

Bài đánh giá

Starter cultures để lên men Kimchi

Mo-Eun Lee†, Ja-Young Jang†, Jong-Hee Lee, Hae-Woong Park, Hak-Jong Choi, và Tae-Woon Kim*
Khoa Nghiên cứu, Viện Kimchi Thế giới, Gwangju 503-360, Hàn Quốc

Kimchi là một sản phẩm rau củ truyền thống của Hàn Quốc được lên men tự nhiên bằng nhiều vi sinh vật có trong rau củ sống. Trong số những vi sinh vật này, vi khuẩn axit lactic chi phối quá trình lên men. Việc lên men tự nhiên bằng các nguyên liệu sống chưa qua tiệt trùng dẫn đến tăng sinh nhiều vi khuẩn axit lactic, dẫn đến đa dạng biến thể về hương vị và chất lượng của kimchi, điều này có thể gây khó khăn trong việc sản xuất kimchi ở quy mô công nghiệp có chất lượng đồng bộ. Việc sử dụng starter cultures (nguồn giống vi sinh vật khởi động) đã được xem như là một phương pháp lên men thay thế trong sản xuất công nghiệp kimchi chuẩn hóa, và các xu hướng gần đây chỉ ra rằng nhu cầu đối với starter cultures đang trên đà gia tăng. Tuy nhiên, một số yếu tố nên được cân nhắc kỹ càng để ứng dụng thành công starter cultures vào việc lên men kimchi. Trong bài đánh giá này, chúng tôi tổng kết các nghiên cứu gần đây về starter cultures dùng cho kimchi, mô tả những vấn đề thực tế trong việc ứng dụng sản xuất kimchi quy mô công nghiệp, và bàn luận các phương hướng dành cho nghiên cứu sau này.

Lời giới thiệu

Kimchi là một loại thực phẩm truyền thống của Hàn Quốc được làm bằng cách cho lên men những loại rau củ, như là cải thảo, củ cải và dưa chuột muối, với nhiều loại gia vị, gồm bột ớt đỏ, tỏi, gừng, và các nguyên liệu khác. Việc cho thêm những sản phẩm hải sản lên men hoặc ướp muối cũng như những loại gia vị nêm khác là tùy chọn. Kimchi được lên men bằng các vi khuẩn axit lactic (LAB) ở nhiệt độ thấp, đảm bảo kimchi chín vừa và được bảo quản đúng cách. Các axit hữu cơ sinh ra từ các carbohydrates và làm giảm độ pH giúp duy trì độ tươi mới của rau củ trong khi lưu giữ. LAB sản sinh ra nhiều hợp chất ngoài các axit hữu cơ, gồm có CO₂, ethanol, mannitol, bacteriocin, axit γ -aminobutyric (GABA), ornithine, axit linoleic liên hợp, và oligosaccharide; những hợp chất này góp phần tạo nên những đặc trưng lên men và tác dụng đối với sức khỏe của kimchi. Kimchi được lên men đúng cách thì thơm ngon, sở hữu một kết hợp riêng biệt ngon miệng gồm các vị chua, cay, nóng, ngọt và tươi. Quá trình lên men bị ảnh hưởng rõ rệt bởi các yếu tố môi trường như là nhiệt độ, nồng độ muối, và sự có mặt của những nguyên liệu nhất định.

Những vi sinh vật hiếu khí trước tiên tăng số lượng trong những giai đoạn lên men kimchi ban đầu, trong khi các vi

sinh vật kỵ khí (chủ yếu là LAB) tăng đều đặn trong suốt những giai đoạn giữa của quá trình lên men. LAB như là *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., và *Weissella* spp. là hệ vi khuẩn chính tham gia vào quá trình này. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng *Leuconostoc mesenteroides* là vi sinh vật chính xuất hiện trong giai đoạn chín tối ưu của kimchi ở nhiệt độ thấp (thường <10°C); *Lactobacillus plantarum* trở thành loài chiếm ưu thế trong các giai đoạn sau và được xem như một vi sinh vật không mong muốn là nguyên nhân khiến kimchi biến chua ở nhiệt độ trên 10°C và giảm chất lượng của kimchi sau đó. Ngoài ra, *Lb. sakei* là LAB xuất hiện nhiều nhất trong kimchi chín quá và cùng với *Lb. plantarum*, khuẩn được cho là nguyên nhân gây chín quá và làm giảm chất lượng kimchi. Những gien liên quan đến sản xuất axit lactic của *Leu. mesenteroides* được thể hiện chủ yếu trong giai đoạn lên men ban đầu, trong khi đó những gien tương ứng của *Lb. sakei* được biểu hiện tích cực trong giai đoạn giữa và cuối quá trình lên men.

Cộng đồng vi khuẩn xuất hiện trong quá trình lên men kimchi trước đó đã được phân tích bởi các phương pháp định danh vi sinh có thể nuôi cấy được bằng cách nuôi cấy (culture-dependent) căn cứ trên các đặc điểm hình thái và kiểu hình của các tế bào sinh trưởng trên môi trường nuôi cấy thạch dinh dưỡng (agar culture media).

Mới đây, các phương pháp nghiên cứu vi sinh không cần nuôi cấy (culture-independent), như là phản ứng chuỗi polymerase (PCR)-Điện di ADN biến tính trên gel gradient (DGGE) và PCR-giải trình tự ADN bằng việc tổng hợp dựa trên khuếch đại trực tiếp gien 16S rARN, đã đem lại một biện pháp định danh loài vi khuẩn chính xác hơn. Đến nay *Leu. citreum*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. carnosum*, *Leu. gelidum*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. sakei*, *Weissella koreensis*, và *W. cibaria* đã được phát hiện là các vi sinh vật chủ đạo trong một số mẫu kimchi, trong khi đó thành viên thuộc giống (genera) *Lactococcus* và *Pediococcus* đã được phát hiện có quần thể thiểu số. Hơn nữa, một số lượng lớn các chuỗi ADN thực khuẩn thể được tìm thấy trong khi lên men kimchi trong một nghiên cứu gần đây, cho thấy một tỉ lệ lớn các LAB bị nhiễm các thể thực phẩm (bacteriophage), những vật này có thể là một yếu tố quyết định quan trọng đến việc lên men kimchi.

Với sản xuất sản phẩm kimchi thương mại, lên men tự nhiên bằng những nguyên liệu chưa qua thanh trùng dẫn đến tăng sinh nhiều LAB, làm khó kiểm soát quá trình lên men. Quá trình lên men tự nhiên này thường dẫn đến chất lượng không đồng bộ của thành phẩm kimchi. Việc sử dụng starter cultures đã được coi như là một biện pháp thay thế để giải quyết những vấn đề nổi trội này. Mục đích của việc áp dụng starter cultures vào việc lên men kimchi gồm tăng đặc tính cảm quan, kéo dài hạn sử dụng, và đạt được các thuộc tính chức năng cùng với chất lượng đồng bộ. Cho tới nay, *Leu. mesenteroides* DRC0211 đã được dùng làm starter culture trong sản xuất kimchi thương mại, và các xu hướng gần đây cho thấy nhu cầu đối với starter cultures đang trên đà gia tăng. Tuy nhiên, có nhiều hạn chế trong việc sử dụng starters vào lên men kimchi. Ví dụ như là khó mà tìm được starter cultures thương mại hóa, và giá đơn vị của sản phẩm kimchi tăng khi dùng những starter cultures như thế.

Bài đánh giá này có mục đích là tổng kết các đặc điểm của starter cultures dùng cho kimchi mà đã được nghiên cứu cho đến nay, bàn luận những khó khăn của việc áp dụng vào kimchi quy mô công nghiệp, và miêu tả những phương hướng nghiên cứu tương lai để giải quyết những khó khăn này.

Tiêu chuẩn chọn lựa và ứng dụng của Starter Cultures vào sản xuất Kimchi

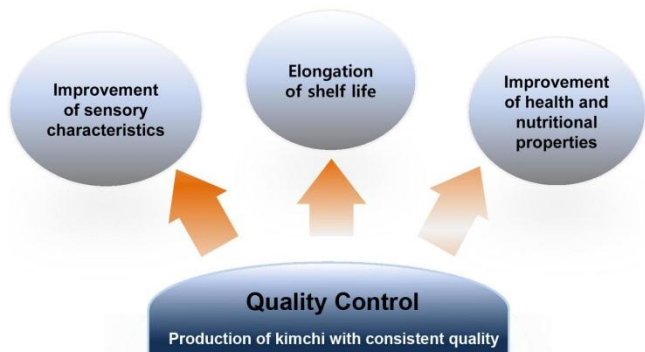
Starter cultures thường gồm một số lượng lớn các vi sinh vật mà gia tốc và đẩy mạnh quá trình lên men. Các vi sinh vật được chọn lựa cho mục đích này được cho là sở hữu những đặc điểm cụ thể, bao gồm khả năng thích nghi với môi trường lên men. Starter cultures dùng trong kimchi cần phải thích nghi tốt với môi trường lên men kimchi độc nhất, bao gồm nhiệt độ thấp, pH thấp, và có sự hiện diện của NaCl.

Sản phẩm kimchi tự làm và thương mại thường được bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh và chất lượng cảm quan của kimchi lên men ở nhiệt độ thấp (thường <10°C) thì trội hơn chất lượng cảm quan của kimchi được lên men ở nhiệt độ phòng. Do đó, những LAB được dùng trong kimchi liên tục đối diện với thách thức nhiệt độ thấp, và vì thế, một đặc điểm quan trọng của starter cultures là khả năng phát triển mạnh ở nhiệt độ thấp. Khi quá trình lên men kimchi tiếp diễn, thì độ pH giảm, trong khi đó độ axit chuẩn độ (titratable acidity) tăng do LAB sản xuất nhiều axit. Độ pH giảm xuống dưới 4,0 khi kimchi bị lên men quá mức. Sự có mặt của NaCl (1%-4%) trong kimchi có tác dụng ức chế tăng sinh một số vi sinh vật gây hư hỏng không mong muốn và tạo các điều kiện lý tưởng cho LAB sinh sôi.

Các nghiên cứu về starter cultures dùng cho kimchi đã tập trung chủ yếu vào sản xuất kimchi kéo dài giai đoạn chín tối ưu, tăng các thuộc tính cảm giác và chức năng tác dụng, cũng như là tăng độ an toàn bằng cách dùng các LAB nổi trội để lên men kimchi, các chủng vi khuẩn kháng axit mà ức chế các vi sinh vật làm chua hóa quá mức cùng với các chủng sản sinh bacteriocin (Bảng 1, Hình 1).

Cải thiện các đặc tính cảm quan

Leuconostoc spp. được dùng rộng rãi làm giống khởi động (starter) vì những chủng này được cho là có các tác dụng lý tưởng đối với việc lên men kimchi, bao gồm cải thiện các thuộc tính cảm giác của kimchi. Những nghiên cứu trước đây báo cáo rằng *Leuconostoc* spp. chi phối từ ban đầu đến giai đoạn giữa của quá trình lên men kimchi. Khi *Leu. mesenteroides* B1 được dùng làm giống khởi động, đường tự do được tiêu thụ sớm hơn và kết quả là hơi tăng sản xuất axit lactic, axit acetic và mannitol, điều này cho thấy rằng lên men kimchi mà dùng một nguồn giống khởi động thì quá trình lên men kết thúc sớm hơn, đi cùng với giải phóng nhiều chất chuyển hóa hơn so với trường hợp không dùng một starter culture trong quá trình lên men.



Hình 1. Dùng starter cultures để lên men kimchi Cải thiện đặc tính cảm quan (improvement of sensory characteristics). Kéo dài hạn sử dụng (Elongation of shelf life). Tăng thuộc tính dinh dưỡng và sức khỏe (Improvement of health and nutritional properties). Kiểm soát chất lượng (Quality Control). Sản xuất kimchi có chất lượng đồng bộ (Production of kimchi with consistent quality).

Bảng 1. Đặc điểm của starter cultures và tác dụng đối với lên men kimchi.

Starter cultures	Đặc điểm	Tác dụng đối với kimchi
Lb. plantarum HSU015, P. cerevisiae HSU02, Lb. brevis HSU01, Leu. mesenteroides HSU05	Lên men nhanh	Gia tốc quá trình lên men
Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides A02, Leu. mesenteroides subsp. dextranicum A18, Leu. paramesenteroides B30, Lb. bavaricus B01, Lb. homohiochii B21	Vi khuẩn axit lactic chịu lạnh	Gia tốc quá trình lên men
Leu. paramesenteroides làm chủng đột biến kháng axit	Kháng axit	Ức chế Lb. plantarum
Chủng đột biến của Leu. mesenteroides và Leu. paramesenteroides	Kháng axit adipic	Làm chậm chua hóa và tổng khả năng chấp nhận cao hơn
Leu. citreum IH22	Khuẩn lactic acid chiếm ưu thế tham gia lên men kimchi	Giữ chất lượng kimchi trong thời gian kéo dài
Bifidobacterium spp.	Sản sinh axit linoleic liên hợp (CLA)	Tăng nồng độ CLA
B. longum BO-11	Dung hạn với axit và mật	Tăng tác dụng chức năng
Leu. mesenteroides K2M5, Lb. sakei K5M3	Khuẩn lactic acid chiếm ưu thế tham gia lên men kimchi	Duy trì chất lượng kimchi trong thời gian dài
Leu. citreum GJ7	Sản sinh bacteriocin	Ngăn ngừa chín quá và tăng thời gian sử dụng
Lb. plantarum PL62	Sản sinh axit linoleic liên hợp với hoạt tính chống ung thư và chống béo phì	Tăng tác dụng chức năng
Leu. citreum, Lb. plantarum	Khuẩn lactic acid chiếm ưu thế tham gia lên men kimchi	Tăng tác dụng chức năng
Leu. mesenteroides strain B1	Sản sinh mannitol	Rút ngắn thời gian để chín tối ưu
Leu. mesenteroides LK93	Kháng muối mật và axit; Hoạt tính kháng nấm và kháng vi sinh vật	Ức chế tăng sinh nấm men tạo màng
Lb. plantarum 3099K, Lb. plantarum pnuK, Leu. mesenteroides pnuK	Hoạt tính chống oxi hóa và chống ung thư	Tăng tác dụng
Leu. citreum KACC91035	Hoạt tính enzyme dextransucrase cao	Tăng giải phóng isomaltooligosaccharide

Căn cứ vào các nghiên cứu tìm hiểu thành phần vi sinh vật chính của kimchi và mối liên quan của nó với vị kimchi, *Leu. mesenteroides* K2M5 đã được chọn làm giống khởi động để cải thiện các đặc tính cảm quan và kiểm soát thành phần vi sinh vật. Kể từ năm 2004, *Leu. mesenteroides* DRC đã được dùng làm một starter culture trong ngành công nghiệp kimchi Hàn Quốc để đạt được những tác dụng cảm quan tốt hơn.

Bên cạnh *Leu. mesenteroides*, *Leuconostoc* spp. khác cũng được ghi nhận là những giống chi phối theo nhiệt độ lên men.

Leu. gelidum và *Leu. citreum* đã được chứng minh là các giống nổi trội trong giai đoạn lên men ban đầu của kimchi lên men lần lượt ở 8°C và 15°C, trong khi đó *Leu. mesenteroides* được phát hiện là giống thiểu số. Ngoài ra, sau khi được đưa vào kimchi thì chủng *Leu. citreum* IH22 cho thấy sự chi phối nguồn giống vi sinh vật cấy (culture) và trì hoãn sinh trưởng của các LAB khác trong kimchi lên men ở 15°C, chứng tỏ rằng vi sinh vật này có thể được dùng làm một starter culture để duy trì chất lượng kimchi trong thời gian kéo dài.

Kiểm soát tốc độ lên men

Để đẩy nhanh quá trình lên men, *Leu. mesenteroides* HSU05, *Lb. plantarum* HSU015, *Lb. brevis* HSU01, và *Pediococcus cerevisiae* HSU02 đã được dùng trong starter cultures ở tỉ lệ là 1:1:1:1; điều này rút ngắn đi khoảng 24 tiếng trong mức thời gian cần thiết để đạt đến giai đoạn lên men tối ưu so với thời gian cần thiết của kimchi đối chứng ở 25°C; hơn nữa, việc sử dụng lẫn lộn các chủng vi sinh thì hiệu quả hơn chỉ dùng đơn lẻ một chủng. Năm chủng LAB ưa lạnh (*Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides* A02, *Leu. mesenteroides subsp. dextranicum* A18, *Leu. paramesenteroides* B30, *Lactococcus bavaricus* B01, và *Lc. homohiochii* B21) được cấy làm kimchi starters đã rút ngắn thời gian cần thiết đạt đến tình trạng chín tối ưu ở 8°C. Với kimchi mà không được cấy một starter, thì cần 10 ngày để đến được tình trạng chín tối ưu; ngược lại, toàn bộ chỗ mẫu kimchi được cấy starter chỉ cần 4 ngày là đạt được trạng thái chín tối ưu. Tuy nhiên, mặc dù rõ ràng là có thể rút ngắn được thời gian để đạt đến tình trạng chín tối ưu, nhưng việc phát triển các công nghệ để giữ chất lượng kimchi lâu dài sau khi đạt đến giai đoạn chín tối ưu thông qua việc lên men nhanh chóng vẫn chưa được cân nhắc xem xét.

Kéo dài hạn sử dụng

Mặc dù *Leuconostoc* là một giống chiếm ưu thế ban đầu, nhưng nó có nhược điểm là dùng làm một starter thì có tính ứng dụng thấp do khả năng kháng axit kém. Do đó, để bù cho khiếm khuyết này, các chủng có tính kháng axit đã được chọn, hay tính kháng axit đã được gia tăng thông qua sự đột biến, theo đó cải thiện khả năng ứng dụng của chủng này khi dùng làm starter. Kháng axit có thể giúp duy trì vai trò của các starters trong khi lên men kimchi, bởi vì kimchi cuối cùng đạt đến tình trạng hóa chua (pH khoảng 4.0). Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng lên men kimchi hoàn tất với điểm số đánh giá cảm giác cao hơn, và ức chế tăng trưởng của *Lactobacillus* spp. khi các đột biến kháng axit được dùng làm một starter, góp phần kéo dài hạn sử dụng của kimchi và tăng các đặc tính cảm giác. Độ pH thấp là điều kiện hạn chế sự sinh sôi của *Leu. mesenteroides* trong lên men kimchi; có thể khắc phục hạn chế này bằng cách dùng các chủng vi sinh đột biến kháng axit thu được qua xử lý nitrosoguanidine, những chủng mà có thể tăng sinh ở độ pH thấp (khoảng pH 4.0). Kimchi đã cấy chủng đột biến M-10 được đánh giá trội hơn về cảm giác và có giai đoạn chín tối ưu kéo dài khi lên men ở 10°C. Các chủng đột biến kháng axit adipic *Leu. mesenteroides* và *Leu. paramesenteroides*, với axit adipic, đã được dùng để áp chế tăng sinh của các vi sinh vật gây chua hóa trong khi lên men kimchi, tăng cường đặc tính cảm quan và kéo dài hạn sử dụng của sản phẩm kimchi một cách hiệu quả.

Nấm men (yeast) xuất hiện ở các giai đoạn lên men về sau có thể sản xuất nhiều enzymes làm mềm mô, gồm polygalacturonase, mà hủy hoại các chất pectic và những cấu trúc khác trong các mô cải thảo và củ cải làm giảm chất lượng kimchi. *Leu. mesenteroides* LK93 mà có các hoạt tính kháng vi sinh vật và kháng nấm cho thấy khả năng ức chế sinh sôi nấm men tạo màng. Tuy nhiên, các loại nấm men, mà dùng axit axetic và lactic làm nguồn carbon, cũng đã được dùng làm các starter cultures để giảm số lượng lớn các axit hữu cơ bị giải phóng quá nhiều trong các giai đoạn sau của lên men kimchi. Kết quả này cho thấy *Saccharomyces* spp. kéo dài hạn sử dụng của kimchi bằng cách giảm sản xuất các axit hữu cơ và tăng hương vị tươi ngon của kimchi. Hơn nữa, việc đưa vào đồng thời cả nấm men và chủng đột biến kháng axit *Leu. mesenteroides* M-100 có thể có tác dụng cộng hợp trên phương diện làm chậm chua hóa kimchi nhờ giải phóng ít axit lactic, kéo dài hạn sử dụng của kimchi bằng cách giảm nồng độ axit lactic và axit acetic nhờ *Saccharomyces fermentati*, và cải thiện khả năng chấp nhận tổng thể đối với các đặc tính cảm quan của kimchi.

Nhiều nghiên cứu đã tìm hiểu khả năng ứng dụng của các chủng vi sinh sản xuất bacteriocin với tư cách là starters trong kimchi. Những nghiên cứu này đã chủ yếu tập trung vào việc kéo dài giai đoạn chín tối ưu bằng cách ức chế các vi sinh vật làm chua hóa kimchi hay kiểm hãm các vi sinh vật có hại mà có thể nhiễm vào quá trình lên men kimchi ban đầu. Các nỗ lực để kéo dài hạn sử dụng của kimchi đã được cố gắng thực hiện thông qua dùng các LAB sản xuất bacteriocin để ức chế *Lb. plantarum*. Ngoài ra, việc thành công kéo dài hạn sử dụng kimchi cũng được báo cáo là do sử dụng chủng *Enterococcus* sp. sản xuất bacteriocin phân lập từ kimchi làm một starter. Tuy nhiên, việc sử dụng *Enterococcus* làm một starter được xem là không thích hợp do vấn đề an toàn, vì những vi khuẩn này góp phần làm nổi lên tình trạng kháng thuốc. Hơn nữa, đã định danh được *Leu. mesenteroides* và *Leu. Citreum* sản xuất bacteriocin, những vi sinh ức chế tăng sinh *Lb. plantarum*, và đã làm sáng tỏ các đặc điểm sản sinh bacteriocin của chúng. Trong số những vi khuẩn này, việc áp dụng *Leu. citreum* GJ7 làm một starter culture trong kimchi đã dẫn đến gia tăng các đặc tính cảm quan và kéo dài hạn sử dụng. *Leu. citreum* GJ7 cũng đã được chứng minh làm ức chế tăng sinh khuẩn *Escherichia coli* và vi khuẩn gram-âm trong khi lên men kimchi. Bên cạnh đó, các LAB sản xuất bacteriocin, loài *Leuconostoc* và *Weissella*, mà giải phóng các chất kháng khuẩn phi protein có tác dụng ức chế *Lb. sakei*, một trong những vi khuẩn LAB dồi dào nhất trong kimchi chín quá, đã được phân lập ra để ứng dụng trong tương lai với tư cách là starter cultures trong lên men kimchi.

Trong một nghiên cứu gần đây, *Lc. lactis*, mà có hoạt tính kháng khuẩn chống các khuẩn liên quan đến tính axit hóa quá mức của kimchi, gồm *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*, và *Lb. sakei*, được chứng minh là có tiềm năng làm một starter culture để kéo dài hạn sử dụng của kimchi.

Tăng tác dụng chức năng

Để thúc đẩy các thuộc tính chức năng của kimchi, nhiều nhà nghiên cứu đã tìm hiểu việc sử dụng starter cultures dùng cho kimchi. Một số nghiên cứu đã cho thấy việc cấy các starter cultures vào kimchi có thể đem lại những ích lợi cho sức khỏe thông qua việc gia tăng các hoạt tính kháng ung thư và chống oxy hóa. Starter cultures giải phóng GABA và các chất chống béo phì cũng đã được sử dụng. Một số LAB phân lập từ kimchi cũng đã được chứng minh có khả năng xúc tác quá trình tách carboxyl của glutamate, giải phóng sản phẩm cuối cùng là GABA và CO₂. *W. koreensis* OK1-6 phân lập từ kimchi thể hiện khả năng sản xuất ornithine vượt trội và hiệu quả cao trong việc ức chế tích lũy lipid nội bào khi biệt hóa các adipocyte. Hơn nữa, kimchi được lên men bằng *Leu. kimchi* GJ2 cho thấy tác dụng hạ cholesterol ở chuột được cho ăn uống nhiều chất béo và nhiều cholesterol.

Bifidobacterium spp. được dùng để tăng tác dụng chức năng của kimchi vì khả năng sống sót của chúng trong khi lên men, mặc dù có những yếu tố ngăn cản sự chi phối của những vi khuẩn này trong quá trình lên men kimchi.

Một chiến lược mới khai thác phản ứng enzyme của starter cultures đã được đề xuất để tăng sản xuất oligosaccharide và duy trì mức độ vị ngọt thích hợp của kimchi. Vi khuẩn *Leu. citreum* KACC 91035, mà biểu hiện các glycosyltransferases hoạt tính cao, đã được dùng để tổng hợp các oligosaccharides có lợi trong kimchi. Ngoài ra, việc bổ sung tổ hợp sucrose-maltose, với tư cách là chất cho và chất nhận, vào starter culture đã được chứng minh là đem lại mức độ vị ngọt thích hợp bằng cách giải phóng fructose và ngăn ngừa tổng hợp polymer bất lợi thông qua sản sinh isomaltooligosaccharide.

Có nhiều bằng chứng chứng minh cho những ích lợi sức khỏe tiềm năng của việc dùng các starter cultures; tuy nhiên, những nghiên cứu này chủ yếu được thực hiện bằng cách dùng trong những mô hình chuột hay vitro. Do đó, cần có các thử nghiệm lâm sàng để xác định liệu những kết quả nghiên cứu này có thể áp dụng cho con người được hay không.

Nồng độ chất cấy ban đầu và giám sát starter cultures

Nhiều thứ vi sinh vật khác nhau tồn tại trong các nguyên liệu sống và giai đoạn lên men ban đầu. Một đặc điểm quan trọng của một starter culture là khả năng chi phối của nó đối với các vi sinh vật vốn có trong các nguyên liệu sống.

Điều này phụ thuộc vào việc tăng sinh nhanh chóng dưới các điều kiện lên men và/hoặc khả năng sản sinh các chất đối kháng, như là bacteriocin. Số lượng vi khuẩn cấy vào ban đầu là một yếu tố quan trọng trong việc xác định liệu những starters đó có thể chi phối môi trường lên men được hay không. Thực vậy, đa số các nghiên cứu đã khảo sát các starter cultures có nhiều starter (7-8 log CFU/g) hơn 100 lần bằng số lượng LAB ban đầu (4-5 log CFU/g) thường có mặt trong những giai đoạn sản xuất kimchi ban đầu. Ngoài ra, nồng độ chất cấy ban đầu của các starters kimchi được cho là một yếu tố quyết định ảnh hưởng đến việc sản xuất giá đơn vị và các tác động đối với lên men kimchi. Tuy nhiên, những yếu tố này vẫn chưa được miêu tả rõ ràng. Do đó, cần có thêm nghiên cứu để xác định nồng độ cấy starters kimchi tối ưu và để giảm số lượng vi sinh vật ban đầu trong các nguyên liệu sống làm kimchi.

Khi cấy starter cultures, chúng thường lẫn lộn với vi sinh vật địa phương có trong các nguyên liệu sống. Để làm rõ hơn sự tăng trưởng của starter kimchi và để dự đoán trước sự chi phối của starter trong khi lên men, cần phải giám sát starter đó trong hệ tự nhiên hoặc hệ đã được cấy. Sự tăng sinh của các starter cultures đã được theo dõi bằng đếm số tế bào, soi kính hiển vi, và các kỹ thuật phân tử như là PCR-DGGE, tích hợp gien ngẫu nhiên dùng các gien nhảy (transposon), giải mã trình tự bằng tổng hợp mã vạch, và PCR với các bộ mồi chuyên biệt (specific primer sets) (Bảng 2). Tuy nhiên, khó mà phân biệt được starter cultures với hệ vi sinh vật tự nhiên trong kimchi vì các chủng phân lập từ kimchi điển hình được dùng làm starter cultures. A *Leuconostoc* đột biến được tạo ra bằng cách tích hợp bộ gien gián tiếp gien nhảy (transposon-mediated genomic integration) của gien kháng chloramphenicol (ở mèo) đã được chứng minh là hữu ích trong việc theo dõi tăng sinh của chủng starter. Dựa trên những nghiên cứu trước đây, có thể sẽ cần phải thiết lập một phương pháp chuẩn hóa để xác định số lượng starter culture nhằm giám sát sự sinh sôi và sống sót của chúng một cách hiệu quả.

Tiền xử lý các nguyên liệu Kimchi

Quần thể các vi sinh vật có mặt trong các nguyên liệu sống là yếu tố quan trọng trong việc định danh diễn thế hệ vi sinh vật địa phương trong kimchi, bởi lẽ kimchi nhìn chung được chế biến bằng quá trình lên men tự nhiên mà không có bất cứ quy trình tiệt trùng nào. Do đó, cần giảm số lượng vi sinh vật ban đầu trong nguyên liệu sống để tối đa hóa hiệu suất và duy trì hoạt động của starter cultures bổ sung vào quá trình lên men kimchi. Như vậy, việc xử lý trước các nguyên liệu sống để giảm số lượng các vi sinh vật ban đầu có thể ảnh hưởng lớn đến các đặc điểm của sản phẩm, đặc biệt khi có dùng starter cultures.

Bảng 2. Nồng độ chất cấy ban đầu và giám sát starter cultures được dùng để lên men kimchi.

Loại kimchi	Starter cultures	SL LAB ban đầu Kiểm soát kimchi /Starter kimchi	Phương pháp giám sát
Kim chi cải thảo	Leu. mesenteroides DRC	-	Phương pháp tích hợp gen ngẫu nhiên
Kim chi cải thảo	Leu. citreum GJ7	4.2 log CFU/ml 7.6 log CFU/ml	Soi kính hiển vi & API 50CHL kit PCR
Kim chi cải thảo	Lb. plantarum PL62	4.0 × 10 ⁶ CFU/ml 1.8 × 10 ⁸ CFU/ml	PCR dùng cặp mồi chuyên biệt /DGGE
Kim chi cải thảo	Leu. citreum GJ7	3.43 log CFU/ml 7.50 log CFU/ml	Soi kính hiển vi API 50CHL kit PCR
Kim chi cải thảo	Leu. citreum KM20/ Lb. plantarum KCTC 3099	5 log CFU/ml 4~4.5 log CFU/ml	Đếm số vi sinh vật dùng môi trường
Kimchi cải thảo & củ cải	Leu. mesenteroides B1	- 7 log CFU/g	Giải mã trình tự bằng tổng hợp mã vạch
Kim chi cải thảo	Leu. mesenteroides LK93	3.63 log CFU/ml 7.85 log CFU/ml	Giải mã trình tự 16S rADN
Dongchimi	Leu. citreum KACC 91035	5 log CFU/ml 7 log CFU/ml	Phân tích PCR-DGGE

Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu điều tra việc giảm số lượng các vi sinh vật ban đầu trong nguyên liệu sống đã được tiến hành để cải thiện độ an toàn và hạn sử dụng kimchi hơn là để áp dụng starter culture. Ví dụ, những vi sinh vật trên các nguyên liệu sống gây ô nhiễm có thể giảm được đáng kể bằng ozone (tối đa 6 ppm) hay chiếu xạ gamma (tối đa 5 kGy) mà không tác động đến hàm lượng đường chất, và kimchi làm từ các nguyên liệu đã qua sát trùng cho thấy ít thay đổi về phương diện quần thể vi sinh vật nhưng biểu hiện thời gian bảo quản lâu hơn. Thật không may là những phương pháp này không đáp ứng những tiêu chuẩn tiêu dùng về an toàn thực phẩm và chưa được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm.

Việc bổ sung starter cultures hỗn hợp gồm *Leu. citreum* và *Lb. plantarum* vào cải thảo muối tiết trùng được chứng minh là làm tăng đáng kể số lượng LAB, và những đặc điểm lên men được chỉ ra là giống với đặc điểm của kimchi lên men tự nhiên. Tuy nhiên, vì đa số các nguyên liệu sống đều dễ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ, cần có thêm nghiên cứu về các công nghệ mới nhằm giảm số lượng vi sinh ban đầu trong nguyên liệu sống để dùng các starter cultures hiệu quả hơn.

Đánh giá độ an toàn của starter cultures

Bất kể tầm quan trọng của việc tiến hành đánh giá độ an toàn trước khi áp dụng các starters vào kimchi thương mại, các đánh giá về độ an toàn hiếm khi được thực hiện trong các nghiên cứu về phát triển starter kimchi.

Trong một trong hai nghiên cứu về chủ đề này được công bố cho đến nay, *Leu. mesenteroides* K2M5 và *Lb. sakei* K5M3, cả hai chủng này được dùng làm starters kimchi, không biểu hiện các đặc điểm có hại, như là tan huyết beta (β -hemolysis), hình thành amoniac và indole, và hóa lỏng gelatin, và không thể hiện hoạt tính của một số enzyme gây hại, bao gồm phenylalanine deaminase, β -glucuronidase, β -glucosidase, 7 α -dehydroxylase, và nitroreductase. Ngoài ra, một nghiên cứu gần đây đã đánh giá khả năng kháng sinh và sản sinh amine nguồn gốc sinh vật của chủng *Lactobacillus* spp. phân lập từ kimchi.

Gần đây, nhiều nghiên cứu đã ghi nhận kết quả giải mã trọn vẹn bộ gen của nhiều LAB phân lập từ kimchi (Bảng 3). Những kết quả này sẽ đem lại nhận thức về các thuộc tính an toàn kiểu gen liên quan đến sở hữu các gen kháng sinh và các gen sản sinh độc tố.

Sản xuất đại trà starter cultures dùng cho kimchi

Cần sản xuất quy mô lớn để ứng dụng starter cultures dùng cho kimchi vào công nghiệp, và cần có nhiều kỹ thuật trình bày để phân phối ổn định. Quy trình cấy nguồn giống khởi động, chọn lựa các chất bảo vệ và kỹ thuật ổn định hóa là các biến số quan trọng. Sản xuất sinh khối thông thường theo sau là quá trình ổn định hóa các tế bào bằng cô đặc cryo và sấy lạnh. Để tăng khả năng sống sót của các LAB đã sấy đông, vô số các chất bảo vệ đã được sử dụng. So với sữa gầy, 10% tỏi băm mịn nhuyễn cho thấy hiệu quả bảo vệ cryo thích hợp.

Bảng 3. Đặc trưng trình tự gen của vi khuẩn axit lactic phân lập từ kimchi

Chủng/Strains	Số đăng ký Ngân hàng Gen/GenBank Accession No.	Kích cỡ NST/ Chromosome size (Mb)	Hàm lượng GC (%)	Năm xuất bản
<i>Leu. citreum</i> KM20	DQ489736	1.80	39.0	2008
<i>Leu. kimchii</i> IMSNU11154	CP001758	2.01	37.9	2010
<i>Leu. argentinum</i> KCTC 3773	AEGQ00000000	1.72	42.9	2010
<i>Lb. plantarum</i> ST-III	CP002222	3.25	44.5	2011
<i>Leu. fallax</i> KCTC 3537	AEIZ00000000	1.64	37.5	2011
<i>W. cibaria</i> KACC 11862	AEKT01000000			2011
<i>Leu. gelidum</i> KCTC 3527	AEMI00000000			2011
<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> KCTC 3167	AELK00000000	2.96	42.8	2011
<i>Lb. animalis</i> KCTC 3501	AEOF00000000	1.88	41.1	2011
<i>Leu. inhae</i> KCTC 3774	AEMJ00000000			2011
<i>Lb. farciminis</i> KCTC 3681	AEOT00000000	2.50	36.4	2011
<i>W. koreensis</i> KACC 15510	CP002899	1.42	35.5	2011
<i>Leu. kimchii</i> strain C2	CP002898	1.88	37.9	2011
Chủng <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18	CP003101	1.90	37.8	2012
<i>W. koreensis</i> KCTC 3621T	AKGG00000000	1.73	35.5	2012
<i>Leu. gelidum</i> JB7	CP003839	1.89	36.68	2012
<i>Leu. carnosum</i> JB16	CP003851	1.64	37.24	2012
<i>P. pentosaceus</i> SL4	CP006854	1.79	37.3	2013
<i>Lb. plantarum</i> Wikim18	JMEL00000000	3.35	44.3	2014

Mới đây, khả năng sống sót của LAB sấy đông, gồm *W. cibaria*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, và *Leu. citreum*, đã được đánh giá bằng các chất bảo vệ loại thực phẩm (ví dụ sữa gầy, dịch chiết nấm men/yeast extract, bột đậu tương, và trihaloza). Bột đậu tương được chứng minh là có ích nhất trong các chất bảo vệ được nghiên cứu, duy trì xấp xỉ 90% khả năng sống sót của các LAB trong quá trình sấy đông lạnh.

Để cung cấp starter cultures cho các nhà máy kimchi với mức chi phí thấp, các quy trình nuôi cấy LAB dùng môi trường MFL chứa chiết xuất cải thảo, maltose, dịch chiết nấm men, và muối vô cơ đã được tìm hiểu. Số lượng *Leu. citreum* GR1 được nuôi trong môi trường MFL cao hơn 2,2 lần so với số lượng thu được trong môi trường MRS tiêu chuẩn. Ngoài ra, khả năng chống mất cân bằng của *Leu. mesenteroides* có thể được cải thiện bằng việc nuôi trong môi trường MRS có bổ sung glutathione, chất tham gia vào khả năng kháng axit, chống oxy hóa và chống mất cân bằng thẩm thấu.

Lời kết và triển vọng tương lai

Để có thể đáp ứng được nhu cầu kimchi đang tăng trên toàn cầu, cần phát triển các phương pháp xác thực đem lại sản phẩm chất lượng cao và ổn định. Phương thức lý tưởng nhất bao gồm cấy starter cultures đã được tối ưu hóa và kiểm soát quá trình lên men.

Đa số kimchi sản xuất thương mại vẫn dựa vào lên men tự nhiên; tuy nhiên, khả năng về sau sử dụng starter cultures đã trở nên thu hút đối với ngành công nghiệp này hơn nhờ có những tiến bộ trong các đặc điểm cảm quan, độ an toàn, ích lợi đối với sức khỏe và hạn sử dụng của kimchi.

Một số starter cultures dùng cho kimchi đã được chứng minh có khả năng ức chế các vi sinh vật liên quan đến việc kimchi bị chín quá và các mầm bệnh liên quan đến thực phẩm. Hơn nữa, starter cultures đã được chỉ ra là sản xuất được axit lactic, axit acetic, và mannitol từ đường tự do nhiều hơn nhiều trong giai đoạn lên men ban đầu, kết quả làm gia tốc quá trình lên men.

Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu đã kết luận rằng kimchi được cấy starter cultures có các thuộc tính tăng cường sức khỏe tốt hơn như là chống oxy hóa, chống ung thư và hiệu quả chống béo phì, so với kimchi thông thường. Kimchi dùng starter cũng sản xuất nhiều oligosaccharides và GABA hơn. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc sử dụng starter cultures cũng liên quan đến khả năng kiểm soát không trọn vẹn toàn bộ quá trình lên men kimchi; những nghiên cứu này nhìn chung được thực hiện trong thời gian ngắn; tức là không đủ lâu để đánh giá được khả năng kéo dài hạn sử dụng của kimchi.

Hiện tại, độ sẵn có của các chuỗi bộ gen của nhiều vi sinh vật cũng đã cho phép các nhà nghiên cứu nhanh chóng phân biệt được tác dụng chuyển hóa của những chủng cụ thể. Thực tế thì, những bộ gen đã được giải mã của nhiều LAB phân lập từ kimchi hiện đang có sẵn và có thể cung cấp thông tin hữu ích để tối ưu hóa starter cultures.

Mặc dù nhiều nghiên cứu đã tìm hiểu việc sử dụng starter cultures vào lên men kimchi, bức tranh rõ ràng về khả năng ứng dụng của phương pháp này vẫn chưa nổi lên trọn vẹn. Thực tế thì, một số starter cultures thực sự đang được sử dụng trong sản xuất kimchi công nghiệp, và một số vấn đề thực tế vẫn tồn tại cần được giải quyết để tăng chất lượng của loại kimchi dùng starter cultures. Những vấn đề trong sản xuất kimchi thương mại sử dụng starters gồm (i) thiếu nhiều loại starter cultures đã được thương mại hóa, (ii) tăng giá đơn vị của sản xuất kimchi do bổ sung starter, (iii) thiếu các nguyên tắc hướng dẫn đánh giá độ an toàn của starter cultures dùng cho kimchi, và (iv) thiếu các phương pháp tiên tiến để giảm số lượng vi sinh vật ban đầu trong các nguyên liệu sống. Bên cạnh đó, cần có thêm nghiên cứu về các tương tác giữa thể thực khuẩn và vật chủ (phage-host interaction) để đánh giá sự đóng góp của diễn thể LAB (LAB succession) vào quá trình lên men kimchi, điều này có thể hỗ trợ tối ưu hóa giai đoạn bảo quản và ngăn ngừa tình trạng chín quá của kimchi, tạo điều kiện phát triển starter cultures kimchi kháng thực khuẩn thể.

Hiện thời, sản xuất kimchi nhà máy quy mô công nghiệp đã gia tăng so với sản xuất kimchi làm tại nhà. Do đó, sẽ cần có thêm nỗ lực nghiên cứu để gia tốc các cải tiến trong chất lượng kimchi, đặc biệt là trong bối cảnh sản xuất quy mô công nghiệp. Do đó, nghiên cứu về starter cultures dùng cho kimchi nên có mục tiêu là để giải quyết những vấn đề này.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi chương trình phát triển công nghệ thực phẩm giá trị gia tăng cao, thuộc Bộ nông nghiệp, lương thực và nông thôn Hàn Quốc (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs) và được cấp phép nghiên cứu bởi Viện nghiên cứu Kimchi thế giới (World Institute of Kimchi).

Received: January 12, 2015

Revised: February 4, 2015

Accepted: February 4, 2015

First published online February 12, 2015

**Corresponding author Phone: +82-62-610-1723;*

Fax: +82-62-610-1853;

E-mail: korkimchiman@wikim.re.kr †

These authors contributed equally to this work. pISSN

1017-7825, eISSN 1738-8872

Copyright© 2015 by The Korean Society for

Microbiology and Biotechnology

Dịch tiếng Việt: Trần Tuyết Lan

Nhóm: Hạ Mến, hướng dẫn ăn đúng

Website: hamen.org