thực phẩm đông lạnh để tan đá, rồi làm đông đá lại là kém an toàn.
- *Nấu chín kỹ thức ăn.* Nấu chín kỹ hoàn toàn thức ăn, là bảo đảm nhiệt độ trung tâm thực phẩm phải đạt tới trên 70°C.
- *Ăn ngay sau khi nấu.* Hãy ăn ngay sau khi vừa nấu xong, vì thức ăn càng để lâu thì càng nguy hiểm.
- *Bảo quản cẩn thận các thức ăn đã nấu chín.* Muốn giữ thức ăn quá 5 tiếng đồng hồ, cần phải giữ liên tục nóng trên 60°C hoặc lạnh dưới 10°C. Thức ăn cho trẻ nhỏ không nên dùng lại.
- *Nấu lại thức ăn thật kỹ.* Các thức ăn chín dùng lại sau 5 tiếng, nhất thiết phải được đun kỹ lại.
- *Tránh ô nhiễm chéo giữa thức ăn chín và sống, với bề mặt bẩn.* Thức ăn đã được nấu chín có thể bị nhiễm mầm bệnh do tiếp xúc trực tiếp với thức ăn sống hoặc gián tiếp với các bề mặt bẩn (như dùng chung dao, thớt để chế biến thực phẩm sống và chín).
- *Rửa tay sạch trước khi chế biến thức ăn và sau mỗi lần gián đoạn để làm việc khác.* Nếu bạn bị nhiễm trùng ở bàn tay, hãy băng kỹ và kín vết thương nhiễm trùng đó trước khi chế biến thức ăn.
- *Giữ sạch các bề mặt chế biến thức ăn.* Do thức ăn dễ bị nhiễm khuẩn, bất kỳ bề mặt nào dùng để chế biến thức ăn cũng phải được giữ sạch. Khăn lau bát đĩa cần phải được luộc nước sôi và thay thường xuyên trước khi sử dụng lại.
- *Che đậy thực phẩm để tránh côn trùng và các động vật khác.* Che đậy giữ thực phẩm trong hộp kín, chạn, tủ kính, lồng bàn... Đó là cách bảo vệ tốt nhất. Khăn đã dùng che đậy thức ăn chín phải được giặt sạch lại.
- *Sử dụng nguồn nước sạch an toàn.* Nước sạch là nước không màu, mùi, vị lạ và không chứa mầm bệnh. Hãy đun sôi trước khi làm đá uống. Đặc biệt cẩn thận với nguồn nước dùng nấu thức ăn cho trẻ nhỏ.

V.3.2. Đối với người tiêu dùng

- Rửa tay trước khi ăn, nhất là khi ăn bốc.
- Chỉ uống nước chín (đun sôi để nguội), hoặc đã qua thiết bị tinh lọc.
- Phòng ngộ độc bởi phẩm màu độc hại: luôn nghi ngờ thịt sống, chín nhuộm màu khá thường: xôi màu gấc không thấy hột và thịt gấc; bánh, kẹo, mứt có màu lòe loẹt, không có địa chỉ sản xuất.
- Phòng ngộ độc bởi hóa chất bảo vệ thực vật: rau, củ, quả tươi, đặc biệt thức ăn sống phải được ngâm kỹ rồi rửa lại vài lần bằng nước sạch hoặc dưới vòi nước chảy.
- Phòng ngộ độc bởi thực phẩm có độc tự nhiên: không ăn nấm, củ, rau, quả hoang dại nghi có độc, sản phẩm động vật có độc (phủ tạng, và da cóc, cá nóc, ...).

- Phòng vi khuẩn sống sót làm thực phẩm biến chất, có hại: Không dùng đồ hộp lon phòng cứng ở hai đáy hộp, bị gỉ, móp méo; sữa, nước giải khát trong hộp giấy bị phơi ngoài nắng dù còn hạn sử dụng; nước giải khát, nước đóng chai bị biến màu, đục, có cặn.
- Phòng vi khuẩn nhân lên trong điều kiện môi trường: thức ăn chín để qua bữa quá giờ nếu không được bảo quản lạnh (dưới 10°C), phải được hâm lại kỹ hoặc chần nước sôi.
- Phòng ô nhiễm chéo sang thực phẩm chế biến sẵn (thịt quay, luộc) để ăn ngay từ: cá, dụng cụ bán hàng như dao, thớt, đũa, thìa, que gắp đang chế biến thực phẩm sống hoặc chưa được làm sạch; bàn tay, trang phục của người bán hàng trực tiếp bị bẩn...
- Không mua hàng bao gói sẵn không có địa chỉ nơi sản xuất, đóng gói và hàng hết hạn sử dụng.
- Tránh ăn ở quán không có nước sạch hoặc cách xa nguồn nước sạch và không có tủ kính che đuổi ruồi, bụi, chất độc môi trường (nếu ở mặt đường, vỉa hè) hoặc không có lưới che ruồi, nhặng (nếu ở trong nhà, chợ có mái che).

Tài liệu tham khảo:

1. Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm – Lương Đức Phẩm – NXB Nông nghiệp
2. Vệ sinh và an toàn thực phẩm – Nguyễn Đức Lượng, Phạm Minh Tâm – NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Câu hỏi ôn tập chương V:

1. Bệnh truyền nhiễm qua thực phẩm? các loại bệnh thường gặp do vi khuẩn? do virus?

2.Thế nào là ngộ độc thực phẩm? Các dạng ngộ độc thực phẩm do nấm, do tảo, do vi khuẩn?

3. Các biện pháp ngăn ngừa bệnh qua đường thực phẩm?

CHƯƠNG VI: CÁC PHƯƠNG PHÁP KIỂM NGHIỆM VI SINH VẬT THỰC PHẨM (9t)

VI.1. Các chỉ tiêu vi sinh vật trong thực phẩm

VI.1.1. Vi sinh vật chỉ thị

Vi sinh vật chỉ thị vệ sinh thực phẩm là những nhóm (hoặc loài) có mặt trong thực phẩm ở một giới hạn nhất định được coi là có thể dẫn tới nguy hiểm.

Vi sinh vật chỉ thị vệ sinh thực phẩm có ý nghĩa rất lớn trong việc đánh giá an toàn về vi sinh và chất lượng thực phẩm.

Vi sinh vật chỉ thị vệ sinh thực phẩm bao gồm:

1. Vi sinh vật ưa nhiệt độ trung bình
    - Vi sinh vật hiếu khí ưa nhiệt độ trung bình
    - Vi sinh vật kị khí ưa nhiệt độ trung bình
    - Vi sinh vật ưa lạnh
2. Coliforms và E.coli
3. Tổng số vi khuẩn đường ruột
4. Cầu khuẩn đường ruột
5. Tụ cầu khuẩn

VI.1.2. Ý nghĩa vi sinh vật chỉ thị

a. Vi sinh vật hiếu khí ưa nhiệt độ trung bình

Tổng lượng vi sinh vật hiếu khí ưa nhiệt độ trung bình cho biết lượng vi sinh vật hiếu khí ưa nhiệt độ trung bình mà nguyên liệu và sản phẩm thực phẩm bị nhiễm. Khi đó người quản lý và sản xuất thực phẩm phải kiểm tra lại điều kiện vệ sinh trong sản xuất, điều kiện bảo quản và phân phối.

Thực phẩm thực sự bị phân hủy khi trong 1 gam chứa 10^6 đến 10^8 tế bào vi sinh vật hiếu khí.

b. Vi sinh vật kỵ khí ưa nhiệt độ trung bình

Tổng lượng vi sinh vật kỵ khí ưa nhiệt độ trung bình cho biết khả năng thực phẩm bị nhiễm *Clostridium*.

c. Vi sinh vật ưa lạnh

Tổng lượng vi sinh vật ưa lạnh cho biết trước khoảng thời gian cần thiết để bảo quản lạnh nhằm đảm bảo sự an toàn thực phẩm.

d. Coliforms

Nhóm này gồm tất cả các vi khuẩn Gram âm, hiếu khí và kỵ khí sống ở ruột, đất, nước, hạt ngũ cốc. Chúng bao gồm: *Escherichia coli, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella*. Việc phát hiện ra Coliforms không chứng tỏ thực phẩm bị nhiễm khuẩn từ phân. Sự có mặt của Coliforms cho ta biết là thực phẩm được sản xuất chưa đảm bảo điều kiện vệ sinh, do đó sẽ cho phép *Salmonella, Shigella, Staphylococcus* phát triển.

e. E.coli

E.coli là vi khuẩn chỉ thị về vệ sinh thực phẩm rõ ràng nhất. Nếu phát hiện *E.coli* cho phép ta xác định được thực phẩm bị nhiễm bẩn tương đối do phân.

E.coli thường sống ở phần cuối của đường ruột của người và động vật có xương sống.

f. Tổng số vi khuẩn đường ruột

Vi khuẩn đường ruột thuộc họ *Enterobacteriacelle*. Phát hiện ra những vi khuẩn này, chứng tỏ thực phẩm đã bị nhiễm tương đối phân.

g. Cầu khuẩn đường ruột

Cầu khuẩn đường ruột là *Streptococcus faecalis* và *Streptococcus falcium*. Chúng hiện diện trong đường ruột của người và động vật. Chúng được dùng như là vi khuẩn chỉ thị vệ sinh thực phẩm tốt.

h. Tụ cầu khuẩn

Sự có mặt của *Staphylococcus aureus* trong thực phẩm có thể có nguồn gốc từ da, miệng hoặc mũi của công nhân chế biến thực phẩm. Có nhiều tụ cầu khuẩn trong thực phẩm chứng tỏ vệ sinh trong chế biến thực phẩm và nhiệt độ diệt khuẩn chưa tốt.

VI.1.3. Các chỉ tiêu vi sinh vật trong thực phẩm

Các chỉ tiêu vi sinh vật trong thực phẩm được quy định bởi tiêu chuẩn của Bộ Y tế (Bảng 6.1) bao gồm các chỉ tiêu sau: tổng số vi khuẩn hiếu khí, Coliforms, *E.coli, Staphylococcus aureus, Salmonella, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens,* tổng số nấm men, nấm mốc… Quy định về giới hạn cho phép của các chỉ tiêu thay đổi theo nhóm và chủng loại thực phẩm.

Các mặt hàng thủy sản chế biến xuất khẩu được quy định bởi tiêu chuẩn quốc gia (TCVN) và tiêu chuẩn ngành (TCN, Bộ thủy sản, Bảng 6.2) và của thị trường xuất khẩu (bảng 6.3). Các chỉ tiêu thường được quan tâm là: tổng số vi khuẩn hiếu khí, Coliforms, Coliforms phân, *E.coli, Staphylococcus aureus, Salmonella, Shigella, Vibrio cholera, Vibrio parahaemolyticus,* tổng số nấm men, nấm mốc, *Clostridia, Listeria monocytogenes*…

Bảng 6.1. Tiêu chuẩn vi sinh cho phép trong thực phẩm, Bộ Y tế 4/1998

Nhóm thực phẩm	Giới hạn cho phép (CFU/g hoặc CFU/ml thực phẩm)											
	TVKHK	ECO	SAU	SAL/25g	BCE	COL	CPE	VPA	NM–MO	SFA	PAE	CBO
Nhóm thịt: - Thịt tươi, thịt đông lạnh, thịt xay nhỏ, thịt nghiền, thịt chế biến.	10^6	10^2	10^2	0	10^2							
- Sản phẩm chế biến từ thịt: thịt hun khói, pate, xúc xích.	$3.\ 10^5$	3	10	0	10	50	10					
Nhóm cá và hải sản: - Cá và thủy sản tươi sống	10^6	10^2	10^2	0			10^2	10^2				
- Sản phẩm chế biến: tôm, cá hấp nóng hun khói, chả cá, chả mực, các loại giáp xác, nhuyễn thể luộc hấp.	10^5	3	10	0		10	10	10	10			
- Thủy sản khô sơ chế: cá khô	10^6	10	10^2	0		10^2	20	10^2				
Nhóm trứng: - Trứng tươi, dịch trứng tươi hoặc đông lạnh.	10^5	3	10	0		10^2						
- Sản phẩm chế biến từ trứng (đã tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur)	10^3	0	3	0		10						

Nhóm sữa: - Sữa khô, sữa bột	$5.\ 10^4$	0	0	0		10						
- Sữa tươi tiệt trùng theo phương pháp Pasteur.	$5.\ 10^4$	3		0		10						
- Sữa tươi tiệt trùng theo phương pháp UHT	10	0	0	0		0						
- Sản phẩm chế biến từ sữa (bơ, sữa chua, phomat)	10^4	0	0	0		10						
Sản phẩm chế biến từ ngũ cốc, khoai củ, đậu đỗ: - Cần sử lý nhiệt trước khi dùng	10^6	10^2	10^2		10^2	10^3	10^2		10^3			
- Dùng trực tiếp, không xử lý nhiệt: bánh bột.	10^4	3	10		10	10	10		10^2			
Nhóm nước khoáng và nước giải khát đóng chai:	10	0	0				0			0	0	
- Nước giải khát có cồn	10^2	0	0			10	0		10	0	0	
- Nước giải khát không cồn												
- Nước khoáng đóng chai	Theo G.M.P					0	0			0	0	
Nhóm gia vị:	10^4	3	10^2	0		10^2			10^2			

Nhóm nước chấm: - Nguồn gốc động vật: nước mắm - Nguồn gốc thực vật	10^4	0	3	0		10^2	10	10				
	10^4	0	3	0		10^2	10		10			
Nhóm thức ăn khô và chứa dinh dưỡng cho trẻ em, thức ăn thay thế đặc biệt: - Phải xử lý nhiệt trước khi sử dụng - Dùng trực tiếp không qua xử lý nhiệt	10^5	10	10^2	0	10^2	10						
	10^4	0	3	0	10	10	10					
Kem, nước đá	$5.\ 10^4$	0	10	0		10^2	10					
Nhóm đồ hộp		0	0				0		0			0
Nhóm dầu mỡ	10^3	3	0	0		10			0			

TVKHK: tổng vi khuẩn hiếu khí; ECO: *E.coli*; SAU: *Staphylococcus aureus*; SAL: *Salmonella*; BCE: *Bacillus cereus*;
COL: Coliforms; CPE: *Clostridium perfringens*; VPA: *Vibrio parahaemolyticus*; NM – MO: tổng số nấm men, nấm mốc;
SFA: *Streptococcus faecalis*; PAE: *Pseudomonas aeruginosa*; CBO: *Clostridium botulinum*;
G.M.P: Goof Manufacturing Practice: quy phạm sản xuất GMP

VI.2. Kiểm tra vi sinh vật trong nguyên liệu thực phẩm và thực phẩm

a. Kiểm tra vi sinh vật nước:

Nước được coi như một dạng nguyên liệu rất đặc biệt trong chế biến một số loại thực phẩm. Mặt khác nước cũng được coi như là một nguồn lây nhiễm vi sinh vật trong chế biến thực phẩm. Người ta chia nước làm ba loại dựa trên sự liên quan đến vi sinh vật:

- Nước đã sát khuẩn
- Nước chưa sát khuẩn
- Nước thải

Yêu cầu kiểm tra vi sinh vật nước bao gồm:

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí
- Tổng số *E.coli*
- *Clostridium perfringens*
- Phagơ
- Vi khuẩn gây bệnh

b. Kiểm tra vi sinh vật nước giải khát:

Kiểm tra vi sinh vật nước giải khát bao gồm:

- Tổng số vi khuẩn hiếu khí
- *E.coli*
- *Clostridium perfringens*
- Nấm mốc
- Vi khuẩn gây đục
- Vi khuẩn gây bệnh

c. Kiểm tra vi sinh vật trong bia:

Kiểm tra vi sinh vật trong bia bao gồm:

- Tổng số vi khuẩn hiếu khí
- *E.coli*
- Nấm men
- *Clostridium perfringens*
- Vi sinh vật làm đục bia

d. Kiểm tra vi sinh vật trong sữa:

Kiểm tra vi sinh vật trong sữa bao gồm:

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí
- Tổng số vi sinh vật kỵ khí
- Vi sinh vật gây bệnh
- kiểm tra sơ bộ bằng xanh metylen

e. Kiểm tra vi sinh vật đồ hộp

- Kiểm tra vi sinh vật đồ hộp động vật
  - Vi sinh vật hiếu khí
  - Vi sinh vật kỵ khí
  - *Clostridium botulinum* và độc tố
  - Vi sinh vật chịu nhiệt
- Kiểm tra vi sinh vật đồ hộp thực vật

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí
- Tổng số bào tử của vi sinh vật hiếu khí
- Vi khuẩn *E.coli*
- Vi sinh vật sinh H_2S
- Vi khuẩn chịu nhiệt

f. kiểm tra vi sinh vật nước mắm, nước chấm:

- Vi sinh vật hiếu khí
- *E.coli*
- Trực khuẩn kỵ khí sinh H_2S
- Trực khuẩn hiếu khí sinh H_2S

VI.3. Phương pháp thu, bảo quản và chuẩn bị mẫu thực phẩm:

VI.3.1. Phương pháp thu, bảo quản mẫu thực phẩm:

Tiêu chuẩn quy định về mật độ cho phép của các vi sinh vật trong thực phẩm thay đổi tùy theo nhòm vi sinh vật cần phân tích, đối tượng thực phẩm, tiêu chuẩn về vệ sinh an toàn thực phẩm của từng quốc gia. Đối với vi sinh vật gây bệnh, mức độ nguy hiểm cao, tiêu chuẩn thường không cho phép sự hiện diện của vi sinh vật trong một đơn vị khối lượng thực phẩm. Trường hợp này cần định tính sự hiện diện của vi sinh vật. Thông thường, tiêu chuẩn quy định mật độ vi sinh vật cho phép hiện diện trong một khối lượng thực phẩm xác định. Trong trường hợp này cần tiến hành định lượng mật độ vi sinh vật hiện diện trong mẫu thực phẩm. Tuy nhiên kết quả phân tích, định lượng vi sinh vật trong từng mẫu thực phẩm thường không phản ánh chính xác mật độ vi sinh vật thực tế hiện diện trong mẫu. do vậy, thông thường cần thực hiện việc định lượng mẫu trên một số lượng mẫu xác định và sử dụng những khoảng giới hạn quy ước để nhận định kết quả như:

- Khoảng chấp nhận: khi mật độ vi sinh vật nhỏ hơn trị số **m**.
- Khoảng không chấp nhận: khi mật độ vi sinh vật lớn hơn trị số **M**.
- Khoảng lân cận giới hạn: khi mật độ vi sinh vật lớn hơn **m** và nhỏ hơn **M**.

Dựa vào tiêu chuẩn quy định, người phân tích cần có kế hoạch (thông số về khối lượng và số lượng) mẫu thích hợp. Các thông số này thay đổi tùy thuộc vào độ nguy hiểm của từng loại thực phẩm khi có sự hiện diện của vi sinh vật gây bệnh.

Kết quả phân tích, định lượng phụ thuộc rất nhiều vào phương pháp và quy trình thu mẫu.

a. Dụng cụ thu, chứa mẫu:

Dụng cụ thu, chứa mẫu thay đổi tùy loại thực phẩm nhưng phải vô trùng để bảo đảm tính chính xác của phương pháp định lượng. Khối lượng cần thu của mỗi mẫu thay đổi tùy thuộc khối lượng các chỉ tiêu cần phân tích. Mẫu cần phải đảm bảo tính đại diện. dụng cụ chứa mẫu thường là các bình nhựa có nắp bằng nhôm hay bằng chất dẻo, bao nilon chứa mẫu. Tránh sử dụng các bình thủy tinh vì dễ vỡ.

b. Vận chuyển và bảo quản mẫu:

Mẫu sau khi thu được bảo quản một cách độc lập với nhau trong các thùng bảo quản mẫu được làm lạnh bằng các bao nước đá. Nước đã phải kho được tan chảy trong suốt quá trình vận chuyển mẫu về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí

nghiệm mẫu được chuyển vào tủ đông và được phân tích ngay khi có thể. Nếu không phân tích ngay, mẫu phải được bảo quản ở - 20^{o}C cho đến khi phân tích. Trường hợp mẫu không thể bảo quản đông thì có thể bảo quản trong tủ lạnh ở 0 – 4^{o}C nhưng không được quá 36 giờ. Các loại thực phẩm như đồ hộp hay các loại thực phẩm khó hư hỏng có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng đến khi phân tích.

VI.3.2. Chuẩn bị mẫu:

a. Giải đông mẫu: mẫu đông lạnh cần được giải đông trong điều kiện vô trùng trước khi phân tích. Việc giải đông được thực hiện ở nhiệt độ 2 – 5^{o}C trong khoảng 18 giờ, khi cần thiết có thể giải đông nhanh ở 45^{o}C trong 15 phút nhưng phải lắc liên tục.
b. Đồng nhất mẫu: mẫu cần được làm đồng nhất trước khi phân tích do sự phân bố không đều của vi sinh vật bên trong mẫu. việc đồng nhất được tiến hành trong điều kiện vô trùng, lắc đều đối với mẫu lỏng và đảo trộn bằng thiết bị dập mẫu đối với mẫu rắn.
c. Cân mẫu: cân chính xác một lượng mẫu xác định để tiến hành phân tích tùy theo yêu cầu của chỉ tiêu phân tích. Sai số cho phép là ±0,1g.

VI.4. Các phương pháp định lượng vi sinh vật:

Sự hiện diện của vi sinh vật có thể được định lượng bằng nhiều phương pháp khác nhau, trực tiếp như đếm trên kính hiển vi, gián tiếp thông qua phương pháp đo độ đục, đếm số khuẩn lạc mọc trên môi trường xác định, định lượng một cách thống kê bằng phương pháp pha loãng tới hạn (MPN).

a. **Phương pháp đếm trực tiếp**: bằng buồng đếm trên kính hiển vi. Thường áp dụng để xác định mật độ vi sinh vật đơn bào có kích thước lớn như nấm men, tảo…

Ưu điểm: Quy trình này cho phép xác định nhanh chóng mật độ vi sinh vật chứa trong mẫu.

Nhược điểm:

- Không phân biệt được tế bào sống và tế bào chết
- Dễ nhầm lẫn tế bào vi sinh vật với các vật thể khác trong mẫu
- Khó đạt được độ chính xác cao
- Không thích hợp với huyền phù vi sinh vật có mật độ thấp.

Ta có các phương pháp đếm trực tiếp sau:

- Đếm bằng buồng đếm hồng cầu
- Đếm bằng buồng đếm Breed
- Đếm bằng kính hiển vi huỳnh quang

b. **Phương pháp đếm khuẩn lạc**: cho phép xác định mật độ tế bào còn sống hiện diện trong mẫu. Tế bào còn sống là tế bào có khả năng phân chia tạo thành khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc. Phương pháp này cho phép định lượng chọn lọc vi sinh vật tùy môi trường và điều kiện nuôi cấy.

Trong phương pháp này cần thực hiện pha loãng mẫu thành nhiều độ pha loãng bậc 10 liên tiếp sao cho có độ pha loãng với mật độ tế bào thích hợp để xuất hiện các khuẩn lạc riêng lẻ trên bề mặt thạch với số lượng đủ

lớn để hạn chế sai số khi đếm và tính toán. Mật độ tế bào quá lớn sẽ làm các khuẩn lạc chồng chéo lên nhau hoặc tạo thành màng sinh khối, ngược lại số lượng khuẩn lạc quá nhỏ thì lại không có ý nghĩa thống kê. Số lượng khuẩn lạc tối ưu là trong khoảng từ 25 – 250 khuẩn lạc/đĩa.

Số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa tùy thuộc vào lượng mẫu sử dụng, môi trường và điều kiện ủ. Các tế bào trên đĩa không tăng trưởng và hình thành khuẩn lạc với tốc độ như nhau, do vậy nhiều tế bào chưa kịp hình thành khuẩn lạc nếu thời gian ủ không đủ dài. Thông thường điều kiện nuôi cấy (môi trường, nhiệt độ, thời gian) cần đảm bảo sao cho số khuẩn lạc xuất hiện tối đa. Phương pháp này dễ sai số nên cần thực hiện lặp lại trên ít nhất hai đĩa. Ngoài ra, do có khả năng nhiều tế bào hình thành chung một khuẩn lạc nên số đếm khuẩn lạc không biểu hiện chính xác số tế bào ban đầu được đưa vào môi trường, nên kết quả đếm và mật độ tế bào được trình bày bằng số đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony forming unit) CFU/g thay vì số tb/ml.

Ưu điểm: Độ nhạy cao, cho phép định lượng vi sinh vật ở mật độ thấp trong mẫu.

Quy trình thao tác như sau:

- Pha loãng mẫu theo dãy thập phân
- Tạo hộp trải hay hộp đổ
- Ủ ở điều kiện nhiệt độ và thời gian thích hợp
- Đếm khuẩn lạc và tính kết quả. Mật độ tế bào vi sinh vật trong mẫu ban đầu được tính theo công thức sau:

$$A\ (CFU/g \text{ hay } CFU/ml) = \frac{N}{n_1 V f_1 + \ldots + n_i V f_i}$$

Trong đó:

A: số tế bào vi khuẩn trong 1g hay 1ml mẫu

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn

n_i: số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i

V: thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

f_i: độ pha loãng tương ứng

c. **Phương pháp MPN (phương pháp tối khả)**: là phương pháp đánh giá số lượng vi sinh vật theo số lượng vi sinh vật có xác suất lớn nhất hiện diện trong 1 đơn vị thể tích mẫu. Phương pháp này có thể dùng để định lượng mọi nhóm vi sinh vật có thể được nuôi cấy trong môi trường lỏng chọn lọc và cho kết quả biểu kiến thích hợp.

Là phương pháp định lượng dựa trên kết quả định tính của một loạt thí nghiệm được lặp lại ở một số độ pha loãng khác nhau (Thông thường, là lặp lại 3 lần ở 3 độ pha loãng bậc 10 liên tiếp, tổng cộng: 3x3=9 ống nghiệm). Số lượng ống nghiệm lặp lại càng cao thì độ chính xác của phương pháp này càng lớn.

Quy trình thực hiện phương pháp này như sau:

- Cho vào các ống nghiệm có chứa môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của đối tượng vi sinh vật cần định lượng một thể tích xác định dung dịch mẫu ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp.
- Ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp
- Dựa vào kết quả biểu kiến chứng minh sự tăng trưởng của vi sinh vật cần kiểm định trong từng ống nghiệm (phản ứng dương tính), ghi nhận số lượng ở từng độ pha loãng.
- Sử dụng số liệu này dựa vào bảng Mac Crady suy ra mật độ vi sinh vật được trình bày dưới dạng số MPN/100ml hay số MPN/1g mẫu.

d. **Phương pháp đo độ đục:** là phương pháp gián tiếp xác định mật độ vi sinh vật. Định lượng mật độ tế bào thông qua đo độ đục bằng máy so màu ở các bước sóng từ 550 – 610 nm.

Phương pháp xác định mật độ tế bào theo độ đục có thể được dùng để so sánh mức độ tăng trưởng của hai hay nhiều chủng vi sinh vật trong môi trường lỏng. phương pháp này cho kết quả nhanh chóng và thường được ứng dụng trong theo dõi hoặc nghiên cứu đặc trưng tăng trưởng của các chủng vi sinh vật trong phòng thí nghiệm hoặc trong sản xuất tuy nhiên không thích hợp dùng trong kiểm nghiệm vi sinh vật.

$$A\ (CFU/g \text{ hay } CFU/ml) = \frac{N}{n_1 V f_1 + \ldots + n_i V f_i}$$ Trong đó:

A: số tế bào vi khuẩn trong 1g hay 1ml mẫu

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn

n_i: số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i

V: thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

f_i: độ pha loãng tương ứng

VI.5. Các thử nghiệm sinh hóa:

Người ta có thể định danh vi sinh vật dựa vào các đặc điểm sinh hóa đặc trưng của loài (hay nhóm) vi sinh vật đó. Có ba cách tiếp cận để thực hiện các thử nghiệm sinh hóa dùng cho mục đích định danh là cách truyền thống, cách sử dụng các bộ KIT và dùng các thiết bị tự động.

Các thử nghiệm sinh hóa quan trọng thường được sử dụng trong kiểm nghiệm vi sinh vật bao gồm:

- *Thử nghiệm khả năng lên men*: nhằm xác định khả năng sử dụng một nguồn cacbon nhất định bởi vi sinh vật để tăng trưởng. Nguồn cacbon này được chia làm 3 nhóm: đường đơn, đường đa và rượu. Khả năng lên men được đánh giá sự làm giảm pH của môi trường dẫn đến sự thay đổi màu của chỉ thị pH trong môi trường. Ngoài ra, CO_2 được tạo thành sẽ được bẫy lại thành bọt khí trong ống chuông Durham làm nổi ống chuông này (môi trường lỏng) hoặc làm vỡ thạch (môi trường rắn). Được dùng để định danh các vi sinh vật đường ruột.
- *Thử nghiệm khả năng oxy hóa – lên men:* còn được gọi là thử nghiệm Hugh – Leifson nhằm xác định vi sinh vật đang thử nghiệm biến dưỡng

hydratcacbon theo phương thức oxy hóa hay phương thức lên men. Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách nuôi cấy chủng thử nghiệm trên môi trường Hugh – Leifson có glucose là nguồn cacbon duy nhất và chỉ thị pH là bromothymol blue. Các sản phẩm có tính axit của quá trình lên men sẽ làm thay đổi màu chỉ thị.

- *Thử nghiệm Bile esculin:* thử nghiệm này phân biệt vi sinh vật dựa trên khả năng thủy phân liên kết glucoside trong esculin thành esculetin và glucost khi có sự hiện diện của muối mật. Esculetin phản ứng với muối sắt trong môi trường tạo thành hợp chất màu đen hay nâu đen.
- *Thử nghiệm khả năng biến dưỡng citrate:* môi trường thử nghiệm khả năng biến dưỡng citrate sử dụng citrate làm nguồn cacbon duy nhất và có chứa muối ammonium dùng làm nguồn đạm làm tăng giá trị pH của môi trường. Sự gia tăng giá trị pH này được chỉ thị bằng sự đổi màu của chỉ thị pH trong môi trường.
- *Thử nghiệm catalase:*catalase là enzyme chỉ chứa trong tế bào vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí tùy ý. Catalase thủy phân H_2O_2 thành H_2O và O_2 ngăn cản sự tích tụ của phân tử có độc tính cao này trong tế bào. Sự giải phóng O_2 sẽ được ghi nhận thông qua hiện tượng sủi bọt khí.
- *Thử nghiệm decacboxylase:* thường dùng để định danh và phân loại các vi khuẩn đường ruột họ *Enterobacteriaceae.* Các vi sinh vật này thường cảm ứng tạo thành các enzyme decacboxylase khi môi trường có tính axit và có chất cảm ứng đặc hiệu (một loại axit amin nào đó: lizin, ornithin, arginin,…) trong tất cả các trường hợp, CO_2 sinh ra làm tăng pH của môi trường và được ghi nhận qua sự đổi màu của chỉ thị pH.
- *Thử nghiệm coagulase:* một số loài vi khuẩn đặc biệt là nhóm *Staphylococcus*, có khả năng tiết ra môi trường enzyme coagulase có tác dụng làm kết tụ các thành phần của huyết tương. Thử nghiệm này được dùng ở bước cuối cùng trong các chỉ tiêu thử nghiệm để định danh các loài trong giống *Staphylococcus: Staphylococcus aureus* (+),*Staphylococcus epidermidis* (-).
- *Thử nghiệm urease:* một số vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp urease để thủy phân ure. Sự phóng thích NH_3 và CO_2 làm tăng pH của môi trường và có thể được theo dõi qua sự đổi màu chất chỉ thị pH. Thử nghiệm urease đặc trưng cho các loại *Proteus spp.*
- *Thử nghiệm gelatinase:* một số vi sinh vật có khả năng tổng hợp nhóm enzyme gelatinase ngoại bào thủy phân gelatin trong môi trường nuôi trường nuôi cấy. Trong thử nghiệm này, phản ứng (+) khi môi trường đặc tan chảy thành dạng lỏng.
- *Thử nghiệm khả năng tăng sinh H_2S:* trong quá trình phân giải các axit amin chứa lưu huỳnh khí H_2S được giải phóng, tạo tủa màu đen với chỉ thị sulfite có trong môi trường.
- *Thử nghiệm khả năng sinh indol:* một số vi sinh vật có khả năng oxy hóa tryptophan thành các sản phẩm chứa gốc indol. Việc phát hiện indol được

thực hiện bằng phản ứng của phân tử này với các thuốc thử chứa p-Dimethylaminobenzaldehyde (p-DMABA) tạo nên một phức chất dạng quinon có màu đỏ.

- *Thử nghiệm KIA, TSI:* môi trường KIA (Kligler Iron Agar) và môi trường TSI (Triple Sugar Iron agar) được sử dụng để kết hợp thử nghiệm đồng thời khả năng sử dụng các nguồn cacbon khác nhau (glucose, lactose) và khả năng sinh H_2S của chủng vi sinh vật. Nếu vi sinh vật chỉ lên men đường glucose thì sau 18 – 24 giờ nuôi cấy môi trường thạch nghiêng phần trên sẽ có màu đỏ, phần sâu sẽ có màu vàng. Nếu vi sinh vật lên men cả đường glucose và lactose thì thị sau 18 – 24 giờ toàn bộ môi trường sẽ có pH acid, môi trường có màu vàng. Nếu vi sinh vật không sử dụng được cả hai nguồn cacbon trên thì chỉ có phần trên thạch chuyển sang màu đỏ. Trong các trường hợp trên nếu sự lên men đường tạo ra các sản phẩm khí thì sẽ làm vỡ thạch.
- *Thử nghiệm nitratase:* Thử nghiệm này nhằm xác định khả năng tổng hợp hệ enzyme nitratase xúc tác sự khử nitrate thành nitrit và nitơ phân tử của vi sinh vật.
- *Thử nghiệm oxidase:*thử nghiệm này nhằm xác định sự hiện diện của hệ enzyme oxidase ở vi sinh vật.
- *Thử nghiệm ONPG:* Xác định sự có mặt của enzyme β-galactosedase có vai trò xúc tác sự thủy phân lactose trong tế bào vi sinh vật dựa vào một cơ chất tổng hợp là o-nitrophenyl-D-galactopyranoside (ONPD). Sự thủy phân của cơ chất đường này bởi β-galactosidase sẽ phóng thích o-nitrophenol có màu vàng.
- *Thử nghiệm MR (methyl red):* Thử nghiệm MR nhằm phân biệt vi sinh vật dựa trên sự khác biệt về khả năng tạo ra và duy trì các sản phẩm biến dưỡng có tính axit bền trong môi trường trong quá trình lên men glucose. Thử nghiệm MR phụ thuộc rất lớn vào thời gian nuôi cấy. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy, các vi sinh vật có phản ứng MR (+) có đặc tính là tích lũy axit trong môi trường ngày càng nhiều, pH trong môi trường ngày càng giảm. Các vi sinh vật có phản ứng MR (-) sẽ tiếp tục chuyển hóa các sản phẩm có tính axit thành các sản phẩm trung tính, pH sẽ chuyển về phía trung tính. Chỉ thị metyl red giúp phân biệt nồng độ H^+ hiện diện trong môi trường sau khi vi sinh vật lên men.
- *Thử nghiệm VP (Voges – Proskauer):* thử nghiệm VP giúp phân biệt các loài trong họ *Enterobacteriaceae* dựa trên sự oxi hóa acetoin.
- *Thử nghiệm CAMP:* Là phản ứng phối hợp giữa nhân tố protein và nhân tố β-hemolysin tiết ra bởi chủng *Staphyloccocus aureus* gây ra hiện tượng làm tan máu hồng cầu của cừu hoặc bò trên môi trường thạch máu. Nếu thử nghiệm (+) thì sẽ xuất hiện đường tan huyết phân biệt rõ với vùng sẫm màu còn lại trong môi trường.
- *Thử nghiệm tính di động:* khả năng di động của vi sinh vật có thể theo dõi được trên môi trường thạch mềm. ngoài ra, triphenyltetrazolium chloride

(TTC) có thể được bổ sung vào môi trường để giúp phát hiện dễ dàng vị trí hiện diện của tế bào vi sinh vật trong môi trường do hợp chất này khi vào bên trong tế bào sẽ bị khử thành formazan có màu đỏ.

Ngày nay các thử nghiệm sinh hóa truyền thống để định danh vi sinh vật đã có thể được thực hiện ỏ các thuốc thử ở dạng đĩa giấy, que giấy. Ngoài ra, còn có các bộ kit cho phép thực hiện hàng loạt các phản ứng sinh hóa theo một quy trình lựa chọn để định danh vi sinh vật. Các bộ kit này sản xuất dưới dạng thương phẩm có ưu điểm ví dụ như mỗi bộ kit chỉ cho phép định danh được một số vi sinh vật, chi phí thử nghiệm đắt tiền hơn. Ngoài ra, nhu cầu phân tích số lượng mẫu lớn của thực tế công tác kiểm nghiệm nhanh để rút ngắn thời gian từ khi nhận mẫu đến khi có kết quả. Do vậy, nhiều thiết bị được chế tạo nhằm tự động hóa công tác kiểm nghiệm, đặc biệt là không yêu cầu kiểm nghiệm viên luôn phải có mặt để giám sát công việc, có thể thực hiện qua đêm.

VI.6. Các phương pháp truyền thống phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật:

VI.6.1. Tổng số vi khuẩn hiếu khí:

Chỉ số này còn có tên gọi khác là: số vi sinh vật hiếu khí, tổng số đếm trên đĩa, tổng số vi sinh vật sống, số đếm đĩa chuẩn. Chỉ tiêu này được dùng để đánh giá mức độ nhiễm tạp của nguyên liệu và sản phẩm. Từ đó đánh giá tình trạng vệ sinh và các điều kiện bảo quản sản phẩm và dự đoán khả năng hư hỏng của sản phẩm.

Vi khuẩn hiếu khí là những vi khuẩn tăng trưởng và hình thành khuẩn lạc trong điều kiện có sự hiện diện của oxy phân tử (O_2). Tổng số vi khuẩn hiếu khí hiện diện trong mẫu chỉ thị mức độ vệ sinh của thực phẩm. Chỉ số này được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch dinh dưỡng từ một lượng mẫu xác định trên cơ sở xem một khuẩn lạc là sinh khối phát triển từ 1 tế bào hiện diện trong mẫu và được biểu diễn dưới dạng *số đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony forming unit, CFU)* trong một đơn vị khối lượng thực phẩm.

VI.6.2. Coliforms và *Escherichia coli*

Coliforms là những trực khuẩn Gram (-) không sinh bào tử hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý, có khả năng lên men lactose sinh axit và sinh hơi ở 37^{o}C trong 24 – 48 giờ, hiện diện rộng rãi trong tự nhiên, trong ruột người, động vật. Chúng bao gồm: *Escherichia coli, Enterobacter spp, Citrobacter spp, Klebsiella spp*. Số lượng hiện diện của chúng trong thực phẩm được dùng để chỉ thị khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác. Tính chất sinh hóa đặc trưng của nhóm này được thể hiện qua các thử nghiệm Indol (I), Methyl Red (MR), Voges Proskauer (VP) và Citrate (iC) thường được gọi chung là IMViC.

- **Coliforms chịu nhiệt** là những Coliforms có khả năng lên men lactose sinh hơi trong khoảng 24 giờ khi được ủ ở 44^{o}C trong môi trường canh EC.
- **Coliforms phân** (Feacal Coliforms hay *E.coli* giả định) là Coliforms chịu nhiệt có khả năng sinh indol khi được ủ khoảng 24 giờ ở 44,5^{o}C trong canh Trypton. Dùng để chỉ thị mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản, vận chuyển thực phẩm cũng như chỉ thị sự ô nhiễm phân.

Để định lượng coliforms có thể nuôi cấy trên môi trường lỏng (phương pháp MPN) hoặc trên môi trường thạch rắn chọn lọc bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

VI.6.3. *Staphylococcus aureus:*

a. Định nghĩa và nguyên tắc:

Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* hình cầu, gram dương, có khả năng sinh nội độc tố gây ngộ độc thực phẩm. Các tế bào thường liên kết thành các chùm nho, không tạo bào tử, không di động, có khả năng sinh coagulase. *S. aureus* hiếu khí hay kỵ khí tùy ý có khả năng lên men và sinh axit từ manitol, trehalose, saccarose. Mẫn cảm với novobiocine, có khả năng tăng trưởng trên môi trường có đến 15% NaCl. Một số dòng có khả năng làm tan máu trên môi trường thạch máu. Đường kính vòng tan máu phụ thuộc vào từng chủng nhưng đều nhỏ hơn đường kính của khuẩn lạc. Khi phát triển trong môi trường, tạo sắc tố vàng sau 1 – 2 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng và đều tổng hợp enterotoxin ở nhiệt độ trên 15^{o}C, nhiều nhất là khi tăng trưởng ở 35 – 37^{o}C.

S. aureus còn được gọi là tụ cầu khuẩn gây bệnh, do đó cần xác định để biết mẫu sản phẩm thực phẩm phân tích có mang mối nguy hiểm cho người tiêu dùng hay không.

Staphylococcus. aureus được xác định trên cơ sở các đặc điểm tăng trưởng và phản ứng đông huyết tương của các dòng thuần từ các khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường phân lập.

VI.6.4. *Clostridium*

Clostridium là các vi khuẩn gram dương, hình que, kỵ khí, sinh bào tử, phần lớn di động, có thể thủy phân đường và protein trong các hoạt động thu nhận năng lượng. Hầu hết nhóm *Clostridium* đều ưa nhiệt vừa tuy nhiên có một số loài ưa nhiệt và một số loài thuộc nhóm ưa lạnh. Các loài gây ngộ độc thực phẩm quan trọng là *C.botulinum* và *C.perfringens*.

C. botulinum là loài sống kỵ khí bắt buộc, chỉ tăng trưởng được trong môi trường trung tính, không có sự cạnh tranh với các vi sinh vật khác. Các dòng trong loài này có các đặc điểm nuôi cấy khác nhau và có 6 kiểu kháng nguyên được ký hiệu từ A – F. Kiểu kháng nguyên A, B và F có hoạt tính thủy giải protein tạo nên một vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc trên môi trường Willis và Hobbs, còn các kiểu C, D, E không có khả năng này. Kiểu A thường thấy trên các mẫu thịt trong khi kiểu E chỉ được phân lập trên các mẫu cá.

C. perfringens là loài kỵ khí không bắt buộc, rất ít khi tạo bào tử trong các môi trường nuôi cấy nhân tạo, nhưng có thể quan sát được bào tử trên môi trường nuôi cấy Ellner, môi trường có bổ sung muối mật và bicarbonate hay quinoline. Loài này có 6 kiểu kháng nguyên được ký hiệu từ A – F. Kiểu kháng nguyên A thường gây hoại tử cho các vết thương và gây ngộ độc thực phẩm.

Mật độ vi khuẩn *Clostridium* được xác định bằng cách sử dụng môi trường có chứa ferri ammonium citrate và disodium sulphate, ủ ở 37^{o}C trong 1 – 2 ngày. Nếu nghi ngờ có ưa nhiệt thì ủ thêm ở 50^{o}C. Trên môi trường này các khuẩn lạc

Clostridium có màu đen do phản ứng giữa ion sulphite (S^{2-}) và ion sắt (Fe^{2+}) có trong môi trường.

VI.6.5. *Salmonella*:

Salmonella là trực khuẩn gram âm, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý, có khả năng di động, không tạo bào tử, lên men glucose và manitol sinh axit nhưng không lên men saccharose và lactose, không sinh indol, không phân giải ure, không có khả năng tách nhóm amin từ triptophan, hầu hết đều sinh H_2S.

Salmonella có thể được xác định gồm 4 bước:

- Tăng sinh do *Salmonella* thường có mặt trong mẫu với số lượng nhỏ và bị tổn thương nên phải chọn quy trình tăng sinh phù hợp.
- Tăng sinh chọn lọc salmonella trên các môi trường tăng sinh chọn lọc dùng để phát hiện *Salmonella* trong các mẫu thực phẩm như: RV (Rappaport Vassiliadis), Tetrathionate Mueler Kauffmann Broth (TT)…
- Phân lập: Tách và nhận dạng *Salmonella* khỏi quần thể các vi sinh vật khác trong mẫu, môi trường giúp nhận dạng *Salmonella* dựa trên vài đặc tính.
- Khẳng định: nhằm xác nhận lại sự có mặt của các khuẩn lạc đặc trưng cho *Salmonella* xuất hiện trên môi trường phân lập. Bước này dựa trên các việc sử dụng các phản ứng sinh hóa và thử nghiệm huyết thanh đặc trưng cho *Salmonella* như KIA/TSI, indol, LDC, ODC, urease, lên men manitol, sorbitol,…

VI.6.6. Tổng số nấm men, nấm mốc:

Trong thực phẩm, sự hiện diện của nấm men, nấm mốc có thể làm thay đổi màu của thực phẩm, làm phát sinh mùi hay vị lạ, làm hư hỏng hay thay đổi cơ cấu của thực phẩm, một số có thể tạo độc tố hay gây ngộ độc thực phẩm.

Mật độ nấm mốc, nấm men trong mẫu được xác định chung dưới dạng tổng số nấm mốc, nấm men bằng kỹ thuật pha loãng, trải và đếm khuẩn lạc trên môi trường Dichloran Glycerol Agar (DG18) hay Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC).

VI.7. Các phương pháp không truyền thống:

Các phương pháp truyền thống tuy được công nhận rộng rãi nhưng lại có một số nhược điểm như: tốn nhiều thời gian, chậm thu kết quả, mất nhiều công sức, tốn kém… Để khắc phục các nhược điểm này, nhiều phương pháp nhanh và tự động được phát triển và thương mại hóa. Các phương pháp này được gọi chung là các phương pháp không truyền thống và có đặc điểm chung là cho kết quả nhanh hơn phương pháp truyền thống.

VI.7.1. Phương pháp phát quang sinh học ATP trong giám sát vệ sinh

Adenosin triphotphat (ATP) được tìm thấy trong tất cả các tế bào sống nên sự phát hiện ATP là dấu hiệu nhận biết vật chất sống đang tồn tại. ATP có thể được phát hiện một cách nhanh chóng bởi lượng ánh sáng phát ra thông qua sự kết hợp với enzyme luciferase nhờ một máy đo ánh sáng. Kỹ thuật này có thể phát hiện được 1pg (10^{-12}g) tương ứng với khoảng 1000 tế bào vi khuẩn (10^{-15}gATP/ tế bào). Độ nhạy này có được khi sử dụng các hóa chất thương mại đắt tiền, sự phân

tích thường chỉ diễn ra vài phút và vì thế phương pháp này được xem là nhanh hơn và thuận lợi hơn so với phương pháp đếm khuẩn lạc.

Việc dùng phương pháp đo hàm lượng ATP để xác định rõ số vi sinh vật đang hiện diện đã được biết đến vào năm 1960. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi nhiều sự cải tiến trong việc thiết kế máy đo lượng ánh sang phát ra (giảm giá thành và có thể mang đi được) và những hóa chất ổn định sự phát sang. Phương pháp này được ứng dụng trong 3 lĩnh vực: giám sát vệ sinh, kiểm tra những chất lỏng như nước rửa làm sạch hệ thống, đánh giá chất lượng vi sinh của thực phẩm. để đánh giá chất lượng vi sinh của thực phẩm bằng ATP thì ATP của vi sinh vật cần phải được tách chiết ra khỏi tế bào vi sinh vật và được định lượng dựa vào cường độ ánh sáng phát ra.

Phản ứng phát sáng sinh học ở đom đóm trải qua hai giai đoạn:

$E + LH_2 + ATP \leftrightarrow E - LH_2\ AMP + PP_i$ (1)

$E - LH_2\ AMP + O_2 \leftrightarrow Oxyluciferin + AMP + CO_2 + h\nu$ (2)

Phản ứng có thể được viết lại như sau:

$E + LH_2 + ATP + O_2 \leftrightarrow Oxyluciferin + AMP + CO_2 + h\nu + PP_i$

(E: Luciferase; LH_2: Luciferin)

Phản ứng phát sáng của đom đóm là có hiệu quả nhất, được biết đến như phản ứng phát sáng sinh học để xác định hàm lượng ATP. Phản ứng này đòi hỏi D-Luciferin và ion Mg^{2+} để hoạt động, đây là thành phần cơ bản trong bộ kit thương mại. Chất dioxetanone thì được hình thành bởi sự tạo phức hợp của luciferase với oxi và phức hợp Mg – ATP. Sau đó, ánh sáng vàng - xanh (bước song cao nhất là 562nm) được phát ra. Để kiểm tra tình trạng vệ sinh bề mặt thiết bị trong sản xuất, chế biến thực phẩm, tổng vi khuẩn hiếu khí trong thành phẩm, người ta xác định tổng lượng ATP của mẫu. Tổng hàm lượng ATP này bao gồm hàm lượng ATP của eukaryote và của tế bào vi sinh vật. Thông thường ATP không có nguồn gốc là của tế bào vi sinh vật sẽ được tách chiết bởi những chất tẩy không ion ví dụ như Triton X-100. ATP này sau khi tách chiết khỏi tế bào sẽ được thủy phân bằng cách xử lý với enzyme ATPase trong vòng 5 phút. Tiếp theo, ATP của tế bào vi sinh vật sẽ được ly trích bằng chất tricloaxetic 5%. Ánh sáng phát ra bởi phản ứng phát sáng được đo bằng các loại máy đo ánh sáng đo được cường độ ánh sáng thấp.

Ngày nay sự phát quang sinh học đã được sử dụng khá rộng rãi để đánh giá chất lượng vệ sinh bề mặt thiết bị sử dụng trong quá trình sản xuất, chế biến, đánh giá chất lượng thực phẩm, mĩ phẩm. Quy trình thực hiện rất đơn giản, nhanh chóng chỉ trong vài phút và có thể dễ dàng tự động hóa.

Nguyên tắc chung của quy trình phát quang sinh học này như sau: Mẫu được thu bằng cách dùng que bông vô trùng quẹt một diện tích nhỏ nhất định trên bề mặt dụng cụ, thiết bị. sau đó que bông được cho vào dung dịch trích ly ATP, xử lý với ATPase và cho phản ứng phát sáng.

Gần đây, nhiều hệ thống phát hiện được thiết kế, chế tạo chứa sẵn những hóa chất nằm trong dụng cụ quẹt mẫu bằng tay và sự phát sáng xảy ra ở phía đầu

của dụng cụ quẹt mẫu, sau đó dụng cụ này được đặt trong máy đo lượng ánh sáng phát ra.

Để biết mật độ vi sinh vật, so sánh trị số ánh sáng đo được với một đường chuẩn tương quan giữa lượng ánh sáng phát ra và mật độ tế bào vi sinh vật đã biết trước.

VI.7.2. Phương pháp ELISA (Enzyme – linked ImmunoSorbent Assay)

Những tiến bộ kỹ thuật trong vài thập niên vừa qua thúc đẩy sự phát triển của nhiều kỹ thuật chuẩn đoán huyết thanh nhanh nhạy, chính xác các bệnh truyền nhiễm. Mặt khác, sự phát triển của những kỹ thuật tự động cho phép đơn giản hóa thao tác thực hiện. Nguyên tắc của phương pháp miễn dịch là phản ứng kết hợp giữa một tế bào (kháng nguyên) với một kháng thể đặc hiệu. Tín hiệu của phản ứng miễn dịch có thể nhận biết thông qua sự ngưng tủa hay kết dính của kháng nguyên – kháng thể hoặc bằng cách sử dụng những kháng thể đã được đánh dấu (bằng chất nhuộm huỳnh quang, đồng vị phóng xạ hay enzyme).

Trong số các phương pháp phân tích miễn dịch, phương pháp hấp phụ miễn dịch dùng enzyme (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay: ELISA) được quan tâm nhiều nhất do có tính đơn giản và hiệu quả cao. Phương pháp này có thể sử dụng cho hầu hết các loại kháng nguyên với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Nguyên tắc của kỹ thuật ELISA là sử dụng kháng thể đơn dòng phủ bên ngoài những đĩa giếng. Nếu có sự hiện diện của kháng nguyên mục tiêu trong mẫu, kháng nguyên này sẽ giữ lại trên bề mặt giếng. các kháng nguyên này sẽ được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp có gắn với enzyme như horseradish peroxydase hay alkaline phosphate. Khi bổ sung một cơ chất đặc hiệu của enzyme vào giếng, enzyme xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất để tạo ra các sản phẩm có màu hay phát sáng. Bằng cách theo dõi sự đổi màu có thể phát hiện sự hiện diện và định lượng kháng nguyên.

ELISA đã được sử dụng rộng rãi dưới dạng các bộ kit thương mại và có thể được cải tiến để tự động hóa. ELISA có thể sử dụng phát hiện và định lượng vi sinh vật trong thực phẩm trong thời gian vài giờ sau khi tăng sinh.

VI.7.3. Phương pháp lai phân tử

Hiện nay nhiều hệ thống đã được thiết lập dựa trên DNA để định lượng vi sinh vật và độc tố. Tuy nhiên, chỉ có phương pháp lai phân tử (hay còn gọi là phương pháp mẫu dò, probes) và phương pháp PCR là được thương mại hóa dưới dạng các bộ kit phát hiện vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm. Phương pháp sử dụng mẫu dò để phát hiện vi sinh vật trong thực phẩm được dựa trên sự phát hiện một đoạn gen đặc trưng của vi sinh vật. Cơ sở của việc sử dụng mẫu dò là phương pháp lai phân tử. Quá trình này bao gồm sự tách rời hai mạch đôi của chuỗi xoắn kép DNA khi nhiệt độ vượt quá nhiệt độ nóng chảy (T_m) của phân tử DNA và sự tái bắt cặp các trình tự nucleotide bổ sung khi nhiệt độ trở lại bình thường. Sự lai phân tử xảy ra khi đoạn mồi có trình tự nucleotide bổ sung với một vùng trình tự trên DNA mục tiêu gặp nhau do chuyển động nhiệt và khi nhiệt độ môi trường thấp hơn T_m ít nhất vài độ. Quá trình lai phân tử chiu ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu

tố: nồng độ DNA trong môi trường, nhiệt độ và thời gian phản ứng, kích thước các trình tự lai và lực ion của môi trường.

Ví dụ: ở hệ thống dò Gen – trak (Framingham, USA), hệ thống này sử dụng que thử với mẫu dò để phát hiện *Listeria* trong mẫu bơ sữa và mẫu môi trường. mẫu dò là những đoạn oligomer AND đánh dấu bằng hóa chất phát quang. Quy trình phân tích có thể chia làm 6 bước:

1) Phá vỡ tế bào thu nhận rRNA
2) Mẫu dò phát hiện chứa fluorescein isothiocyanate ở đầu 5` và 3` của phân tử được đặt vào phản ứng.
3) Que thử được bao bọc bởi polydeoxythymidine (dT) để gắn được với oligodA của mẫu dò.
4) Que thử được đặt trong ống đo chứa mẫu dò phát hiện được đánh dấu bằng enzyme
5) Sau khi rửa loại phần enzyme thừa, que thử được đặt vào ống đo chứa cơ chất tạo màu.
6) Sau khi ủ để hiện màu, màu được phát hiện ở bước sóng 450nm.

VI.7.4. Phương pháp PCR

Phương pháp PCR (polymerase chain reaction) là phương pháp invitro để tổng hợp DNA dựa trên khuôn là một trình tự DNA ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp mồi (primer) đặc hiệu cho đoạn DNA này. Kỹ thuật này do Karl Mullis mà cộng sự phát minh vào năm 1985. Hiện nay, kỹ thuật này được sử dụng rộng rãi để phát hiện, tạo ra các đột biến gen, chẩn đoán bệnh, phát hiện các mầm bệnh vi sinh vật có trong thực phẩm…

Tất cả các DNA polymerase đều cần những mồi chuyên biệt để tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn. Mạch khuôn thường là một trình tự DNA của gen (gọi là trình tự DNA mục tiêu) đặc trưng cho loài vi sinh vật mục tiêu hoặc là gen quy định việc tổng hợp một loại độc tố chuyên biệt của vi sinh vật này. Mồi là những đoạn DNA ngắn, có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của đoạn mạch khuôn và nhờ hoạt động của DNA polymerase đoạn mồi này được nối dài để hình thành mạch mới. Phương pháp PCR được hình thành dựa trên đặc tính này của DNA polymerase. Khi có sự hiện diện của hai mồi chuyên biệt bắt cặp bổ sung với hai đầu của một trình tự DNA trong phản ứng PCR, ở điều kiện đảm bảo hoạt động của DNA polymerase, đoạn DNA nằm giữa hai mồi sẽ được khuếch đại thành số lượng lớn bản sao đến mức có thể thấy được sau khi nhuộm bằng ethidium bromide và có thể thu nhận được đoạn DNA này cho các mục đích thao tác trên gen. Như vậy, để khuếch đại một trình tự DNA xác định, cần phải có những thông tin tối thiểu về trình tự của DNA, đặc biệt là trình tự base ở hai đầu đoạn đủ để tạo các mồi bổ sung chuyên biệt.

Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước:

- Bước 1: biến tính: trong một dung dịch phản ứng bao gồm các thành phần cần thiết cho sự sao chép, phân tử DNA được biến tính ở nhiệt độ cao hơn

T_m của phân tử, thường là 94 – 95^oC trong 30 – 60 giây. Mạch đôi DNA tách ra thành dạng mạch đơn.

- Bước 2: bước lai: nhiệt độ được hạ thấp hơn T_m của các mồi cho phép các mồi bắt cặp với mạch khuôn, nhiệt độ này khoảng 40 – 70^oC, trong khoảng 30 – 60 giây.
- Bước 3: tổng hợp: nhiệt độ được tăng lên đến 72^oC giúp cho DNA polymerase hoạt động tổng hợp tốt nhất. Thời gian của bước này tùy thuộc độ dài trình tự DNA cần khuếch đại, thường kéo dài từ 30 giây đến nhiều phút.

Trong phản ứng PCR, một chu kỳ gồm 3 bước như trên sẽ lặp lại nhiều lần, mỗi lần lặp lại làm tăng gấp đôi lượng mẫu của lần trước. đây là sự khuếch đại theo cấp số nhân. Theo tính toán sau 30 đến 40 chu kỳ sự khuếch đại sẽ tạo ra 10^6 bản sao. Sau phản ứng PCR, các DNA được nhuộm bởi ethidium bromide và có thể quan sát thấy thông qua việc điện di sản phẩm PCR trong gel agarose và quan sát dưới tia UV (bước sóng 320nm).

Quy trình chung cho việc phát hiện vi khuẩn gây bệnh trong mẫu thực phẩm bằng phương pháp PCR như sau:

- Bước 1: tăng sinh trên môi trường không hoặc ít chọn lọc trong thời gian từ 10 – 20 giờ.
- Bước 2: thu dịch nuôi cấy, ly tâm bỏ mảnh vụn, ly tâm gộp sinh khối tế bào vi khuẩn, huyền phù tế bào trong dung dịch TE (10mM Tris – HCl pH= 8,0, 1mM EDTA) với thể tích bằng 1/10 thể tích dịch nuôi cấy ban đầu, xử lý nhiệt ở 100^oC trong 10 phút, ly tâm loại bỏ tạp chất không tan ức chế phản ứng PCR.
- Bước 3: thực hiện phản ứng PCR
- Bước 4: điện di trên gel agarose 1,5% xem kết quả trên đèn UV.

Ngoài ra còn có một số phương pháp thử nhanh khác như:

- Kỹ thuật phân tách và tăng mật độ
- Kỹ thuật màng lọc phát huỳnh quang trực tiếp
- Kỹ thuật màng Petri
- Kỹ thuật Redigel
- Kỹ thuật độ dẫn điện, trở kháng.
- Kỹ thuật đo vi lượng calorie
- Kỹ thuật đo mức phóng xạ

Tài liệu tham khảo chương VI

1. Trần Linh Thước – Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mĩ phẩm – NXB Giáo dục
2. Nguyễn Đức Lượng – Vệ sinh an toàn thực phẩm – NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Câu hỏi ôn tập chương VI

1. Vi sinh vật chỉ thị là gì? Ý nghĩa? các chỉ tiêu vi sinh vật trong thực phẩm?
2. Kiểm tra vi sinh vật trong nguyên liệu thực phẩm và thực phẩm?

3. Phương pháp thu, bảo quản và chuẩn bị mẫu thực phẩm?
4. Các phương pháp định lượng vi sinh vật?
5. Các thử nghiệm sinh hóa quan trọng?
6. Phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật theo phương pháp truyền thống?
7. Phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật theo phương pháp không truyền thống?

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lân Dũng, 2003, Vi sinh vật học, NXB nông nghiệp.
2. Nguyễn Đức Lượng, 2000, Cơ sở vi sinh vật công nghiệp, Trường đại học bách khoa thành phố Hồ Chí Minh.
3. Lương Đức Phẩm, 2005, Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm, NXB Nông nghiệp.
4. Lê Xuân Phương, 2001, Vi sinh học công nghiệp, NXB Xây dựng.
5. Nguyễn Xuân Thành, 2005, Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp, NXB Giáo dục.
6. Trần Linh Thước, 2003, Phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, NXB Giáo dục.
7. Nguyễn Đức Lượng, 2005, An toàn vệ sinh thực phẩm, NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
8. M.R.Adam – M.O.Moss, Microbiology of food