

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ SỰ HIỆN DIỆN CỦA VI SINH VẬT TRÊN PHI LÊ CÁ RÔ PHI VẦN (*Oreochromis niloticus*) CUỐI QUÁ TRÌNH CHẾ BIẾN

PROXIMATE COMPOSITION AND MICROFLORA OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) FILLETS AT THE PROCESSING END

Nguyễn Thị Kiều Diễm^{1,2}, Mai Thị Tuyết Nga²

¹Khoa Công nghệ Thủy sản, Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

²Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: Mai Thị Tuyết Nga (Email: ngamtt@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 08/01/2021; Ngày phản biện thông qua: 26/03/2021; Ngày duyệt đăng: 29/03/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm khảo sát chất lượng của cá rô phi vằn sau quá trình phi lê và sau khi đông ròi IQF, kết quả khảo sát cho thấy phi lê cá rô phi sau khi đông lạnh có hàm lượng lipid là 0,68% và hàm lượng acid béo tự do 4,87 g/100 g chất béo. Chỉ số acid thiobarbituric (TBARS) trong phi lê sau khi phi lê và đông lạnh thấp (lần lượt là $0,06 \pm 0,004$ và $0,11 \pm 0,012$ mg MDA/kg), đồng thời hàm lượng peroxide sau phi lê và sau quá trình đông lạnh đều dưới ngưỡng phát hiện. Hàm lượng tổng nitơ bazơ bay hơi (TVB-N) ban đầu của phi lê cá rô phi sau phi lê là $11,13 \pm 0,74$ và sau đông lạnh là $12,82 \pm 1,22$ mg N/100g thấp hơn rất nhiều so với ngưỡng cho phép là 25 mg N/100 g. Lượng *Pseudomonas* spp., tổng số vi sinh vật hiếu khí (TVC), *Clostridium perfringens*, Coliforms và *E.coli* nằm trong giới hạn cho phép, không phát hiện sự có mặt của các vi sinh vật gây bệnh như: *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Listeria*. Kết quả định danh vi sinh vật trên phi lê cá rô phi cho thấy có sự hiện diện của các vi sinh vật gây hư hỏng đặc trưng *Pseudomonas lundensis* và *Pseudomonas fragi*.

Từ khóa: Lạnh đông, cá rô phi, phi lê, *Pseudomonas* spp., chỉ số peroxide, thành phần hoá học cơ bản

ABSTRACT

The study aimed to investigate the quality of tilapia after filleting and IQF steps, the results showed that tilapia fillets contained 0.68% lipid and content amount of free fatty acids 4.87g of free fatty acids/100 g lipid. The thiobarbituric acid (TBARS) value in the fillets were low (0.06 ± 0.004 and 0.11 ± 0.012 mg MDA/kg after filleting and freezing, respectively) and the peroxide contents were undetectable at these stages. The of total volatile basic nitrogen (TVB-N) values of tilapia fillets were 11.13 ± 0.74 and 12.82 ± 1.22 mg N/100 g after being filleted and frozen, accordingly, lower than that in the permitted threshold of 25 mg N/100 g. The load of *Pseudomonas* spp., total viable count (TVC), *Clostridium perfringens*, Coliforms and *E.coli* were within the acceptable limits. In addition, no such pathogens as *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, or *Listeria* were observed in all samples. The identification results of microorganisms isolated from tilapia fillets revealed that there was the presence of such specific spoilage organisms as *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*.

Key words: Frozen, tilapia, fillets, *Pseudomonas* spp., peroxide value, proximate compositions

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) được biết đến là nguồn nguyên liệu thủy sản phổ biến ở Đồng bằng Sông Cửu Long, là một trong những loại nguyên liệu có khả năng đáp ứng nhu cầu xuất khẩu mạnh mẽ cho Việt Nam trong những năm qua. Ở một số quốc gia trên thế giới cá rô phi trở thành nguồn cung cấp protein chủ yếu [9]. Năm 2019, sản lượng cá

rô phi trên toàn thế giới đạt 6,5 triệu tấn, tăng 3,8% so với năm 2018. Theo ước tính, tốc độ tăng trưởng trung bình của cá rô phi từ năm 2010 đến năm 2019 trên toàn thế giới là 7,7%. Trong đó, Trung Quốc là quốc gia sản xuất cá rô phi đứng đầu trên thế giới, với sản lượng 1,7 triệu tấn trong năm 2019 chiếm gần 50% tổng sản lượng toàn thế giới. Trên thế giới quốc gia có sản lượng xuất khẩu cá rô phi nhiều nhất

phải kể đến là Trung Quốc, Indonesia, Ai Cập, Brazil, Bangladesh, Philippines, Thái Lan và Việt Nam [7], trong đó Việt Nam sản xuất cá rô phi đứng hàng thứ 6 trên thế giới [8]. Do đó, cá rô phi và sản phẩm từ cá rô phi là đối tượng đang được quan tâm và phát triển ở Việt Nam, đặc biệt là phi lê cá rô phi, một trong những sản phẩm xuất khẩu phổ biến hiện nay.

Thủy sản là một trong những thực phẩm giàu dinh dưỡng và cần thiết cho sức khỏe con người đặc biệt là cá do có nhiều acid béo không no với hàm lượng cao [14]. Tuy nhiên, lipid chứa acid béo không no cao lại là nguyên nhân gây ra sự hư hỏng, từ đó làm giảm chất lượng của thủy sản [13]. Sự biến đổi chất lượng cơ bản quá trình chế biến thủy sản phải kể đến là sự oxy hóa chất béo, quá trình này được đo bởi các chỉ số peroxide (PV) và chỉ số acid thiobarbituric (TBARS). TBARS phản ánh lượng aldehyde sinh ra khi hydroperoxide bị phân hủy ở giai đoạn tiếp theo của sự ôi dầu [15, 19]. Thêm vào đó, sự hiện diện của vi sinh vật phân hủy protein và acid amin hình thành các hợp chất cấp thấp, trong đó có các nitơ bazơ bay hơi đặc trưng bằng hàm lượng tổng nitơ bazơ bay hơi (TVB-N) [1], thông số này thường được sử dụng để đánh giá chất lượng thủy sản. Có thể nói vi sinh vật là một trong những nguyên nhân thúc đẩy sự suy giảm chất lượng của thủy sản, chính vì thế vi sinh vật là đối tượng cần được quan tâm theo dõi. Sự lây nhiễm vi sinh vật có thể xảy ra trong quá trình chế biến, bảo quản và tiêu thụ. Đã có nhiều nghiên cứu về hệ vi sinh vật phát triển trên phi lê cá rô phi trong quá trình chế biến, bảo quản và tiêu thụ như: tổng số vi sinh vật hiếu khí, *Pseudomonas* spp., Coliforms, *E.coli*... [3, 4]. Tuy nhiên, có thể còn có những nhóm vi sinh vật khác hiện diện trên phi lê cá, do đó, để quản lý chất lượng phi lê cá rô phi trong chuỗi cung ứng được tốt hơn, cần kiểm soát các nhóm vi sinh vật hiện diện ban đầu trên phi lê cá. Xuất phát từ thực tế cho thấy, khảo sát chất lượng ban đầu của phi lê cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) tại nhà máy chế biến sẽ là cơ sở cho quá trình quản lý chất lượng sản phẩm phi lê cá rô phi vằn trong chuỗi cung ứng lạnh sau này.

II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Phi lê cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*): cá rô phi được phi lê và đông rời IQF tại nhà máy chế biến thủy sản Nam Việt, An Giang, cỡ 120-170 g/phi lê. Mẫu được lấy ngay sau công đoạn phi lê và sau công đoạn cấp đông rời IQF và bao gói bằng túi PE, mẫu được chứa trong thùng xốp cách nhiệt có xếp xen kẽ trong các lớp đá gel và vận chuyển về phòng thí nghiệm Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ trong vòng 1 giờ.

Hóa chất và môi trường: Hóa chất và môi trường sử dụng đều đạt tiêu chuẩn phân tích, gồm có: acid trichloroacetic, acid boric, acid sulfuric, Bromocresol green, Formaldehyde solution, Eosin Methylene Blue agar, Violet Red Bile agar, Glycerol, Plate count agar, *Pseudomonas* base F, *Pseudomonas* CFC supplement, Iron agar, Pepton from meat, Pepton from casein, Phenol red (NaCl, Kova'c (Merck, Đức); Methyl red, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 và NaOH (Xilong, Trung Quốc).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Các chỉ tiêu phân tích

Mẫu phi lê cá rô phi được lấy ngay sau công đoạn phi lê và sau công đoạn cấp đông rời IQF. Ngay sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm, mẫu được phân tích các chỉ tiêu hoá học: hàm lượng nước, protein, tro, hàm lượng lipid, hàm lượng acid béo tự do, chỉ số peroxide, chỉ số TBARS, thành phần acid béo tự do và TVB-N. Phi lê cá rô phi tiếp tục được kiểm tra sự hiện diện của các nhóm vi sinh vật theo TCVN 5289:2006 và một số vi sinh vật thường gặp trên sản phẩm thủy sản như: tổng số vi sinh vật hiếu khí (TVC) phát triển ở nhiệt độ thấp, *Pseudomonas* spp., Coliforms, *E.coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Vibrio*...

Sau khi xác định sự hiện diện của nhóm vi sinh vật gây hư hỏng trên phi lê cá rô phi, tiến hành phân lập tách ròi và định danh một số vi sinh vật gây hư hỏng đặc trưng.

2.2. Phương pháp phân tích hoá học

- Xác định hàm lượng nước theo phương pháp TVCN 3700:1990
- Xác định hàm lượng protein theo phương pháp TCVM 3705:1990
- Xác định hàm lượng tro theo phương pháp AOAC 938:08- Xác định hàm lượng tổng nitơ bazơ bay hơi (TVB-N) theo phương pháp của Malle và Poumeyrol (1989)
- Xác định chỉ số TBARS theo phương pháp của Raharjo và Schmidt (1992) [22]
- Xác định chỉ số Peroxide theo TVCN 6121:2018
- Xác định hàm lượng acid béo tự do (FFA) theo TCVN 6127:2010
- Xác định hàm lượng lipid theo TCVN 3730:2009
- Xác định thành phần acid béo tự do theo CASE.SK.0107-GC được thực hiện bởi trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm (CASE)

2.3. Phương pháp phân tích vi sinh vật

Chuẩn bị mẫu: đồng nhất phi lê cá rô phi bằng máy đập mẫu sau đó lấy chính xác 25 g cá cho vào túi PE vô trùng, thêm vào 225 ml dung dịch đệm phosphate. Tiến hành đồng nhất mẫu.

Pha loãng mẫu: mẫu sau khi đồng nhất sẽ được pha loãng theo dãy thập phân như sau: dùng micropipet hút 1 ml từ độ pha loãng 10^{-1} cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý (đã được khử trùng), đồng nhất dịch pha loãng ta được mẫu pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục pha đến độ nồng độ thích hợp nếu nghi ngờ mẫu có mật độ vi sinh vật cao hơn.

Cấy mẫu: dùng micropipet hút 0,2 ml dịch mẫu đã pha loãng vào đĩa petri có chứa 20-30 ml môi trường thạch (đã được vô trùng) thích hợp cho từng loại vi sinh vật cần kiểm tra. Dùng que cấy trang nhúng vào cồn 70° , đưa que cấy đốt trên ngọn lửa đèn cồn, đợi cho que cấy nguội, sau đó dùng que cấy trang đều mẫu trên bề mặt thạch. Chờ mặt thạch khô, lật úp đĩa petri nuôi cấy ở nhiệt độ và thời gian thích hợp cho từng loại vi sinh vật cần kiểm tra theo quy định.

Phương pháp xác định vi sinh vật được sử dụng dựa vào các phương pháp theo quy định của TCVN hiện hành, tuy nhiên có sự điều

chỉnh cho phù hợp với tình hình nghiên cứu thực tế.

- Xác định vi khuẩn sinh H₂S và tổng số vi sinh vật hiếu khí (TVC) phát triển ở nhiệt độ thấp theo NMKL 86:2006
- Xác định *Pseudomonas* spp. theo TCVN 7138:2013
- Xác định Coliforms và *E.coli* theo MNKL 125 4th ed. 2005.
- Xác định *Staphylococcus aureus* theo MNKL 66:2003
- Xác định *Vibrio* theo FDA 2004
- Xác định *Listeria monocytogenes* theo TCVN 7700-1:2007
- Xác định *Salmonella* theo ISO 6579:2002
- Xác định *Clostridium perfringens* theo ISO 7937:2004.

2.4. Định danh vi sinh vật

Phân lập và tách rỗng vi sinh vật: Đốt que cấy vòng trên ngọn lửa đèn cồn để khử trùng, đợi khi que cấy vừa nguội, đưa que cấy tiếp xúc với khuẩn lạc cần phân lập trên đĩa petri. Sau đó đưa que cấy vào đĩa petri có chứa môi trường thạch thích hợp, thực hiện các thao tác cấy truyền bằng cách ria các đường trên đĩa petri chứa môi trường thạch. Sau mỗi đường ria liên tục, đốt khử trùng que cấy và làm nguội trước khi thực hiện đường ria tiếp theo. Lật ngược đĩa, ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ ẩm.

Trích ly Deoxyribonucleic acid (DNA): DNA được trích ly bằng phương pháp của Sambrook và cộng sự (1989) [23]. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB, lấy 2 ml dung dịch vi khuẩn cho vào eppendorf sau đó tiến hành ly tâm với chế độ 13.000 rpm trong 5 phút. Thu cặn và hòa tan cặn trong 250µl dung dịch TE (Tris EDTA buffer) gồm 10 mM Tris và 1mM Ethylene Diamine Tetracetic Acid (EDTA) pH 8, bổ sung 50µl dung dịch 10% SDS và 10µl Proteinase K (10 mg/l), sau đó ủ ở nhiệt độ 65°C trong 20 phút, cứ 5 phút đảo eppendorf một lần để trộn đều dung dịch, tiếp tục thêm 400µl 10% Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)/0,7 M NaCl, và tiếp tục ủ ở nhiệt độ 65°C trong 20 phút. Sau đó, thêm 600µl hỗn hợp Chloroform: Isoamyl

Alcohol với tỷ lệ 24:1, trộn đều và ly tâm với chế độ 12.000 rpm trong 10 phút, tiến hành hút phần dung dịch trong phía trên vào eppendorf mới và thêm 1 ml Isopropanol, lắc đều, ổn định ở -20°C trong 30 phút, sau đó ly tâm 13.000 rpm trong 10 phút, lấy phần kết tủa sau đó bổ sung 1ml Ethanol 70%, tiếp tục ly tâm ở 12.000 rpm trong 5 phút, bỏ phần Ethanol, giữ lại phần kết tủa và sấy khô kết tủa, hòa tan kết tủa với 30µl nước cất, trữ ở -20°C.

Giải trình tự một số dòng vi khuẩn: quá trình giải trình tự DNA sau quá trình trích ly được tiến hành bởi công ty First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia. Sau đó sử dụng chương trình BLAST N (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) để so sánh trình tự đoạn gen 16SrRNA của các dòng vi khuẩn với trình tự gen 16SrRNA của các loài vi khuẩn có trong dữ liệu ngân hàng của NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 6 lần độc lập với 6 lô phi lê cá rô phi. Số liệu được tính trung bình, độ lệch chuẩn trên 6 lần thí nghiệm bằng phần Microsoft Excel.

So sánh trình tự đoạn gen 16SrRNA của vi sinh vật với dữ liệu trong ngân hàng NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLAST N (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) tại <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Bảng 1. Thành phần hoá học cơ bản ban đầu trên cá rô phi vẫn sau quá trình phi lê và sau đông rôi IQF.

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Sau phi lê	Sau đông
Lipid	%	1,19 ± 0,03	0,68 ± 0,04
Protein	%	17,7 ± 0,6	19,6 ± 0,2
Độ ẩm	%	79,7 ± 1,1	78,0 ± 0,9
Tro	%	0,81 ± 0,04	0,78 ± 0,02
TVB-N	mg N/100g	11,13 ± 0,74	12,82 ± 1,22

Lipid và thành phần lipid là một trong những chỉ tiêu rất được quan tâm trong thực phẩm nói chung và trong thủy sản nói riêng, lipid trong thủy sản thường được biết đến là nguồn lipid quý giá và tốt cho sức khỏe con người. Tuy nhiên, hàm lượng lipid cao lại dễ dàng bị biến đổi trong quá trình chế biến và bảo quản từ đó ảnh hưởng đến chất lượng của

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần hoá học cơ bản ban đầu trên phi lê cá rô phi

Phi lê cá rô sau quá trình đông IQF có hàm lượng protein là 19,6%, hàm lượng lipid là 0,68%, cao hơn so với hàm lượng protein và lipid thông thường của cá phi lê [18, 24]. Ngoài ra hàm lượng nước và tro của phi lê cá rô phi sau khi đông rôi lần lượt là 78% và 0,78% (Bảng 1). Điều này cho thấy hàm lượng dinh dưỡng của phi lê cá rô phi tương đối cao, do đó cần lưu ý bởi vì hàm lượng này dễ bị biến đổi trong quá trình chế biến và bảo quản. Một trong những chỉ tiêu biểu thị sự biến đổi và hư hỏng sản phẩm thủy sản được quan tâm là TVB-N. Hàm lượng TVB-N của cá rô phi sau khi phi lê và sau quá trình lạnh đông được ghi nhận là 11,13 ± 0,74 và 12,82 ± 1,22 mg N/100 g, thấp hơn so với ngưỡng quy định là 25 mg N/100 g. Kết quả nghiên cứu thấp hơn so với những nghiên cứu tương tự trên cá rô phi đỏ sau khi lạnh đông chậm và lạnh đông nhanh [10]. Các tác giả cho rằng phương pháp lạnh đông ảnh hưởng đến thành phần lipid và hàm lượng TVB-N của phi lê. Sự khác biệt về hàm lượng TVB-N của cá rô phi ở nghiên cứu này và các nghiên cứu khác còn có thể là do sự khác biệt về loài, chế độ nuôi dưỡng, v.v...

thủy sản.

Kết quả phân tích ở Bảng 2 cho thấy hàm lượng lipid phi lê cá rô phi sau đông là 0,68 ± 0,04% và hàm lượng acid béo tự do là 4,87 ± 0,12 g/100 g chất béo, các chỉ số thường dùng để đánh giá sự biến đổi thành phần lipid trong quá trình chế biến phải kể đến là: chỉ số peroxide và chỉ số TBARS, kết quả phân tích cho thấy chỉ

Bảng 2. Thành phần lipid trên cá rô phi vằn sau quá trình phi lê và sau đông rời IQF.

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Sau phi lê	Sau đông
Acid béo tự do	g/100 g béo	$2,86 \pm 0,05$	$4,87 \pm 0,12$
Peroxide	meq/kg béo	0	0
TBARS	mg MDA/kg	$0,06 \pm 0,004$	$0,11 \pm 0,012$
C14:0	%	0,03	0
C16:0	%	0,29	0,15
C16:1	%	0,04	0
C18:0	%	0,08	0,05
C18:1	%	0,38	0,17
C18:2	%	0,16	0,08
C20:4	%	0,03	0,04

số peroxide không có sau quá trình phi lê và đông lạnh, còn chỉ số TBARS sau phi lê và sau làm đông lần lượt là 0,06 và 0,11 mg MDA/kg. Điều này cho thấy chất lượng của lipid chưa có sự biến đổi sau quá trình lạnh đông, có thể hiểu do quá trình đông rời có thời gian đông nhanh nên chưa có sự biến đổi về chỉ tiêu này. Trong một số nghiên cứu trên cá rô phi đồ so sánh chất lượng lipid của phi lê lạnh đông chậm và lạnh đông nhanh sau 6 tháng, kết quả cho thấy hàm lượng TBARS của mẫu lạnh đông chậm cao hơn so với mẫu lạnh đông nhanh [10]. Trong những nghiên cứu khác về cá bơn, cá trích cũng có kết quả tương tự [11, 16].

Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu về thành phần acid béo của các loại thủy sản đặc biệt là cá, trong đó các acid béo tự do là chỉ tiêu luôn được quan tâm. Kết quả nghiên cứu cho thấy thành phần chất béo của phi lê cá rô phi vằn có chứa các acid béo không no như C18:1 chiếm $0,17 \div 0,38\%$, C18:2 chiếm $0,08 \div 0,16\%$ và C20:4 chiếm $0,03 \div 0,04\%$ cho thấy phi lê cá rô phi vằn là một nguồn dinh dưỡng rất tốt, mặc

khác chất lượng của sản phẩm rất dễ bị biến đổi do oxy hoá chất béo. Nghiên cứu trên cá trắng nước ngọt, cá đối và cá chép [10] chỉ ra rằng hàm lượng acid béo thường thay đổi trong quá trình làm đông và bảo quản đông.

2. Sự hiện diện của các nhóm vi sinh vật ban đầu trên phi lê cá rô phi vằn

Kiểm tra sự hiện diện và mật số của các nhóm vi sinh vật trên cá rô phi sau phi lê và sau đông rời IQF được thực hiện trên 6 lô cá độc lập. Tuy nhiên, một số nhóm vi sinh vật được phát hiện trên cá tiếp tục được theo dõi và kiểm soát sau khi cá được vận chuyển về phòng thí nghiệm, bởi vì các vi sinh vật này có thể tiếp tục phát triển trên cá, và dễ dàng bị lây nhiễm trong quá trình bảo quản và vận chuyển. Do đó, sau khi cá được đưa về phòng thí nghiệm và bảo quản để phục vụ cho quá trình nghiên cứu, chúng tôi tiếp tục kiểm tra mật số vi sinh vật ban đầu ở tất cả nội dung tiếp theo của đề tài nghiên cứu. Vì vậy mật số TVC, *Pseudomonas* spp., Coliforms và *E.coli*. được thực hiện trên 60 lô cá độc lập.

Bảng 3. Sự hiện diện của các nhóm vi sinh vật trên mẫu sau quá trình phi lê và phi lê sau khi đông rời IQF của cá rô phi vằn.

Chỉ tiêu kiểm tra	Mật số vi sinh vật		
	Sau phi lê	Sau đông IQF	Sau vận chuyển về phòng thí nghiệm
TVC	$8.10^3 \div 8,3.10^3$ CFU/g	$3,4.10^3 \div 3,9.10^3$ CFU/g	$3,33.10^4 \div 9,3.10^5$ CFU/g*
<i>Pseudomonas</i> spp.	$10^2 \div 1,33.10^3$ CFU/g	$2,23.10^3 \div 3,03.10^3$ CFU/g	$4,5.10^2 \div 3,63.10^4$ CFU/g*
Vi khuẩn sinh H_2S	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu

Coliforms	< 10 CFU/g	< 10 CFU/g	$1,02.10^2 \div 1,21.10^4$ CFU/g*
E. Coli	< 10 CFU/g	< 10 CFU/g	< 10 CFU/g*
Staphylococcus aureus	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu
Listeria monocytogenes	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu
Salmonella	Không phát hiện trong 25g mẫu	Không phát hiện trong 25g mẫu	Không phát hiện trong 25g mẫu
Vibrio parahaemolyticus	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu	Không phát hiện trong 1g mẫu
Vibrio cholerae	Không phát hiện trong 25g mẫu	Không phát hiện trong 25g mẫu	Không phát hiện trong 25g mẫu
Clostridium perfringens	<10 CFU/g	<10 CFU/g	< 10 CFU/g

Ghi chú:

- Chỉ tiêu vi sinh vật của mẫu sau phi lê và sau đông được thực hiện trên 6 lô cá

- *Chỉ tiêu TVC, *Pseudomonas* spp., Coliforms và *E.coli* của mẫu sau khi đến phòng thí nghiệm được thực hiện trên 60 lô cá.

Kết quả phân tích ở Bảng 3 cho thấy mật số vi sinh vật trên phi lê cá rô phi chưa vượt quá ngưỡng theo quy định mật số vi sinh vật trên mặt hàng thủy sản đông lạnh của Bộ Y tế [6] và TCVN 5289: 2006, cụ thể tổng số vi sinh vật hiếu khí sau quá trình đông lạnh trên phi lê cá rô phi dao động từ $3,4.10^3 \div 3,9.10^3$ CFU/g, mật số Coliforms và *E.coli* nhỏ hơn 10 CFU/g, các nhóm vi sinh vật còn lại không phát hiện trên phi lê. Riêng mật số *Pseudomonas* spp. dao động từ $2,23.10^3 \div 3,03.10^3$ CFU/g. Điều này có thể hiểu đây là sản phẩm của quá trình chế biến nên yếu tố vệ sinh luôn đặt lên hàng đầu đối với nhà sản xuất, quá trình chế biến được kiểm soát chặt chẽ, do đó việc lây nhiễm vi sinh vật ít xảy ra trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên, mật số TVC và *Pseudomonas* spp. của phi lê cá sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm có mức dao động lớn hơn so với mẫu sau phi lê và sau đông, sự gia tăng mật số vi sinh vật phụ thuộc nhiều vào yếu tố như biến động nhiệt trong quá trình vận chuyển, thời gian lưu kho tại nhà máy, an toàn vệ sinh trong quá trình vận chuyển và bảo quản tại nhà máy, tất cả các yếu tố trên góp phần thúc đẩy sự phát triển của vi sinh vật, kết quả kiểm tra cho thấy phi lê cá sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm có mật số TVC dao động từ $3,33.10^4 \div 9,3.10^5$ CFU/g và mật số *Pseudomonas* spp. dao động $4,5.10^2 \div 3,63.10^4$ CFU/g, vẫn nằm trong giới hạn cho phép theo quy định của Bộ Y tế và TCVN 5289:2006.

Kết quả của nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thụy Vân Duyên (2017) [5] và Huỳnh Thị Ái Vân (2015) [2], các tác giả cho rằng vi sinh vật hiện diện trên nguyên liệu cá ban đầu có thể như nhau, tuy nhiên trong quá trình chế biến có thể có sự lây nhiễm từ bề mặt tiếp xúc như dụng cụ chế biến vào sản phẩm, kiểm soát tốt quá trình chế biến sẽ giảm thiểu lượng vi sinh vật ban đầu. Kết quả phân tích của các tác giả trên về mật số vi sinh vật ban đầu trên phi lê cá tra và phi lê cá rô phi đều nằm ở mức cho phép theo quy định của Bộ Y tế [6], hầu hết chỉ phát hiện sự có mặt của TVC và nhóm vi sinh vật chỉ thị vệ sinh, còn lại không phát hiện sự có mặt của các vi sinh vật gây bệnh *Samonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, hay *Listeria*. Kết quả phân tích của nghiên cứu này và nghiên cứu của Nguyễn Thụy Vân Duyên (2017) [5] và Huỳnh Thị Ái Vân (2015) [2] đều cho thấy *Pseudomonas* spp. chính là vi sinh vật đặc trưng trên phi lê cá rô phi bảo quản lạnh/đông, đây là nhóm vi sinh vật gây hư hỏng đặc trưng trên hầu hết các sản phẩm thủy sản ướp lạnh, do đó cần được kiểm soát trong quá trình chế biến và bảo quản.

Từ kết quả kiểm tra ban đầu trên phi lê cá rô phi cho thấy sản phẩm đạt chất lượng theo quy định. Tuy nhiên, trong chuỗi cung ứng sẽ có nhiều thay đổi xảy ra như sự biến động nhiệt độ trong quá trình vận chuyển và bảo quản, khi

bày bán, hay mức độ vệ sinh trong tiêu thụ..., tất cả các yếu tố trên đều tạo điều kiện thuận lợi cho sự hư hỏng sản phẩm và mất an toàn thực phẩm xảy ra. Do đó nên tiếp tục theo dõi sự thay đổi mật số vi sinh vật chỉ thị vệ sinh (Coliforms và *E.coli*) và nhóm vi sinh vật gây hư hỏng đặc trưng (TVC phát triển ở nhiệt độ thấp, *Pseudomonas* spp.) tại các điều kiện bảo quản của chuỗi cung ứng.

3. Kết quả nhận diện các dòng vi sinh vật

Tiến hành giải trình tự các dòng vi khuẩn đã được phân lập từ quá trình kiểm tra mật số vi sinh vật ban đầu trên phi lê cá rô phi sau phi lê và phi lê sau quá trình đông lạnh, chúng tôi dùng chương trình BLAST N để so sánh mức độ đồng hình của trình tự các dòng vi khuẩn được phân lập với trình tự của các dòng vi khuẩn trong ngân hàng gen trên trang web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Trình tự nucleotid của dòng P1

TYRKKTAWYMMMCGTGGTAC-
CGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGC-
TACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATG-
G T G T G A C G G G C G G T G T G T A -
CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGT-
GACATTCTGATTACGATTACTAGC-
GATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTG-
CAGACTGCGATCCGGACTACGATCG-
GTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGC-
GGCTTGGCAACCCTTTGTACCGAC-
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCCAG-

GCCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC-
GTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTT-
GTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGT-
GCCCACCATTATGTGCTGGTAAC-
AGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC-
GGGACTTAACCCAACATCTCACGA-
CACGAGCTGACGACAGCCATGCAG-
CACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCAC-
CAATCTATCTCTAGAAAGTTCATTG-
GATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTC-
GCGTTGCTTCGAATTAAACACAT-
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC-
GTCAATTCATTTGAGTTTTTAACCTT-
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGT-
CAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCAC-
TAAGAGTTCAAGACTCCCAACGGC-
TAGTTGACATCGTTTACGGCGTG-
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT-
GCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGT-
CAGTATCAGTCCAGGTAGTCGCCTTC-
GCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTAC-
GCATTTTCACCGCTACACAGGAATTC-
CACTACCCCTCTACCATACTCTAGCTT-
GCCAGTTTTTGGGATGCAGTTCCCAG-
G T T G A G C C C G G G G A T T T C W -
CATCCCAACTTWACAAACCACCCTAC-
GCGCGGCTTTTWACG

Kết quả đối sánh cho thấy dòng P1 có tổng số nucleotid được giải là 951 nucleotid, cho kết quả đồng hình với dòng *Pseudomonas ludensis* ATCC 49968 với tỉ lệ 98% (Hình 1).

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value
☐	Pseudomonas endophytica strain B5T744 16S ribosomal RNA, partial sequence	1598	1598	98%	0.0
☐	Pseudomonas fragi strain ATCC 4973 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1598	1598	98%	0.0
☐	Pseudomonas deceptionensis strain M1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1594	1594	98%	0.0
☐	Pseudomonas fragi strain NBRC 3458 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1591	1591	98%	0.0
☐	Pseudomonas psychrophila strain E-3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1580	1580	98%	0.0
☐	Pseudomonas taetrolens strain 111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	97%	0.0
☐	Pseudomonas protegens strain CHA0 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1559	1559	98%	0.0
☐	Pseudomonas fragi strain IFO 3458 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1557	1557	98%	0.0
☐	Pseudomonas ludensis strain ATCC 49968 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1557	1557	98%	0.0

Hình 1. Mức độ đồng hình của dòng P1 với các dòng vi sinh vật có trên cơ sở dữ liệu NCBI.

Trình tự nucleotid của dòng P2

TRWYYWKKTYMMCMCGTTGKTA-
ACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGC-
TACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATG-
G T G T G A C G G G C G Y S T G T K T A -
CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGT-

GACATTCTGATTACGATTACTAGC-
GATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTG-
CAGACTGCGATCCGGACTACGATCG-
GTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGC-
GGCTTGGCAACCCTTTGTACCGAC-
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCCAG-

GCCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC-
GTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTT-
GTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGT-
GCCCACCATTATGTGCTGGTAACTA-
AGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC-
GGGACTTAACCCAACATCTCACGA-
CACGAGCTGACGACAGCCATGCAG-
CACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCAC-
CAATCTATCTCTAGAAAGTTTCATTG-
GATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTC-
GCGTTGCTTCGAATTAAACACAT-
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCC-
GTCAATTCAATTTGAGTTTTAACCTT-
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGT-
CAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCAC-
TAAGAGTTCAAGACTCCCAACGGC-

TAGTTGACATCGTTTACGGCGTG-
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT-
GCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGT-
CAGTATCAGTCCAGGTAGTCGCCTTC-
GCCACTGGGTGTTTCCTTCCTATATC-
TACGCATTTTACCGCTACACAG-
GAAATTCCACTACCCTCTACCATYM-
KYRRMWSKMYTTGCCAGTTTTG-
GATGCAGTTCCCAGGTTTGAGCCC-
GGGGATTTACATCCAACCTTAACAAAC-
CACCTACGCGCGCTTTTACGCCCAGTA-
ATTCCGATTAACGCTTTGCACCCTTCTG

Dòng P2 có tổng số nucleotid được giải là 951 nucleotid, cho kết quả đồng hình với dòng *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 với tỉ lệ 98% (Hình 2).

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pseudomonas endophytica strain BST44 16S ribosomal RNA, partial sequence	1620	1620	98%	0.0	98%	NR_136473.1
Pseudomonas fragi strain ATCC 4973 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1620	1620	98%	0.0	98%	NR_024946.1
Pseudomonas deceptionensis strain M1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1616	1616	98%	0.0	97%	NR_117552.1
Pseudomonas fragi strain NBRC 3458 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1613	1613	98%	0.0	97%	NR_113578.1
Pseudomonas psychrophila strain E-3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1602	1602	98%	0.0	97%	NR_028619.1
Pseudomonas taetrolens strain I11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1585	1585	97%	0.0	97%	NR_036909.1
Pseudomonas protegens strain CHA0 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1581	1581	98%	0.0	97%	NR_114749.1
Pseudomonas fragi strain IFQ 3458 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1580	1580	98%	0.0	96%	NR_112077.1
Pseudomonas lundensis strain ATCC 49968 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1580	1580	98%	0.0	97%	NR_024704.1

Hình 2. Mức độ đồng hình của dòng P2 với các dòng vi sinh vật có trên cơ sở dữ liệu NCBI.

Pseudomonas lundensis và *Pseudomonas fragi* được định danh từ các dòng vi sinh vật đã được phân lập trên phi lê cá rô phi vằn, đây là loài gây hư hỏng thường gặp trong các sản phẩm thịt [26], sữa và cá bảo quản ở nhiệt độ thấp [20]. Trong đó *Pseudomonas lundensis* là một trong những vi khuẩn quan trọng nhất gây hư hỏng thịt ướp lạnh [17], còn *Pseudomonas fragi* là nguyên nhân gây ra mùi và vị ôi khét do chuyển hóa lipid và axit béo trong một số sản phẩm thực phẩm [12]. Các loài này thuộc chi *Pseudomonas* đã được công nhận là tác nhân gây hư hỏng thực phẩm tươi sống có nguồn gốc động vật được bảo quản trong điều kiện hiếu khí [21]. *Pseudomonas* spp. ảnh hưởng rất lớn đến sự giảm chất lượng của sản phẩm [25], đã có nhiều nghiên cứu về sự hư hỏng thủy sản bắt nguồn từ *Pseudomonas* spp. Từ đó cho thấy *Pseudomonas* spp. là nhóm vi sinh vật cần được theo dõi trong quá trình chế biến và bảo quản lạnh/lạnh đông nhằm hạn chế sự hư hỏng

sản phẩm thủy sản.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Từ thực tế nghiên cứu cho thấy phi lê cá rô phi trước và sau khi đông lạnh là một nguồn thực phẩm dinh dưỡng với hàm lượng protein tương đối cao (trung bình 19,6%) và lipid giàu acid béo không no. Ngoài ra, lượng TVB-N ban đầu trên phi lê cá là 12,82 mg N/100 thấp hơn so với giới hạn tối đa cho phép. Không phát hiện sự hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh như: *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Listeria*, *Clostridium perfringens*... trên phi lê cá, điều này cho thấy quá trình sản xuất, chế biến tại nhà máy đảm bảo chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm. Tuy nhiên, sự hiện diện của vi sinh vật gây hỏng đặc trưng *Pseudomonas* spp. và nhóm vi sinh vật chỉ thị vệ sinh trên phi lê cá cho thấy cần giám sát và kiểm soát quá trình bảo quản, vận chuyển và tiêu thụ cuối chuỗi cung ứng lạnh/lạnh đông để duy trì và đảm bảo chất lượng của sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Huss, H.H., 2004. *Cá tươi: chất lượng và các biến đổi về chất lượng*. Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Huỳnh Thị Ái Vân, 2015. *Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ thấp đến sự biến đổi của vi sinh vật gây hỏng đặc trưng (Pseudomonas spp.) và vi sinh vật gây bệnh (Coliform, E. coli) hiện diện trên fillet cá Tra (Pangasius hypophthalmus) bảo quản lạnh*. Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Nha Trang.
3. Nguyễn Thị Kiều Diễm, Mai Thị Tuyết Nga và Lý Nguyễn Bình, 2020. *Nghiên cứu sự phát triển của coliform và escherichia coli trên phi lê cá rô phi khi bảo quản ở nhiệt độ thấp*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 12, p. 67-72.
4. Nguyễn Thị Kiều Diễm, Nguyễn Thụy Vân Duyên và Mai Thị Tuyết Nga, 2019. *Mật số Pseudomonas spp. và tổng số vi sinh vật hiếu khí trên cá rô phi phi lê khi bảo quản ở nhiệt độ thấp*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam 9(106), p. 151-157.
5. Nguyễn Thụy Vân Duyên, 2017. *Nghiên cứu sự biến đổi của vi sinh vật gây hỏng đặc trưng và vi sinh vật gây bệnh hiện diện trên fillet cá rô phi bảo quản lạnh*. Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Nha Trang.
6. Bộ Y tế, 19/12/2007 *Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT 19/12/2007 Về việc ban hành “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm”*.
7. Vasep, 2017. *Bản tin thương mại thủy sản số 3*, truy cập tại địa chỉ: <http://hoinghecvietnam.org.vn>, truy cập ngày 24/3/2018.
8. Vasep, 2018. *Sản lượng cá rô phi trên toàn cầu đến năm 2030*, truy cập tại địa chỉ: <http://hoinghecvietnam.org.vn>, truy cập ngày 10/10/2018.

Tiếng Anh

9. Al-Harbi, A.H., and Naim Uddin, 2005. *Bacterial diversity of tilapia (Oreochromis niloticus) cultured in brackish water in Saudi Arabia*. Aquaculture, 250(3), p. 566-572.
10. Babak Karami, Y.M., Abbas Ali Motalebi and Amir Eghbal Khajehrahimi, 2018. *Effect of Different Freezing Processes on the Quality and Histological Changes of Red Tilapia (Oreochromis niloticus × Tilapia mosambicus)*. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 13(2), p. 82-88.
11. Chevalier, D., Sequeira-Munoz, Amaral, Le Bail, Alain, Simpson, Benjamin K, Ghoul, Mohamed, 2000. *Effect of freezing conditions and storage on ice crystal and drip volume in turbot (Scophthalmus maximus): evaluation of pressure shift freezing vs. air-blast freezing*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 1(3), p. 193-201.
12. Dousset, X.J., E. Zagorec, M. Spoilage: Bacterial Spoilage, in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press, Oxford. p. 106-112.
13. Eyo, A., 2001. *Fish processing technology in the tropics*, National Institute for Freshwater Fisheries Research (NIFFR).
14. Hu, F.B., Bronner, Leslie, Willett, Walter C., Stampfer, Meir J., Rexrode, Kathryn M., Albert, Christine M., Hunter, David Manson, JoAnn E., 2002. *Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women*. Jama, 287(14), p. 1815-1821.
15. Jaczynski, J., A. Hunt, and J.W. Park. *Safety and quality of frozen fish, shellfish, and related products*, in *Handbook of frozen food processing and packaging*. 2005, CRC Press. p. 341-376.
16. Karaçam, H. and M. Boran, 1996. *Quality changes in frozen whole and gutted anchovies during storage at -18 C*. International journal of food science & technology, 31(6), p. 527-531.

17. Liu, Y.J., Xie, J., Zhao, L. J., Qian, Y. F., Zhao, Y., Liu, X., 2015. *Biofilm Formation Characteristics of Pseudomonas lundensis Isolated from Meat*. J Food Sci, 80(12), p. M2904-10.
18. Love, R.M., 1970. *The chemical biology of fishes. With a key to the chemical literature*. The chemical biology of fishes. With a key to the chemical literature.
19. Magnussen, O.M., A.K.T. Hemmingsen, V. Hardarsson, T.S. Nordtvedt and T.M. Eikevik 2008. *Chapter 7 – Freezing of Fish*. In: J.A. Evan (editor). *Frozen Food Science and Technology*. Backwell Publishing.
20. Nychas, G., V. Dillon, and R. Board, 1988. *Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products*. Biotechnology and applied biochemistry, 10(3), p. 203-231.
21. Nychas, G.-J.E., D.L. Marshall, and J.N. Sofos. *Meat, poultry, and seafood, in Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition*. 2007, American Society of Microbiology. p. 105-140.
22. Raharjo S, S.J.N.a.S.G.R., 1992. *Improved speed, specificity and limit of determination of an aqueous acid-extraction thiobarbituric acid -C18 method for measuring lipid-peroxidation in beef*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(11), p. 2182-2185.
23. Sambrook, H., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.
24. Stansby, M.E., 1962. *Proximate composition of fish*.
25. Tryfinopoulou, P., E. Tsakalidou, G.-J. E. Nychas, 2002. *Characterization of Pseudomonas spp. Associated with Spoilage of Gilt-Head Sea Bream Stored under Various Conditions*. Applied and Environmental Microbiology, 68(1), p. 65-72.
26. Zagorec, M. and M.-C. Champomier-Vergès. *Chapter 6 - Meat Microbiology and Spoilage, in Lawrie's Meat Science (Eighth Edition)*, F. Toldra', Editor. 2017, Woodhead Publishing. p. 187-203.