

# KHẢO SÁT MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN NƯỚC DỪA BẰNG KEFIR BỔ SUNG PROBIOTIC *Bifidobacterium bifidum*

Phạm Thị Cẩm Hoa, Nguyễn Phan Khánh Hòa\*, Nguyễn Bảo Toàn,  
Nguyễn Quý Khánh Minh, Nguyễn Ngọc Hoài Thương, Nguyễn Lê Tố Uyên,  
Nguyễn Ngọc Khánh, Nguyễn Thị Ngọc Giao

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

\*Email: [hoanpk@huit.edu.vn](mailto:hoanpk@huit.edu.vn)

Ngày nhận bài: 20/3/2024; Ngày nhận bài sửa: 16/4/2024; Ngày chấp nhận đăng: 22/4/2024

## TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, thực phẩm thực vật (plant-based) bổ sung lợi khuẩn (probiotic) được là xem xu hướng chiến lược và tiềm năng của ngành công nghệ thực phẩm. Với hàm lượng vitamin và khoáng chất dồi dào, nước dừa là môi trường lý tưởng cho sự phát triển của các loài như kefir, nhóm vi khuẩn lactic,... Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men nước dừa từ kefir và *Bifidobacterium bifidum*, góp phần phát triển một loại sản phẩm thuần chay giàu probiotic. Các khảo sát bao gồm xác định nồng độ chất khô hòa tan ban đầu (10-16% w/v), tỷ lệ giống *B. bifidum* bổ sung (1-4% w/v), nhiệt độ (15-45 °C) và thời gian lên men (12-36 giờ). Kết quả cho thấy, kefir và *B. bifidum* có thể phát triển tốt trong nước dừa bổ sung saccharose. Khi nồng độ chất khô ban đầu 12 °Bx, tỷ lệ water kefir (WK) sau 2 lần hoạt hóa được bổ sung 3% w/v, tỷ lệ *B. bifidum* 3% w/v, lên men chính trong 20 giờ ở nhiệt độ phòng (28-30 °C), sau đó lọc loại bỏ hạt WK, phối trộn với syrup 40% và lên men phụ trong 48 giờ, nước dừa lên men thu được có mật độ *B. bifidum* cao nhất (7,15±0,02 lg CFU/mL). Đồng thời, sản phẩm có nồng độ cồn 2,22±0,08%, 9,5±0,1 °Bx, pH 4,58±0,04, mật độ vi khuẩn lactic 7,55±0,01 lg CFU/mL và điểm cảm quan sản phẩm 8,28±0,67. Nghiên cứu cho thấy nước dừa là một loại nguyên liệu tiềm năng trong việc phát triển sản phẩm nước uống lên men có hoạt tính probiotic tốt cho sức khỏe người tiêu dùng.

Từ khóa: *Bifidobacterium bifidum*, lên men, probiotic, water kefir.

## 1. MỞ ĐẦU

Nước dừa là phần chất lỏng trong suốt có bên trong quả (*Cocos nucifera*) giai đoạn còn xanh, có chức năng cung cấp nguồn dinh dưỡng thiết yếu cho sự hình thành và phát triển của nội nhũ rắn (thịt dừa) [1]. Khi quả già, cả phần nội nhũ rắn và nước dừa đều đóng vai trò là chất dinh dưỡng cho phôi và cây con phát triển. Nước dừa có chứa hàm lượng đường cao (16,7 cal/100 g), pH trung tính, nhiều khoáng chất (K, Mg) và vitamin [2-4]. Hiện nay, nước dừa được sử dụng phổ biến nhất dưới dạng uống trực tiếp từ trái, là môi trường lên men tạo thạch dừa [5], một số nơi khác dùng nước dừa để sản xuất giấm [6].

Có nhiều nghiên cứu việc tiến hành lên men nước dừa tươi bằng các vi khuẩn lactic trong thời gian gần đây. Segura-Badilla O. và cộng sự đã sử dụng *Lactobacillus rhamnosus* SP1 lên men nước dừa có bổ sung inulin với vai trò chất xơ hòa tan, phát triển nước dừa thành một thức uống synbiotic. Quá trình lên men được thực hiện trong 8 giờ và bảo quản được 14 ngày trong điều kiện lạnh 4 °C, pH sản phẩm đạt 3,48 và mật độ probiotic đạt 82×10<sup>8</sup> CFU/mL [7]. Trong khi đó, theo khảo sát của Pin-Rou Lee và cộng sự, số tế bào *L. acidophilus* L10 và *L. casei* L26 sống sót sau 2 ngày lên men đạt xấp xỉ 10<sup>8</sup> CFU/mL và duy trì trong khoảng 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/mL sau 26 ngày bảo quản 4 °C [8]. Ngoài việc sử dụng các chủng *Lactobacillus* để lên men nước dừa, *Bacillus coagulans* cũng được lựa chọn trong việc lên men tạo ra nước dừa probiotic [9].

Hạt kefir nước (water kefir - WK) có khả năng chuyển hóa các loại đường thành thức uống có gas, vị chua nhẹ và một lượng cồn thấp (thường trong khoảng 2%). Hạt WK còn có tên gọi khác là Tibics

hay Tibicos, là hỗn hợp bao gồm cộng sinh của vi khuẩn lactic (LAB), nấm men, vi khuẩn acetic (AAB) và một số chủng thuộc nhóm *bifidobacteria* [10-12] phát triển trong mạng lưới polysaccharide do các loài này tự tạo thành [13-15]. Nước kefir là sản phẩm probiotic tự nhiên. Sự kết hợp của nhóm vi sinh vật cộng sinh có ở WK hoàn toàn có thể chuyển hóa những hợp chất đường trong các loại nước trái cây, trong đó có nước dừa nói riêng, tạo ra sản phẩm hương vị thơm ngon, đồng thời cung cấp các probiotic cho người sử dụng. Những loài có hoạt tính probiotic phân lập từ hạt WK bao gồm *Lb. paracasei*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. kefir*, *Lb. lactic*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* [16-20]. Trên thực tế, đường ruột của người cần 2 nhóm probiotic *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. Cả 2 nhóm này đều có trong hệ tiêu hóa của người, tuy nhiên khi cơ thể trưởng thành, lượng *Bifidobacterium* có xu hướng giảm [21]. Hầu hết các chủng có hoạt tính probiotic có nguồn gốc từ hạt kefir thuộc nhóm *Lactobacillus*, do đó, việc bổ sung thêm *Bifidobacterium bifidum* không chỉ thúc đẩy quá trình lên men [22] mà còn lên men tạo ra sản phẩm giàu probiotic, giúp duy trì được nguồn vi sinh vật đường ruột, từ đó giải quyết được nhiều căn bệnh liên quan đến đường tiêu hóa cho con người.

Các khảo sát trong nghiên cứu bao gồm: ảnh hưởng của nồng độ chất khô ban đầu, tỷ lệ *B. bifidum* bổ sung, thời gian và nhiệt độ quá trình lên men.

## 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nước dừa

Sử dụng nước dừa tươi thuộc giống dừa xiêm Bến Tre, nồng độ chất khô ban đầu  $7,20 \pm 0,16$  °Bx, pH  $5,52 \pm 0,06$ , hàm lượng đường khử  $48,27 \pm 2,57$  g/L.

### 2.2 Chủng giống

**Men water kefir:** Sử dụng mẫu hạt WK khô có nguồn gốc từ Mỹ, mua tại The Fermentation Supply Shop (TP. HCM). Để sử dụng trong lên men, hạt WK trải qua các giai đoạn như sau:

- Hoạt hóa WK khô: Cân 2 g WK khô cho vào bình tam giác có chứa 100 mL dịch đường saccharose 5% đã hấp tiệt trùng, nuôi 48 giờ ở nhiệt độ phòng, lọc qua rây để thu WK ướt.

- Hoạt hóa WK ướt lần 1: Cho 2 g WK ướt vào bình tam giác có chứa 100 mL dịch đường saccharose 5% đã hấp tiệt trùng. Nuôi 48 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Hoạt hóa WK ướt lần 2: Chuyển toàn bộ giống sau bước hoạt hóa WK ướt 1 vào bình tam giác có chứa 100 mL bao gồm dịch đường saccharose 5% và nước dừa tỷ lệ 1:1, pH 6. Nuôi 24 giờ ở nhiệt độ phòng. WK được lọc qua rây và sử dụng cho các khảo sát. Sau mỗi mẻ lên men, WK được thu hồi, lặp lại 2 bước tương tự hoạt hóa WK ướt lần 1, 2 và tái sử dụng cho lên men [23].

**Giống *Bifidobacterium bifidum* ATCC® 11863:** Tăng sinh khuẩn lạc đơn vào 10 mL môi trường MRS lỏng, tiến hành nuôi cấy 24 giờ ở 37 °C trong điều kiện kỵ khí. Chuyển 10 mL dịch đã tăng sinh cho vào 90 mL môi trường MRS lỏng, tiếp tục nuôi cấy trong cùng điều kiện. Sinh khối *Bifidobacterium bifidum* thu được bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút, rửa bằng NaCl 0.9% trước khi tiến hành thí nghiệm.

### 2.3 Hóa chất

Môi trường dinh dưỡng cho vi khuẩn lactic: MRS (Án Độ).

Hóa chất khác: Saccharose (Đường tinh luyện Biên Hòa, Việt Nam), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Trung Quốc), NaOH (Trung Quốc), LiCl (Trung Quốc).

### 2.4 Quy trình dự kiến tạo sản phẩm nước dừa lên men kefir giàu probiotic

200 mL nước dừa chứa trong bình tam giác 500 mL được điều chỉnh đến nồng độ chất khô phù hợp bằng đường saccharose, sau đó điều chỉnh về pH 6 bằng Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% và thanh trùng ở 80 °C trong 10 phút. Men WK và *Bifidobacterium bifidum* sau giai đoạn hoạt hóa được bổ sung vào dịch lên men với tỷ lệ khảo sát.

Thực hiện lên men chính theo các khoảng nhiệt độ và thời gian khảo sát, sau đó lọc loại bỏ hạt WK, phối trộn với syrup 40%, dịch được đem chiết vào chai thủy tinh dung tích 100 mL và tiếp tục lên men phụ ở 4 °C trong 48 giờ. Các bước được thực hiện trong điều kiện vô trùng (tủ cấy) [24].

Ảnh hưởng của Brix ban đầu được thực hiện ở các giá trị 10, 12, 14, 16 °Bx, sử dụng saccharose để điều chỉnh các giá trị Bx.

Ảnh hưởng của lượng *Bifidobacterium bifidum* được khảo sát ở các tỷ lệ 1%; 2%; 3%; 4% (w/v).

Ảnh hưởng của thời gian lên men chính được đánh giá trong khoảng thời gian từ 0 đến 36 giờ.

Thực hiện quá trình lên men trong các môi trường có nhiệt độ ở 25 °C; nhiệt độ phòng (~30 °C); 37 °C và 45 °C.

Chỉ tiêu theo dõi: Mật độ vi khuẩn lactic, mật độ *Bifidobacterium bifidum*, Bx, pH, độ cồn và cảm quan.

## 2.5 Phương pháp phân tích

Mật độ vi sinh vật được xác định bằng phương pháp trải đĩa. *Lactobacillus* được định lượng trên môi trường MRS-acid, ủ ở 37 °C trong 72 giờ. *Bifidobacterium bifidum* được định lượng trên môi trường MRS-LP, ủ ở 37 °C trong 72 giờ trong điều kiện kỵ khí.

Sử dụng Brix kế (Hand refractometer) của hãng Alla France để đo nồng độ chất khô hòa tan.

pH được đo bằng máy đo pH để bàn Walklab.

Lượng cồn được xác định bằng bình tỷ trọng (đo ở 20 °C) theo phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn quốc gia TCVN 5562 : 2009 về Bia - xác định hàm lượng ethanol.

Đánh giá cảm quan bằng phép thử cho điểm thị hiếu. Cụ thể như sau: 60 người thử chưa qua huấn luyện có độ tuổi từ 19-22 được cung cấp các mẫu tương ứng trong thí nghiệm với thể tích mỗi mẫu là 25 mL chứa trong ly nhựa trong đã được mã hóa bằng 3 chữ số. Mức độ ưa thích của các mẫu được chấm theo thang điểm 9 (từ 1 - cực kì ghét đến 9 - cực kì thích). Nước lọc được sử dụng để thanh vị trong quá trình cảm quan.

## 2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Các khảo sát được thực hiện lặp lại độc lập 3 lần. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, các nghiệm thức được so sánh sự khác biệt qua phép thử Fisher bằng phần mềm Minitab 19. Đồ thị được vẽ bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2021.

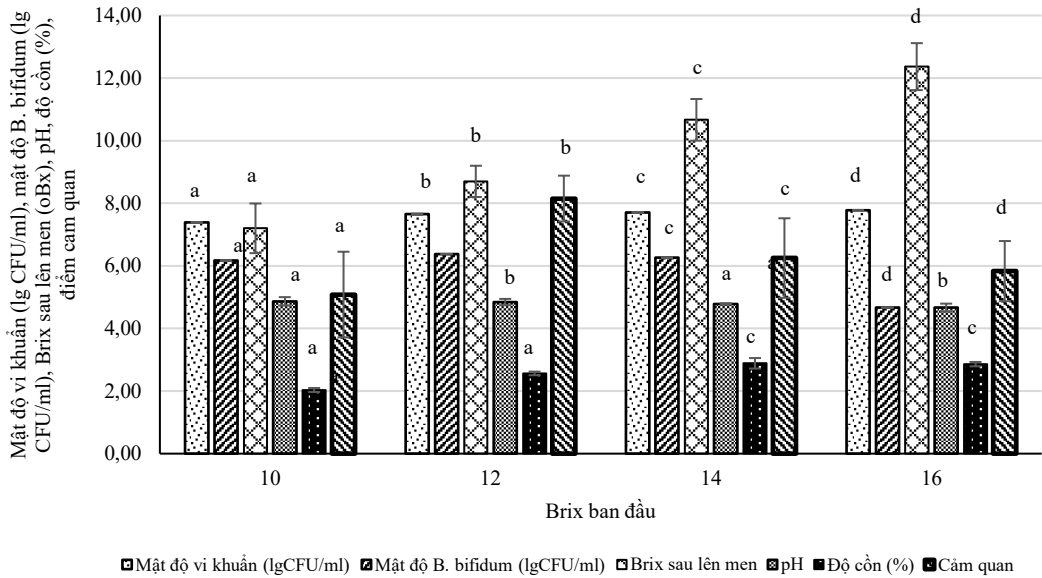
# 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

## 3.1 Ảnh hưởng của nồng độ chất khô ban đầu đến quá trình lên men

Carbohydrate cung cấp nguồn carbon và năng lượng cần thiết cho quá trình sinh trưởng và trao đổi chất ở sinh vật. Trong hạt WK, nhóm vi khuẩn lactic chuyển hóa đường thành lactate, nấm men chuyển hóa đường thành ethanol, vi khuẩn acetic chuyển hóa đường thành acid acetic, từ đây các ester cũng được hình thành, từ đó tạo nên vị riêng cho sản phẩm. Hàm lượng đường khử trong nước dừa khoảng  $48,27 \pm 2,57$  g/L, là cơ chất tốt cho quá trình lên men của WK tạo ra các chất thứ cấp như acid, ethanol [12]; đồng thời cũng là cơ chất cho *Bifidobacterium bifidum* hoạt động [25].

Sử dụng đường tinh luyện saccharose để điều chỉnh Brix của nước dừa ban đầu (10, 12, 14 và 16 °Bx), kết quả được trình bày ở Hình 1. Cùng điều kiện về pH ban đầu và tỷ lệ giống bổ sung, pH sản phẩm không có sự khác biệt ở các nghiệm thức (pH sau lên men của các nghiệm thức 10, 12, 14 và 16 °Bx lần lượt là  $4,87 \pm 0,14$ ,  $4,84 \pm 0,10$ ,  $4,78 \pm 0,02$  và  $4,67 \pm 0,13$ ); trong khi đó, Brix có xu hướng tăng ( $7,2 \pm 0,8$ ,  $8,7 \pm 0,5$ ,  $10,7 \pm 0,7$  và  $12,4 \pm 0,8$  tương ứng các nghiệm thức), độ cồn ở nghiệm thức 14 và 16 °Bx (tương ứng 2,89% và 2,86%) cũng cao hơn so với nghiệm thức 10 và 12 °Bx (tương ứng 2,03% và 2,54%). Chứng tỏ rằng, khi tăng hàm lượng chất khô hòa tan trong môi trường nuôi cấy, đã thúc đẩy hoạt động của các chủng nấm men trong hạt WK, từ đó lượng cồn sinh ra nhiều hơn. Tuy nhiên kết quả cảm quan lại cho thấy mẫu 12 °Bx lại được ưa thích hơn so với mẫu 14 và 16 °Bx. Điều đó có thể do, lượng cồn sinh ra cao làm sản phẩm có mùi nồng [26, 27], không được người sử dụng ưa thích. Khi xét tới mật độ của nhóm vi khuẩn lactic và *B. bifidum* trong sản phẩm, mật dù mật độ vi khuẩn lactic có xu hướng tăng khi tăng Brix, tuy nhiên mật độ *B. bifidum* lại đạt cao nhất khi nồng độ chất khô ban đầu 12 °Bx. Như vậy, Brix ban đầu tăng đã cung cấp một lượng chất dinh dưỡng cho hệ vi sinh vật cộng sinh trong hạt WK, sự hoạt động mạnh mẽ này tạo ra sự cạnh tranh với *B. bifidum*, lượng cồn tích lũy nhiều trong sản phẩm cũng có khả năng ức chế sự phát triển của *B. bifidum*.

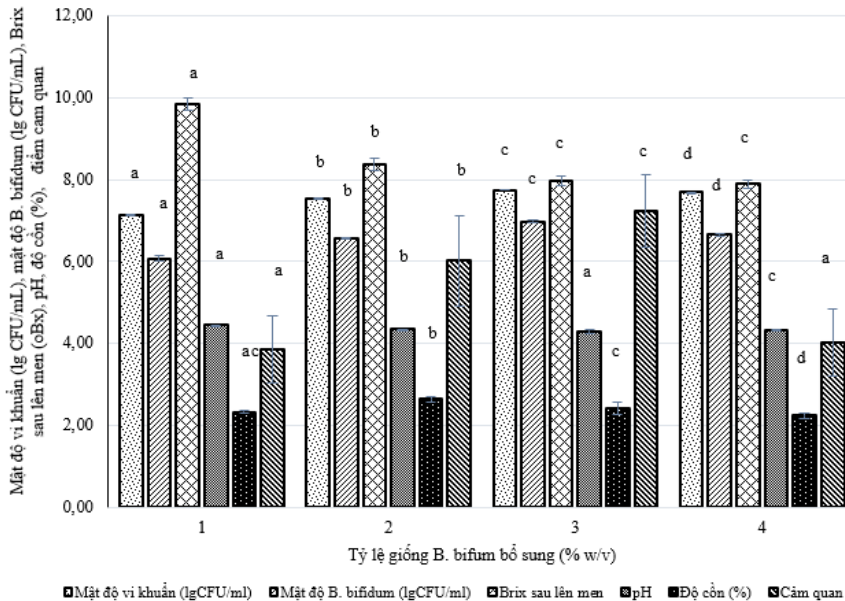
Với mục đích tạo ra sản phẩm lên men giàu probiotic, mật độ *B. bifidum* là căn cứ quan trọng để lựa chọn thông số nồng độ chất khô ban đầu phù hợp. Nghiệm thức 12 °Bx cho kết quả mật độ *B. bifidum* sau lên men cao nhất ( $6,37 \pm 0,01$  lg CFU/mL), đồng thời cũng có điểm cảm quan cao nhất ( $8,15 \pm 0,73$ ), do đó Brix ban đầu 12 được chọn để tiến hành thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất khô ban đầu. <sup>abcd</sup> trong cùng 1 chi tiêu, các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Ảnh hưởng của tỷ lệ *Bifidobacterium bifidum* bổ sung

Hạt WK là hệ cộng sinh của vi khuẩn lactic, vi khuẩn acetic và nấm men. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu chứng minh được trong hạt WK có các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có hoạt tính probiotic, tuy nhiên khó xác định được mật độ của các chủng này. Chính vì thế, việc bổ sung *B. bifidum*, một mật thúc đẩy quá trình chuyển hóa cơ chất tạo sản phẩm nước dứa lên men đồng thời tăng lượng probiotic cho thành phẩm.



Hình 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ *B. bifidum* bổ sung. <sup>abcd</sup> trong cùng 1 chi tiêu, các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Kết quả (Hình 2) cho thấy, tỷ lệ *B. bifidum* bổ sung có ảnh hưởng đến các chỉ tiêu hóa lý và cảm quan của sản phẩm. Khi tăng tỷ lệ *B. bifidum* từ 1 lên 3%, các nghiệm thức cho giá trị Brix của dịch sau lên men giảm (Brix sau lên men đạt  $9,8 \pm 0,2$ ,  $8,4 \pm 0,2$  và  $8,0 \pm 0,1$ , tương ứng tỷ lệ *B. bifidum* bổ sung 1, 2 và 3%); pH sản phẩm cũng giảm đáng kể khi tăng tỷ lệ *B. bifidum* từ 2 lên 3% (tương ứng  $4,34 \pm 0,01$ ,

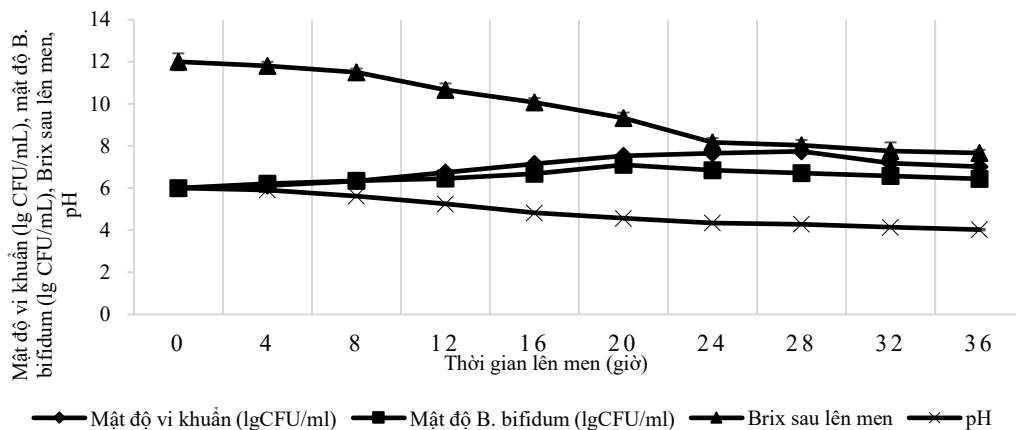
4,30±0,01). Điều này là do *B. bifidum* cũng có khả năng chuyển hóa carbohydrate thành acetate và lactate [28], từ đó làm pH sản phẩm giảm.

Ở nghiệm thức tỷ lệ bổ sung *B. bifidum* 3 và 4%, Brix và pH sau lên men khác biệt không đáng kể. Mật độ tế bào ban đầu cao tạo nên sự cạnh tranh cơ chất, từ đó dẫn đến hiệu suất lên men thấp. Trong cùng điều kiện Brix ban đầu là 12, các vi khuẩn và nấm men chủ yếu sử dụng carbohydrate để gia tăng sinh khối, không chuyển hóa được thành các hợp chất trao đổi chất. Độ cồn sản phẩm đạt cao nhất ở nghiệm thức 2%, tuy nhiên cảm quan lại thấp hơn khi so sánh với nghiệm thức 3%. Mật độ vi khuẩn lactic và mật độ *B. bifidum* trong sản phẩm của nghiệm thức bổ sung *B. bifidum* 3% cũng cho kết quả tốt nhất, cụ thể mật độ vi khuẩn lactic 7,74±0,00 lg CFU/mL và mật độ *B. bifidum* đạt 6,97±0,03 lg CFU/mL. Mật độ tế bào tăng, xảy ra sự thiếu hụt dinh dưỡng đã dẫn đến việc giảm khả năng sống sót của probiotic trong sản phẩm.

Tỷ lệ *B. bifidum* 3% là tối ưu cho quá trình lên men.

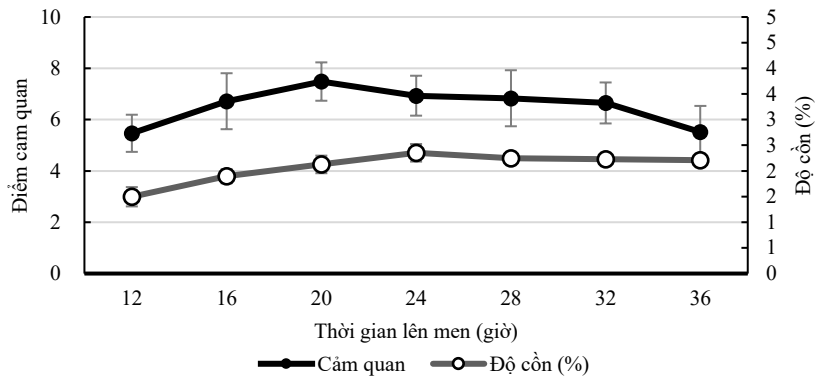
### 3.3 Thời gian lên men chính

Thời gian lên men là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan cũng như sự ổn định của các probiotic trong sản phẩm cuối cùng [29]. Thời gian lên men ngắn, sự tích lũy các hợp chất hương không đủ. Ngược lại, nếu kéo dài quá trình lên men dẫn đến sự tạp nhiễm, từ đó gây hư hỏng sản phẩm [30]. Sự thay đổi của mật độ vi khuẩn lactic, mật độ *B. bifidum*, Brix sau lên men và pH sản phẩm được theo dõi trong 36 giờ (Hình 3). Chỉ tiêu độ cồn và cảm quan sản phẩm được đánh giá từ thời điểm 12 giờ của quá trình (Hình 4).



Hình 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men chính đến mật độ

Số liệu cho thấy, trong khoảng 8 giờ đầu lên men, các vi khuẩn ở trong giai đoạn thích nghi và bắt đầu vào pha tăng trưởng, mật độ tế bào (cả vi khuẩn lactic và *B. bifidum*) có xu hướng tăng chậm, nồng độ chất khô giảm từ 12,0±0,4 °Bx ban đầu tới 11,5±0,2 °Bx sau 8 giờ, Brix giảm mạnh từ mức 12 giờ, lượng còn tạo ra tại thời điểm này còn tương đối thấp 1,50±0,19%). Mật độ vi khuẩn lactic đạt cao nhất sau lên men 28 giờ, tuy nhiên mật độ *B. bifidum* đạt cao nhất sau lên men 20 giờ. Điều này có thể do *B. bifidum* mẫn cảm với ethanol sinh ra trong sản phẩm, kể từ thời điểm lên men 24 giờ, độ cồn sản phẩm tăng cao hơn hẳn so với thời điểm lên men 20 giờ (tương ứng 2,13±0,17% và 2,35±0,17%). Mặt khác, thời gian càng dài, vi khuẩn sinh nhiều acid, cũng ảnh hưởng đến khả năng sống sót của *B. bifidum*. *B. bifidum* không có khả năng chịu acid tốt như các chủng *Lactobacillus*, hầu hết các chủng *Bifidobacterium* phát triển chậm ở pH dưới 4,0 [31]. Điều đó giải thích tại sao, sau thời điểm lên men 20 giờ, mật độ vi khuẩn lactic trong sản phẩm vẫn tiếp tục tăng, trong khi mật độ *B. bifidum* có xu hướng giảm. Sau 32 giờ, các thông số Brix, pH, độ cồn có sự khác biệt không đáng kể, nguyên nhân có thể do nguồn chất dinh dưỡng hết dần, quá trình lên men của hệ vi khuẩn trong WK cũng chậm lại.



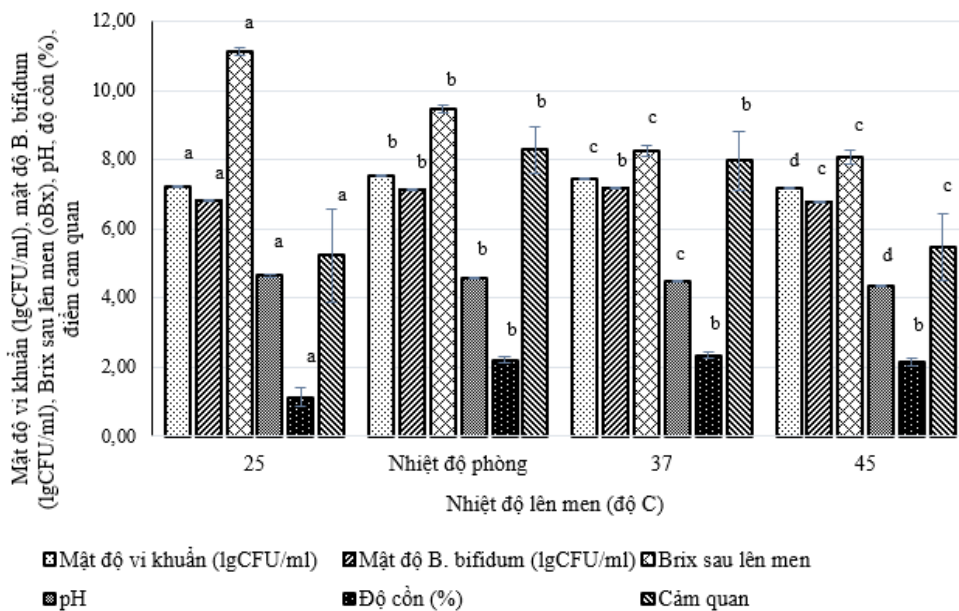
Hình 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men chính đến độ cón và cảm quan sản phẩm

Điểm cảm quan đạt cao nhất ở khoảng 20 giờ lên men, tuy nhiên để duy trì được lượng *B. bifidum* trong khoảng  $7,12 \pm 0,02$  lg CFU/mL sản phẩm [32, 33], 20 giờ là thời điểm thích hợp để ngừng quá trình lên men.

### 3.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men

WK có thể phát triển và chuyển hóa các hợp chất ở nhiệt độ thường (25-30 °C) [34]. Tuy nhiên các chủng *Bifidobacterium* thích hợp trong điều kiện nhiệt độ 37-45 °C [35, 36]. Khảo sát lên men nước dứa kefir bổ sung *B. bifidum* được thực hiện ở 25, nhiệt độ phòng (trong khoảng 28-30 °C), 37 và 45 °C. Kết quả (Hình 5) cho thấy, ở 25 °C, hàm lượng cón tạo ra thấp ( $1,13 \pm 0,17\%$ ), ở 45 °C, độ cón sản phẩm đạt  $2,15 \pm 0,11\%$  hơn nhưng ở nhiệt độ 45 °C mức độ sống sót của vi khuẩn lactic và *B. bifidum* đều thấp hơn so với nhiệt độ 25, nhiệt độ phòng và 37 °C. Mật độ *B. bifidum* trong mẫu lên men ở nhiệt độ phòng và 37 °C tương đương nhau (tương ứng  $7,15 \pm 0,02$  lg CFU/mL và  $7,17 \pm 0,03$  lg CFU/mL), tuy nhiên mật độ vi khuẩn lactic đếm được trong nghiệm thức nhiệt độ phòng cao hơn so với 37 °C (tương ứng  $7,55 \pm 0,01$  lg CFU/mL và  $7,45 \pm 0,01$  lg CFU/mL). Đây chính là ưu điểm của lên men bằng WK, quá trình có thể diễn ra trong điều kiện nhiệt độ phòng, chính vì vậy mang lại hiệu quả kinh tế khi tiến hành lên men ở những quy mô lớn.

Sản phẩm nước dứa lên men kefir bổ sung *B. bifidum* phù hợp diễn ra ở nhiệt độ phòng.



Hình 5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên men. <sup>abcd</sup> trong cùng 1 chi tiêu, các ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ )

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cho thấy kefir và *B. bifidum* có thể phát triển tốt trong môi trường nước dừa. Saccharose bổ sung tác động đáng kể đối với sự phát triển của probiotic, độ cồn và cảm quan. Việc lên men nước dừa bằng kefir kết hợp *B. bifidum* không chỉ giúp đa dạng hóa sản phẩm nước uống lên men mà còn góp phần cân bằng lợi khuẩn (mật độ *B. bifidum* được chứng minh là giảm dần trong cơ thể người khi trưởng thành). Các thông số như nhiệt độ, thời gian cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của probiotic, pH, cồn và cảm quan của sản phẩm. Tuy nhiên, việc đánh giá hoạt tính sinh học, khả năng sống sót của probiotic qua hệ tiêu hóa cũng cần được nghiên cứu sâu hơn nhằm làm rõ hơn giá trị của sản phẩm.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 146/HĐ-DCT ngày 01 tháng 10 năm 2022.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Maciel M.I., Oliveira, S.L., Silva, I.P. - Effects of different storage conditions on preservation of coconut (*Cocos nucifera*) water. *Journal of Food Process Preservation* **16** (1) (1992) 13-22. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1992.tb00189.x>
2. Arditti J. - *Micropropagation of Orchids*, 2nd edition. Blackwell Publishing: Oxford, UK, Volume II (2008) 113-116. <https://doi.10.1093/aob/mcq019>
3. Campbell Falck D., Thomas T., Falck T. M., Tutuo N., Clem K. - The intravenous use of coconut water. *American Journal of Emergency Medicine* **18** (1) (2000) 108-111. [https://doi.org/10.1016/s0735-6757\(00\)90062-7](https://doi.org/10.1016/s0735-6757(00)90062-7)
4. Purselove J. W. - *Tropical Crops: Monocotyledons*. Longman Scientific and Technical, New York (1992) 300-305. <https://doi.org/10.1086/408112>
5. Tietze H., Echano A. - *Coconut: Rediscovered as medicinal food*. Harald Tietze Publishing. ISBN 9781876173579 (2006) 37.
6. Polistico E. - *Philippine Food, Cooking, & Dining Dictionary*. Anvil Publishing, Incorporated. ISBN 9786214200870 (2016).
7. Segura-Badilla O., Lazcano Hernández M., Kammar García A., Vera López O., Aguilar Alonso P., Ramírez Calixto J., Navarro Cruz A.R. - Use of coconut water (*Cocos nucifera* L) for the development of a symbiotic functional drink. *Heliyon* **6** (3) e03653 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03653>
8. Lee P. R, Boo C. X., Liu S. Q. - Fermentation of coconut water by probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* L10 and *Lactobacillus casei* L26. *Annals of Microbiology* **63** (2013) 1441-1450. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0607-z>
9. Gangwar A. S., Bhardwaj A., Sharma V. - Fermentation of tender coconut water by probiotic bacteria *Bacillus coagulans*. *International journal of food studies* **7** (1) (2018) 100-110. <https://doi.org/10.7455/ijfs/7.1.2018.a9>
10. Laureys D., De Vuyst L - The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *Journal of Applied Microbiology* **122** (3) (2016) 719-732. <https://doi.org/10.1111/jam.13370>
11. Pendón M. D., Bengoa A. A., Iraporda C., Medrano M., Garrote G. L., Abraham A.G. - Water kefir: factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology* **133** (1) (2022). 162-180. <https://doi.org/10.1111/jam.15385>
12. Verce M., De Vuyst L., Weckx S. - Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. *Frontiers in Microbiology* **10** (2019) 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>
13. Coma M.E., Peltzer M.A., Delgado J.F., Salvay A.G. - Water kefir grains as an innovative source of materials: study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal* **120** (2019) 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>

14. Fels L., Jakob F., Vogel R.F., Wefers D - Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers* **189** (2018). 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>
15. Pidoux M., Brillouet J.M., Quemener B. - Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnology Letters* **10** (6) (1988) 415-420. <https://doi.org/10.1007/BF01087442>
16. Romero-Luna H. E., Peredo-Lovillo A., Hernández-Mendoza A., Hernández-Sánchez H., Cauich-Sánchez P. I., Ribas-Aparicio R. M., Dávila-Ortiz G. - Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 isolated from water kefir grains (Tibicos). *Current Microbiology* **77** (9) (2020) <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02016-0>
17. Magalhães K. T., de M. Pereira G. V., Dias D. R, Schwan R. F - Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26** (2010) 1241-1250. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0294-x>
18. Englerova K., Nemcova R., Mudronova D. - The study of the probiotic potential of the beneficial bacteria isolated from kefir grains. *Folia veterinaria* **61** (1) (2017) 27-37. <https://doi.org/10.1515/fv-2017-0005>
19. Meira S. M. M, Helfer V. E., Velho R. V., Lopes F. C., Brandelli A.- Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. *Journal of Dairy Research* **79** (2012) 119-127. <https://doi.org/10.1017/S0022029911000884>
20. Çevik T., Aydoğdu N. S, Özdemir N., Taş T. K. - The effect of different sugars on water kefir grains. *Turkish Journal of Agriculture, Food Science and Technology* **7** (1) (2019) 40-45. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp1.40-45.2687>
21. Odamaki T., Kato K., Sugahara H., Hashikura N., Takahashi S., Xiao J., Abe F., Osawa R. - Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology* **16** (2016) 90. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>
22. Farkas N. A, Tran A. M., Dam M. S, Nguyen Q. D. - Lactic acid fermentation of apricot juice by mono and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains Erika Bujna. *Food Science and Biotechnology* **27** (2018) 547-554. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0269-x>
23. Koh W. Y, Lim X. X., Tan T. C, Abdullah S. - Characterization of probiotics from water kefir grains. *Transactions on Science and Technology* **8** (2021) 667-672. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.09.003>
24. Moretti A. F., Moure M. C., Quiñoy F., Esposito F., Simonelli N., Medrano M., León-Peláez A. - Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods* **5** (2022) 100-123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>
25. Hoover D. G. - *Bifidobacterium*. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition) Hardback ISBN: 97801238473009, eBook ISBN: 97801238473312014 (2014) 216-222.
26. Fiorda F. A., de Melo Pereira G. V., Thomaz-Socco V., Rakshit S. K., Pagnoncelli M. G. B., de Souza Vandenberghe L. P., Soccol C. R. - Microbiological, biochemical and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiol* **66** (2017) 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>
27. Pidoux M. - The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *Microbiological Resources Centres Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **5** (1989) 223-238. <https://doi.org/10.1007/BF01741847>
28. Wolin M. J., Zhang Y., Bank S., Yerry S., Miller T. L. - NMR Detection of  $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$  from 3- $^{13}\text{C}$ -Glucose: A Signature for *Bifidobacterium* fermentation in the intestinal tract. *The Journal of Nutrition* **128** (1) (2017) 91-96. <https://doi.org/10.1093/jn/128.1.91>
29. Vaillant H., Formisyn P., Gerbaux V. - Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays. *Journal of Applied Microbiology* **79** (1995): 640-650. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb00949.x>

30. Nguyễn Lâm Dũng - Vi sinh vật học, Nhà xuất bản Giáo Dục Việt Nam (2010)
31. Shah N.P. - Yogurt: The product and its manufacture. Encyclopedia of Food Science and Nutrition **10** (2003) 6252-6259. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01305-5>
32. Shori A. B. - Application of *Bifidobacterium* spp in beverages and dairy food products: an overview of survival during refrigerated storage. Food Science and Technology Food Science Technology (Campinas) **42** (2022) e41520. <https://doi.org/10.1590/fst.41520>
33. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 13368:2021 về Sản phẩm đồ uống chứa probiotic *lactobacilli*.
34. Tzavaras D., Papadelli M., Ntaikou I. - From milk kefir to water kefir: Assessment of fermentation processes. Microbial Changes and Evaluation of the Produced Beverages Fermentation **8** (3) (2022) 135. <https://doi.org/10.3390/fermentation8030135>
35. Garro M. S., de Valdez G. F., de Giori G. S. - Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. Food Microbiology **21** (2004) 511-518. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.001>
36. Mahalakshmi R., Murthy V. V. P. S. - Growth of *Bifidobacterium bifidum* in whey-based media. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **25** (2000) 177-179. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000052>

## ABSTRACT

### INVESTIGATING THE INFLUENCE ON THE FERMENTATION OF COCONUT WATER USING WATER KEFIR SUPPLEMENTED WITH PROBIOTIC *Bifidobacterium bifidum*

Pham Thi Cam Hoa, Nguyen Phan Khanh Hoa\*, Nguyen Bao Toan,  
Nguyen Quy Khanh Minh, Nguyen Ngoc Hoai Thuong, Nguyen Le To Uyen,  
Nguyen Ngoc Khanh, Nguyen Thi Ngoc Giao  
*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

\*Email: [hoanpk@huit.edu.vn](mailto:hoanpk@huit.edu.vn)

In recent years, plant-based foods supplemented with probiotics have become a strategic and potential trend in the food technology industry. With its abundant content of vitamins and minerals, coconut water is an ideal medium for the growth of species such as kefir, lactic acid bacteria, etc. This study was conducted to evaluate some factors affecting the fermentation process of coconut water by kefir and *Bifidobacterium bifidum*, contributing to the development of a probiotic-rich vegan product. The surveys included determining the initial total soluble solids (TSS) concentration (10-16% w/v), the proportion of *B. bifidum* inoculum added (1-4% w/v), temperature (15-45 °C), and fermentation time (12-36 hours). The results showed that kefir and *B. bifidum* can grow well in coconut water supplemented with sucrose. When the initial TSS concentration was 12 °Bx, the ratio of water kefir after 2nd activation is added 3% w/v, the ratio of *B. bifidum* is 3% w/v, main fermentation was performed for 20 hours at room temperature (28-30 °C), followed by filtering to remove the WK grains, mixing with 40% syrup, and secondary fermentation for 48 hours. The resulting fermented coconut water had the highest density of *B. bifidum* (7.15±0.02 lg CFU/mL). At the same time, the product has an alcohol concentration of 2.22±0.08%, 9.5±0.1 °Bx, pH 4.58±0.04, lactic bacteria density 7.55±0.01 lg CFU/mL and product sensory score 8.28±0.67. The study indicates that coconut water is a potential ingredient in developing fermented drinks containing probiotics that are beneficial to consumers' health.

*Keywords:* *Bifidobacterium bifidum*, fermentation, probiotics, water kefir.