

Vi sinh vật tăng cường sức khỏe trong thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam: Bài đánh giá

Nguyễn La Anh

Viện Nghiên cứu Công nghiệp Thực phẩm, 301 Đường Nguyễn Trãi, Q. Thanh Xuân., Hà Nội 100000, Việt Nam

Bản gốc: <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.08.004>

Dịch sang tiếng Việt: Trần Tuyết Lan – [Nhóm Hạ Mên, hướng dẫn ăn đúng](#)

Tóm tắt

Việt Nam có lịch sử sở hữu nhiều sản phẩm lên men truyền thống lâu đời mà có chứa một loạt các vi sinh vật có các đặc tính công nghệ, bảo quản và cảm quan thuận lợi cho quá trình chế biến thực phẩm cũng như là những đặc tính chức năng khác. Bài đánh giá này nhấn mạnh những thực phẩm lên men truyền thống phổ biến nhất của Việt Nam và những vi khuẩn bản địa có tác dụng tăng cường sức khỏe trong những thực phẩm đó.

1. Lời dẫn

Thực phẩm lên men không có nguồn gốc từ sữa là loại thức ăn phổ biến ở châu Á; trong số này thì các đặc tính dinh dưỡng và sinh lý của *kimchi* Hàn Quốc có đặc trưng rõ nhất. Những thực phẩm lên men khác ở châu Á đã được đánh giá trên phương diện công nghệ chế biến chúng cũng như là vai trò của vi khuẩn axit lactic (LAB) đối với các đặc tính dinh dưỡng, bảo quản và cảm quan của các thực phẩm này. Tuy nhiên, chưa có nhiều dữ liệu về những thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam.

Việt Nam, thuộc Đông Nam Á, là một nước nhiệt đới đông dân với lịch sử sản phẩm lên men truyền thống lâu đời. Không giống với các quốc gia phương Tây, nơi mà các loại thực phẩm lên men thương mại được sản xuất quy mô lớn dùng các nguồn giống vi sinh vật khởi động (starter cultures) mà được sản xuất công nghiệp, ở Việt Nam, hầu hết những thực phẩm lên men này được làm tại nhà hoặc ở quy mô nhỏ dùng các phương pháp truyền qua nhiều thế hệ. Đa số những thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam được làm thủ công và liên quan mật thiết đến hệ vi khuẩn tự nhiên ở địa phương, do vậy chúng là một nguồn cung cấp thích hợp các vi sinh vật bản địa có lợi.

Nghiên cứu về các loại thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam chủ yếu tập trung vào đa dạng sinh học vi sinh vật cũng như là các đặc tính công nghệ và cảm quan như là sản xuất axit lactic, phát triển hương vị và bảo quản thực phẩm. Một số nghiên cứu gần đây đã được tiến hành dựa trên những lợi ích sức khỏe của các vi sinh vật phân lập từ thực phẩm lên men; tuy nhiên vẫn chưa có nhiều dữ liệu. Bài đánh giá này tóm tắt dữ liệu về thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam nhằm mô tả chung cụ thể về những đặc tính chức năng của những thực phẩm đó.

2. Bàn luận

2.1. Thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam

Bảng 1 là danh sách những thực phẩm lên men nổi tiếng nhất của Việt Nam. Về quá trình lên men thì các thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam được chia thành hai nhóm: (i) thực phẩm cần lên men ngắn hạn và (ii) thực phẩm cần lên men dài hạn. Thực phẩm lên men ngắn hạn thường có vị chua, dùng để ăn luôn hoặc bảo quản ở 4–8 °C, và có hạn sử dụng ngắn. Thực phẩm lên men dài hạn có hàm lượng muối (NaCl) cao nhằm ngăn ngừa lây nhiễm mầm bệnh. Tương tự với những nền ẩm thực châu Á khác, nguyên liệu sống được dùng để làm thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam thường không có nguồn gốc từ sữa và không đất đỏ cũng như là gồm nhiều loại rau củ

Bảng 1
Thực phẩm lên men truyền thống tiêu biểu ở Việt Nam.

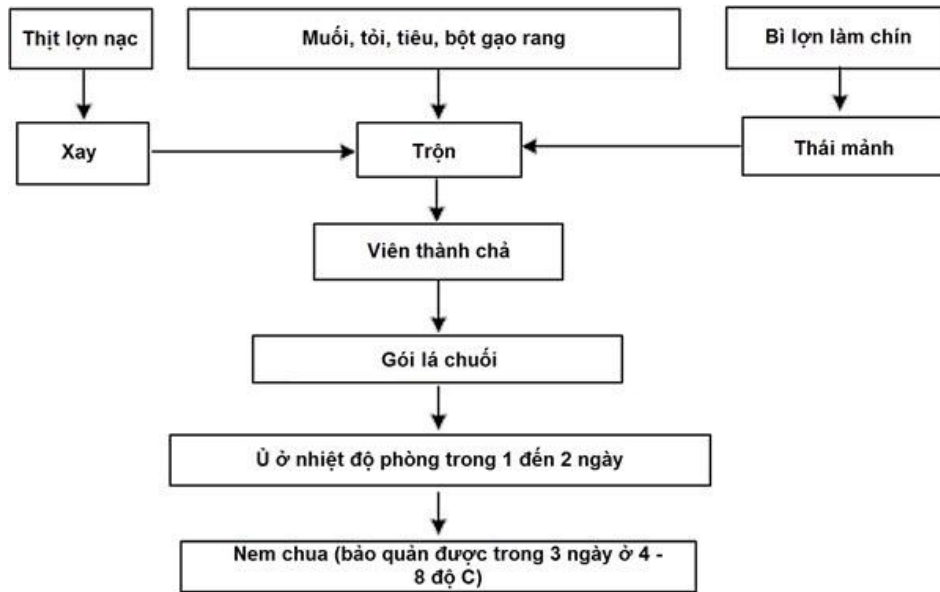
Tên sản phẩm	Sản phẩm	Nguyên liệu	Xuất xứ	Hệ vi sinh vật	Reference
Lên men ngắn hạn <i>Nem chua</i>	Khai vị	Thịt lợn nạc sống, bột gạo rang, gia vị, muối, bì lợn	Cả nước	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. farciminis</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lactococcus garvieae</i>	[4–11]
<i>Thịt lợn chua</i>	Khai vị	Thịt lợn, bột gạo rang và gia vị	Bắc Bộ	<i>Lactic acid bacteria</i>	[12]
<i>Com mẻ</i>	Gia vị, chất tăng vị chua	Com	Cả nước	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. acidophilus</i>	[13]
<i>Dưa chua</i> (<i>Dưa muối</i>)	Khai vị	Trái cây hoặc rau củ, muối	Cả nước	<i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. gaserri</i>	[16–19]
Lên men dài hạn					
<i>Mắm chua</i>	Sốt chấm	Cá nước mặn hoặc nước ngọt, rau thơm, rượu, muối, đường	Nam Bộ	<i>Lactobacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>P. acidilactici</i> <i>Lb. farcimins</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	[22–24]
<i>Tôm chua</i>	Khai vị	Tôm nước ngọt hoặc nước lợ	Nam và Nam Trung Bộ	Halophilic <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Lb. plantarum</i>	[25]
<i>Nước mắm</i>	Gia vị Nước chấm	Cá biển, muối	Cả nước	Halophilic <i>Lb. plantarum</i> <i>B. subtilis</i>	[28]
<i>Trương</i>	Gia vị Nước chấm	Đậu tương, gạo nếp nấu chín, muối	Bắc và Trung Bộ	<i>B. subtilis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Enterobacter mori</i>	[29–31]

(như là cà, củ cải, bắp cải, măng, giá đỗ, tỏi tây, hành tây và dưa chuột), trái cây (như là phần xơ ăn được của quả khế, quả sung và xoài xanh), gạo, cá, tôm và thịt. Rau thơm và gia vị như là tỏi, ớt hoặc tiêu, hành lá và gừng thường được dùng làm các nguyên liệu phụ. Nhiệt độ lên men chủ yếu phụ thuộc vào môi trường tự nhiên. Để thực phẩm dưới nắng hoặc trong bóng râm cũng có thể kiểm soát nhiệt độ lên men, tùy thuộc vào quy trình chế biến truyền thống. Các chủng LAB giữ vai trò quan trọng trong quá trình lên men nhiều loại thực phẩm. Việt Nam là một nước có hình dáng trải dài với các điều kiện đất đai và khí hậu khác biệt tùy thuộc vào vĩ độ. Do đó, những thực phẩm lên men truyền thống có thể đặc trưng cho nông sản địa phương hoặc có thể phổ biến trên khắp cả nước với chỉ những cải biến không đáng kể. Những sản phẩm này thường được tiêu thụ hàng ngày như món khai vị hoặc món ăn kèm.

2.1.1. *Nem chua*

Nem chua là một sản phẩm xúc xích lên men được nghiên cứu tương đối kỹ. Làm *nem chua* là hoạt động phổ biến ở những vùng khác nhau trên cả nước (Hình 1). Các nguyên liệu chính của *Nem chua* bao gồm thịt lợn nạc xay nhỏ (95% protein), bì lợn luộc và thái nhỏ (5% protein),

bột gạo rang, muối (xấp xỉ 2%, w/w) và gia vị (tiêu và tỏi). *Nem chua* được làm như sau: trộn các nguyên liệu theo công thức sau đó nắn thành các khối nhỏ hoặc hình trụ, bọc một số loại rau thơm như là vài mẫu lá ổi hoặc lá đinh lăng và mấy miếng tỏi hoặc ớt (tùy theo địa phương), gói bằng lá chuối, gấp hai đầu rồi cuốn chặt, bao bên ngoài bằng một lớp lá chuối to hơn. Việc gói chặt nem sẽ ngăn không khí thâm nhập vào hỗn hợp, do vậy tạo ra một môi trường tương đối kỵ khí mà thuận lợi tăng sinh LAB và làm sản phẩm chua cũng như là chín sau 1 – 2 ngày tùy thuộc vào nhiệt độ không khí (20–37 °C). Bột gạo rang dùng trong phương pháp làm *nem chua* truyền thống có tác dụng như nguồn cung cấp carbohydrate cho LAB bản địa sinh trưởng và góp phần tạo nên vị chua. Các nhà sản xuất đôi khi dùng một miếng *nem chua* đã lên men từ mẻ nem trước để làm nguồn giống khởi động cho quá trình sản xuất mẻ nem mới. Mật độ tế bào của LAB là (9 ± 1.3) (lg (CFU/g)) cuối quá trình lên men, khá là cao và hạ độ pH của thành phẩm xuống 4,64–4,77 đây là điều kiện cần thiết để duy trì sản phẩm ở mức độ an toàn vi sinh vật chấp nhận được.



Hình 1. Lưu đồ cách làm Nem chua.

Phân tích vi sinh vật của 60 mẫu *nem chua* thu từ các tỉnh khác nhau trên khắp cả nước (Hà Nội, Thanh Hóa, Huế và thành phố Hồ Chí Minh) và được làm trong các mùa khác nhau (từ tháng 3/2008 đến tháng 5/2010) cho thấy LAB chiếm 80%–100% tổng số vi khuẩn hiếu khí (TABC) trong các mẫu nem. Loài LAB chi phối xuất hiện tự nhiên trong *nem chua* là *Lactobacillus plantarum* (67,6%), *Pediococcus pentosaceus* (21,6%), *Lactobacillus brevis* (9,5%), và *Lactobacillus farciminis* (1,3%). Một nghiên cứu gần đây phân tích độ đa dạng của các chủng LAB bản địa trong 10 mẫu *nem chua* từ Hà Nội dùng (GTG)(5)-Phản ứng chuỗi trùng lặp polymerase, điện di đồ đặc trưng và khối phổ ion hóa mẫu hấp thụ dựa trên sự hỗ trợ của các chất nền và năng lượng laser-thời gian bay (MALDI-TOF MS) đã chỉ ra mật độ cao của *Lb. farciminis* (32,8%), *Lb. plantarum* (26,1%), *Leuconostoc citreum* (12,6%), *Lactobacillus pentosus* (8,4%), *Lb. brevis* (5,0%), *P. pentosaceus* (3,4%), và *Pediococcus acidilactici* (2,5%) cùng với mật độ thấp của *Leuconostoc fallax*; *Pediococcus stilesii*; *Weissella cibaria*; và các loài khác như là *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidiphiscis*, và *Lactococcus lactis* (có tỉ lệ hiện hành dưới 1%).

Lb. plantarum, chủng thịnh hành nhất trong *nem chua*, được dùng làm giống khởi động vì các đặc tính axit, bảo quản sinh học và cảm quan của nó (liên quan đến sản xuất bacteriocin). *Nem chua* lấy từ tỉnh Huế Trung bộ có những vi khuẩn khác như là *Bacillus amyloliquefaciens* N1 mà sản xuất nhiều protease ngoại bào, chất thúc đẩy quá trình chín *nem chua* và đem lại kết cấu đặc trưng cho nem.

2.1.2. Thịt lợn chua

Thịt lợn chua là thịt lợn lên men chua, một thực phẩm lên men truyền thống xuất xứ từ tỉnh Phú Thọ thuộc vùng Tây Bắc của Việt Nam. Để làm *Thịt lợn chua*, đầu tiên nướng thịt trên than; thái mỏng; trộn với bột gạo rang (20%), muối (khoảng 1,5%), đường (1%–3%), và các gia vị; rồi lên men ở nhiệt độ không khí xấp xỉ 30°C trong 3-5 ngày.

Thành phẩm có hương vị đặc trưng (vị chua và hơi ngọt) và có màu nâu vàng cũng như là có thể ăn cùng lá sung hoặc lá ổi. Thành phẩm có hàm lượng ẩm là 64%, hàm lượng protein là 17%, hàm lượng lipid là 11%, độ pH xấp xỉ 5, và mật độ LAB là 8,3(lg (CFU/g)). Sau khi bảo quản lạnh trong 4 ngày, độ pH của sản phẩm giảm xuống 4,7 và mật độ LAB duy trì ở cùng mức. Một nghiên cứu đã sử dụng thành công *Lb. plantarum* H1.40 phân lập từ *nem chua* để lên men *Thịt lợn chua*.

2.1.3. Com mẻ

Com mẻ là tương lên men chua làm từ com nát cho lên men trong hộp đựng sạch đóng kín trong 7–10 ngày. Đôi khi, sản phẩm lên men từ mẻ trước được cho vào mẻ đang làm để xúc tiến quá trình chua hóa. Trong khi lên men, com biến đổi từ dạng nguyên hạt thành sản phẩm ướt nát và cuối cùng thành chất kem màu trắng sữa với hương vị chua nhẹ. Sau quá trình lên men, sản phẩm được giã nghiền và đem rây. *Com mẻ* được dùng làm chất tăng vị chua trong nấu nướng cũng như là đem đến vị chua và hương đặc trưng cho món ăn. *Com mẻ* có độ pH là 2,9–3,5, hàm lượng ẩm là 71%–85%, tổng hàm lượng protein là 0,27%–0,49%, hàm lượng carbohydrate là 2,9%–5,8%, và hàm lượng chất béo là 0,53%–2,6% tùy thuộc vào giống gạo được dùng. Phân lập LAB từ 28 mẫu *Com mẻ* lấy từ sáu tỉnh dọc đồng bằng châu thổ sông Mekong (phía Nam của Việt Nam) cho thấy sự xuất hiện của *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, và *Lb. acidophilus*.

2.1.4. Dưa chua

Dưa chua (hay *Dưa muối*) là tên gọi chung cho loại thực phẩm làm từ trái cây hoặc rau củ lên men. Phương pháp lên men trái cây/rau củ truyền thống thì đơn giản và gồm các công đoạn sau: rau củ rửa sạch và để ráo (đôi khi để khô) và ngâm trong nước muối (muối 2%–7% với một lượng đường tối đa 3%) để lên men trong 1-3 ngày trong vại đóng kín nhằm đạt được độ axit tối ưu tùy thuộc vào loại sản phẩm.

Bên cạnh những loại rau củ thông thường được dùng ở nhiều quốc gia như là bắp cải, dưa chuột, cải bẹ (*Brassica juncea*), tỏi, hành khô, hành hoa, và củ kiệu (*Allium chinense*), người dân Việt Nam còn lên men trái cây và rau củ như là ngó sen, cà, khế, măng và xoài xanh. Ngó sen lên men có chứa hàm lượng vitamin C cao dao động từ 100 đến 150mg trong 100g sản phẩm. Xoài xanh được lên men trong 20 ngày bằng cách tẩy trắng trong dung dịch CaCl_2 0,5% ở 75°C trong 90 giây trước khi ngâm vào dung dịch (1:1, w/v) chứa 3% muối và 1,5% sucrose. Sau 4 ngày lên men, mật độ LAB đạt xấp xỉ $1,75 \times 10^7$ CFU/mL, với độ axit là 1,59%, tương đương với độ axit của axit lactic.

Một số nghiên cứu đã đánh giá đa dạng sinh học vi sinh vật của trái cây và rau củ lên men. Độ đa dạng quần thể LAB bản địa trong Dưa muối (củ cải đường và cải bẹ lên men) cùng với Cà muối (cà lên men) đã được nghiên cứu dùng những kỹ thuật có giá trị như là MALDI-TOF MS và phân tích trình tự enzyme synthase (*pheS*) phenylalanyl-tRNA. Tóm lại, 881 phân lập LAB được thu hồi từ 21 mẫu và định danh là *Lb. fermentum* (56,6%), *Lb. pentosus* (24,4%), và *Lb. plantarum* (17,1%). Những loài có ít hơn bao gồm *P. pen-tosaceus* (1,0%) và *Lb. brevis* (0,5%). Những loài có mật độ dưới 0,1% gồm có *Lb. paracasei*, *Lb. pantheris*, và *P. acidilactici*. Mẫu củ cải và cải bẹ lên men có tỉ lệ hiện hành cao nhất là *Lb. fermentum* và mẫu cà lên men có tỉ lệ hiện hành cao nhất là *Lb. pentosus*. Ngoài ra, biến động di truyền và tính phụ thuộc chủng tương ứng với loại rau củ được lên men hoặc vị trí sản xuất được theo dõi trong những loài chủ đạo khác nhau. *P. pen-tosaceus* được phân lập chỉ từ những mẫu rau củ lên men thu tại Hà Nội và *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. pantheris*, và *P. acidilactici* được phân lập chỉ từ rau củ lên men làm tại một hộ gia đình cụ thể. Hơn nữa, không phân lập được vi khuẩn nào thuộc giống *Leuconostoc*.

Lb. fermentum HA6 phân lập từ cà lên men và *Lb. gaserri* HA4 phân lập từ lá củ cải lên men là những vi khuẩn quan trọng vì các đặc tính hoạt tính sinh học của chúng. Một nghiên cứu đã đưa *Lb. plantarum* A17 làm giống khởi động (kích cỡ cấy, 10^7 CFU/mL) vào dung dịch ngâm gồm muối 6% và đường 2% để lên men lá cải bẹ và chứng tỏ rằng việc này làm giảm độ pH xuống dưới 4,5 và kim hãm nhiễm khuẩn *Escherichia coli*, do vậy cho ra đời sản phẩm an toàn.

2.1.5. Mắm chua

Mắm chua là tên gọi chung cho món mắm cá lên men chua. Mắm chua được làm từ những giống cá khác nhau bằng các phương pháp khác nhau. Phường Châu Đốc ở Tây Nam tỉnh An Giang (đồng bằng châu thổ sông Mekong) nổi tiếng với sản xuất Mắm chua, với gần 30 chủng loại được sản xuất trong vùng này. Trong số đó, mắm cá lóc và mắm chua cá sặc là những loại mắm chua nổi tiếng nhất.

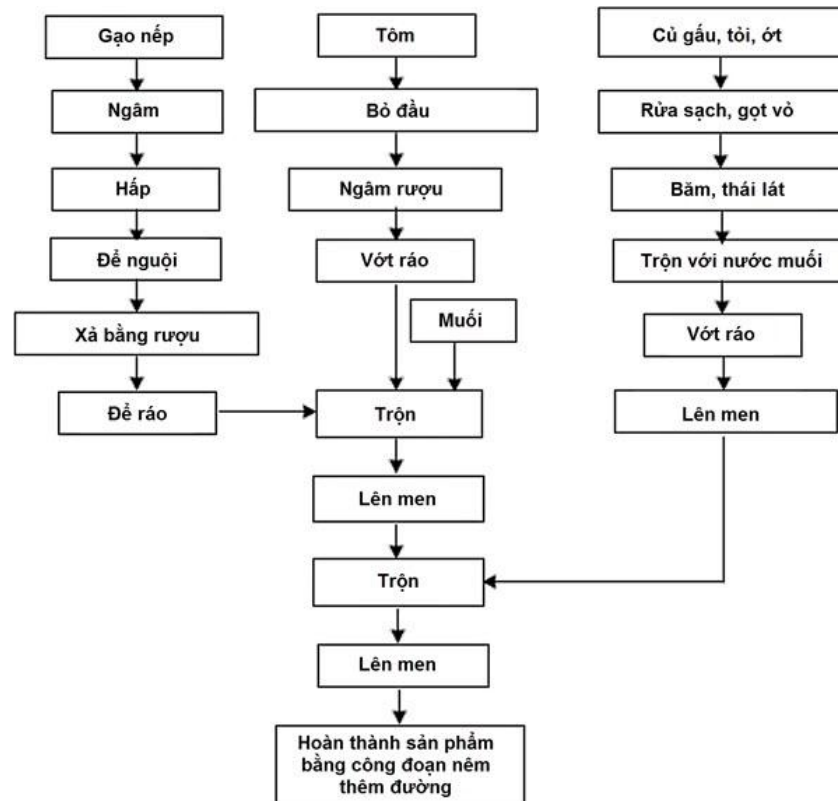
Mắm cá lóc là mắm lên men chua làm từ cá quả bô xương *Channa maculata*. Món này được làm như sau: cá trộn với muối (tối đa 20%, w/w) và bột gạo rang (10%, w/w) rồi lên men trong thời gian dài. Cuối cùng, sản phẩm được nêm thêm đường. Thành phẩm được dùng như món phụ hoặc làm nguyên liệu nấu nướng các món khác.

Kéo dài gian đoạn lên men tới gần 60 ngày là công đoạn quan trọng nhất. Nồng độ protease trong dịch nổi lên tăng từ từ trong 10 ngày đầu tiên, tăng nhanh từ 18 đến 45 ngày, và giảm từ 45 đến 60 ngày. Tuy nhiên, nồng độ protein hòa tan không đổi trong giai đoạn này. Hàm lượng các axit hữu cơ tăng từ ngày 1 đến ngày 33–36. Hơn nữa, TABC trong dịch nổi tăng từ từ trong 15 ngày đầu tiên và sau đó tăng nhanh từ 15 đến 30 ngày. Trong khối cá đã ngâm ướt, TABC tăng đều từ ngày 30 đến ngày 45 và giảm từ từ sau đó. Một nghiên cứu đã phân lập được năm chủng vi khuẩn chịu mặn từ Mắm cá lóc mà có thể chịu được độ mặn 17% và sản xuất protease. Trong số này, một chủng thuộc *Lactobacillus* sp. và hai chủng thuộc *Bacillus* sp., loài vi khuẩn biểu hiện hoạt tính protease cao (1,18 đơn vị tyrosine/mL).

Mắm chua cá sặc là món mắm cá lên men chua làm từ cá sặc xương mềm (*Trichogaster trichopterus* và *T. microlepis*). Món này được làm như sau: xả sạch cá và bỏ đầu ruột nhưng giữ lại vây. Nội tạng cá được ngâm trong nước 16 tiếng, rửa sạch để ráo và làm khô trong 6 tiếng rồi đem trộn với đường, muối khan (xấp xỉ 10%), bột gạo rang, ớt, tỏi và rượu gạo giống vodka 5% (v/w). Đựng nội tạng trong hũ đậy nắp để lên men ở $28\text{--}30^\circ\text{C}$ trong 20–30 ngày. Hình dáng cá được giữ lại nhưng xương cá trở nên mềm do đó khiến món này như sản phẩm không xương. Thành phẩm có vị chua, ngọt và mặn cũng như là được ăn trực tiếp thành món phụ. Một nghiên cứu sinh học vi sinh đã báo cáo rằng trước khi lên men, phát hiện được những chủng LAB xuất hiện tự nhiên (mật độ tế bào, $10^6\text{--}10^7$ CFU/g) trong hỗn hợp Mắm chua cá sặc. Sau lên men, mật độ của chúng tăng $2,61 \times 10^8$ đến $1,14 \times 10^9$ CFU/g. Một số vi khuẩn phân lập từ Mắm chua cá sặc, như là *P. acidilactici* L1, *Lb. farciminis* L2 và L3, *Staphylococcus hominis* L4, giải phóng amylase nhưng chỉ hai chủng, có tên là *P. acidilactici* L1 và *Lb. farciminis* L2, sản xuất protease.

2.1.6. Tôm chua

Tôm chua là mắm tôm lên men chua, món đặc sản của tỉnh Huế Trung bộ nhưng được người tiêu dùng trên khắp cả nước ưa chuộng. Món này được làm như sau: tôm rửa sạch bỏ đầu. Sau đó trộn tôm với gạo nếp hấp chín (50%–75%, w/w), muối (7,5%–12%, w/w), và gia vị (củ gừng, tỏi và ớt) rồi được lên men. Để sản xuất Tôm chua quy mô lớn, hỗn hợp rau thơm và gia vị được lên men riêng trong 3–5 ngày trước khi cho vào hỗn hợp tôm và gạo nếp chín, mà được lên men riêng trong 5–7 ngày. Sản phẩm sống được lên men trong 20–30 ngày ở nhiệt độ không khí là $30\text{--}35^\circ\text{C}$ (H.2). LAB xuất hiện tự nhiên làm lên men carbohydrate từ gạo nếp chín để giải phóng axit lactic, đem đến cho sản phẩm một vị chua dịu. Quá trình lên men, thủy phân một phần các protein từ tôm sống giúp ăn vào tiêu hóa dễ hơn. Gần đây, các nhà nghiên cứu dùng các chủng *Lb. plantarum*, những vi khuẩn ưa mặn và chống chịu được các hợp chất kháng vi sinh vật trong dịch chiết gia vị, phân lập từ mẻ Tôm chua trước làm giống khởi động để sản xuất lên men quy mô lớn. So với sản phẩm truyền thống, thì sản phẩm được làm bằng phương pháp mới có độ an toàn sinh học vi sinh cao hơn và vẫn có hương vị tương tự.



Hình.2. Lưu đồ cách làm *Tôm chua*.

Phỏng theo Nguyễn và Lê.

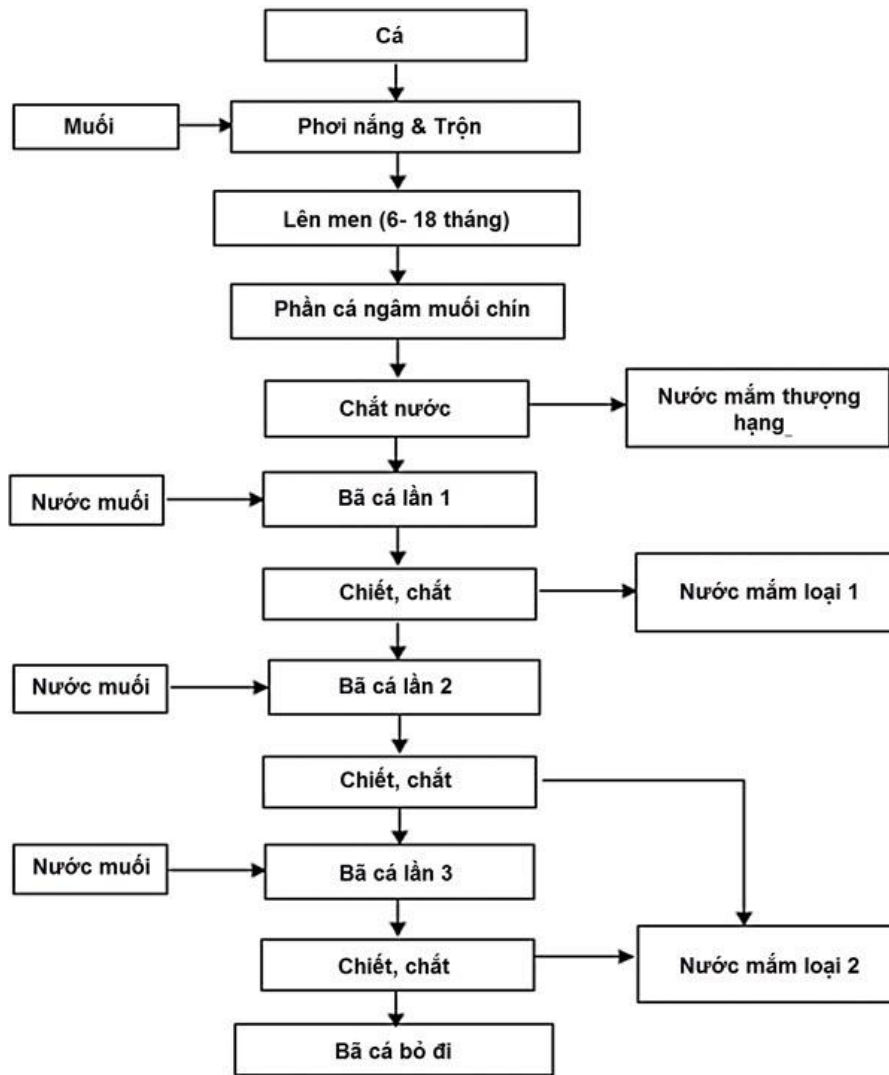
2.1.7. Nước mắm

Nước mắm là một trong số ít những sản phẩm truyền thống được sản xuất quy mô lớn trên khắp cả nước với sản lượng xấp xỉ 220 triệu lít một năm. Quy trình sản xuất *Nước mắm* được cho trong H.3 và bao gồm những công đoạn sau: trộn cá và muối ở tỉ lệ là 25%–33% (w/w) trong thùng làm bằng gỗ, gôm hoặc xi măng tùy thuộc vào phong tục địa phương. Sau khi cá chín, dịch chiết từ khối cá chín được chắt ra, ép bã cá vài lần, và được lọc để thu chất lỏng trong (nước mắm). Dịch chiết được pha trộn để thu được những sản phẩm có cấp độ phân loại khác nhau. Phương pháp truyền thống thì để lên men cá trong 12–18 tháng. Ngày nay, người ta rút ngắn thời gian lên men cá xuống còn 6 tháng bằng cách bổ sung các enzyme từ các nguồn bên ngoài. Cá trổng là loài cá được dùng nhiều nhất để làm *nước mắm*. Nhiệt độ để lên men và thủy phân nằm trong khoảng 35–50 °C. Một số chủng vi sinh vật thuộc giống *Micrococcus*, *Staphylococcus*, và *Streptococcus*, cùng với *Lactobacillus* đã được phân lập từ *Nước mắm*. Nguyễn và các cộng sự đã phân lập được *Lb. plantarum* và *B. subtilis* chịu mặn mà không chỉ sản sinh protease mà còn giải phóng các hợp chất dễ bay hơi như là axit butanoic 2-methyl và 1,3-propanediol mà đem đến hương vị riêng biệt cho *Nước mắm*.

2.1.8. Tương

Tương là một thực phẩm lên men truyền thống phổ biến và điển hình. Những nguyên liệu sống chính để làm *Tương* là đậu nành (30%, w/v), gạo nếp (10%, w/v), muối (10%, w/v), và nước. Cách làm tương được cho trong H.4. Nói ngắn gọn thì gạo nếp đem hấp rồi cấy vào gạo nếp chín một giống khởi động chủ đạo có chứa *Aspergillus oryzae* ở xấp xỉ 30 °C trong 4–5 ngày. Gạo nếp chín đã cấy giống có tác dụng như một chất chứa nhiều enzyme để thủy phân hạt đậu nành rang nghiền trong quá trình lên men chính và sau lên men.

Một số nghiên cứu đã phân lập vi khuẩn ngoài nấm trong quá trình lên men *Tương*. Một trong những loại *Tương* nổi tiếng là *Tương bản* (được gọi như thế vì làm ở thị trấn Bản Yên Nhân tại phía bắc tỉnh Hưng Yên). Tìm hiểu số lượng vi khuẩn của một số mẫu *Tương bản* trong quá trình ngâm và sau khi lên men. TABC trong giai đoạn ngâm tăng dần dần và đạt 10⁶CFU/mL. Tần số vi khuẩn sản sinh protease cũng tăng từ 18% đến 20% lúc đầu đến 50% lúc cuối giai đoạn. Sau khi lên men, chỉ những chủng vi khuẩn chịu mặn sống sót nên làm giảm TABC xuống còn 10⁵CFU/mL. Tuy nhiên, tần số các vi khuẩn sản sinh protease chiếm 98–100% trong TABC, và những vi khuẩn này thuộc về *Bacillus* sp. Phát hiện thêm 98% vi khuẩn phân lập được sau khi lên men có hoạt tính thủy phân fibrin. So với các chủng *B. subtilis* var. natto khác mà sản xuất 1.400–1.800 đơn vị thủy phân fibrin (FU)/g, phân lập từ Natto Nhật Bản và Natto Đài Loan, thì các chủng *Bacillus* phân lập từ *Tương* lấy từ tỉnh Hưng Yên sản xuất 540–1.200FU/g đậu tương khô.



Hình.3 Lưu đồ cách làm Nước mắm.

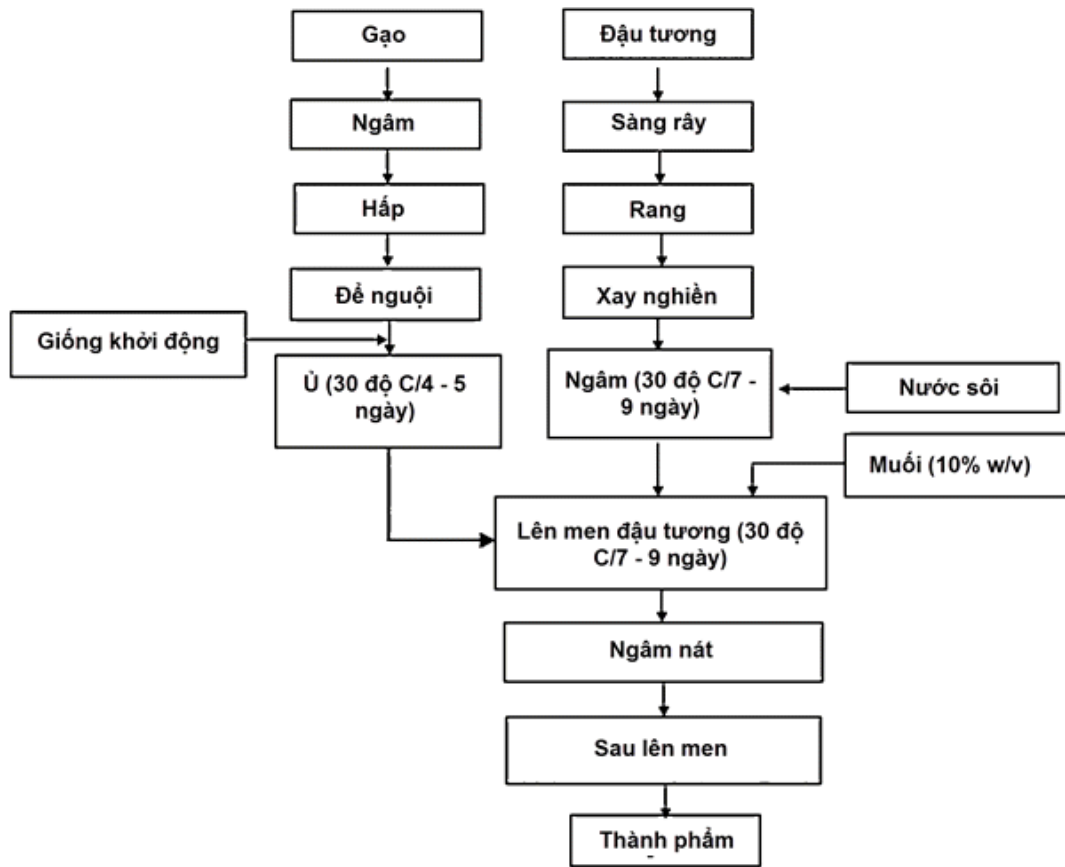
Phỏng theo Nguyễn và các cộng sự

Tương tự các vùng bắc bộ, trung bộ và nam bộ của Việt Nam cũng được phân tích tìm các vi khuẩn có hoạt tính thủy phân fibrin. Sáu mẫu tương tự những vùng này đã cho thấy hoạt tính thủy phân fibrin trong khoảng từ 10,8 đến 73,8FU/g. Trong số này, mẫu thu từ tỉnh Nghệ An trung bộ cho thấy hoạt tính thủy phân fibrin cao nhất là 73,8 FU/g. Chúng vi khuẩn phân lập từ mẫu này được định danh là *Enterobacter mori*, mà sản xuất 1,14–1,49FU/mL trong dịch nổi nuôi cấy giống vi sinh vật khi được nuôi trong môi trường có chứa bột vỏ tôm, K_2HPO_4 , và $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ở 37 °C trong 24 tiếng.

Một số thực phẩm lên men truyền thống khác có tên gọi là *Mắm tôm*, *Com rượu* (hèm rượu thừa sau khi chưng cất rượu), *Chao* (đậu phụ lên men dùng nấm *Actinomyces elegans* và *Mucor* sp.), cùng với tương đậu nêm gia vị lên men bằng *Aspergillus* sp. cũng nổi tiếng. Tuy nhiên, không có nhiều báo cáo về những loại thực phẩm này mặc dù chúng được giới thiệu trong sách giáo khoa.

2.2. Thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam là nguồn cung cấp vi sinh vật tăng cường sức khỏe

Thực phẩm lên men truyền thống là nguồn cung cấp vi sinh vật địa phương thiết yếu với các đặc tính quan trọng. Trong những năm gần đây, người ta nghiên cứu LAB có mặt trong những thực phẩm lên men chua chủ yếu về các đặc tính bảo quản sinh học, công nghệ và cảm quan của chúng để chế biến thực phẩm. Có dữ liệu về những ích lợi sức khỏe của các vi khuẩn probiotic trong thức ăn chăn nuôi; tuy nhiên, dữ liệu về tác dụng của vi khuẩn probiotic đối với sức khỏe con người thì vẫn còn khan hiếm ở Việt Nam. Các probiotic là những vi sinh vật sống được tiêu thụ như là thực phẩm hoặc chất bổ sung thực phẩm với lượng vừa đủ và chiếm một chỗ trong vật chủ để đem đến những ích lợi sức khỏe. Các tiêu chí để dùng vi sinh vật làm các probiotic bao gồm khả năng chịu đựng được hoàn cảnh trong đường tiêu hóa, khả năng bám dính vào niêm mạc ruột, ức chế các vi sinh vật gây bệnh, và đem đến tác dụng probiotic cùng với tăng cường sức khỏe.

H.4 Lưu đồ cách làm *Tuong*

Phỏng theo Đặng và Nguyễn.

2.2.1. Độ ổn định axit và mật

Bất kỳ vi sinh vật nào cũng cần phải sống sót được trong đường tiêu hóa của người thì mới được dùng làm một probiotic. Bất cứ vi sinh vật nào được chọn để hoạt động trong đường tiêu hóa cũng cần có khả năng chịu axit. HCL tiết trong dạ dày tạo môi trường có độ pH thấp (độ pH thấp dao động từ 0,9 đến xấp xỉ 3,0). Một nghiên cứu giám sát đã ghi nhận các chủng LAB sống sót có nguồn gốc Việt Nam phân lập từ những thực phẩm lên men truyền thống, sản phẩm sữa chua địa phương và các sản phẩm có nguồn gốc con người (sữa mẹ và phân trẻ sơ sinh) trong dịch ruột non và dạ dày tái tạo. Trong nghiên cứu này, 0,2mol/L chất đệm glycine-HCl (độ pH 2) được dùng để tạo dịch dạ dày bị kích thích nhằm ngăn tăng độ pH sau khi cho thêm dịch huyền phù vi sinh vật. Thời gian cho tiếp xúc mật cần bằng dịch dạ dày (0.3 g/L pepsin ở độ pH 2) là 120 phút và cho tiếp xúc áp lực ruột (0.1 g/L pancreatin và 0.3 g/L muối mật ở độ pH 8.0) là 240 phút ở 37 °C trong ống nghiệm. Tình trạng mất cân bằng đường ruột cho phép quan sát tìm hiểu được sự khác biệt về khả năng sống sót của nhiều chủng vi khuẩn, tuy nhiên, những điều kiện này đều khác nghiệt hơn điều kiện được dùng trong các nghiên cứu khác.

Bảng 2 so sánh 181 chủng LAB về khả năng sống sót của chúng.

Trong số này, 132 chủng được phân lập từ những thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam, 26 chủng phân lập từ sữa chua địa phương và 23 chủng phân lập từ sữa mẹ và phân nhũ nhi. Các chủng được ghép nhóm theo tỉ lệ sống sót của chúng. Những chủng vi khuẩn ổn định nhất là những chủng sống sót được trong cả dịch vị và dịch ruột nhân tạo, với giảm logarit cơ số 10 tế bào sống sót từ 0 đến 3 (lg (CFU/mL)).

Kết quả trình bày trong **Bảng 2** cho thấy rằng 75 (41,4%) chủng LAB đều chống chịu được stress của dạ dày, với giảm dưới 3(lg (CFU/mL)) số tế bào sống sót. Trong 75 chủng này, 40, 14, và 21 chủng được phân lập lần lượt từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam, sản phẩm sữa chua địa phương cùng với sữa mẹ và phân của nhũ nhi. Hơn nữa, 50 (27,6%) chủng LAB có khả năng chịu được stress của ruột non. Trong số này, 30, 7, và 13 chủng được phân lập lần lượt từ thực phẩm lên men truyền thống Việt Nam, sản phẩm sữa chua địa phương cùng với sữa mẹ và phân nhũ nhi. Trong nghiên cứu này xác định được các đặc trưng cụ thể của sáu chủng probiotic tiềm năng phân lập từ những thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam. Cả sáu chủng này đều sống sót dưới stress của ruột non và dạ dày. *Lb. plantarum* NCDC3 phân lập từ *Nem chua* thu từ Hà Nội cho thấy giảm 1,32 và 0,36(lg (CFU/mL)) tế bào sống sót và *Lb. brevis* NCTH24 phân lập từ *Nem chua* Thanh Hóa cho thấy giảm 2,67 và 0,56 (lg (CFU/mL)) tế bào sống sót (**Bảng 4**).

Bảng 2

Độ ổn định *in vitro*/trong ống nghiệm của các chủng LAB nguồn gốc Việt Nam trong các mẫu axit và mật.

Mục thống kê	Đánh giá Khả năng	Giảm tế bào sống sót lg (CFU/mL)	Số chủng LAB phân lập từ các nguồn			
			Thực phẩm lên men	Sữa chua địa phương	Phần tử người	Tổng
Chủng LAB			132	23	26	181
Số LAB sống sót rõ rệt trong dịch dạ dày nhân tạo có pH =2 sau 120 phút						
	Siêu khỏe	≤1	2	2	3	7
	Rất khỏe	1–2	2	4	0	6
	Khỏe	2–3	36	8	18	62
Tổng từng phần			40	14	21	75
Phần trăm/%			22.1	7.7	11.6	41.4
Số LAB sống sót rõ rệt trong dịch ruột non nhân tạo sau 240 phút						
	Không hao hụt	0	2	0	2	4
	Siêu khỏe	≤1	22	6	5	33
	Rất khỏe	1–2	5	1	3	9
	Khỏe	2–3	1	0	3	4
Tổng từng phần			30	7	13	50
Phần trăm/%			16.6	3.8	7.2	27.6

Phòng theo Nguyễn.

Các chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam chịu được stress của đường tiêu hóa tương tự như các chủng khác phân lập từ sữa lên men hoặc sản phẩm có nguồn gốc từ người. Tuy nhiên, phân lập 132 chủng trong tổng số 181 chủng LAB từ những thực phẩm lên men truyền thống chỉ ra rằng những thực phẩm này nên được xem như là những nguồn cung cấp probiotic tiềm năng.

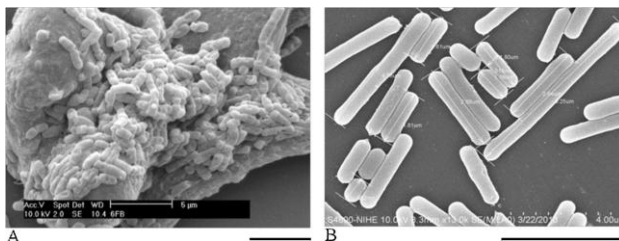
Một số nghiên cứu khác đã báo cáo về khả năng sống sót của LAB trong hoàn cảnh ruột mô phỏng *in vitro* (trong ống nghiệm). Khả năng sống sót của *Lb. fermentum* HA6 không sụt giảm khi được nuôi trong dịch vị mô phỏng ở độ pH=3, khả năng sống sót giảm nhẹ xuống xấp xỉ 90% khi được nuôi ở độ pH=2,5, và mất khả năng sống sót khi được nuôi ở độ pH=2; tuy nhiên chúng này cho thấy khả năng sống sót gần 80% khi được nuôi trong dịch ruột non. *Ca. 10⁸* CFU/mL tế bào dịch huyền phù của *Lb.gasseri* HA4 vẫn là *ca.4*(lg (CFU/mL)) trong dịch dạ dày ở độ pH=2 và gần 6(lg (CFU/mL)) ở dịch ruột non.

Mặc dù độ ổn định của axit và mật là một yếu tố quan trọng, các vi sinh vật có khả năng sống sót trung bình vẫn có thể có những tác dụng probiotic ấn tượng dựa trên các đặc tính tăng cường sức khỏe khác của chúng.

2.2.2. Khả năng bám dính ruột

Sau khi chuyển dịch qua dạ dày và ruột non, các vi khuẩn probiotic bám dính vào niêm mạc ruột và xâm chiếm đường ruột, do vậy tạo nên một hàng rào tự nhiên cho ruột để thực hiện chức năng của chúng, chức năng này nhất quán với các tiêu chí chọn lọc probiotic như là bài trừ cạnh tranh, tác dụng gây miễn dịch và các lợi ích sức khỏe khác. Khả năng bám dính ruột là một điều kiện tiên quyết để xâm chiếm được ruột và do vậy là một tiêu chí quan trọng để đánh giá probiotic. Những mô hình thích hợp để đánh giá khả năng bám dính ruột căn cứ trên việc theo dõi khả năng bám dính vào các dòng tế bào ruột Caco-2 và HT-29 hoặc bám vào niêm mạc ruột.

Lb. fermentum HA6 phân lập từ *Dưa muối* bám vào bề mặt của các tế bào Caco-2 ở người (H.5A). *Lb. gasseri* HA4 cũng chủ động bám vào các tế bào Caco-2 ở người nhưng ở mức độ kém hơn. Một nghiên cứu khác mà đánh giá khả năng bám dính vào niêm mạc của các chủng probiotic *in vitro* đã xác định được 20 chủng probiotic tiềm năng có khả năng bám dính mạnh nhất vào bề mặt polystyrene phủ dịch nhầy của đĩa vi phẩm ở mật độ là 10^7 – 10^8 CFU/cm². Trong số này, chín chủng được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống, sáu chủng từ sữa lên men và năm chủng từ sữa mẹ cùng với phân nhũ nhi. Những chủng phân lập từ thực phẩm lên men thuộc *Lb. casei*, *Lb. plantarum* và *Lb. brevis*.



H.5. Theo dõi khả năng bám dính. (A) *Lb. fermentum* HA6 bám vào tế bào Caco-2; khung tỉ lệ = 5 μ m. Phòng theo Ho và Adams. (B) *Lb. brevis* NCTH24 bám vào bản kính polystyrene phủ dịch nhầy; khung tỉ lệ = 4 μ m. Phòng theo Nguyễn.

Bảng 3

Tác dụng ức chế bốn chủng gây bệnh của các chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men của Việt Nam

Mục thống kê	Số LAB phân lập từ các nguồn			
	Thực phẩm lên men	Sữa chua địa phương	Phân tử người	Tổng
Chủng LAB để sàng lọc	20	10	17	47
Số chủng mầm bệnh thí nghiệm bị ức chế bởi LAB				
<i>Bacillus cereus</i> CNTP6089	18	8	13	39
<i>Staphylococcus aureus</i> CNTP6083	15	4	8	27
<i>Escherichia coli</i> CNTP6078	14	8	13	35
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC14028	20	8	12	40
Khả năng bài trừ trong nhiều chủng chỉ thị bị ức chế				
Cả bốn chủng chỉ thị bị ức chế	12	4	7	23
Ba chủng chỉ thị bị ức chế	5	4	2	11
Hai chủng chỉ thị bị ức chế	1	2	5	8
Một chủng chỉ thị bị ức chế	2	0	2	4
Không chủng chỉ thị nào bị ức chế	0	0	1	1

Phòng theo Nguyễn.

Một hình ảnh hiển vi quét tiêu biểu của *Lb. brevis* NCTH24 bám vào bản kính polystyrene phủ dịch nhầy được cho trong H.5B.

Nghiên cứu này chỉ ra rằng LAB phân lập từ thực phẩm lên men có khả năng bám dính ruột tương tự như các chủng vi khuẩn phân lập từ sản phẩm từ sữa và từ người, những chủng được xem như các nguồn cung cấp probiotic cổ điển cho con người sử dụng.

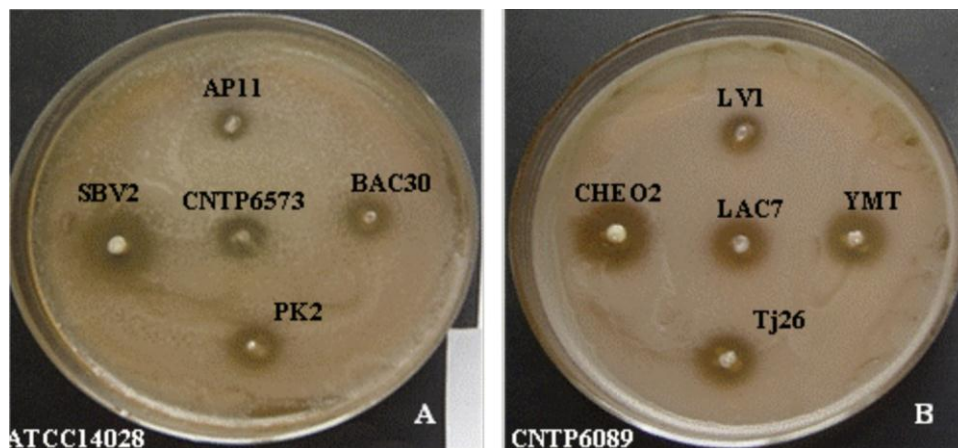
2.2.3. Đặc tính đối kháng các vi sinh vật gây bệnh

Vi sinh vật probiotic ảnh hưởng đến thành phần của hệ vi khuẩn ruột ở người. Chúng xâm chiếm đường ruột và biểu hiện các đặc tính bảo vệ bằng cách gây ra các tác dụng kháng mầm bệnh dựa trên bài trừ cạnh tranh (để chiếm chất nền và vị trí bám dính) và bằng cách ức chế chất chuyển hóa lên men (các axit hữu cơ và những hợp chất kháng vi sinh vật khác). Chúng tác động có lợi đến sức khỏe và sinh lý của vật chủ thông qua việc cải thiện cân bằng vi sinh trong đường ruột

Một số nghiên cứu đã ghi nhận LAB cạnh tranh bài trừ mạnh mẽ các vi sinh vật gây bệnh. Bốn vi khuẩn gây bệnh có tên là *B. cereus* CNTP6089, và *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC14028 được rải trên thạch dinh dưỡng

DeMan, Rogosa, và Sharpe (MRS) trong các đĩa Petri cùng với các chủng LAB. Những đĩa này được bảo quản ở 30 °C trong 3 ngày. Kết quả cho thấy trong 47 chủng LAB, thì 23 chủng (48,9%) có thể loại trừ cả bốn chủng gây bệnh. Trong 23 chủng này, 12/20 (60%) được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam, 4/10 (40%) phân lập từ sản phẩm sữa chua địa phương, và 7/17 (41,1%) phân lập từ sản phẩm từ người (Bảng 3 và H.6). Tác dụng ức chế của các chủng LAB có thể là do kết hợp việc cạnh tranh giành chất nền chuyển hóa, kim hãm tăng trưởng do các axit hữu cơ và tiết bacteriocin.

Một số chủng LAB sản xuất ra bacteriocin ức chế vi khuẩn gam dương liên quan mật thiết. Một số chủng vi sinh sản xuất bacteriocin đã được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam như là *Nem chua*. Một nghiên cứu đã phân lập được *Lb. plantarum* NV23 mà sản xuất bacteriocin từ *Nem chua* lấy tại tỉnh Cần Thơ thuộc phía Nam đồng bằng châu thổ sông Mekong. Bacteriocin do *Lb. plantarum* NCDN4 tạo ra mà được phân lập từ *Nem chua* lấy tại tỉnh Đà Nẵng duyên hải trung bộ đã được làm sạch và có đặc điểm là một peptide có trọng lượng phân tử tương đối lớn từ 14,3 đến 20,1kDa và thuộc vào bacteriocin cấp II.



H.6. Tác dụng ức chế các chủng gây bệnh chỉ thị của một số chủng LAB probiotic. (A) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC14028 và (B) *B. cereus* CNTP6089. Phòng theo Nguyễn.

Lactococcus garvieae 0-5 phân lập từ *Nem chua* tại tỉnh Thanh Hóa thuộc phía nam sản sinh ra bacteriocin cấp 1 có trọng lượng phân tử là 2,5kDa.

Trong một nghiên cứu khác, chủng probiotic tiềm năng *Lb. gasseri* HA4 phân lập từ *Dưa chua* chứng tỏ hoạt tính kháng vi sinh vật phổ rộng chống lại bảy chủng vi khuẩn chỉ thị có tên là *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9650, *E. coli* O157:H7 VT-N NCTC 12900, *S. aureus* ACM 4988, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, và *Enterococci* 306 R. Nguyên nhân chủ yếu là vì tính axit và độ pH thấp đi kèm, ngoại trừ *L. monocytogenes* ATCC 7644, mà bị ức chế do hợp chất kháng khuẩn protein có thể thuộc về bacteriocin cấp IIa.

Cũng có nghiên cứu về hoạt tính kháng listeria của LAB thông qua bám dính cạnh tranh. *Lb. gasseri* HA4 làm giảm hơn 1 (lg (CFU/mL)) tình trạng bám dính cạnh tranh vào các tế bào Caco-2 của mầm bệnh từ thực phẩm này, không có khác biệt đáng kể về số lượng *L. monocytogenes* khi cho thêm *Lb. gasseri* HA4 trước, sau hoặc cùng lúc với *L. monocytogenes*. Ngoài ra, *Lb. gasseri* HA4 chủ động bám vào các tế bào biểu mô ở người chứng tỏ chủng này có thể ức chế khả năng bám dính của vi khuẩn gây bệnh.

Hoạt tính kháng nấm của LAB được mô tả dựa trên một số cơ chế như là hoạt tính đồng vận của các axit hữu cơ và độ pH hoặc các protein kháng nấm phụ thuộc vào độ pH. Gần đây, người ta đã định danh được một hợp chất kháng nấm mới 3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedione (khối lượng phân tử, 226 kDa) sinh ra bởi *Lb. plantarum* phân lập từ kimchi. Một vài nghiên cứu đã ghi nhận hoạt tính kháng nấm phổ rộng của các chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam. Trong 11 chủng LAB được xét nghiệm, thì 8 chủng, bao gồm 5 chủng *Lb. plantarum* HA2, HA3, HA5, HA8, và HA9 cùng với 3 chủng *Lb. fermentum* HA6, HA7, và HA10, biểu hiện hoạt tính ức chế mạnh và trên phổ rộng đối với 7 trong 11 chủng men và mốc chỉ thị (*Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Absidia corymbifera*, *Paecilomyces lilacinus*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium* sp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Curvularia lunata*, *Penicillium* sp., và *Candida albicans*) phân lập từ các loại thực phẩm. *Lb. fermentum* HA7 cho thấy hoạt tính mạnh nhất, với khả năng ức chế mọi nấm và men được thử nghiệm ở mức độ nào đó. Nấm *G. candidum* là loại khó ức chế nhất trong số nấm và men được thử nghiệm, và chỉ bị ức chế bởi chủng HA7. Chỉ hai chủng *Lb. plantarum* HA3 và HA9 ức chế mạnh mẽ *A. niger*. *S. brevicaulis* và *C. albicans* là những vi sinh vật thí nghiệm nhạy nhất vì chúng bị ức chế bởi toàn bộ 11 chủng LAB. *C. albicans* là một loại nấm men cơ hội gây các bệnh da liễu. Do đó, tác dụng ức chế tăng sinh nấm và men của vi khuẩn probiotic không chỉ tăng hạn sử dụng của thực phẩm mà còn giúp phòng tránh nhiễm nấm *Candida*.

Ngoài ra, những nguyên liệu phụ rau thơm và gia vị (vd: tỏi và gừng) được dùng để làm những thực phẩm lên men truyền thống có các hoạt tính kháng vi sinh vật chống lại vi sinh vật gây bệnh mà không ảnh hưởng đến bất cứ LAB nào. Thế nên hoạt tính kháng mầm bệnh của thực phẩm lên men truyền thống có thể là do hiệu ứng đồng vận của LAB probiotic bắt nguồn từ thực phẩm lên men cùng với rau thơm và gia vị.

2.2.4. Tính miễn kháng sinh

Vi khuẩn cho thấy tính miễn cảm, tính miễn cảm tương đối, và khả năng chống chịu những loại kháng sinh khác nhau. Vi khuẩn biểu thị ba loại chống chịu: tự nhiên (nội tại hay bẩm sinh), đặc thụ, và đột biến. Các chủng vi khuẩn LAB vốn có khả năng kháng cự nhiều loại kháng sinh. LAB cho thấy khả năng chống chịu tự nhiên không liên quan đến mỗi lo lắng về an toàn cụ thể nào. Khả năng chống kháng sinh liên quan đến plasmid, mà thỉnh thoảng mới xuất hiện, có thể lây lan sang những giống và loài khác nguy hại hơn.

Một khảo sát về 44 chủng LAB probiotic tiềm năng đã được tiến hành để xác định độ miễn kháng sinh của chúng. Trong số này, 19 chủng đã được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống, 15 phân lập từ sữa mẹ và phân nữ nhi, cùng với 10 phân lập từ sản phẩm sữa chua địa phương. Những chủng này được sàng lọc về khả năng chống chịu với 12 loại kháng sinh có tên là cefoperazone, ceftriaxone, ceftazidime, gentamicin, penicillin, ofloxacin, azithromycin, erythromycin, chloramphenicol, streptomycin, polymyxin B, và clindamycin dùng phương pháp khuếch tán trên đĩa thông thường. Chloramphenicol là loại kháng sinh mạnh nhất ức chế 40 chủng, theo sau là erythromycin, ức chế 32 chủng. Streptomycin là loại kháng sinh yếu nhất, với 43 chủng thí nghiệm cho thấy khả năng chống cự lại nó, theo sau là gentamicin, penicillin, và polymyxin B, với lần lượt 42, 40, và 37 chủng cho thấy khả năng kháng cự các kháng sinh này. Những kết quả này chứng tỏ rằng mọi chủng vi khuẩn LAB thí nghiệm đều miễn với ít nhất một loại và tối đa là với tám loại kháng sinh. Chỉ một loại kháng sinh ức chế được hai trong số những chủng vi khuẩn có khả năng chống chịu mạnh nhất phân lập từ thực phẩm lên men và một trong những chủng nhạy nhất bị ức chế bởi bảy loại kháng sinh. Một loại kháng sinh ức chế được hai trong số những chủng vi khuẩn có khả năng chống chịu mạnh nhất phân lập từ sản phẩm của người và tám loại kháng sinh ức chế được một trong những chủng nhạy nhất. Một loại kháng sinh ức chế hai trong số những chủng vi khuẩn có khả năng chống chịu mạnh nhất phân lập từ sữa chua và một trong những chủng nhạy nhất bị ức chế bởi năm loại kháng sinh.

Bảng 4 tổng kết tính miễn kháng sinh của sáu chủng vi khuẩn probiotic tiềm năng phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam. Chúng có tính chống chịu mạnh nhất là *Lb. plantarum* BAC52 phân lập từ *Nem chua* lấy tại tỉnh Thanh Hóa, chủng mà miễn với chloramphenicol, miễn vừa với erythromycin, và chống chịu được 10 loại kháng sinh còn lại. Chủng miễn nhất là *Lb. plantarum* LV1 phân lập từ *Com ruợu* lấy tại Làng Vân ở tỉnh Bắc Giang, chủng mà miễn với chloramphenicol, erythromycin, ceftriaxone, và ceftazidime; miễn vừa với azithromycin; và chống chịu được tám loại kháng sinh còn lại.

Một nghiên cứu gần đây báo cáo sử dụng giải mã toàn bộ trình tự nhiễm sắc thể để sàng lọc những gen đặc thụ khả năng kháng cự kháng sinh trong các chủng LAB mà có thể được dùng trong dinh dưỡng ở người. Tuy nhiên, theo chúng tôi biết thì chưa có nghiên cứu nào xác định được tính miễn kháng sinh của các chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men của Việt Nam mà dùng kỹ thuật này.

Bảng 4

Mô tả sáu chủng probiotic tiềm năng trong 132 chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống Việt Nam dựa trên thí nghiệm *in vitro*.

Chủng	Nguồn phân lập	Giảm tế bào sống sót, lg (CFU/mL)		Ức chế ^a Mầm bệnh	Tinh mẫn ^b Kháng sinh	pepX ^c	GABA ^d	Bám dính Màng nhầy CFU/cm ²
		Dịch dạ dày, pH 2, 120 phút	Dịch ruột non, 240 phút					
<i>Lb. plantarum</i> NCDC3	Nem chua, Hà Nội	0,96	0	4	S3/I1/R8	+	+	3,91E+07
<i>Lb. brevis</i> NCTH24	Nem chua, Thanh Hóa	2,73	0,56	3	S3/I9	-	+	2,66E+07
<i>Lb. plantarum</i> BAC52	Nem chua, Thanh Hóa	2,76	1,97	4	S1/I1/R10	+	-	8,19E+07
<i>Lb. plantarum</i> LD3	Dưa chua, Hà Nội	2,82	1,18	4	S2/I1/R9	-	+	7,17E+07
<i>Lb. plantarum</i> LV1	Cơm rượu, Bắc Giang	2,85	0,4	4	S4/I1/R7	-	+	1,48E+08
<i>Lb. plantarum</i> NCHD5-2	Nem chua, Hải Dương	2,91	2,19	3	S2/I1/R9	+	-	9,81E+07

Phòng theo Nguyễn

^a Số chủng mầm bệnh bị ức chế trong bộ chỉ thị được thí nghiệm gồm *Bacillus cereus* CNTP6089, *Staphylococcus aureus* CNTP6083, *Escherichia coli* CNTP6078; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC14028.

^b Tinh mẫn kháng sinh ở ba mức, S (mẫn cảm), I (mẫn vừa) và R (chống chịu) theo sau là nhiều loại kháng sinh tương tác với các chủng, thí nghiệm với 12 loại kháng sinh gồm cefoperazone, ceftriaxone, ceftazidime, gentamicin, penicillin, ofloxacin, azithromycin, erythromycin, chloramphenicol, streptomycin, polymyxin B, và clindamycin.

^c Sản sinh X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase nội bào.

^d Sản sinh axit gamma-aminobutyric.

2.2.5. Ức chế tế bào ung thư ở người *in vitro*/trong ống nghiệm

Hệ vi khuẩn bản địa ảnh hưởng rõ rệt đến cấu trúc màng nhầy của ruột trong vật chủ, chức năng của nó cũng như là toàn bộ sự phát triển của hệ miễn dịch. Các chủng LAB probiotic có thể loại trừ tổn hại đối với vi môi trường ruột, kích thích đáp ứng miễn dịch hệ thống và cục bộ, cũng như là duy trì tính toàn vẹn của thành ruột.

Đa số các nghiên cứu *trong ống nghiệm (in vitro)* và *trong cơ thể (in vivo)* về các tác dụng chống ung thư của các chủng LAB probiotic đã được thực hiện dùng các tế bào ung thư đại trực tràng. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã điều tra tác dụng của những vi khuẩn này đối với khả năng kiềm chế tăng sinh tế bào u tủy hay khả năng ức chế sinh sôi tế bào ung thư gan, xương, vú và tuyến tụy. Một số nghiên cứu tập trung vào tác dụng chống ung thư của các chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam. Chủng probiotic tiềm năng *Lb. fermentum* HA6 đã được thí nghiệm khả năng sinh tồn trong dịch ruột non và dịch dạ dày tái tạo, khả năng bám vào các tế bào biểu mô ở ruột kết và khả năng sản sinh các tác dụng probiotic *in vitro*. Chủng này ức chế tình trạng sinh sôi của bốn dòng tế bào ung thư ở người *in vitro*: giảm sinh sôi dòng tế bào melanin MM200 90%, giảm sinh sôi dòng tế bào ung thư vú MCF7 và dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU145 60%, cùng với giảm sinh sôi dòng tế bào ung thư ruột kết HT29 40%. Những kết quả trên cho thấy tác dụng của các chủng probiotic này trong việc ngăn ngừa phòng tránh ung thư.

2.2.6. Tiêu hóa exorphin

Exorphin là các peptide giàu proline và giống opioid mà hình thành từ thức ăn đã tiêu hóa một phần mà phản ứng với các thụ thể opiate trong não bộ, do đó gây ra rối loạn thần kinh và tiêu hóa. Vì cấu tạo độc đáo của proline, nên đa số các enzyme vi sinh vật không thể thủy phân exorphin thông qua phân tách liên kết trong amino axit này. Một nghiên cứu mới đây chứng tỏ rằng một số chủng LAB sản sinh X-prolyl

dipeptidyl aminopeptidase (pepX; EC 3.4.14.5) mà hoạt động như một dipeptidase nội bào và tiêu hóa dipeptide dư trong các protein bằng cách thủy phân liên kết peptide ở đầu cacboxyl (C(=O)OH) của phần dư proline.

Hoạt tính pepX chống lại exorphin chủ yếu được phát hiện ở những vi khuẩn trong chế phẩm từ sữa như là *Lb. casei* và trong một số trường hợp là *Lb. del-brueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Propionibacterium shermanii*, *Lb. helveticus*, và *Lb. curvatus*. Gần đây, hoạt tính này được tìm thấy ở những chủng LAB phân lập từ những thực phẩm lên men khác, như là *Lb. sakei* phân lập từ xúc xích và *Lb. sanfranciscensis* phân lập từ bột nhào chua.

Sàng lọc dữ liệu của 47 chủng LAB (19 từ thực phẩm lên men truyền thống, 10 từ sản phẩm sữa chua địa phương và 15 từ sữa mẹ cùng với phân nhũ nhi) cho thấy bốn chủng sản sinh pepX (Bảng 4). Trong số này, ba chủng thuộc *Lb. plantarum* phân lập từ *Nemchua* và một chủng thuộc *Lb. casei* phân lập từ mẫu phân của một trẻ sơ sinh bú mẹ người Việt Nam. Hồ và các cộng sự đã sàng lọc được 11 chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men tự nhiên của Việt Nam và phát hiện thấy sáu chủng *Lb. fermentum* (HA6, HA7, HA10, và HA11), một chủng *Lb. gasseri* (HA4), và một chủng *Lb. acidophilus* (HA12) sản sinh pepX nội bào mà làm giảm exorphin gluten, beta-casomorphin, và dermorphin. Phát hiện được PepX sản sinh bởi *Lb. fermentum* HA6 và *Lb. acidophilus* HA12 tiêu hóa hoàn toàn cả ba peptide này. PepX tạo ra bởi *Lb. gasseri* HA4 và *Lb. fermentum* HA7 và HA11 giảm exorphin gluten và beta-casomorphin nhưng biểu hiện giảm ít hoặc không giảm dermorphin. PepX tạo ra bởi *Lb. fermentum* HA10 thay đổi tỉ lệ của ba peptide này trong hỗn hợp sau khi tiêu hóa.

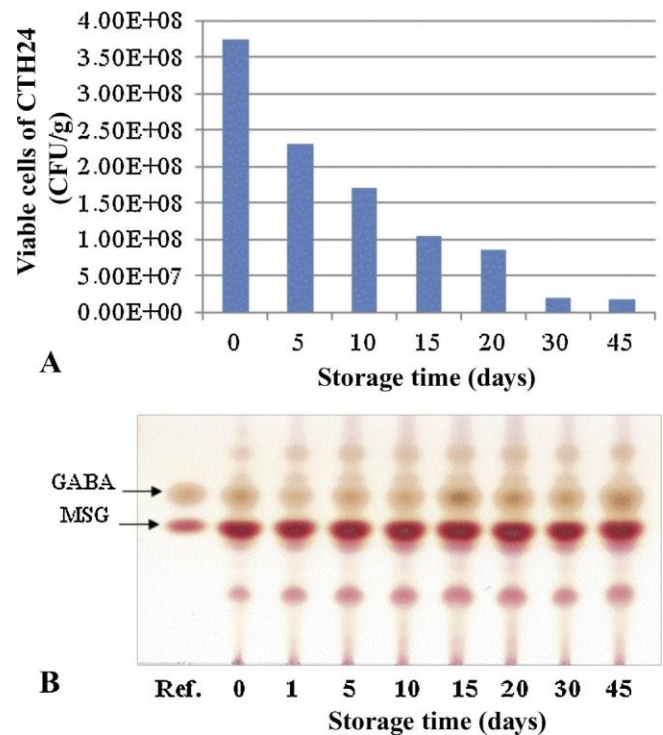
Nghiên cứu hoạt tính pepX của *Lb. fermentum* HA6 được thực hiện trong các tế bào nguyên vẹn mà tiếp xúc hoặc không tiếp xúc với dịch tiêu hóa mô phỏng. Trong cả hai hoàn cảnh, *Lb. fermentum* HA6 chứng tỏ có hoạt tính pepX. Tuy nhiên hoạt tính giảm từ 0,5 U/mL xuống 0,23 U/mL sau 3 tiếng tiếp xúc với dịch dạ dày ở độ pH=2,5. Điều thú vị là, hoạt tính pepX của *Lb. fermentum* HA6 mà cho tiếp xúc với dịch ruột

non mô phỏng trong 3 tiếng lại tốt hơn hoạt tính ban đầu (lần lượt là 1,1 U/mL với 0,5 U/mL), chứng tỏ là việc ứng dụng *Lb. fermentum* HA6 làm một chất probiotic có thể giữ lại được hoạt tính chuyển hóa của nó. Nguyên nhân có thể là vì ảnh hưởng của muối mật trong dịch ruột non với tư cách là một phần trong cơ chế tự vệ của đường tiêu hóa mà tác động giống chất tẩy đến các vi sinh vật. Các tế bào thích nghi axit của *Lb. fermentum* HA6 biểu thị hoạt tính pepX cụ thể là 24,5U/mg khi được nuôi trong điều kiện có tính axit nhẹ trong môi trường MRS Broth/MRS dịch thể (có độ pH=4). Hoạt tính pepX của chủng này cao hơn hoạt tính của các tế bào đối chứng (17,8 U/mg), mà được nuôi thường trong các mẻ. Do vậy *Lb. fermentum* HA6 có thể được dùng để chữa trị các rối loạn do các peptide opioid gây ra.

2.2.7. Sản sinh axit gamma-aminobutyric

Axit gamma-aminobutyric (GABA) là một amino axit protein mà là một chất ức chế dẫn truyền thần kinh tự nhiên và một chất xoa dịu căng thẳng. GABA là một thành phần hoạt tính sinh học của trái cây, rau củ và ngũ cốc cũng như là được tổng hợp bởi một số vi khuẩn, men và nấm. Các chủng LAB probiotic sản sinh GABA bằng cách tách cacboxyl axit glutamic. Những vi khuẩn này ổn định hệ tiêu hóa bằng cách tổng hợp GABA tại chỗ/in situ trong đường ruột.

Nói chung, 181 chủng LAB đã được sàng lọc và đối chiếu để tìm ra khả năng tổng hợp GABA của chúng. Trong số này, 132 chủng được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống, 26 phân lập từ sản phẩm sữa chua địa phương, và 23 phân lập từ sữa mẹ cùng với phân nhũ nhi. Trong 181 chủng, 13 chủng (7,2%) sản sinh GABA. Trong 13 chủng này, năm chủng vi khuẩn phân lập từ thực phẩm lên men, ba chủng phân lập từ sản phẩm sữa chua, và năm chủng phân lập từ sữa mẹ. Đáng chú ý là, ba chủng vi khuẩn sản sinh GABA được phân lập từ *Nem chua*, một từ *Dưa chua*, và một từ *Cơm rượu*. Trong năm chủng vi khuẩn này thì bốn thuộc về *Lb. plantarum* và một thuộc về *Lb. fermentum*. Sáu trong 132 chủng LAB phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam (Bảng 4) là thích hợp nhất để dùng làm probiotic vì chúng có thể sinh tồn trong đường tiêu hóa, với mật độ tế bào sống sót sụt giảm trong khoảng 0–3(lg (CFU/mL)), khả năng bám dính niêm mạc là $2,66 \times 10^7$ đến $1,48 \times 10^8$ CFU/cm², và khả năng cạnh tranh và bài trừ mạnh mẽ các mầm bệnh vi khuẩn. Ngoài ra ba chủng sản sinh pepX nội bào và bốn chủng sản sinh GABA, chứng tỏ là những chủng này cũng hữu ích như các chủng probiotic tiềm năng phân lập từ các sản phẩm từ người hoặc những thực phẩm từ sữa lên men, mà được xem là nguồn cung cấp vi khuẩn probiotic cổ điển. Tuy nhiên, những chủng phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam thì trội hơn nhiều so với những chủng phân lập từ sản phẩm từ sữa lên men và sản phẩm có nguồn gốc từ người do tính sẵn có và khả năng tiếp cận của việc lấy mẫu mô. Mức tiêu thụ sữa ở Việt Nam chỉ là 14,8 lít/người/năm, ít hơn nhiều so với các nước khác. Hơn nữa chỉ 10,8% lượng tiêu thụ này là dưới hình thức sản phẩm từ sữa lên men, chủ yếu là sữa chua, cho thấy là sản phẩm sữa lên men mà thường được xem là nguồn cung cấp probiotic thích hợp, thì không có sẵn với mọi người Việt Nam hàng ngày. Do đó, người dân Việt Nam dùng những thực phẩm lên men truyền thống hàng ngày, có tác dụng như một nguồn cung cấp nhiều vi sinh vật bản địa có lợi mà đem đến



H. 7. Độ ổn định của *Lb. brevis* NCTH24 trong sữa chua sinh học bảo quản ở 4°C trong 45 ngày. (viable cells=tế bào sống sót của CTH24;storage time=thời gian bảo quản;days=ngày)

(A) Biến đổi số tế bào sống sót phụ thuộc thời gian; (B) Khả năng sản sinh GABA: Tham khảo.: Mẫu GABA và MSG tham khảo. Số lượng ở dòng cuối tương ứng với ngày bảo quản *Lb. brevis* NCTH24 phân lập từ sữa chua sinh học đã làm xong.

Phóng theo Quách và các cộng sự

một loạt những tác dụng tăng cường sức khỏe.

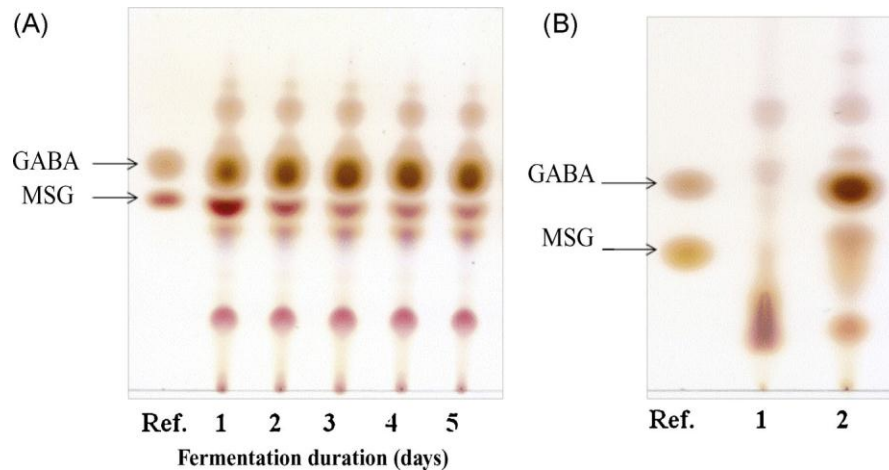
2.3. Ứng dụng LAB phân lập từ thực phẩm lên men làm các probiotic tiềm năng trong chế biến thực phẩm

Các vi khuẩn probiotic từ thực phẩm có thể có các đặc tính công nghệ và cảm quan thuận lợi hơn những probiotic lấy từ sản phẩm của người, do vậy thực phẩm trở thành một nguồn cung cấp probiotic bảo đảm. Các probiotic từ thực phẩm có thể kiểm soát tăng sinh các vi sinh vật gây bệnh mà không cần dùng đến những biện pháp xử lý và đóng gói tốn kém cũng như là đem lại những tính chất cảm quan mong muốn cho thực phẩm.

Do đó, một số nghiên cứu đã dùng probiotic tiềm năng và các chủng LAB có nguồn gốc thực phẩm để cải thiện chất lượng và đảm bảo độ an toàn của những thực phẩm chế biến sẵn mà dùng kỹ thuật truyền thống hoặc kỹ thuật mới.

Lb. plantarum VKL33 đã được áp dụng thành công làm một giống vi khuẩn khởi động để sản xuất *Nem chua* và *Dưa chua*. Một số nghiên cứu đã dùng *Lb. plantarum* NCDN4 mà sản sinh bacteriocin để sản xuất *Nem chua* và *Tôm chua* cũng như là vi khuẩn probiotic tiềm năng *Lb. plantarum* A17 để sản xuất lá cải bẹ lên men.

Một số kỹ thuật chế biến thực phẩm đã được phát triển trên khái niệm thực phẩm probiotic, mà bao gồm sinh khối tối thiểu là 10⁶CFU/g trong suốt hạn sử dụng của nó, theo chuẩn Codex dành cho sữa lên men (2003). *Lb. fermentum* HA6 không bị ảnh hưởng bởi dung dịch polyphenol dưới 1% mà được dùng để sản xuất sữa probiotic chứa chiết xuất trà xanh



H.8. Lên men môi trường cấu thành một phần từ chiết xuất cám gạo và 10g/L MSG. (A) Biến đổi nồng độ MSG và GABA trong lên men 5 ngày. (B) so sánh các mẫu: mẫu 1, chiết xuất cám gạo không lên men; mẫu 2, môi trường cấu thành một phần từ chiết xuất cám gạo và 10g/L MSG sau khi lên men. Phòng theo Trần và các cộng sự,

0,025% (mà chứa polyphenol 95%). *Lb. fermentum* HA6 đủ ổn định để dùng làm probiotic vì khi sữa probiotic mà được làm giàu bằng chiết xuất trà xanh được xử lý bằng dịch dạ dày (pH=2,5) và dịch ruột non mô phỏng, tình trạng sống sót của *Lb. fermentum* HA6 không thay đổi nhiều (sống sót lần lượt 95,8% và gần 100% trong dịch axit dạ dày và dịch ruột non). Tuy nhiên, cho *Lb. fermentum* HA6 ở mật độ 10^8 CFU/mL vào nước ép cà rốt làm thay đổi các đặc tính cảm quan, chứng tỏ nó không có các yêu cầu cảm quan thích hợp. Nguyễn và các cộng sự đã áp dụng *Lb. acidophilus* vào nước *Centella* ở mật độ 10^7 CFU/mL (pH=4,93) và quan sát được số tế bào sống sót vẫn ở 10^6 CFU/mL và độ pH giảm xuống 4,53 sau 35 ngày.

Sữa chua đậu tương được làm bằng cách dùng vi khuẩn *Lb. fermentum* DC5, *Lb. plantarum* N5, và *P. acidilactici* TC2 mà phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống lấy tại tỉnh Huế trung bộ làm một seed culture/hạt nuôi cấy (10^6 CFU/mL) để lên men ở 43 °C sau 9 tiếng. Kết quả sản phẩm đặc chắc, trơn mịn và đồng tính (về cấu trúc) với cấu trúc gel tốt và độ pH dao động từ 4,47 đến 4,54. Hơn nữa, bổ sung chiết xuất dừa 0,7–1% và đường 10% vào sữa đậu tương để gia tăng tính chất cảm quan của sản phẩm.

Chủng vi khuẩn probiotic tiềm năng *Lb. brevis* NCTH24 phân lập từ *Nem chua* mà sản sinh GABA được dùng để sản xuất sữa chua sinh học. Quy trình bao gồm những công đoạn sau: lên men sữa bằng một giống khởi động thương mại và sau đó bổ sung *Lb. brevis* NCTH24 để đạt được mật độ tế bào là $3,75 \times 10^8$ CFU/g trong thành phẩm. Sau 45 ngày bảo quản ở 4 °C, các đặc tính cảm quan của sữa chua thu được vẫn không thay đổi. Sữa chua có cấu trúc mịn, vị chua ngọt cân bằng cùng với hương vị dễ chịu. Mật độ tế bào *Lb. brevis* NCTH24 trong thành phẩm là $1,75 \times 10^7$ CFU/mL, và những tế bào này có thể sản sinh GABA khi được nuôi trong môi trường nuôi cấy chọn lọc MRS có bổ sung thêm 10g/L monosodium glutamate/mì chính (MSG; H.7)

Một nghiên cứu khác dùng chủng probiotic tiềm năng *Lb. plantarum* NCDC3 phân lập từ *Nem chua* lấy tại Hà Nội để lên men một môi trường cấu thành một phần từ chiết xuất cám gạo và 10g/L MSG. Chủng này cho thấy khả năng sản sinh đủ GABA, với 6,49g/L GABA được tạo ra sau 3 ngày, do đó biểu thị một tỉ lệ chuyển đổi sinh học rất cao (H.8). Dịch huyền phù lên men có thể được dùng trực tiếp làm một loại thức uống vi khuẩn probiotic cũng như là một bán thành phẩm hoặc một nguyên liệu để phối trộn với các nguyên liệu sống khác nhằm sản xuất các loại thực phẩm giàu GABA.

Ứng dụng của những vi sinh vật an toàn và thích hợp phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam vào hoạt động chế biến thực phẩm phụ thuộc vào các chủng LAB phân lập từ những thực phẩm này và lợi ích sức khỏe của chúng.

3. Kết luận

Thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam là nguồn cung cấp phong phú probiotic với các vi sinh vật hữu ích cũng như là cấu thành một phần quan trọng trong dinh dưỡng hàng ngày. Theo các tiêu chí chọn lọc probiotic, thì những vi sinh vật phân lập từ thực phẩm lên men có thể có hiệu quả hơn ở mức độ nào đó so với vi sinh vật phân lập từ nguồn sản phẩm của người hoặc sữa. Các chủng vi khuẩn LAB đóng vai trò quan trọng trong nhiều thực phẩm lên men truyền thống sản xuất tại Việt Nam. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu chuyên sâu về những tác dụng probiotic của các chủng vi khuẩn LAB phân lập từ những thực phẩm lên men không có nguồn gốc từ sữa. Do đó nên tiến hành thêm các nghiên cứu về hệ vi sinh vật phân lập từ những thực phẩm lên men truyền thống của Việt Nam nhằm tìm hiểu những ích lợi sức khỏe của chúng. Ngoài ra, những vi sinh vật probiotic nên được cân nhắc để phát triển thực phẩm và chất bổ sung thực phẩm cách tân đổi mới.