

# Động lực học quần thể vi khuẩn của kimchi, một sản phẩm cải thảo lên men

## Tóm tắt

Vi khuẩn axit lactic được biết đến với những vai trò quan trọng trong quá trình lên men của kimchi, một sản phẩm cải thảo lên men. Tuy nhiên, vẫn cần làm sáng tỏ động lực học quần thể vi khuẩn (microbial population dynamics) vốn có trong quá trình lên men của kimchi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã mô tả rõ đặc điểm động lực học vi khuẩn thông qua xác định tổng số 970 dòng vi khuẩn bản địa đã phân lập, đại diện loài thuộc giống *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, và *Weissella*, toàn bộ chủ yếu được xác định bằng kỹ thuật phân tích enzyme giới hạn dựa trên phản ứng chuỗi PCR (PCR-based restriction enzyme analysis). Động lực học quần thể vi khuẩn trong kimchi dường như bị **ảnh hưởng rõ rệt bởi nhiệt độ lên men**. Tăng sinh vi khuẩn hai pha rõ ràng đã được quan sát thấy khi nuôi cấy sơ bộ hai ngày ở 15°C, giai đoạn ủ được tiến hành trước khi lên men chính ở -1°C. *Leuconostoc citreum*, cũng như là *Leuconostoc gasicomitatum*, chiếm ưu thế trong pha tăng trưởng đầu tiên, trong khi đó *Weissella koreensis* chi phối pha thứ hai. Ngược lại, khi ủ sơ bộ trong 4 ngày ở 10°C, chỉ *W. koreensis* tăng trưởng nhanh chóng từ đầu quá trình lên men. Do đó kết quả của chúng tôi đề xuất rằng ủ kimchi trong thời gian ngắn ở 15°C làm tăng cường sinh trưởng của loài *Leuconostoc* ưa lạnh, gồm *Lc. citreum*, do đó trì hoãn tăng sinh *W. koreensis* chủ đạo, loài thích nghi tốt hơn ở -1°C.

## Lời dẫn

---

Kimchi, sản phẩm cải thảo lên men, được làm từ cải thảo muối cùng với một loạt những loại gia vị khác nhau gồm tỏi, gừng và ớt đỏ cay. Phân loại cổ điển của các dòng vi khuẩn bản địa phân lập từ kimchi cho thấy rằng *Leuconostoc mesenteroides* và *Lactobacillus plantarum* là những loài vi khuẩn chiếm ưu thế

trong kimchi. Tuy nhiên, những nghiên cứu khác mà khai thác phương pháp xác định phân tử đã báo cáo phát hiện thấy có nhiều loài *Leuconostoc*, gồm *Lc. citreum*, *Lc. gasicomitatum*/*Lc. gelidum* và *Lb. sakei* trong một số mẫu kimchi khác nhau. Hai nghiên cứu gần đây mà đều áp dụng phương pháp định danh vi sinh có thể nuôi cấy được bằng cách nuôi cấy (culture-independent identification methods), đã xác nhận chứng thực những kết quả nghiên cứu trước đây này, và chỉ ra rằng đa số những tế bào vi khuẩn trong kimchi đều có thể nuôi được. Một điều thay đổi ở kimchi mà gần đây mới phát hiện được đó là một thực tế rằng *Weissella koreensis* giờ đang là loài chủ đạo trong sản phẩm kimchi, loài này chưa được phát hiện từ năm 2001 trở về trước.

Kimchi theo truyền thống chỉ được làm trong mùa đông, do các vấn đề ở cả quá trình lên men và bảo quản. Các vấn đề bảo quản đã được giải quyết phần nào nhờ sự gia tăng nhanh chóng của tủ lạnh hiện đại. Tuy nhiên chúng ta vẫn khó mà kiểm soát được nhiệt độ của quá trình lên men khi làm kimchi tại nhà. Do đó, những chiếc tủ lạnh đặc biệt, được gọi là ‘tủ lạnh kimchi chuyên dụng’, gần đây đã ra mắt thị trường. Những chiếc tủ lạnh này được cài đặt các chương trình kiểm soát nhiệt độ. Mặc dù việc sử dụng những chiếc tủ lạnh kimchi chuyên dụng để kiểm soát việc lên men của kimchi gần đây đã trở nên khá phổ biến ở Hàn Quốc và nhìn chung được xem như đạt yêu cầu, thì vẫn cần phải làm rõ động lực học quần thể và những vai trò chính của các loài vi khuẩn chủ đạo trong quá trình lên men của kimchi.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành khảo sát đánh giá động lực học quần thể vi khuẩn (microbial population dynamics) của kimchi được lên men bằng tủ lạnh kimchi chuyên dụng.

## **Tài liệu và phương pháp**

---

### **Làm kimchi và lên men kimchi trong tủ lạnh kimchi chuyên dụng**

Kimchi đã được làm ở hệ thống nhà máy kimchi, dùng các nguyên liệu sau: cải thảo (74.5%), củ cải (13.5%), tỏi (2.0%), gừng (0.5%), hành tây (2.0%), hành hoa

(1.0%), bột ớt đỏ (3.0%), tỏi tây (0.5%), mắm tôm/shrimp paste (1.5%), mắm cá trổng/anchovy paste (0.5%), và sucrose (1.0%). Cải thảo được ngâm trong nước muối nồng độ 10-14% trong 16 đến 18 tiếng, và rồi được rửa lại ba lần với nước. Quá trình lên men và bảo quản kimchi được thực hiện bằng một tủ lạnh kimchi chuyên dụng kiểu cửa trên (DC-R1566DCR, WiniaMando, Asan, Hàn Quốc). Chiếc tủ lạnh này gồm hai ngăn, có thể kiểm soát nhiệt độ của mỗi ngăn thông qua việc cài đặt chương trình nhiệt độ. Với nghiên cứu này, **nhật độ của một ngăn được đặt là 10°C trong 4 ngày, sau đó nhiệt độ thiết lập giảm xuống -1°C trong 12h (trong bài này sẽ gọi là *chương trình 10°C*)**, trong khi đó nhiệt độ ở ngăn kia được đặt là 15°C trong 2 ngày, và sau đó được thiết lập giảm nhiệt xuống -1°C trong 24h (gọi là *chương trình 15°C*). Trong nghiên cứu này, 160kg kimchi được chia thành 8 phần và sau đó chia tám phần này cho hai ngăn tủ lạnh, mỗi ngăn đựng bốn phần kimchi.

### **Phân lập vi khuẩn axit lactic và các xét nghiệm sinh lý học**

Dùng 500g kimchi ở các ngày 0, 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 75, và 90 để tính toán số lượng tế bào sống sót, hàm lượng đường và sản phẩm lên men. 500g kimchi mẫu được vắt bằng máy ép điện (DA502, Donga Co., Seoul, Hàn Quốc) để thu được nước cốt. Số lượng tế bào sống sót được tính theo CFU, sau khi nuôi cấy theo thứ tự các dịch pha loãng từ nước cốt trên các đĩa thạch dinh dưỡng MRS (Difco, Franklin Lakes, NJ) ở 25°C. Để phân tích thành phần vi khuẩn tại một thời điểm xác định trong quá trình lên men, khoảng 30 tập đoàn vi khuẩn đã được phân lập từ một đĩa nuôi cấy thích hợp và sau khi định danh, thì tính toán tỉ lệ tương đối của mỗi loài vi khuẩn. Để tránh thiên lệch có thể xảy ra trong việc chọn tập đoàn, chúng tôi đã phân lập gần như mọi tập đoàn từ một đĩa nuôi cấy xác định, hay từ một khu vực trong đĩa. Mọi vi khuẩn đã phân lập được trữ trong dung dịch glycerol 20% ở -70°C. Độ pH được đo ở 20°C dùng pH kế (Orion 720, Thermo Electron, Waltham, MA). Sản phẩm và chất nền của quá trình lên men được phân tích thông qua kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography) (Orom 2000Q LC, Orom, Seoul, Hàn Quốc), dưới những điều kiện sau: tiêm một mẫu 20 µL vào một cột sắc ký (Shim-pack SCR-102H, 300 × 8.0 mm; Shimadzu,

Kyoto, Nhật Bản) và tách ở tốc độ dòng chảy là  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$ , dùng  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.1% (Aldrich, St Louis, MO) làm dung dịch rửa chất ghép cặp, ở áp suất  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$ , ở nhiệt độ  $60^\circ\text{C}$ . Dùng đầu dò UV (SPD-10A, Shimadzu) phát hiện thấy các axit hữu cơ ở 210 nm và các phân tử đường bị chia tách (Aminex HPX-87 K; Bio-Rad, Hercules, CA) ở tốc độ dòng chảy  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  ở  $65^\circ\text{C}$ , và phát hiện bằng dò chỉ số khúc xạ (refractive index detection) (RID-10A, Shimadzu). Xác định các đặc điểm tiêu thụ đường của những vi khuẩn đã phân lập bằng cách dùng hệ thống API 50 CHL (BioMerieux, Marcy l'Etoile Pháp) ở  $25^\circ\text{C}$ .

### **Định danh vi khuẩn đã phân lập thông qua phân tích enzyme giới hạn dựa trên gen 16S rARN được khuếch đại**

Các ADN nhiễm sắc thể được tách bằng một phương pháp đã miêu tả ở trước, hoặc bằng cách đun các mẻ cấy vi khuẩn trong 10 phút dùng chelex-100 (Bio-Rad). Khuếch đại PCR nhắm vào gen 16S rARN và việc định danh loài sau đó thông qua phân tích enzyme giới hạn được mô tả ở trên với loài *Leuconostoc*, loài *Weissella* và *Lactobacillus sakei*. Với *Lb. pentosus* và *Lb. plantarum*, các kỹ thuật phân tích PRC đa mồi (multiplex PCR) được thực hiện như đã mô tả bởi Torriani (2001). Việc định danh một số dòng vi khuẩn đã được phân tách (năm dòng bản địa trong mỗi loài) thông qua quy trình phân tích enzyme giới hạn dựa trên phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR-based restriction enzyme analysis protocol) dùng trong nghiên cứu này được xác nhận chứng minh bởi phương pháp đa pha, bao gồm lai ADN-ADN và giải mã trình tự gen 16S rARN. Những dòng vi khuẩn bản địa chưa được định danh bởi phân tích enzyme giới hạn căn cứ trên phản ứng chuỗi trùng hợp PCR là đối tượng để định danh thêm thông qua giải mã trình tự gen 16S rARN.

## **Kết quả**

---

### **Động lực học quần thể vi khuẩn trong khi lên men kimchi**

Mục tiêu chính của nghiên cứu này là để theo dõi động lực học quần thể vi khuẩn trong các mẫu kimchi lên men trong tủ lạnh kimchi chuyên dụng. Để hoàn thành được mục tiêu này, trước tiên chúng tôi phân lập tổng cộng 970 vi khuẩn axit lactic

sau 10 quãng thời gian trong quá trình lên men kimchi ở  $-1^{\circ}\text{C}$ , sau một giai đoạn ủ sơ bộ (4 ngày) ở  $10^{\circ}\text{C}$  (chương trình  $10^{\circ}\text{C}$ ) hay trong 2 ngày ở  $15^{\circ}\text{C}$  (chương trình  $15^{\circ}\text{C}$ ). Những dòng vi khuẩn đã phân lập này sau đó được định danh thông qua phân tích enzyme giới hạn căn cứ phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR-based restriction enzyme analysis).

Mọi dòng vi khuẩn đã phân lập được phát hiện thuộc về một tập hợp con của vi khuẩn axit lactic (tổng cộng có 15 loài; Bảng 1) mà trước đây đã được phân lập từ các mẫu kimchi. Những dòng vi khuẩn bản địa này gồm có tám loài *Leuconostoc* (*Lc. carnosum*, *Lc. citreum*, *Lc. gasicomitatum*, *Lc. gelidum*, *Lc. inhae*, *Lc. kimchii*, *Lc. lactis*, và *Lc. mesenteroides*), ba loài *Weissella* (*W. cibaria*, *W. confusa*, và *W. koreensis*), và bốn loài *Lactobacillus* (*Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, và *Lb. sakei*).

## 1

Phân bố vi khuẩn của loài vi khuẩn axit lactic trong quá trình lên men kimchi

Lên men (ngày)	0	2	4	8	15	30	45	60	75	90
(n=30)	(120)	(120)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)
<i>Lc. carnosum</i>	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	2	4	7	3	–	7	–	–	–	–
<i>Lc. citreum</i>	50	41	36	17	13	–	–	–	–	–
50	46	23	10	7	60	10	–	–	–	–
<i>Lc.</i>	–	3	3	13	37	7	20	–	7	17

<b>Lên men (ngày)</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>75</b>	<b>90</b>
<b>(n=30)</b>	<b>(120)</b>	<b>(120)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>
<i>gasicomitatum</i>										
	4	11	20	43	–	17	3	10	40	
<i>Lc. gelidum</i>	–	–	1	–	23	20	17	3	–	–
–	2	6	–	3	–	–	–	–	–	
<i>Lc. inhae</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Lc. kimchii</i>	7	3	2	–	–	–	–	–	–	–
7	2	1	–	–	10	–	–	–	–	
<i>Lc. lactis</i>	23	3	7	3	13	13	–	–	–	
23	21	9	3	–	27	–	–	–	–	
<i>Lc. mesenteroides</i>	7	1	6	7	–	–	–	3	–	–
7	2	8	7	7	3	–	7	20	20	

<b>Lên men (ngày)</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>75</b>	<b>90</b>
<b>(n=30)</b>	<b>(120)</b>	<b>(120)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>	<b>(30)</b>
<i>W. cibaria</i>	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	16	21	23	3	–	10	3	–	–	–
<i>W. confusa</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	2	2	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>W. koreensis</i>	–	–	1	20	17	63	53	90	93	73
–	2	8	13	10	–	30	80	50	40	–
<i>Lb. curvatus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	1	3	3	–	7	–	–	–	–
<i>Lb. pentosus</i>	–	–	3	13	–	10	–	–	–	7
–	1	–	–	–	–	–	13	13	–	–
<i>Lb. plantarum</i>	–	–	1	7	–	–	–	–	–	–
–	3	1	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lb. sakei</i>	–	50	41	17	10	–	7	3	–	–

Lên men (ngày)	0	2	4	8	15	30	45	60	75	90
(n=30)	(120)	(120)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)
–	–	5	13	20	–	20	7	17	7	

*Lc.*, *Leuconostoc*; *W.*, *Weissella*; *Lb.*, *Lactobacillus*.

% thành phần vi khuẩn bản địa phân lập từ một mẫu kimchi lên men ở

\* chương trình 10°C hoặc

† ở chương trình 15°C. –, không phát hiện được.

Số lượng vi khuẩn bản địa đã xét nghiệm được cho trong ngoặc.

Để xác định được ưu điểm của việc ủ sơ bộ kimchi ở nhiệt độ cao trước khi ủ chính ở  $-1^{\circ}\text{C}$ , chúng tôi đồng thời lên men kimchi mới làm theo chương trình 10°C hoặc 15°C. Chúng tôi đã phát hiện ra rằng, đúng với kỳ vọng, thành phần vi khuẩn của cả hai mẫu kimchi về cơ bản là giống nhau (Bảng 1). Tuy nhiên động lực học vi khuẩn của hai mẫu kimchi có hơi khác nhau. Một trong những khác biệt này có thể là do tăng tổng số lượng tế bào phát hiện trong giai đoạn trước khi ủ ở 15°C, chứ không phải ở 10°C. *Leuconostoc citreum*, *Lc. lactis*, và *W. cibaria* tăng sinh mạnh trong 2 ngày đầu ở 15°C, và hệ quả là kích thước quần thể tăng tạo nên tình trạng tăng sinh cạnh tranh (competitive growth) ở nhiệt độ bị hạ thấp, trong trường hợp này là  $-1^{\circ}\text{C}$  (Hình 1b; Bảng 1). Vào ngày thứ 8 của chương trình 15°C, *W.*

*cibaria* cho thấy số lượng tế bào lớn nhất (23%), xếp sau là *Lc.*

*gasicomitatum* (20%). Đến thời điểm này số lượng các tế bào *Lc. citreum* và *Lc.*

*lactis* đã sụt giảm biểu thị tình trạng tăng sinh diễn ra chậm ở  $-1^{\circ}\text{C}$ . Tuy nhiên, *Lc.*

*Citreum* biểu hiện số lượng tế bào nhiều nhất (60%) ở ngày thứ 30, đứng sau là *Lc.*

*lactis* (27%), điều này chứng tỏ tình trạng tăng sinh diễn ra liên tục nhưng ở tốc độ chậm (Hình. 1b; Bảng 1). Tình trạng tăng sinh cạnh tranh này dẫn đến việc kích thước các loài khác thu nhỏ lại, gồm *Lc. gasicomitatum* (<3 %) và *W.*

*koreensis* (<3%), cả hai loài đều có tính kháng axit tương đối. Sau ngày thứ 30, số lượng tế bào *Lc. citreum* và *Lc. lactis* giảm nhanh chóng, do ảnh hưởng của môi

trường axit (pH 4.6). Tuy nhiên, *W. koreensis* và *Lc. gasicomitatum* được chứng minh là tăng sinh nhanh chóng trong điều kiện axit này, dẫn đến tình trạng chua hóa tiếp diễn (pH 4.3) ở ngày thứ 45 (Hình.1b). Sau ngày thứ 45, chỉ *W. koreensis* biểu hiện tiếp tục tăng sinh (80% ở ngày 60). Tuy nhiên, tình trạng tăng sinh này gần như bị kìm hãm triệt để sau ngày 60 (pH 4.1), kết quả là làm giảm nhanh tổng số tế bào sống sót.

*Động lực học quần thể của các loài vi khuẩn chủ đạo trong kimchi lên men ở chương trình 10°C (a) hoặc chương trình 15°C (b). Nhiệt độ giảm xuống -1°C (ở ngày 4.5) từ 10°C trong 12h hoặc xuống -1°C (ở ngày 3) từ 15°C trong 24h. ○, CFU mL<sup>-1</sup>; △, pH; •, *Leuconostoc citreum*; □, *Leuconostoc gasicomitatum*; ▪, *Weissella koreensis*; ▲, *Lactobacillus sakei*.*

Không giống những gì quan sát được trong chương trình 15°C, bất cứ quần thể hiện hữu nào cũng không thể tăng sinh trong giai đoạn ủ sơ bộ (10°C trong 4 ngày) trong chương trình 10°C, điều này có thể là do giai đoạn thích nghi lâu hơn (Hình. 1a). Ở ngày 8, quan sát thấy kích thước quần thể tăng nhẹ. Chỉ *Lc. gasicomitatum*, *Lc. gelidum*, và *W. koreensis* biểu hiện tăng sinh rõ rệt. Ở ngày thứ 15, *Lc. gasicomitatum* cho thấy số lượng tế bào lớn nhất (37%), đứng sau là *Lc. gelidum* (23%), và *W. koreensis* (17%). Số lượng tế bào *Lc. citreum* giảm nhanh, từ 43% trong giai đoạn trước khu ủ, xuống 13% ở ngày 15, và sau đó xuống dưới 3% ở ngày 30 (pH 5.2), theo đó quần thể thừa thớt hơn là do tình trạng tăng sinh diễn ra rất chậm (Hình. 1a; Bảng 1). Từ ngày 30 đến ngày 60, chỉ *W. koreensis* chiếm ưu thế (63% ở ngày 30; 90% ở ngày 60). Nhìn chung, loài *Leuconostoc*, gồm *Lc. citreum*, chi phối nửa đầu giai đoạn lên men, và *W. koreensis* chiếm ưu thế trong giai đoạn tiếp sau trong chương trình 15°C, trong khi đó *W. koreensis* vượt trội trong toàn bộ giai đoạn lên men trong chương trình 10°C.

Để có thể khẳng định được liệu *W. koreensis* cũng chiếm ưu thế trong những giai đoạn lên men về sau trong các mẫu kimchi khác hay không, chúng tôi đã xét nghiệm 10 mẫu kimchi khác nhau, các mẫu đã được làm trong các mùa khác nhau và lên men trong các môi trường khác nhau. *Weissella koreensis* là loài chủ đạo



**Vi khuẩn đã  
phân lập (%)**

Loài	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
(n=117)	(30)	(202)	(30)	(92)	(36)	(70)	(106)	(30)	(120)	
<i>Lc. kimchii</i>	–	3	–	7	–	–	–	–	–	–
<i>Lc. lactis</i>	5	3	6	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lc. mesenteroides</i>	–	7	18	10	8	14	–	–	20	–
<i>W. cibaria</i>	–	10	17	–	2	3	–	–	–	3
<i>W. koreensis</i>	4	–	–	60	7	3	–	–	–	–
<i>W. paramesenteroides</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	2	–
<i>W. soli</i>	1	–	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lb. brevis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	3	10
<i>Lb. curvatus</i>	–	–	–	–	16	47	–	29	43	11
<i>Lb. mali</i>	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–

**Vi khuẩn đã  
phân lập (%)**

Loài	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
(n=117)	(30)	(202)	(30)	(92)	(36)	(70)	(106)	(30)	(120)	
<i>Lb. paraplantarum</i>	–	–	–	–	1	–	–	3	–	–
<i>Lb. pentosus</i>	–	–	–	–	–	–	–	5	–	–
<i>Lb. plantarum</i>	–	–	–	–	3	8	3	2	–	–
<i>Lb. sakei</i>	2	–	1	23	26	14	92	50	33	8

*Lc.*, *Leuconostoc*; *W.*, *Weissella*; *Lb.*, *Lactobacillus*.

\* % thành phần vi khuẩn đã phân lập từ các mẫu kimchi.

Số lượng vi khuẩn đã phân lập xét nghiệm được cho trong ngoặc. Các mẫu kimchi được liệt kê là mẫu A (nhiệt độ lên men – 8°C, thời gian đóng gói – tháng 11), B (15°C, tháng 11), C (20°C, tháng 11), D (15°C, tháng 4), E (8°C, tháng 7), F (20°C, tháng 7), G (10°C, pH 3.8, tháng 8), H (15°C, tháng 9), I (15°C, tháng 10), và J (15°C, tháng 11). Chỉ có ba mẫu kimchi (mẫu A, B, và C) được làm trong phòng thí nghiệm của chúng tôi và các mẫu kimchi thương mại khác là những sản phẩm kimchi đóng gói mới phân phối ra thị trường được chúng tôi mua về. Vi khuẩn đã phân lập thu được tại một số mốc thời gian (pH 5.0–3.8) trong quá trình lên men với mọi mẫu kimchi, với ngoại lệ mẫu G. Vi khuẩn phân lập từ mẫu G được thu ở độ pH 3.8.

## **Động học (kinetics) của việc tiêu thụ sucrose và sản xuất axit trong quá trình lên men kimchi**

Sucrose (khoảng 1%) thường được cho thêm vào kimchi làm theo kiểu hiện đại. Để xác định được vai trò của sucrose trong quá trình lên men kimchi, chúng tôi đã phân tích hàm lượng sucrose trong khi lên men thông qua kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography). Gần như toàn bộ sucrose đã bị tiêu thụ trong các giai đoạn đầu của quá trình lên men (trong vòng 15 ngày), biểu thị tổng số tế bào tăng nhanh trong chương trình 15°C, trong khi đó cùng một lượng sucrose tương tự được tiêu thụ rất chậm (trong vòng 45 ngày) trong chương trình 10°C (Hình 2a và b). Điểm khác biệt này có thể là do sự chi phối của loài *Leuconostoc* species trong suốt giai đoạn này ở chương trình 15°C, khi một quần thể đa số nữa, *W. koreensis*, không có khả năng lên men sucrose, mặc dù có tiêu thụ một lượng nhỏ sucrose dextran. Tình trạng tiêu thụ sucrose nhanh chóng được quan sát thấy chủ yếu ở *Lc. citreum*, *Lc. gasicomitatum*, và *W. cibaria* trong chương trình 15°C, trong khi đó ghi nhận tình trạng tiêu thụ chậm và được cho là do *W. koreensis* chủ đạo, trong chương trình 10°C. Đồng thời, giải phóng nhiều axetat (acetate) trong giai đoạn lên men cuối của chương trình 10°C (62 mM) hơn so với trong chương trình 15°C (42 mM). Quan sát này chứng tỏ động học quần thể giữa hai chương trình lên men là khác nhau (Hình 2a và b).

## **2**

Khoảng thời gian tiêu thụ sucrose và các sản phẩm lên men trong quá trình lên men kimchi dùng chương trình 10°C (a) hoặc chương trình 15°C (b). ○, CFU mL<sup>-1</sup>; ●, sucrose; □, lactate; ▣, acetate; ▲, ethanol; ◆, mannitol.

Vì quá trình lên men kimchi được thực hiện chỉ bằng vi khuẩn axit lactic, nên các sản phẩm của quá trình lên men trên phương diện nào đó bị hạn chế. Phát hiện thấy lactate, acetate, ethanol, và mannitol (Hình 2a và b). Lượng lactate và acetate có tương quan mật thiết với tình trạng tăng sinh của tổng số quần thể. Tuy nhiên, không xác định được nồng độ ethanol tăng sau khi tiêu thụ sucrose hoàn toàn, theo

đó chứng tỏ rằng fructose có thể đã được dùng làm vật nhận electron để sản xuất mannitol trong các giai đoạn lên men sau đó. (Hình 2a và b).

## Bàn luận

---

Nghiên cứu này chứng minh rằng quá trình lên men kimchi được dẫn dắt bởi chuyển động học quần thể riêng biệt của một tập hợp con của các loài *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, và *Weissella*. Hai loài *Leuconostoc*, lần lượt là *Leuconostoc citreum* và *Lc. gasicomitatum*, cũng như là *Weissella cibaria*, chiếm ưu thế trong những giai đoạn lên men đầu tiên (>pH 4.6), trong khi đó *W. koreensis* trở thành loài chủ đạo về sau, trong chương trình 15°C (Hình. 1b; Bảng 1). Một điều bất ngờ là mô hình diễn thế vi khuẩn (microbial succession pattern) lại khác trông thấy trong chương trình 10°C, mặc dù toàn bộ những điều kiện khác ngoại trừ nhiệt độ là đều giống với chương trình 15°C. Loài *Leuconostoc* hay *W. cibaria* đều không chiếm ưu thế, trong khi đó chỉ *W. koreensis* nổi trội trong suốt toàn bộ giai đoạn lên men. Điều này có thể chỉ ra rằng, không giống với đa số loài *Leuconostoc*, *W. koreensis* có khả năng tăng sinh ngay cả trong những điều kiện bất lợi nhất, ví dụ như là -1°C và <pH 4.3, mà dưới những điều kiện này thì độ đa dạng các loài vi khuẩn sẽ bị giảm rõ rệt do một số loài thích nghi tốt có xu hướng lấn át số lượng các loài hiện hữu. Những kết quả này cũng đề xuất một điều là nhiệt độ lên men là một trong những yếu tố quyết định cơ bản đến các quần thể vi khuẩn trong kimchi, và diễn thế vi khuẩn phức tạp đó không phải là điều cốt yếu đối với quá trình lên men kimchi. Kết luận này được chứng minh bởi những kết quả nghiên cứu trước đó mà chỉ ra rằng một chủng *Lc. citreum* đơn lẻ, dùng làm một starter (nguồn giống khởi động), là đủ để chi phối toàn bộ quá trình lên men kimchi.

Một điều đáng chú ý là chỉ đến gần đây mới phát hiện được rằng có *W. koreensis* trong kimchi. Nguyên nhân có thể được lý giải bởi độ hiếm của loài này trong hầu hết những mẫu kimchi nghiên cứu trước đây, những mẫu được lên men ở nhiệt độ trên 8°C, những điều kiện mà loài vi khuẩn ưa lạnh này có thể thấy khó mà cạnh tranh sinh tồn được. Quan điểm này được xác minh bởi kết quả của một

ngiên cứu gần đây. Lee (2005) chứng minh rằng không thể phát hiện được *W. koreensis* trong kimchi làm tại phòng thí nghiệm cho lên men ở 10 và 20°C, trong khi đó *Lc. citreum*, *W. confusa*, và *Lactobacillus sakei/Lb. curvatus* được phát hiện là chiếm ưu thế trong những mẫu này.

Một số phân tử đường tự do gồm fructose, glucose, và sucrose, cũng xuất hiện trong kimchi. Nồng độ sucrose giảm mạnh trong những giai đoạn lên men ban đầu, theo đó chứng tỏ có sự gia tăng đáng kể của vi khuẩn tiêu thụ sucrose, những vi khuẩn này thường bao gồm phần lớn các vi khuẩn axit lactic, mặc dù không phải *W. koreensis* (Hình 1b và 2b). Nhìn chung có vẻ như là lên men kimchi ở -1°C khá là dễ diễn ra thông qua phản ứng lên men phần lớn là không đồng nhất (principally heterofermentative reaction), bao gồm giải phóng số lượng lớn acetate (60 hay 40 mM lần lượt ở chương trình 10 hoặc 15°C) chủ yếu thông qua quá trình khử đường fructose thành mannitol (Hình 2a và b).

Cuối cùng, chúng tôi cố gắng xác định xem liệu phương pháp nuôi cấy có thể đã bỏ sót một số loài vi khuẩn mà thực tế có tồn tại trong các mẫu kimchi không, vì một số quần thể vi khuẩn có thể không nuôi cấy được trong các điều kiện thí nghiệm. Có hai bằng chứng chứng minh rằng các loài vi khuẩn chủ đạo có thể nuôi cấy được. Thứ nhất là tình trạng gia tăng tổng số tế bào sống sót được có tương quan gần với sự gia tăng trong nồng độ các sản phẩm lên men gồm lactate và acetate (Hình 2a và b). Thứ hai, hai phân tích về các cộng đồng vi khuẩn trong kimchi bằng các phương pháp nghiên cứu vi sinh không cần nuôi cấy đã hé mở ra rằng các thành phần vi khuẩn chính gồm có *Lc. citreum*, *Lc. gasicomitatum*, *Lc. gelidum*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *W. confusa*, và *W. koreensis*. Những nghiên cứu này chứng minh vững chắc cho phần giải thuyết của chúng tôi, rằng các loài chủ đạo trong các mẫu kimchi có thể, mà thực như thế, nuôi cấy được trên môi trường MRS. Tuy nhiên, những phân tích nghiên cứu vi sinh không cần nuôi cấy này trên phương diện nào đó còn có hạn chế. Như chúng tôi đã chỉ ra trong nghiên cứu trước đây, kỹ thuật khuếch đại PCR (PCR amplification) không thể tương quan chặt chẽ với tỉ lệ giữa ADN mục tiêu (target DNA) và ADN tổng (total DNA). Kết quả là có thể đã bỏ sót một số nhóm quần thể vi khuẩn thiểu số.

Để kết luận thì, kết quả của chúng tôi cho thấy *W. koreensis*, một vi khuẩn ưa lạnh, có khả năng là loài chủ đạo trong kimchi sản xuất ở  $-1^{\circ}\text{C}$  và sự chi phối của loài *Leuconostoc*, gồm *Lc. citreum*, quan sát được sau giai đoạn ủ sơ bộ thời gian ngắn ở  $15^{\circ}\text{C}$ , dẫn đến làm chậm lại tình trạng tăng sinh quá nhanh của *W. koreensis* ở  $-1^{\circ}\text{C}$ . Tuy nhiên, cũng rõ ràng là động lực học quần thể khá là nhạy cảm với các điều kiện môi trường, gồm nhiệt độ lên men. Do đó, động lực học quần thể được mô tả trong nghiên cứu này có thể chứng minh là có thể áp dụng được vào việc kiểm soát lên men và bảo quản kimchi tốt hơn.

## Lời cảm ơn

---

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến H. Bae và H. Kim vì những trợ giúp kỹ thuật. Bài nghiên cứu này được hỗ trợ bởi WiniaMando Inc.

Nguồn bài viết: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00186.x>

Dịch sang tiếng Việt: Trần Tuyết Lan, [nhóm Ha Mên](#), [hướng dẫn ăn đúng](#)