

TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SỮA CHUA ỔI LÊ TỪ DÒNG VI KHUẨN AXIT LACTIC ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ TRÁI ỔI LÊ (*Psidium guajava* L.) TẠI TỈNH ĐỒNG THÁP

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm^{1,*}, Huỳnh Yến Nhi¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập các dòng vi khuẩn axit lactic và khảo sát các điều kiện tối ưu để ứng dụng trong lên men sữa chua có bổ sung dịch trái ổi lê. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 17 dòng vi khuẩn axit lactic, các dòng vi khuẩn đều có màu trắng đục, dạng lồi, bìa nguyên, có khả năng phân giải CaCO_3 , đều là vi khuẩn Gram dương, hình que hoặc oval, không di động, không có khả năng sinh indole, âm tính với thử nghiệm catalase và oxidase. Nghiên cứu đã tuyển chọn được dòng vi khuẩn ĐTa2 có khả năng sinh axit lactic cao và kháng vi khuẩn *Escherichia coli* với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 12,33 mm. Khi ứng dụng dòng vi khuẩn ĐTa2 vào lên men sữa chua có bổ sung 8% dịch trái ổi lê, tỷ lệ sữa tươi và sữa đặc là 2, mật số vi khuẩn ở mức 7 logCFU/mL trong điều kiện pH 6,0, nhiệt độ lên men và thời gian lên men là 30°C trong 16 giờ cho giá trị cảm quan cao nhất đạt 14,17/15 điểm theo TCVN 7030:2002. Dòng vi khuẩn ĐTa2 được định danh là dòng vi khuẩn *Lactococcus lactis* với độ tương đồng đạt 99% khi so sánh trên ngân hàng gene NCBI.

Từ khóa: Kháng khuẩn, phân lập, sữa chua, trái ổi lê, vi khuẩn axit lactic.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các sản phẩm lên men từ sữa được biết đến rộng rãi và là sự quan tâm của cả thế giới bởi giá trị dinh dưỡng của nó, việc sử dụng men vi sinh như một phương pháp tiềm năng để phòng ngừa nhiều bệnh đường tiêu hóa, cũng như mang lại lợi ích sức khỏe cho con người bằng cách tăng cường miễn dịch [1].

Sữa chua là một sản phẩm sữa lên men phổ biến được sản xuất bởi vi khuẩn axit lactic (LAB) bao gồm: *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*... Theo cơ sở dữ liệu của Euromonitor, sản lượng sữa chua năm 2015 đạt 27,7 triệu tấn, tăng gấp 1,2 lần so với sản lượng năm 2010 [2]. Trong quá trình sản xuất sữa chua, những vi khuẩn này sẽ tạo ra axit lactic làm giảm độ pH và khiến protein trong sữa đông tụ lại. Trong quá trình lên men, những vi khuẩn này sẽ thực hiện 3 giai đoạn chuyển hóa chính các thành phần sữa: (1) chuyển hóa carbohydrate

thành axit lactic hoặc các chất chuyển hóa khác (glycolysis), (2) thủy phân casein thành peptide và axit amin tự do (phân giải protein) và cuối cùng (3) phân hủy chất béo trong sữa thành axit béo tự do (lipolysis) [3].

Việc đa dạng hóa các sản phẩm sữa chua đang ngày càng được quan tâm bởi các nhà nghiên cứu cũng như thị hiếu của khách hàng về sản phẩm sữa chua. Những nghiên cứu gần đây đã và đang có xu hướng bổ sung các dịch trái cây tự nhiên vào sản phẩm sữa chua truyền thống để nâng cao chất lượng cũng như tăng hương vị của sản phẩm so với sữa chua truyền thống. Trái ổi lê hiện tại ở đồng bằng sông Cửu Long đang giảm giá trầm trọng, cuối năm 2022 đầu năm 2023, giá ổi giảm do nguồn cung tăng vì thời gian qua, nông dân chạy theo xu hướng tăng diện tích đất trồng dẫn đến lượng ổi tươi bán ra thị trường quá nhiều trong khi ổi chủ yếu chỉ được tiêu thụ dưới dạng tươi. Điều này đã ảnh hưởng rất nhiều đến thu nhập của nông dân. Do đó, việc phân lập các dòng vi khuẩn LAB và định hướng ứng dụng các dòng vi khuẩn này trong lên men sữa chua bổ sung dịch ổi lê không chỉ góp phần đa dạng hóa sản phẩm sữa

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: hnttam@ctu.edu.vn

chưa mà còn khắc phục được tình trạng dư thừa lượng ổi tươi trên thị trường hiện nay.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Mẫu ổi lê được thu tại huyện Lai Vung và thành phố Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp.

Hóa chất sử dụng: Hóa chất nhuộm Gram, thuốc thử catalase H_2O_2 3%, thuốc thử oxidase, NaOH,...

Môi trường MRS gồm: Yeast extract 0,4%, beef extract 0,8%, peptone 1%, D-glucose 2%, K_2HPO_4 0,2%, $MgSO_4$ 0,02%, $MnSO_4$ 0,004%, Tween 80 0,1%, $C_2H_3NaO_2$ 0,5%.

Sữa tươi Vinamilk, sữa đặc Ngôi sao Phương Nam và đường cát trắng Biên Hòa được mua tại siêu thị Bách hóa xanh, thành phố Cần Thơ.

Vi sinh vật thử nghiệm *Escherichia coli* (*E. coli*) được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Vi sinh vật thực phẩm, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các dòng vi khuẩn lactic từ trái ổi lê (*Psidium guajava* L.)

Ổi lê sau khi thu về được khử trùng bề mặt bằng cồn 70° trong 1 phút, sau đó khử khuẩn với H_2O_2 3% trong 1 phút và rửa lại bằng nước cất đã khử trùng từ 4 - 5 lần, sau đó gọt vỏ và cắt nhỏ để tiến hành nuôi cấy sinh trong môi trường MRS lỏng, ủ lactic ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Trải đều 100 μ L dịch sau tăng sinh trên môi trường MRS agar có bổ sung $CaCO_3$, các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 48 giờ ủ, cấy chuyển nhiều lần các dòng vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc đặc trưng như: Không màu hoặc trắng đục, bờ láng hoặc lở, bìa nguyên hoặc chia thùy, có khả năng phân giải $CaCO_3$. Các dòng vi khuẩn lactic dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100X sẽ bắt màu Gram dương, hình que hoặc hình cầu, không di động. Các dòng vi khuẩn lactic không có khả năng sinh indole, âm tính với thử nghiệm catalase và oxidase.

2.2.2. Tuyển chọn các dòng vi khuẩn lactic có khả năng lên men axit lactic cao từ các dòng phân lập

Các dòng vi khuẩn LAB được nuôi trong 10 mL môi trường MRS lỏng ở 37°C, trong 48 giờ. Sau đó, tiến hành chủng 10% huyền phù vi khuẩn LAB

vào môi trường sữa tươi vô trùng có bổ sung 4% sucrose, giữ yên và ủ ở 37°C. Phân tích hàm lượng axit tổng sinh ra sau 24, 48 và 72 giờ bằng phương pháp chuẩn độ axit. Tiến hành chuẩn độ axit bằng cách nhỏ 1 - 2 giọt phenolphthalein vào bình tam giác chứa 2 mL huyền phù vi khuẩn trong môi trường sữa tươi. Sau đó, thêm vào 20 μ L NaOH 0,1 N đã chuẩn bị, đếm số lần cho vào đến khi mẫu trong ống nghiệm chuyển sang màu hồng bền màu. Từ số lần nhỏ NaOH xác định được thể tích NaOH 0,1 N cần dùng.

Công thức tính hàm lượng axit lactic trong dịch mẫu:

$$A = (0,009 \times n \times 1000) / 2 \text{ (g/L)}$$

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

Dòng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic cao sẽ được tuyển chọn để khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *Escherichia coli* ở thí nghiệm tiếp theo.

2.2.3. Tuyển chọn các dòng vi khuẩn lactic có khả năng kháng *Escherichia coli* cao bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch

Dòng vi khuẩn chỉ thị được nuôi trong môi trường NB ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ (mật số 10^6 tế bào/mL) [4], tiến hành trải đều 50 μ L huyền phù vi khuẩn chỉ thị trên môi trường NA đã khử trùng. Năm giếng được tạo thành bằng phương pháp đục lỗ, với đường kính mỗi giếng là 4 mm. Các dòng vi khuẩn LAB được nuôi ở 37°C, trong 48 giờ trong môi trường MRS lỏng. Sau đó, sẽ tiến hành pha loãng và điều chỉnh mật số vi khuẩn về 10^8 tế bào/mL. Nhỏ 50 μ L huyền phù vi khuẩn LAB đã điều chỉnh mật số lần lượt vào ba giếng, tương tự 50 μ L nước cất (đối chứng âm) và 50 μ L kháng sinh ampicillin (0,1 mg/mL) được nhỏ vào hai giếng còn lại. Đường kính vòng kháng khuẩn (ĐKVKK) được tính bằng công thức: ĐKVKK (mm) = $D_1 - D_0$.

Trong đó: D_1 là đường kính tổng (mm), D_0 là đường kính giếng thạch (4 mm).

Mức độ kháng khuẩn của các dòng LAB được xác định theo quy ước của Leska và cs (2020) [5]: Không có tính kháng khuẩn: Kháng khuẩn yếu: 1 mm < ĐKVKK < 6 mm; kháng khuẩn trung bình: 6 mm $\leq$ ĐKVKK < 11 mm; kháng khuẩn mạnh: 11 mm $\leq$ ĐKVKK $\leq$ 16 mm; kháng khuẩn rất mạnh: ĐKVKK $\geq$ 16.

2.2.4. Định danh các dòng vi khuẩn lactic bằng phương pháp giải trình tự kết hợp với đặc điểm về hình thái và sinh hóa

Dựa vào hình dạng, sinh hóa của dòng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic và kháng khuẩn cao được chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi:

1492R (5'-TACGGTTACCTTGGTACGACT-3') và

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3').

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dịch ổi lê, tỷ lệ sữa và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua

Tiến hành lên men sữa chua bổ sung ổi lê với tỷ lệ dịch ổi lê bổ sung là 2%, 5% và 8%; tỷ lệ sữa tươi không đường và sữa đặc là 1%, 2% và 4% và mật số vi khuẩn LAB bố trí là 3, 5 và 7 log tế bào/mL. Sản phẩm sữa chua thành phẩm sau khi ủ 16 giờ sẽ được ghi nhận về giá trị pH, hàm lượng chất rắn hòa tan (°Brix), hàm lượng axit lactic sinh ra (g/L) và đánh giá cảm quan theo TCVN 7030:2002 [6]. Nghiệm thức tối ưu sẽ được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.6. Khảo sát sự ảnh hưởng độ pH đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua

Sau khi tuyển chọn được nghiệm thức tối ưu từ thí nghiệm tại mục 2.2.5 sẽ tiến hành khảo sát giá trị pH thích hợp cho quá trình lên men sữa chua ổi lê. Giá trị pH sẽ được bố trí tại pH 6; 6,5; 7. Sản phẩm sữa chua thành phẩm sẽ được ghi nhận về giá trị pH, hàm lượng chất rắn hòa tan (°Brix), hàm lượng axit lactic sinh ra (g/L), mật số vi khuẩn (logCFU/mL) và đánh giá cảm quan theo TCVN 7030:2002 [6].

2.6.7. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua

Sau khi tuyển chọn được nghiệm thức tối ưu từ thí nghiệm tại mục 2.2.5 và 2.2.6 sẽ tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (25, 30 và 35°C) và thời gian đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua có bổ sung dịch ổi lê. Sữa chua thành phẩm sẽ được đánh giá về giá trị pH, hàm lượng chất rắn hòa tan (°Brix), hàm lượng axit lactic sinh ra (g/L), mật số vi khuẩn (logCFU/mL) và đánh giá cảm quan theo TCVN 7030:2002 [6] sau 14, 16, 18 và 20 giờ.

2.2.8. So sánh chất lượng sữa chua bổ sung dịch ổi lê bởi dòng vi khuẩn phân lập và dòng vi khuẩn thương mại

Từ các thí nghiệm trên sẽ chọn ra được các giá trị tối ưu để lên men sữa chua bổ sung dịch ổi lê. Phân lập dòng vi khuẩn lactic từ sản phẩm sữa chua trên thị trường sau đó tiến hành so sánh khả năng lên men sữa chua với dòng vi khuẩn lactic đã phân lập trong nghiên cứu. Sản phẩm sữa chua bổ sung dịch ổi lê thành phẩm sẽ được đánh giá về giá trị pH, hàm lượng chất rắn hòa tan (°Brix), hàm lượng axit lactic sinh ra (g/L), mật số vi khuẩn (logCFU/mL) và đánh giá cảm quan theo TCVN 7030:2002 [6].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các dòng vi khuẩn lactic từ trái sori (*Malpighia glabra* L.)

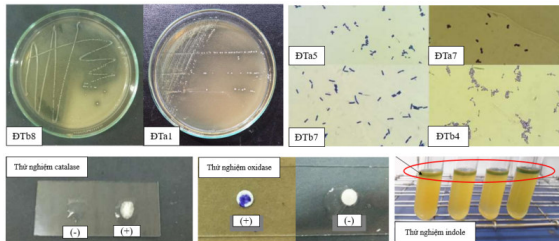
17 dòng vi khuẩn thuần đã được phân lập trên môi trường MRS agar từ trái ổi lê ở tại tỉnh Đồng Tháp. Dựa vào tên mẫu và địa điểm thu mẫu, ký hiệu các dòng vi khuẩn được phân lập được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn axit lactic từ trái ổi lê

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm hình thái						Thử nghiệm sinh hóa	
		Màu sắc	Hình dạng		Độ nổi	Bia	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Gram	Oxidase/Catalase/Indole
			Khuẩn lạc	Tế bào					
1	ĐTa1	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,0	+	-/-/-
2	ĐTa2	Trắng đục	Tròn đều	Oval	Mô	Nguyên	1,1	+	-/-/-
3	ĐTa3	Trắng đục	Tròn đều	Cầu	Mô	Nguyên	1,5	+	-/-/-
4	ĐTa4	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,2	+	-/-/-
5	ĐTa5	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,2	+	-/-/-

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm hình thái						Thử nghiệm sinh hóa	
		Màu sắc	Hình dạng		Độ nổi	Bìa	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Gram	Oxidase/Catalase/Indole
			Khuẩn lạc	Tế bào					
6	ĐTa6	Trắng đục	Tròn đều	Cầu	Mô	Nguyên	2,0	+	-/-/-
7	ĐTa7	Trắng đục	Tròn đều	Oval	Mô	Nguyên	1,0	+	-/-/-
8	ĐTb1	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,5	+	-/-/-
9	ĐTb2	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,0	+	-/-/-
10	ĐTb3	Trắng đục	Tròn đều	Oval	Mô	Nguyên	1,5	+	-/-/-
11	ĐTb4	Trắng đục	Tròn đều	Oval	Mô	Nguyên	1,5	+	-/-/-
12	ĐTb5	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,1	+	-/-/-
13	ĐTb6	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,0	+	-/-/-
14	ĐTb7	Trắng đục	Tròn đều	Que dài	Mô	Nguyên	1,0	+	-/-/-
15	ĐTb8	Trắng đục	Tròn đều	Cầu	Mô	Nguyên	1,5	+	-/-/-
16	ĐTb9	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	2,0	+	-/-/-
17	ĐTb10	Trắng đục	Tròn đều	Que ngắn	Mô	Nguyên	1,2	+	-/-/-

Ghi chú: (+): Dương tính; (-): Âm tính. Số thứ tự từ 1 - 7 là mẫu được thu tại huyện Lai Vung, số thứ tự từ 8 - 17 là mẫu được thu tại thành phố Cao Lãnh.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc, tế bào và thử nghiệm sinh hóa của các dòng LAB

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính

Qua kết quả phân lập cho thấy, các dòng vi khuẩn được phân lập từ trái ổi lê trên môi trường đặc hiệu MRS có đặc điểm hình thái, sinh hóa tương tự với nhóm vi khuẩn axit lactic đã được mô

tả tại mục 2.2.1. Do đó bộ sưu tập vi khuẩn lactic tại thí nghiệm này được tiến hành cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Tuyển chọn các dòng LAB có khả năng lên men axit lactic cao

Nhìn chung, tất cả các dòng LAB phân lập được từ trái ổi lê đều có khả năng sinh axit lactic cao trong môi trường sữa nuôi cấy sau 24, 48 và 72 giờ trong điều kiện 37°C tại các nghiệm thức bổ sung 4% sucrose (hàm lượng axit lactic dao động từ 3,45 - 12,27 g/L) và không bổ sung sucrose (hàm lượng axit lactic dao động từ 2,31 - 8,70 g/L) (Bảng 2).

Bảng 2. Hàm lượng axit tổng (g/L) sinh ra theo thời gian và nồng độ sucrose bổ sung của 17 dòng LAB ở 37°C

STT	Dòng vi khuẩn	Bổ sung 0% sucrose			Bổ sung 4% sucrose		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
1	ĐTa1	4,14 ^{ab}	4,38 ^{gh}	7,02 ^{de}	4,26 ^{defg}	6,30 ^{bcde}	8,79 ^{cdef}
2	ĐTa2	4,05 ^{abc}	5,19 ^{abc}	8,70 ^a	4,41 ^{cdef}	5,61 ^{defg}	12,27 ^a
3	ĐTa3	3,00 ^{de}	3,84 ^{jk}	5,22 ⁱ	4,44 ^{cde}	5,79 ^{cdefg}	8,94 ^{bcde}
4	ĐTa4	2,91 ^{de}	4,17 ^{hij}	6,15 ^{gh}	4,14 ^b	5,61 ^{efg}	7,77 ^{defg}
5	ĐTa5	3,06 ^{de}	4,71 ^{def}	5,97 ^{gh}	4,50 ^{efgh}	5,67 ^{defg}	8,46 ^{cdefg}
6	ĐTa6	3,66 ^c	4,23 ^{hi}	6,84 ^{de}	4,08 ^{fghi}	4,95 ^{gh}	7,65 ^{efg}
7	ĐTa7	3,18 ^d	4,65 ^{efg}	5,40 ⁱ	3,54 ^k	4,50 ^h	7,14 ^g
8	ĐTb1	2,91 ^{de}	5,04 ^{bcd}	8,16 ^{bc}	3,78 ^{ijk}	6,06 ^{bcdef}	8,40 ^{cdefg}
9	ĐTb2	2,76 ^{ef}	3,93 ^{ijk}	6,39 ^{fg}	5,58 ^a	7,59 ^a	9,39 ^{bc}

STT	Dòng vi khuẩn	Bổ sung 0% sucrose			Bổ sung 4% sucrose		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
10	ĐTb3	3,15 ^{de}	5,28 ^{ab}	7,26 ^d	4,41 ^{cdef}	6,24 ^{bcde}	8,31 ^{cdefg}
11	ĐTb4	2,31 ^g	4,41 ^{fgh}	6,66 ^{ef}	4,50 ^{cd}	6,69 ^{abc}	8,46 ^{cdefg}
12	ĐTb5	3,66 ^c	5,34 ^{ab}	8,37 ^{ab}	4,71 ^{bc}	6,66 ^{bc}	8,37 ^{cdefg}
13	ĐTb6	3,87 ^{abc}	5,22 ^{abc}	8,67 ^{de}	3,75 ^{ijk}	6,42 ^{bcd}	10,44 ^b
14	ĐTb7	3,09 ^{de}	3,78 ^k	6,90 ^{de}	3,63 ^{jk}	5,31 ^{fgh}	7,29 ^{fg}
15	ĐTb8	3,66 ^c	4,35 ^{gh}	6,36 ^{fg}	5,34 ^a	6,48 ^{bcd}	8,76 ^{cdef}
16	ĐTb9	2,40 ^{fg}	3,06 ^l	3,75 ^j	3,96 ^{ghij}	6,51 ^{bcd}	9,30 ^{bcd}
17	ĐTb10	4,17 ^a	5,40 ^a	7,83 ^c	5,52 ^a	6,78 ^{ab}	9,48 ^{bc}

Ghi chú: Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Tất cả các dòng LAB phân lập được đều cho hàm lượng axit tổng tăng dần từ 24 - 72 giờ ở cả 2 nghiệm thức không bổ sung sucrose và bổ sung 4% sucrose. Đối với thí nghiệm không bổ sung sucrose thì dòng vi khuẩn ĐTa1, ĐTa2, ĐTb6 và ĐTb10 cho hàm lượng axit tổng cao nhất sau 24 giờ lên men; đến thời điểm 48 giờ lên men thì các dòng ĐTa2, ĐTb3, ĐTb5, ĐTb6, ĐTb10 cho hàm lượng axit tổng cao nhất; đến thời điểm sau 72 giờ lên men thì chỉ còn hai dòng ĐTa2 và ĐTb5 đạt hàm lượng cao nhất. Đối với các nghiệm thức bổ sung 4% sucrose thì các dòng vi khuẩn cho hàm lượng axit tổng cao nhất là ĐTb2, ĐTb8 và ĐTb10 (tại thời điểm 24 giờ); ĐTb2, ĐTb4 và ĐTb10 (tại thời điểm 48 giờ) và ĐTa2 (tại thời điểm 72 giờ). Hàm lượng axit tăng theo thời gian do sau 24 giờ số lượng vi khuẩn tăng sinh chưa đủ nên hàm lượng axit tổng sinh ra ít, sau 48 và 72 giờ số lượng vi khuẩn tăng lên nhiều hơn, do đó lượng axit sinh ra cao hơn. Yếu tố thời gian nuôi cấy sẽ có ảnh hưởng đến việc tăng số lượng tế bào vi khuẩn, để chuyển hóa hết nguồn dinh dưỡng thành axit tổng vi khuẩn cần phải có thời gian nhất định và đủ lượng vi khuẩn. Bên cạnh đó, hàm lượng axit lactic sinh ra tại nghiệm thức có bổ sung 4% sucrose đều cho kết quả cao hơn nghiệm thức không bổ sung sucrose tại cả ba thời điểm khảo sát. Nguyên nhân có thể là do vi khuẩn vừa sử dụng đường lactose có trong sữa và đường sucrose bổ sung để chuyển hóa thành axit tổng, do đó hàm lượng axit tổng tại các nghiệm thức bổ sung đường sucrose cao hơn nghiệm thức không bổ sung đường. Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy, các chủng vi khuẩn ĐTa1, ĐTa2, ĐTb3, ĐTb5, ĐTb6 và ĐTb10 là 6

chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic cao nhất từ thời điểm 24 giờ hoặc 48 giờ (tại nghiệm thức không bổ sung sucrose). Bên cạnh đó, tại thời điểm này nghiệm thức bổ sung 4% sucrose cho thấy, ba chủng vi khuẩn ĐTb2, ĐTb4 và ĐTb8 cho khả năng sinh axit lactic cao nhất. Do đó, 9/17 dòng LAB phân lập sẽ được chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Tuyển chọn dòng vi khuẩn lactic có khả năng kháng khuẩn

Bảng 3. Khả năng kháng vi khuẩn *Echerichia coli* từ các dòng LAB phân lập

STT	Các dòng LAB	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Khả năng ức chế
1	ĐTa2	12,33 ^b ± 0,58	+++
2	ĐTb2	8,00 ^{bc} ± 0,58	++
3	ĐTb4	5,00 ^c ± 1,00	+
4	ĐTb5	7,00 ^c ± 1,16	++
5	ĐTb9	5,00 ^c ± 0,58	+
6	ĐTb10	4,33 ^c ± 0,58	+
7	Đối chứng dương	27,26 ^a ± 0,58	++++
8	Đối chứng âm	0	-

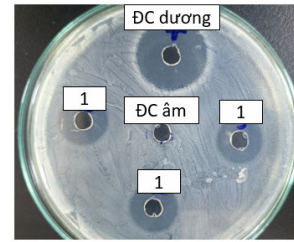
Ghi chú: Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey. (+): Kháng khuẩn yếu; (++) : Kháng khuẩn trung bình; (+++): Kháng khuẩn mạnh; (++++): Kháng khuẩn rất mạnh.

Từ kết quả khảo sát hàm lượng axit tổng đã tuyển chọn được 9 dòng LAB (ĐTa1, ĐTa2, ĐTb2, ĐTb3, ĐTb4, ĐTb5, ĐTb6, ĐTb8 và ĐTb10) để tiến hành khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* bằng phương pháp khuếch tán trên giếng

thạch. Kết quả kháng khuẩn cho thấy, có 6/9 dòng LAB tuyển chọn có khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 4,33 - 12,33 mm (Bảng 3).

Kết quả trên cho thấy, dòng ĐTa2 có khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli* mạnh nhất với đường kính vòng vô khuẩn 12,33 mm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với dòng ĐTb2 (8 mm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại (Hình 2). Kết quả này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Goa T. và cs (2022) [7] khi khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli* bởi các dòng LAB, đường kính vòng phân giải chỉ đạt 12,00 mm. Ngoài khả năng tạo axit lactic làm cho môi trường có pH thấp ức chế vi khuẩn gây bệnh mà các dòng LAB còn có khả năng sản sinh bacteriocin, reuterin, CO₂, H₂O₂ và diacetyl [8]. Theo nghiên cứu của Anjana và Tiwari S. K. (2022) [9] thì các bacteriocin được tạo ra từ vi khuẩn LAB là các peptide kháng khuẩn có tác dụng ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh trong ruột, hơn nữa bacteriocin có bản chất là protein và được tổng hợp ở ribosome, bị phân hủy bởi các enzyme phân

giải protein, do đó mầm bệnh không thể phát triển tính kháng thuốc trong ruột [10], [11].



Hình 2. Khả năng kháng vi khuẩn *E. coli* bởi dòng vi khuẩn ĐTa2

3.4. Kết quả định danh dòng LAB bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA

Từ kết quả khảo sát khả năng sinh axit lactic cũng như khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh đường ruột *E. coli* thì dòng vi khuẩn ĐTa2 là dòng được tuyển chọn để tiến hành khuếch đại trình tự gen 16S rRNA, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% cho thấy, band ADN của dòng ĐTa2 có chiều dài khoảng 1.400 bp (Hình 3a). Kết quả giải trình tự được BLAST trên Ngân hàng gen NCBI đã định danh được dòng ĐTa2 là dòng vi khuẩn *Lactococcus lactis* với độ tương đồng 99% (Hình 3b).



Hình 3. Kết quả định danh dòng vi khuẩn ĐTa2

3.5. Ảnh hưởng tỷ lệ dịch ổi lè, tỷ lệ sữa và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua

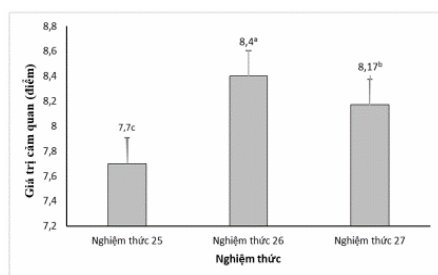
Nhìn chung, hàm lượng axit lactic sinh ra bởi các dòng LAB bị ảnh hưởng rất nhiều bởi mật số vi khuẩn, tỷ lệ dịch ổi và tỷ lệ sữa. Sau 16 giờ lên men tại nghiệm thức 26 cho hàm lượng axit lactic cao nhất đạt 9 g/L, hàm lượng axit lactic tại nghiệm

thức này khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 25 và 27 với hàm lượng lactic đạt lần lượt là 8,4 g/L và 8,85 g/L. Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy, mật số vi khuẩn càng cao thì hàm lượng axit lactic sinh ra càng lớn dẫn đến giá trị pH sẽ càng giảm và có xu hướng axit hóa (Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của tỷ lệ dịch ổi lê, tỷ lệ sữa và mật số vi khuẩn đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua

Nghiệm thức	Mật số giống dòng (log CFU/mL)	Tỷ lệ ổi (%)	Tỷ lệ sữa tươi: sữa đặc	pH sau	°Brix đầu	°Brix sau	Axit lactic (g/L)
1	3	2	1	6,23 ^b	43	41,67	4,80 ^l
2	3	2	2	6,26 ^c	34	32,33	5,10 ^{kl}
3	3	2	4	6,21 ^d	29	23,67	5,25 ^{jkl}
4	3	5	1	6,43 ^a	43	42,00	5,10 ^{kl}
5	3	5	2	5,99 ^g	34	32,00	5,40 ^{ijkl}
6	3	5	4	6,17 ^{de}	29	22,67	5,55 ^{hijk}
7	3	8	1	6,28 ^{bc}	43	41,67	5,40 ^{ijkl}
8	3	8	2	6,17 ^{de}	34	32,00	6,00 ^{efghi}
9	3	8	4	6,14 ^e	29	23,33	5,85 ^{ghij}
10	5	2	1	6,27 ^c	43	40,33	6,15 ^{efgh}
11	5	2	2	6,15 ^e	34	31,33	6,60 ^{ef}
12	5	2	4	6,09 ^f	29	22,00	6,45 ^{efg}
13	5	5	1	6,18 ^{de}	43	40,33	6,30 ^{efg}
14	5	5	2	5,97 ^g	34	31,00	6,60 ^{ef}
15	5	5	4	6,06 ^f	29	21,33	6,75 ^e
16	5	8	1	6,07 ^f	43	39,67	6,60 ^{ef}
17	5	8	2	6,00 ^g	34	30,33	6,75 ^e
18	5	8	4	5,98 ^g	29	21,33	6,60 ^{ef}
19	7	2	1	5,23 ^{ij}	43	38,67	7,80 ^{cd}
20	7	2	2	5,21 ^{ijk}	34	28,33	8,10 ^{cd}
21	7	2	4	5,21 ^{ijk}	29	22,67	7,80 ^{cd}
22	7	5	1	5,24 ⁱ	43	38,00	7,50 ^d
23	7	5	2	5,20 ^{ijk}	34	27,67	8,10 ^{cd}
24	7	5	4	5,19 ^{ijkl}	29	21,33	8,25 ^{bc}
25	7	8	1	5,30 ^h	43	37,67	8,4 ^{abc}
26	7	8	2	5,14 ^l	34	26,33	9,00 ^a
27	7	8	4	5,17 ^{kl}	29	21,33	8,85 ^{ab}

Ghi chú: Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.



Hình 4. Ảnh hưởng của mật số vi khuẩn, tỷ lệ dịch ổi và tỷ lệ sữa đến chất lượng cảm quan sữa chua

Từ kết quả trên cho thấy, chất lượng sữa chua tại nghiệm thức 26 với mật số vi khuẩn 7 log CFU/mL, 8% dịch ổi lê và tỷ lệ sữa bổ sung là 2 sẽ cho chất lượng cảm quan tốt nhất (8,4/15 điểm theo TCVN 7030:2002) [6] (Hình 4).

3.6. Ảnh hưởng độ pH đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua

Giá trị pH đã ảnh hưởng đến hàm lượng axit lactic cũng như chất lượng sữa chua thành phẩm.

Cụ thể, tại nghiệm thức pH 6,0 cho hàm lượng axit lactic cao nhất đạt 10,65 g/L với chất lượng cảm quan tốt nhất 13,3/15 điểm, đồng thời tại nghiệm

thức này, mật số tế bào vi khuẩn đạt cao nhất và cao hơn mật số vi khuẩn ban đầu (9,16 logCFU/mL) (Bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá trị pH đến khả năng lên men và chất lượng sữa chua

pH ban đầu	°Brix đầu	pH sau	°Brix sau	Axit lactic (g/L)	Mật số tế bào (logCFU/mL)	Cảm quan (điểm)
6,0	33	5,26 ^b	25,00 ^b	10,65 ^a	9,16 ^a	13,3 ^a
6,5	33	5,41 ^{ab}	25,67 ^b	9,60 ^b	9,14 ^a	11,57 ^b
7,0	33	5,59 ^a	26,67 ^a	8,82 ^c	9,11 ^b	9,87 ^c

Ghi chú: Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Theo kết quả nghiên cứu của Sánchez và cs (2008) [12] đã chỉ ra rằng, giá trị pH từ 6,0 - 6,5 sẽ cho hiệu suất lên men tối ưu nhất. Kết quả trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và cs (2023) [13] khi ứng dụng dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* TG2 vào lên men sữa chua có bổ sung dịch sơ ri, nghiên cứu đã chỉ ra rằng, dòng vi khuẩn *L. plantarum* đạt hiệu suất lên men cao trong khoảng giá trị pH từ 6,0 - 6,5. Do đó, trong thí nghiệm này tại giá trị pH 6,0 là giá trị pH thích hợp để dòng vi khuẩn *L. lactis* lên men sữa chua bổ sung dịch ổi lè.

3.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm sữa chua

Kết quả nghiên cứu cho thấy, pH, °Brix, hàm lượng axit lactic đều có sự thay đổi theo nhiệt độ và tại từng mốc thời gian khác nhau. Nhìn chung, tại nhiệt độ 30°C và 35°C cho hàm lượng axit lactic cao hơn tại nhiệt độ 25°C. Cụ thể, tại nghiệm thức có nhiệt độ 35°C và thời gian lên men là 20 giờ cho hàm lượng axit lactic và mật số vi khuẩn cao nhất, đạt lần lượt là 16,80 g/L và 9,88 logCFU/mL (Bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến quá trình lên men sữa chua

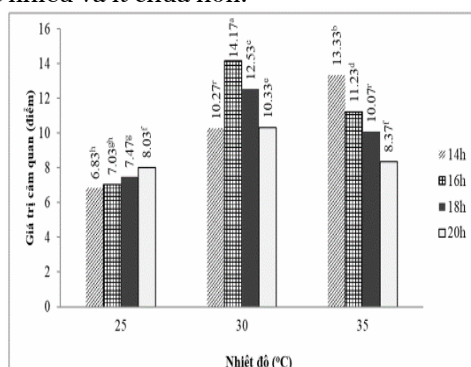
Nhiệt độ (C)	Thời gian (giờ)	pH sau	Axit lactic (g/L)	°Brix	Mật số tế bào (logCFU/mL)
25	14	5,87 ^a	6,30 ^h	28,67 ^a	8,25 ^h
25	16	5,73 ^b	6,6 ^{gh}	28,33 ^{ab}	8,47 ^g
25	18	5,48 ^c	9,75 ^e	27,69 ^b	8,70 ^f
25	20	5,28 ^e	9,30 ^{ef}	26,67 ^c	9,05 ^{de}
30	14	5,39 ^d	7,20 ^g	27,67 ^b	8,90 ^e
30	16	5,02 ^f	9,75 ^e	24,00 ^d	9,14 ^d
30	18	4,89 ^g	10,50 ^d	23,67 ^d	9,70 ^b
30	20	4,83 ^h	12,00 ^c	23,33 ^d	9,95 ^a
35	14	5,03 ^f	9,00 ^f	24,00 ^d	9,10 ^d
35	16	4,87 ^g	10,50 ^d	24,00 ^d	9,40 ^c
35	18	4,69 ⁱ	15,45 ^b	23,67 ^d	9,86 ^a
35	20	4,57 ^j	16,80 ^a	23,33 ^d	9,88 ^a

Ghi chú: Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Tuy nhiên, tại ngưỡng nhiệt độ 30°C và thời gian lên men là 16 giờ lại cho kết quả đánh giá cảm quan chất lượng sữa chua bổ sung dịch ổi lè đạt cao nhất (14,17/15 điểm) (Hình 5). Nguyên

nhân có thể do đại đa số người dân Việt Nam có xu hướng thích vị ngọt nhiều hơn vị chua, tại nghiệm thức này °Brix còn khá cao và độ pH không quá

thấp nên vị sữa chua thành phẩm có xu hướng ngọt nhiều và ít chua hơn.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến chất lượng cảm quan sữa chua

Bảng 7. So sánh các yếu tố lên men và chất lượng cảm quan của sữa chua bổ sung dịch ổi lê bởi dòng vi khuẩn phân lập và dòng vi khuẩn trên thị trường

Dòng vi khuẩn	pH	°Brix	Axit lactic (g/L)	Mật số vi khuẩn (logCFU/mL)	Cảm quan (điểm)
ĐTa2	5,18 ^a	26	9,3 ^a	9,61 ^a	13,93 ^a
C1	5,04 ^a	26	9,6 ^a	9,65 ^a	14,23 ^a

Ghi chú: Các giá trị trung bình của cùng một cột, theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định Tukey.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu suất lên men sữa chua ổi lê bởi dòng vi khuẩn phân lập và dòng vi khuẩn trên thị trường là tương đương nhau về hàm lượng axit lactic, mật số vi khuẩn và giá trị cảm quan. Bên cạnh đó, sữa chua lên men bởi vi khuẩn ĐTa2 có độ chua vừa phải và mang hương vị đặc trưng của ổi lê nhiều hơn so với sữa chua lên men bằng vi khuẩn C1. Kết quả nghiên cứu này đã góp phần làm đa dạng các sản phẩm sữa chua bổ sung dịch trái cây trên thị trường.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 17 dòng vi khuẩn axit lactic từ trái ổi lê và tuyển chọn được dòng vi khuẩn ĐTa2 có khả năng sinh axit lactic cao nhất mà không cần bổ sung sucrose, ĐTa2 có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 12,33 mm. Bên cạnh đó, dòng vi khuẩn ĐTa2 được ứng dụng để lên men sữa chua có bổ sung dịch trái ổi lê đã cho giá trị cảm quan cao với 13,3/15 điểm khi điều chỉnh giá trị pH ban đầu bằng 6,0; mật số vi khuẩn ban đầu là 7 logCFU/mL, 8% dịch ổi lê, tỷ lệ sữa là 2 và lên men ở điều kiện 30°C trong 16 giờ. Kết

3.8. So sánh chất lượng sữa chua bổ sung dịch ổi lê bởi dòng vi khuẩn phân lập và dòng vi khuẩn thương mại

Dòng vi khuẩn C1 sau khi được phân lập từ sản phẩm sữa chua trên thị trường sẽ được ứng dụng làm nguồn giống để lên men sữa chua bổ sung dịch ổi lê tại các điều kiện khảo sát tối ưu (mật số vi khuẩn ban đầu là 7 logCFU/mL, 8% dịch ổi lê, tỷ lệ sữa là 2 tại pH 6,0 và lên men trong điều kiện 30°C trong 16 giờ). Mật số vi khuẩn, hàm lượng axit lactic sinh ra và giá trị cảm quan của sản phẩm sữa chua bổ sung dịch ổi lê được trình bày tại bảng 7.

quả nghiên cứu còn cho thấy, chất lượng sữa chua được lên men bởi dòng vi khuẩn ĐTa2 có giá trị cảm quan tương đương với sản phẩm sữa chua được lên men bởi dòng vi khuẩn được phân lập từ sản phẩm sữa chua trên thị trường. Kết quả định danh xác định được dòng vi khuẩn ĐTa2 là dòng vi khuẩn *L. lactis* với độ tương đồng là 99%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen C., Zhao S., Hao G., Yu H., Tian H. and Zhao G. (2016). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International journal of food properties*, Vol. 20, No. S1, S316 - S330.
- Tsarouhas P. H., Arvanitoyannis I. S. (2014). Yogurt production line: reliability analysis. *Production & Manufacturing Research*, 2(1), 11 - 23.
- Smit, G., Engels W.J. (2005). Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and Biochemical Flavour Profiling of Cheese Products. *FEMS Microbiology Review*, 29, 591 - 610.
- Huỳnh Ngọc Tâm, Trần Thanh Trúc, Nguyễn Văn Mười và Hà Thanh Toàn (2016). Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn axit lactic có khả

năng kháng khuẩn từ dưa lê non (*Cucumis melo* (L.)) muối chua. *Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ*, 1, 18 - 24.

5. Leska A., Nowal A., Szulc J., Motyl I. and Chrebelska K. H. C. (2020). Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens. *Pathogens*, 11, 1367.

6. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 7030:2002. Sữa chua - Quy định kỹ thuật.

7. Goia T., Beyene G., Mekonne M. and Gorems K. (2022). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk Produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia and Evaluation of their Antimicrobial Activity against Selected Pathogenic Bacteria. *Int J Food Sci.*, 2076021.

8. Smid E. J. and Kleerebezem M. (2014). Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *The Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 5: 313 – 26.

9. Anjana and Tiwari S. K. (2022). Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in

Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, Vol 12.

10. Epand R. M., Walker C., Epand R. F. and Magarvey N. A. (2016). Molecular Mechanisms of Membrane Targeting Antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 1858, 980 - 987.

11. Umu Ö.C., Rudi K. and Diep, D. B. (2017). Modulation of the Gut Microbiota by Prebiotic Fibres and Bacteriocins. *Microb. Ecol. Health Dis.* 28, 1 - 12.

12. Sánchez C., Neves A. R., Cavaleiro J., Santos M. M., Nieves G. Q., López P. and Santos H. (2008). Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at Low pH. *Appl Environ Microbiol*, 74(4): 1136 - 1144.

13. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Lê Huỳnh Như, Đỗ Tấn Thành, Huỳnh Yến Nhi (2023). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn lactic từ trái sori định hướng ứng dụng trong lên men sữa chua sori (*Malpighia glabra* L.). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 259 - 272.

SELECTION AND INVESTIGATION OF OPTIMAL FERMENTATION CONDITIONS FOR YOGURT BY THE LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM GUAVA FRUIT (*Psidium guajava* L.) IN DONG THAP PROVINCE

Huynh Ngoc Thanh Tam¹, Huynh Yen Nhi¹

¹ Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

Summary

The study aimed to isolate lactic acid bacteria strains and investigate the optimal conditions for application in yogurt fermentation supplemented with guava fruit juice. The research results isolated seventeen strains of lactic acid bacteria from guava in Dong Thap province. Colonies of all bacterial strains have had milky white, tissue buoyancy, intact covers, ability to decompose CaCO₃. Cells of bacteria strains have Gram-positive, rod or oval shape, non-motile, unable to produce indole, negative for catalase and oxidase tests. The study selected the DTa2 bacterial strain with high lactic acid production ability and resistance to *Escherichia coli* bacteria with an antibacterial ring diameter of 12.33 mm. When applying the DTa2 bacterial strain to ferment yogurt supplemented with 8% guava fruit juice, the ratio of fresh milk and condensed milk is 2, bacterial density 7 logCFU/mL under pH 6.0, fermentation temperature and fermentation time of 30C for 16 hours conditions that give the highest sensory value of 14.17/15 points according to TCVN 7030:2002. The DTa2 bacterial strain was identified as the *Lactococcus lactis* strain with 99% similarity when compared on the NCBI gene bank.

Keywords: Antibacterial, fermentation, isolation, lactic acid bacteria, yogurt.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Việt Anh

Ngày nhận bài: 25/01/2024

Ngày thông qua phản biện: 23/02/2024

Ngày duyệt đăng: 22/4/2024