

KHẢO SÁT CÁC THÔNG SỐ TỐI ƯU CỦA QUÁ TRÌNH LÊN MEN VÀ THỜI GIAN BẢO QUẢN DƯA BỒN BỒN (*Typha orientalis*) MUỐI CHUA

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm^{1*}, Lê Thị Kim Đồng²

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra thông số tối ưu cho quá trình lên men và xác định thời gian bảo quản dưa bồn bồn (*Typha orientalis*). Sử dụng dòng *Lactobacillus plantarum* CMT2 được đăng ký trên GenBank với mã số MN841920, thông qua phần mềm Design Expert 7.0 với thể thức Box-Behnken, đã xác định được nghiệm thức tối ưu cho quá trình lên men dưa bồn bồn là pH 4,87, nồng độ muối 4,08%, mật số vi khuẩn $5,1 \times 10^8$ tế bào/mL với hàm lượng acid lactic đạt 5,71 g/L sau 6 ngày lên men ở nhiệt độ phòng. Tỷ lệ giữa khối lượng nguyên liệu và dịch lên men là 1:1 (200 g/200 mL) cho hiệu suất lên men cao nhất với lượng acid lactic là 6,12 g/L, pH 3,17, dưa bồn bồn cho cấu trúc sản phẩm giòn đều, có màu sắc tươi sáng, vị chua mặn hài hòa. Thời gian bảo quản sản phẩm bồn bồn muối chua tối đa ở nhiệt độ phòng (khoảng 30°C) là 28 ngày kể từ ngày lên men, tăng lên 84 ngày khi bảo quản ở 4-6°C với các số liệu tương ứng ở hai nhiệt độ lần lượt là tổng số vi sinh vật hiếu khí (TPC): $9,8 \times 10^3$, pH: 3,36, acid lactic 5,96 g/L và TPC $4,8 \times 10^3$, pH 3,33, acid lactic 5,97 g/L.

Từ khóa: Bảo quản, bồn bồn, *Lactobacillus plantarum*, lên men.

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, để đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng, các sản phẩm lên men đã và đang được nghiên cứu rộng rãi nhằm cải tiến về chất lượng, năng suất cũng như quy mô sản xuất. Một trong những sản phẩm lên men phổ biến trên thế giới cũng như ở Việt Nam đó là rau củ muối chua, một loại thực phẩm vừa cung cấp nhiều dinh dưỡng vừa giúp con người kéo dài thời gian bảo quản nguyên liệu [1]. Bồn bồn có tên khoa học là *Typha orientalis* còn gọi là cỏ nển, là loài cây hoang dại, rễ tiền và dễ tìm để làm rau củ muối chua.

Vi khuẩn lactic (LAB - Lactic Acid Bacteria) có ứng dụng khá rộng rãi trong thực tiễn và có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu cũng như trong sản xuất thực phẩm, được phẩm và công nghiệp hóa chất [2], là nhóm vi khuẩn được ứng dụng nhiều trong lên men các sản phẩm dưa muối chua; là nhóm vi khuẩn có lợi cho con người, giúp kích thích hoạt động hệ miễn dịch và cân bằng hệ vi sinh vật trong đường ruột có lợi cho sức khỏe [3], [4]. Bên cạnh đó, nhiều

sản phẩm muối chua cũng là nguồn protein, carbohydrate, khoáng chất, vitamin và chất xơ quý giá [5], [6], [7]. LAB còn sinh các thành phần hương thơm, chất kháng khuẩn và khuẩn và exopolysaccharides (EPS) góp phần vào một số đặc điểm quan trọng, chẳng hạn như kết cấu, mùi vị và thời hạn sử dụng lâu hơn cho dưa chua lên men [8], [9], [10]. Ngoài ra, LAB trong các sản phẩm ngâm chua có vai trò quan trọng trong việc giảm độc tố nấm mốc trong một số trường hợp nhất định, do đó làm giảm nhiều nguy cơ đối với sức khỏe. LAB được công nhận là GRAS (Generally Recognized As Safe: được công nhận là an toàn) và rất hữu ích để chống lại sự phát triển liên tục của mầm bệnh và vi sinh vật gây hư hỏng trong các sản phẩm muối chua [6], [11]. Trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều đề tài nghiên cứu ứng dụng các dòng vi khuẩn lactic trong lên men nhiều loại rau củ quả như: bắp cải, cải thảo, củ hành, tỏi, củ kiệu,... và nhiều loại rau củ khác [12], [13], [14]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm ứng dụng vi khuẩn lactic được tuyển chọn vào quá trình lên men dưa bồn bồn muối chua. Nghiên cứu cũng sẽ góp phần đa dạng hóa sản phẩm lên men, nâng cao giá trị của nguồn đặc sản hiện có và phần nào đáp ứng nhu cầu sử dụng thực phẩm đa dạng của người dân Việt Nam hiện nay.

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Sinh viên ngành Công nghệ sinh học K42, Trường Đại học Cần Thơ
Email: hnttam@ctu.edu.vn

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Vật liệu: Cây bần bần (*Typha orientalis*); dòng *Lactobacillus plantarum* CMT2 được phân lập từ cây bần bần và được đăng ký trên GenBank với mã số MN841920. Dòng vi khuẩn này thuộc vi khuẩn lactic Gram dương, hình que và được trữ trong glycerol ở nhiệt độ -20°C.

Hóa chất và môi trường: yeast extract, beef extract, peptone, glucose, NaOH 0,1N, phenolphthalein, cồn (70% và 96%), MRS agar (De Man, Rogosa và Sharpe, Merck, Đức), môi trường MRS broth (Merck, Đức).

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH, nồng độ muối và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dưa bần bần

Khảo sát sự ảnh hưởng của pH, nồng độ muối của dung dịch ban đầu và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dưa bần bần, từ đó chọn ra được các thông số thích hợp để quá trình lên men dưa bần bần đạt hiệu quả cao. Thí nghiệm với 2 lần lặp lại. Thí nghiệm được bố trí theo mô hình Box Behnken của phần mềm Design Expert 7.0 với ba nhân tố ảnh hưởng đến quá trình lên men dưa bần bần: Nhân tố A: nồng độ muối, giá trị nhỏ nhất (min) 3,5% và giá trị lớn nhất (max) 4,5%; nhân tố B: pH, giá trị nhỏ nhất (min) 4,5 và giá trị lớn nhất (max) 6,5; nhân tố C: mật số vi khuẩn (tế bào/mL), giá trị nhỏ nhất (min) 10^5 và giá trị lớn nhất (max) 10^9 . Các giá trị biến thiên này tham khảo vào quy trình sản phẩm muối chua và một số nghiên cứu về sản phẩm muối chua trước đó [12], [14], [16].

Chuẩn bị vi khuẩn giống: sử dụng dòng vi khuẩn đã được tuyển chọn có khả năng sinh acid lactic cao nhất. Bồn bần sau khi đã xử lý sơ bộ sẽ cho vào môi trường được điều chỉnh lần lượt về nồng độ muối, pH, mật số vi khuẩn dựa theo bố trí thí nghiệm của phần mềm Design Expert 7.0. Cho 100 mL dung dịch vào bình lên men, sau đó chủng vi khuẩn với mật số dựa theo bố trí thí nghiệm của bảng 1. Lên men 6 ngày ở nhiệt độ phòng. Khi quá trình lên men kết thúc tiến hành phân tích mẫu.

Chỉ tiêu đánh giá: pH sau lên men; hàm lượng acid toàn phần, tính theo acid lactic (%). Phương pháp chuẩn độ acid: Thu 2 mL dung dịch cho vào bình tam giác. Sau đó nhỏ tiếp 1-2 giọt phenolphthalein vào mỗi bình tam giác chứa dung dịch vi khuẩn và tiến

hành chuẩn độ bằng cách cho mỗi lần 20 μ L NaOH 0,1 N đã chuẩn bị, đếm số lần cho vào đến khi mẫu trong bình tam giác chuyển sang màu hồng nhạt và bền màu trong 30 giây. Từ số lần nhỏ NaOH xác định được thể tích NaOH 0,1 N cần dùng. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại.

Bảng 1. Các nghiệm thức theo bố trí của thể thức Box-Behnken, phần mềm Design Expert 7.0

Nghiệm thức	pH	Nồng độ muối (%)	Mật số LAB (tế bào/mL)
1	4,5	3,5	5×10^8
2	6,5	3,5	5×10^8
3	4,5	4,5	5×10^8
4	6,5	4,5	5×10^8
5	4,5	4,0	10^5
6	6,5	4,0	10^5
7	4,5	4,0	10^9
8	6,5	4,0	10^9
9	3,5	3,5	10^5
10	5,5	4,5	10^5
11	5,5	3,5	10^9
12	5,5	4,5	10^9
13	5,5	4,0	5×10^8
14	5,5	4,0	5×10^8
15	5,5	4,0	5×10^8

Công thức tính hàm lượng acid lactic trong 2 mL dịch mẫu: $A = (0,009 \times n \times 1000) / 2$ (g/L).

Trong đó: A: hàm lượng acid trong 2 mL mẫu (g/L); n: số mL NaOH 0,1 N dùng để chuẩn độ; 0,009: hệ số K của acid lactic.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của khối lượng nguyên liệu so với dịch lên men đến quá trình lên men dưa bần bần

Nghiên cứu sự ảnh hưởng của nhân tố khối lượng nguyên liệu so với dung dịch lên men ban đầu ảnh hưởng đến quá trình lên men dưa bần bần. Từ đó chọn ra được giá trị tốt nhất cho quá trình lên men dưa bần bần đạt hiệu quả và chất lượng cao. Thí nghiệm được bố trí giữ nguyên các thông số tối ưu nhất của 3 nhân tố của quá trình lên men dưa bần bần ở thí nghiệm trước. Nhân tố khối lượng nguyên liệu sẽ thay đổi trên cùng một thể tích dung dịch (Bảng 2). Thí nghiệm với 2 lần lặp lại.

Chuẩn bị vi khuẩn giống: Sử dụng dòng *Lactobacillus plantarum* CMT2. Thân non cây bần bần sau khi đã xử lý sơ bộ sẽ được điều chỉnh lần lượt

về nồng độ muối, pH, mật số vi khuẩn với thông số tối ưu nhất của từng nhân tố của quá trình lên men dựa bồn bồn ở thí nghiệm trước. Cho 200 mL dung dịch vào bình lên men, sau đó chủng vi khuẩn với mật số dựa theo các thông số tối ưu từ thí nghiệm trước. Lên men khoảng 7 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau khi quá trình lên men kết thúc, tiến hành phân tích mẫu.

Bảng 2. Khối lượng nguyên liệu so với thể tích dung dịch

Nghiem thức	Khối lượng bồn bồn (g)	Thể tích dung dịch (ml)
1	100	200
2	150	200
3	200	200
4	250	200
5	300	200

Chỉ tiêu theo dõi: pH sau lên men, hàm lượng acid toàn phần, tính theo acid lactic, tham khảo cảm nhận sau khi dùng thử sản phẩm (đánh giá cảm quan).

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến thời gian bảo quản sản phẩm bồn bồn muối chua ở hai mức nhiệt độ 4-6°C và nhiệt độ phòng thí nghiệm

Nghiên cứu sự ảnh hưởng của nhân tố nhiệt độ đến quá trình bảo quản dựa bồn bồn. Từ đó chọn ra được giá trị tối ưu cho quá trình bảo quản dựa bồn bồn đạt hiệu quả và chất lượng cao. Thí nghiệm được bố trí với thông số tối ưu nhất từng nhân tố của quá trình lên men dựa bồn bồn ở thí nghiệm trước sau 5 ngày lên men. Sau đó sẽ bảo quản ở nhiệt độ 4-6°C và nhiệt độ phòng thí nghiệm và theo dõi các chỉ tiêu đến khi sản phẩm không còn sử dụng được. Thí nghiệm với 2 lần lặp lại.

Chuẩn bị vi khuẩn giống: Sử dụng dòng vi khuẩn dòng *Lactobacillus plantarum* CMT2. Thân non cây bồn bồn sau khi đã xử lý sơ bộ sẽ được điều chỉnh lần lượt về nồng độ muối, pH, mật số vi khuẩn, khối lượng với thông số tối ưu nhất của từng nhân tố của quá trình lên men dựa bồn bồn ở thí nghiệm trước, sau đó đem đi thanh trùng UV trong 2 giờ. Cho 100 mL dung dịch vào bình lên men, sau đó chủng vi khuẩn với mật số dựa theo các thông số tối ưu từ thí nghiệm trước. Lên men khoảng 6 ngày ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, kiểm tra các chỉ tiêu rồi tiếp tục

bảo quản sản phẩm ở hai nhiệt độ 4-6°C và nhiệt độ phòng thí nghiệm. Một tuần kiểm tra chỉ tiêu sản phẩm trong quá trình bảo quản một lần đến khi sản phẩm không còn sử dụng được.

Theo dõi tổng số vi khuẩn hiếu khí: Tiến hành pha loãng dịch lên men sau 5 ngày và thực hiện lặp lại 14 ngày/lần. Pha loãng đến nồng độ $10^2 - 10^3$, cho 1 mL mẫu ở từng nồng độ vào đĩa petri chứa môi trường NA, ủ trong điều kiện hiếu khí các đĩa ở 30°C trong 72 giờ và đếm số khuẩn lạc hình thành. Ở mỗi nồng độ 2 lần lặp lại.

* Tính kết quả: Sau khi khuẩn lạc đã mọc, đếm số khuẩn lạc đã mọc trên đĩa và tính kết quả theo công thức.

Gọi N là số tế bào vi sinh vật có trong 1 mL mẫu được tính theo công thức:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

Trong đó: C: Số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri; d: Nồng độ pha loãng mẫu, mà ở đó đĩa petri đầu tiên được chọn để n_1 ; Số đĩa chọn đếm các khuẩn lạc ở nồng độ đầu tiên ($n_1 = 1$ hoặc $n_1 = 2$); n_2 : Số đĩa chọn đếm các khuẩn lạc ở nồng độ kế tiếp ($n_2 = 1$ hoặc $n_2 = 2$).

Chỉ tiêu theo dõi: thời gian bảo quản ở hai mức nhiệt độ, tổng số vi sinh vật hiếu khí, pH sau lên men, hàm lượng acid toàn phần, tính theo acid lactic, tham khảo cảm nhận sau khi dùng thử sản phẩm trong thời gian bảo quản (đánh giá cảm quan).

2.5. Xử lý thống kê

Số liệu được thu thập, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Bố trí thí nghiệm và xác định các thông số tối ưu theo phần mềm Design Expert 7.0. Phần mềm Statgraphics Centurion XV.I được sử dụng để phân tích thống kê và kiểm định LSD các trung bình nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự ảnh hưởng của pH, nồng độ muối và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dựa bồn bồn muối chua

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của pH, nồng độ muối và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men dựa bồn bồn theo bố trí của thể thức Box-Behnken (Design Expert 7.0) được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Giá trị pH và hàm lượng acid lactic (g/L) của quá trình lên men bằng dòng vi khuẩn CMT2 của 15 nghiệm thức

NT	pH - Nồng độ muối (%) - MSVK (tb/mL)	pH TB sau lên men			Lượng acid lactic TB (g/L)		
		2 ngày	4 ngày	6 ngày	2 ngày	4 ngày	6 ngày
1	4,5 – 3,5% - 5x10 ⁸	3,90	3,78	3,50	2,75 ^{bc}	4,55 ^{ef}	4,73 ^{cdef}
2	6,5 – 3,5% - 5x10 ⁸	4,52	3,81	3,52	2,48 ^{cd}	5,48 ^b	5,36 ^b
3	4,5 – 4,5% - 5x10 ⁸	3,98	3,65	3,57	2,43 ^{de}	4,16 ^g	4,28 ^{fg}
4	4,5 – 4,0% - 1x10 ⁹	3,84	3,49	3,36	2,03 ^f	5,00 ^c	5,13 ^{bc}
5	4,5 – 4,0% - 1x10 ⁵	3,80	3,39	3,33	2,12 ^f	4,32 ^{fg}	5,41 ^{efg}
6	6,5 – 4,0% - 1x10 ⁵	4,68	4,01	3,32	2,30 ^{def}	4,55 ^{ef}	4,68 ^{cdef}
7	4,5 – 4,0% - 1x10 ⁹	3,88	3,78	3,39	2,75 ^{bc}	4,73 ^{de}	4,82 ^{bcd}
8	6,5 – 4,0% - 1x10 ⁹	4,43	3,67	3,31	2,79 ^b	4,73 ^{de}	5,09 ^{bcd}
9	5,5 – 3,5% - 1x10 ⁵	4,22	3,58	3,48	2,79 ^b	5,06 ^c	5,13 ^{bc}
10	5,5 – 4,5% - 1x10 ⁵	4,39	4,02	3,60	2,21 ^{def}	3,41 ^h	3,96 ^g
11	5,5 – 3,5% - 1x10 ⁹	4,42	3,57	3,32	2,16 ^{ef}	4,82 ^{cd}	4,91 ^{bcd}
12	5,5 – 4,5% - 1x10 ⁹	4,47	3,64	3,30	2,30 ^{def}	4,32 ^{fg}	4,50 ^{defg}
13	5,5 – 4,0% - 5x10 ⁸	3,68	3,46	3,17	3,29 ^a	5,85 ^a	6,12 ^a
14	5,5 – 4,0% - 5x10 ⁸	3,65	3,46	3,19	3,29 ^a	5,94 ^a	6,08 ^a
15	5,5 – 4,0% - 5x10 ⁸	3,66	3,41	3,19	3,33 ^a	5,99 ^a	6,21 ^a
CV%							9,6

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 2 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có cùng kí tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5 % ($P < 0,05$)

Với kết quả pH và hàm lượng acid lactic tạo ra sau khi lên men của 15 nghiệm thức trong bảng 3 cho thấy trong cùng một mức bố trí pH ban đầu, ở những nghiệm thức có hàm lượng acid lactic cao thì pH còn lại sau lên men thấp hơn so với nghiệm thức có hàm lượng acid lactic thấp. Nồng độ acid của môi trường lên men ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất hoạt động và quá trình lên men của vi khuẩn. Nếu môi trường lên men có nồng độ acid quá cao sẽ ảnh hưởng đến quá trình hoạt động của vi khuẩn, có thể sẽ khiến chúng hoạt động kém dẫn đến sự chuyển hóa của chúng cũng sẽ chậm lại. Đồng thời các vi sinh vật có khả năng hoạt động ở môi trường acid cao sẽ phát triển, ngăn cản tác dụng của vi khuẩn gây chua. Do đó cần tạo môi trường có độ acid thích hợp cho các vi khuẩn lactic hoạt động.

Kết quả cho thấy pH của sản phẩm lên men bốn ở tất cả các nghiệm thức đều thấp hơn so với pH ban đầu. Mức pH sau lên men dao động từ 3,17 (nghiệm thức 12) đến 3,60 (nghiệm thức 10). Hàm lượng acid lactic tổng số sau lên men của các nghiệm thức nằm trong khoảng từ 3,96 g/L đến 6,21 g/L với nghiệm thức 15 (pH 5,5, NaCl 4% và MSVK 5x10⁸ tế bào/mL) cho lượng acid lactic cao nhất 6,21 (g/L)

cao hơn các nghiệm thức 13 và 14 (pH 5,5, NaCl 4% và MSVK 5x10⁸ tế bào/mL) cho lượng acid lactic lần lượt là 6,12 (g/L) và 6,08 (g/L) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Văn Mười và ctv. (2013) [13] với dịch phối chế ban đầu có nồng độ muối là 4%, sau 6 ngày lên men cho sản phẩm có hàm lượng acid cao nhất và chất lượng tốt nhất. Kết quả thực nghiệm về giá trị pH của nghiệm thức 15 (pH 5,5, NaCl 4% và MSVK 5x10⁸ tế bào/mL) sau 6 ngày lên men cho ra giá trị pH 3,19. Kết quả này phù hợp với giá trị pH của nghiên cứu lên men của cải sau 6 ngày [13], khi tất cả các mẫu sau khi kết thúc quá trình lên men đều có giá trị pH dao động trong khoảng 3,1-3,6.

Để xác định giá trị tối ưu nhất về các nhân tố pH ban đầu, nồng độ muối và mật số vi khuẩn để cho lượng acid lactic tối ưu phải xây dựng phương trình hồi quy dựa trên kết quả lượng acid lactic thu được sau 6 ngày lên men dựa bốn bốn của 15 nghiệm thức, được bố trí bằng phần mềm Design Expert 7.0, qua thu thập và phân tích số liệu bằng phần mềm Design Expert 7.0 với độ tin cậy 95%, đưa ra được phương trình hồi quy là:

$$\text{Acid lactic (g/L)} = -49,245 + 18,135 \cdot A + 6,70496 \cdot B + (14458E-009) \cdot C + 0,115 \cdot A \cdot B + 0,00 \cdot A \cdot C + (382538E-010) \cdot B \cdot C - 2,2825 \cdot A^2 - 0,69438 \cdot B^2 = 0,00 \cdot C^2 \quad (1)$$

Trong đó: A là giá trị pH, B là nồng độ muối (%), và C là mật số vi khuẩn (tế bào/mL).

Tuy nhiên, việc lựa chọn điều kiện phù hợp với dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* CMT2 phải căn cứ vào 30 nghiệm thức tối ưu mà phần mềm Design Expert 7.0 đưa ra kết hợp với phương trình hồi quy (1). Tiến hành kiểm tra thực nghiệm đối với 3 trên tổng số 30 nghiệm thức tối ưu được dự đoán bởi phần mềm Design Expert 7.0, kết quả được thể hiện qua bảng 4.

Bảng 4. So sánh hàm lượng acid lactic tổng số theo thuật toán và thực nghiệm của 3 nghiệm thức tối ưu từ phần mềm Design Expert 7.0 (g/L)

NT	[NaCl]- pH-MSVK (tb/mL)	pH sau lên men	Lượng acid lactic thực tế (g/L)	Lượng acid lactic theo thuật toán (g/L)
1	4,08%-4,87-5,1x10 ⁸	3,26	5,71 ^a	6,06
2	3,87%-5,62-5,2x10 ⁸	4,21	4,95 ^b	5,98
3	3,95%-5,26-4,4x10 ⁸	3,97	5,15 ^b	6,11
CV%			8,10%	

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang các kí tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$)

Dựa vào kết quả ở bảng 4, kết quả thực nghiệm 3 nghiệm thức tối ưu cho thấy, ở nghiệm thức 1 (pH 4,87, NaCl 4,08% và MSVK 5,1x10⁸ tế bào/mL) cho lượng acid lactic cao nhất sau lên men là 5,71 (g/L) và pH sau lên men là 3,26, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 2 (pH 5,62, NaCl 3,87% và MSVK 5,2x10⁸ tế bào/mL) cho lượng acid lactic thấp nhất 4,95 (g/L) và nghiệm thức 3 (pH 5,26, NaCl 3,95% và MSVK 4,4x10⁸ tế bào/mL) cho kết quả lượng acid lactic là 5,15 (g/L). Kết quả này thấp hơn kết quả được dự đoán theo mô hình tối ưu tính bằng phần mềm Design Expert 7.0 (thực tế cao nhất thu được là 5,71 g/L) so với kết quả dự đoán cao nhất là 6,11 g/L). Do đó, các thông số của nghiệm thức 1 với pH 4,87, NaCl 4,08% và MSVK 5,1x10⁸ tế bào/mL được chọn là thông số tối ưu cho quá trình lên men dưa bòn bòn.

So sánh với kết quả của Lâm Thị Việt Hà và cs (2006) [12] nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men bắp cải chua cho thấy nồng độ muối thuận lợi là 2,0-2,5%, nguyên liệu bắp cải để nguyên lá cho cảm quan tốt tương ứng ở nhiệt độ lên men là 30°C (6-7 ngày), đối với bắp cải cắt nhỏ nhiệt độ thích hợp là 18°C (9-10 ngày). Hàm lượng acid lactic sinh ra để mùi vị dưa tốt nhất khoảng 10,60-12,70% (tính theo căn bản khô). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Nguyễn Văn Mười và cs (2014) [14] cho thấy tiền xử lý ngó sen tươi trong dung dịch chứa acid ascorbic 0,75% kết hợp với NaCl 0,75% và CaCl₂ 0,5% với thời gian ngâm 30 phút (tỷ lệ ngó sen và dịch

ngâm là 1: 2) giúp ngó sen duy trì tốt độ trắng sáng và đặc tính cấu trúc.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của khối lượng nguyên liệu so với dịch lên men đến quá trình lên men dưa bòn bòn

3.2.1. Thời gian lên men, pH và acid lactic (g/L)

Kết quả sự ảnh hưởng của khối lượng nguyên liệu đến thời gian lên men, pH và acid lactic khi kết thúc quá trình lên men được trình bày ở bảng 5.

Với kết quả pH và hàm lượng acid lactic tạo ra sau khi lên men của 5 nghiệm thức trong bảng 5 cho thấy trong cùng một mức bố trí pH, nồng độ muối, mật số vi sinh vật ban đầu, khối lượng nguyên liệu khác nhau sẽ cho kết quả acid lactic và pH sau lên men khác nhau. Từ bảng 5 kết quả dễ nhận thấy rằng có sự khác biệt về hiệu quả lên men khi có sự khác biệt khối lượng nguyên liệu ban đầu. Ở mẻ lên men với tỉ lệ khối lượng nguyên liệu so với dịch lên men là 1:2 có thời gian kết thúc quá trình lên men ngắn hơn (đạt 4 ngày). Ở mẻ lên men với tỉ lệ khối lượng nguyên liệu so với dịch lên men là 2:1 dài hơn (9 ngày). Tuy nhiên cả hai nghiệm thức này đều cho nồng độ acid thấp so với các nghiệm thức còn lại, nồng độ acid cao nhất là thí nghiệm 3 là 6,21 g/L có tỉ lệ khối lượng nguyên liệu so với dịch lên men là 1:1 với thời gian lên men là 6 ngày. Điều này được giải thích là do với cùng một thể tích dịch với khối lượng nguyên liệu khác nhau thì hoạt động của vi khuẩn lactic khác nhau, tốc độ thẩm thấu của các chất hòa

tan vào nguyên liệu cũng khác nhau, dẫn đến thời gian hoàn thành quá trình lên men, nồng độ acid, mùi vị sẽ khác nhau [15].

Bảng 5. Ảnh hưởng của khối lượng nguyên liệu so với dịch lên men đến quá trình lên men dưa cây bồn bồn

NT	pH-NaCl- MSVK-V _{dung dịch}	Khối lượng mẻ lên men (g)	Thời gian kết thúc (ngày)	pH sau lên men	Lượng acid lactic (g/L)
1	4,87-4,08%-5,1x10 ⁸ -200ml	100	4	3,62	4,91 ^d
2		150	5	3,40	5,58 ^{bc}
3		200	6	3,17	6,12 ^a
4		250	8	3,29	5,76 ^b
5		300	9	3,53	5,36 ^c
CV%					8.22%

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 2 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có cùng kí tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5 % ($P < 0,05$)

3.2.2. Kết quả đánh giá cảm quan

Bảng 6. Kết quả đánh giá cảm quan dưa bồn bồn sau khi thay đổi tỉ lệ khối lượng và dịch lên men

Nghiệm thức	Điểm trung bình các chỉ tiêu				
	Cấu trúc	Màu sắc	Mùi	Vị	Ý thích đối với mẫu thử
NT1	3,90	3,95	3,50	3,30	3,00
NT2	4,10	3,98	3,95	4,32	4,00
NT3	4,55	4,10	4,05	4,52	4,22
NT4	2,95	2,95	3,92	3,41	4,05
NT5	2,50	2,70	3,20	2,95	2,50

Ghi chú: Kết quả là trung bình của 15 lần lặp lại.

Kết quả ở bảng 6 cũng cho thấy, khối lượng mẻ lên men ảnh hưởng đến chất lượng và cảm quan sản phẩm. pH và hàm lượng acid ở các mẻ lên men có khối lượng khác nhau có sự khác biệt nhiều. Ở nghiệm thức 3 có lượng acid lactic cao nhất là 6,12 với thời gian lên men 6 ngày cũng được điểm đánh giá cảm quan rất cao, với tỉ lệ dung dịch: khối lượng nguyên liệu là 1:1 thì dưa bồn bồn cho cấu trúc sản phẩm giòn đều, có màu sắc tươi sáng đặc trưng của sản phẩm, vị chua hài hòa do lượng nguyên liệu và dung dịch bằng nhau nên lượng bồn bồn có thể ngập trong nước dịch và lượng muối ngấm vào bồn bồn cũng cân bằng với lượng acid lactic tạo nên vị chua mặn hài hòa.

Lượng acid lactic cao được tạo ra trong thời gian ngắn nên ức chế được các vi sinh vật có hại phát triển. Với hương thơm đặc trưng của dưa bồn bồn lên men cùng với lượng acid lactic cao thì nghiệm thức này được người dùng ưa thích. Nghiệm thức này phù hợp với kết quả của nghiên cứu của **Nguyễn Văn Mười và cs (2013) [16]**.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến thời gian bảo quản sản phẩm bồn bồn muối chua ở hai mức nhiệt độ 4-6 °C và nhiệt độ phòng thí nghiệm.

3.3.1. Hàm lượng acid lactic, pH và mật số tế bào vi sinh vật hiếu khí trong dịch lên men qua thời gian bảo quản

Bảng 7. Mật số tế bào vi sinh vật hiếu khí (tb/mL) trong dịch lên men theo thời gian bảo quản

Thời gian (ngày)		5	14	28	42	56	70	84	98	112
4-6°C	TPC	3,6x10 ²	5x10 ²	7,3x10 ²	1,3x10 ³	2,6x10 ³	3,6x10 ³	4,8x10 ³	9,8x10 ³	3,7x10 ⁴
	pH	3,45	3,38	3,35	3,35	3,34	3,33	3,33	3,36	3,51
	Acid	5,92	5,95	5,96	5,96	5,96	5,97	5,97	5,96	5,89
Nhiệt độ phòng	TPC	9,5x10 ²	3,9x10 ³	9,9x10 ³	4,0x10 ⁴	-	-	-	-	-
	pH	3,44	3,17	3,31	3,46	-	-	-	-	-
	Acid	5,98	6,11	6,05	5,90	-	-	-	-	-

Kết quả ở bảng 7 cũng cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng đến thời gian, chất lượng và cảm quan sản phẩm trong quá trình bảo quản. Với kết quả pH và hàm lượng acid actic tạo ra sau khi lên men của 2 nghiệm thức trong bảng 7 cho một mức pH, nồng độ muối, mật số vi sinh vật trước khi bảo quản ở 2 nhiệt độ khác nhau là như nhau. Ở nghiệm thức nhiệt độ 4-6°C có số ngày bảo quản là 98 ngày (TPC: $9,8 \times 10^3$; pH: 3,36; acid lactic: 5,96) kể từ ngày lên men, trong suốt quá trình bảo quản nghiệm thức cho lượng acid lactic cao nhất là 5,97 (g/L) từ ngày 70-84. Ở 112 ngày, nhiệt độ 4-6°C mật số vi khuẩn hiếu khí $3,7 \times 10^4$ vượt mức cho phép theo Quyết định 46/2007/QĐ-BYT của Bộ Y tế về việc ban hành Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hoá học trong thực phẩm ($3,7 \times 10^4 > 10^4$), pH 3,51 tăng lên so với những ngày trước và acid lactic giảm còn 5,89. Ở nghiệm thức nhiệt độ phòng có số ngày bảo quản là 30 ngày (TPC: $9,9 \times 10^3$; pH: 3,31; acid lactic 6,05) kể từ ngày lên men, trong suốt quá trình bảo quản nghiệm thức cho lượng acid lactic cao nhất là 6,11 (g/L) ở kết quả đo

ngày 14. Ở ngày thứ 42, trong nhiệt độ phòng mật số vi khuẩn hiếu khí 4×10^4 vượt mức cho phép theo Quyết định 46/2007/QĐ-BYT của Bộ Y tế về việc ban hành Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hoá học trong thực phẩm ($4 \times 10^4 > 10^4$), pH 3,46 tăng lên so với những ngày trước và acid lactic giảm còn 5,90.

Bảo quản sản phẩm đưa bồn bồn lên men ở nhiệt độ 4-6°C có thời gian bảo quản lâu hơn ở nhiệt độ phòng là 70 ngày, lượng acid lactic khi bảo quản lạnh thấp hơn so với nhiệt độ phòng tuy nhiên không đáng kể.

3.3.2. Kết quả đánh giá cảm quan đưa bồn bồn sau thời gian bảo quản ở hai điều kiện

Kết quả ở bảng 8 cũng cho thấy, nhiệt độ bảo quản lên men ảnh hưởng đến thời gian, chất lượng và cảm quan sản phẩm. Màu sắc, mùi, vị, cấu trúc của sản phẩm sau 5 ngày lên men khác biệt không nhiều do cùng nhiệt độ, pH, MSVK, khối lượng.

Bảng 8. Kết quả đánh giá cảm quan đưa bồn bồn sau thời gian bảo quản

Ngày	Nhiệt độ phòng				4-6°C			
	Chỉ tiêu đánh giá							
	Màu sắc	Mùi	Vị	Cấu trúc	Màu sắc	Mùi	Vị	Cấu trúc
5	4,10	4,05	4,40	4,50	4,05	4,00	4,45	4,50
14	4,10	4,15	4,35	4,20	4,05	4,15	4,45	4,50
28	3,90	3,95	4,05	3,90	4,05	4,15	4,45	4,50
42	3,85	3,5	2,00	3,40	4,05	4,15	4,45	4,50
56	-	-	-	-	4,05	4,10	4,45	4,50
70	-	-	-	-	4,05	4,10	4,30	4,40
84	-	-	-	-	4,05	4,05	4,15	4,30
98	-	-	-	-	4,00	3,95	3,55	4,00
112	-	-	-	-	3,90	3,60	2,5	3,75

Ghi chú: Kết quả là trung bình của 5 lần lặp lại.

Màu sắc ở 2 nhiệt độ bảo quản khác biệt không nhiều, bởi với khối lượng nguyên liệu ngập trong dung dịch thì màu sắc ít biến đổi bởi sự oxy hóa, cấu trúc nguyên liệu ở nghiệm thức 4-6°C giòn hơn so với nghiệm thức nhiệt độ phòng. Ở hai nghiệm thức không có sự khác biệt lớn về cảm quan mà chỉ khác biệt về thời gian bảo quản, khi bảo quản kết thúc là lúc tổng số vi sinh vật hiếu khí $> 10^4$, vượt ngưỡng cho phép của Bộ Y tế, đồng thời sản phẩm có vị hơi đắng, màu sắc ngả vàng sậm hơn so với lúc ban đầu, nên chọn thời gian bảo quản 84 ngày để đảm bảo cảm

quan tốt nhất cho sản phẩm. Xác định được sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình bảo quản sản phẩm đưa bồn bồn muối chua, có thể kết luận biện pháp bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ 4-6°C cho chất lượng tốt hơn ở nhiệt độ phòng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu xác định được nghiệm thức tối ưu cho quá trình lên men đưa bồn bồn là pH 4,87, nồng độ muối 4,08%, mật số vi khuẩn $5,1 \times 10^8$ tế bào/mL với hàm lượng acid lactic đạt 5,71 g/L sau 6 ngày lên men sử dụng dòng *Lactobacillus plantarum* CMT2 và

phần mềm Design Expert 7.0 với mô hình Box-Behnken. Tỷ lệ giữa khối lượng nguyên liệu và dịch lên men là 1:1 (200 g/200 mL) được với lượng acid lactic cao nhất đạt 6,12 g/L, pH 3,17, cảm quan dưa giòn giòn cho cấu trúc sản phẩm giòn đều, có màu sắc tươi sáng, vị chua mặn hài hòa. Xác định được thời gian bảo quản sản phẩm giòn giòn muối chua tối đa ở nhiệt độ phòng (khoảng 30°C) là 28 ngày kể từ ngày lên men, tăng lên 84 ngày khi bảo quản ở 4-6°C với các số liệu tương ứng ở hai nhiệt độ lần lượt là tổng số vi sinh vật hiếu khí (TPC): $9,8 \times 10^3$, pH: 3,36, acid lactic 5,96 g/L, và TPC $4,8 \times 10^3$, pH 3,33, acid lactic 5,97 g/L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Behera S. S., El Sheikha, A. F., Hammami, R. And Kumar, A., 2020. Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits? *Journal of Functional Foods*, 21 pages.
2. Mazzoli, R., F., Bosco, I. Mizrahi & Bayer, E. A., 2014. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*. 32(7): 1216-1236.
3. El Sheikha, A. F., 2018. Molecular techniques and lactic acid-fermented fruits and vegetables: Why and how? In A. F. El Sheikha, R. E. Levin, & J. Xu (Eds.). *Molecular Techniques in Food Biology: Safety, Biotechnology, Authenticity & Traceability* (1st ed.). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 285-308.
4. Kandasamy, S., D. Kavitha & Shetty, P. H., 2018. Lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for fermented foods and their role in commercialization of fermented foods. In S. Panda, & P. Shetty (Eds.). *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries*. Cham, Switzerland: Springer, 25-52.
5. Behera, S. S., R. C. Ray & Zdolet, N., 2018. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>.
6. El Sheikha, A. F., & Hu, D. M., 2020. Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60: 11-32.
7. Mukisa, I. M., Y. B. Byaruhanga, C. M. B. K. Muyanja, T. Langsrud & Narvhus, J. A., 2017. Production of organic flavor compounds by dominant lactic acid bacteria and yeasts from Obushera, a traditional sorghum malt fermented beverage. *Food Science & Nutrition*. 5: 702-712.
8. Harutoshi, T., 2013. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. In M. Kongo (Ed.). *Lactic Acid Bacteria*. London, UK: IntechOpen, 515-538.
9. Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 15: 67-78.
10. Suzuki, C., M. Kobayashi & Kimoto-Nira, H., 2013. Novel exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and the diversity of *epsE* genes in the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 77: 2013-2018.
11. Irkin, R & Songun, G. E., 2012. Applications of probiotic bacteria to the vegetable pickle products. *Scientific Reviews & Chemical Communications*. 2: 562-567.
12. Lâm Thị Việt Hà & Nguyễn Văn Mười, 2006. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men bắp cải muối chua. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 5:123-130.
13. Nguyễn Văn Mười, Vương Tố Trinh & Trần Thanh Trúc, 2013. Xác định chế độ tiền xử lý nhiệt nguyên liệu và nồng độ muối ban đầu của dịch lên men đến chất lượng dưa cải. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*. 29: 25-31.
14. Nguyễn Văn Mười, Huỳnh Ngọc Tâm và Trần Thanh Trúc, 2014. Ảnh hưởng của tiền xử lý và phương thức bảo quản đến sự ổn định màu sắc và đặc tính cấu trúc của ngó sen sau thu hoạch. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp*. 1: 116-123.
15. Battcock, M. và Azam-Ali, S., 2001. *Fermented Fruits and Vegetables: A Global Perspective*. Daya Publishing House, 96 pages.
16. Nguyễn Văn Mười, Nguyễn Ngọc Huỳnh Trân và Trần Thanh Trúc, 2013. Ảnh hưởng của kích cỡ nguyên liệu và khối lượng mẻ đến quá trình lên

men lactic dưa leo. Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Công nghệ Sinh học. 28: 44-51.
học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và

**DETERMINATION OF THE OPTIMAL PARAMETERS OF THE FERMENTATION PROCESS AND
STORAGE TIME OF *Typha orientalis***

Huỳnh Ngọc Thanh Tam, Lê Thị Kim Dung

Summary

The study was conducted to find the optimal parameters for fermentation and to determine the storage time of the fermentation of *Typha orientalis*. Using the *Lactobacillus plantarum* CMT2 strain registered on GenBank with code MN841920, through Design Expert 7.0 software with Box-Behnken format, the optimal treatment for fermentation was determined was pH 4.87, salt concentration 4.08%, 5.1×10^8 cells/mL of bacteria cell density with lactic acid content reaching 5.71 g/L after 6 days of fermentation at room temperature. The ratio of the weight of the fermentation material and the fermentation solution is 1:1 (200 g/200 mL) for the highest fermentation efficiency with lactic acid content of 6.12 g/L, pH 3.17. The structure of fermented product is crunchy, has bright colors, and has a harmonious salty and sour taste. The maximum storage time of product at room temperature (about 30°C) is 28 days from the date of fermentation, increased to 84 days when stored at 4-6°C with corresponding respectively of two temperatures was total aerobic microorganisms (TPC) 9.8×10^3 , pH 3.36, lactic acid 5.96 g/L, and TPC 4.8×10^3 , pH 3.33, lactic acid 5.97 g/L.

Keywords: Fermentation, *Lactobacillus plantarum*, storage time, *Typha orientalis*.

Người phản biện: TS. Trần Thị Mai

Ngày nhận bài: 17/8/2020

Ngày thông qua phản biện: 18/9/2020

Ngày duyệt đăng: 25/9/2020