

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn axit acetic tham gia vào quá trình lên men hạt ca cao

Võ Thị Thúy Huệ*, Trần Thị Quỳnh Diệp, Nguyễn Minh Quang

Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận 19/3/2018; ngày chuyển phản biện 23/3/2018; ngày nhận phản biện 23/4/2018; ngày chấp nhận đăng 4/5/2018

Tóm tắt:

Lên men hạt ca cao là một trong những công đoạn quan trọng, quyết định chất lượng ca cao thương phẩm. Mỗi loài vi sinh vật đều có vai trò nhất định giúp nâng cao chất lượng hạt ca cao lên men, đặc biệt là các chủng vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn axit acetic.

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 8 mẫu vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic và 3 mẫu vi khuẩn có khả năng sinh axit acetic; tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic cao là *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum* và 1 chủng vi khuẩn có khả năng sinh axit acetic cao là *Acetobacter lovaniensis*. Thời gian nhân sinh khối tối ưu cho các chủng vi khuẩn là 48 giờ và môi trường bán rắn tối ưu để nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus coagulans* là môi trường 85% cám bắp + 15% cám gạo (mật số vi khuẩn đạt $1,61 \times 10^{12}$ Cfug); vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* là môi trường 90% cám bắp + 10% cám gạo (mật số đạt $2,15 \times 10^{10}$ Cfug) và vi khuẩn *Acetobacter lovaniensis* là môi trường 90% cám bắp + 10% cám gạo (mật số đạt $2,19 \times 10^{11}$ Cfug).

Từ khóa: lên men ca cao, vi khuẩn axit acetic, vi khuẩn axit lactic.

Chỉ số phân loại: 2.8

Đặt vấn đề

Lên men là giai đoạn cần thiết để tạo hương vị cho ca cao. Lên men là một quá trình do vi sinh vật gây ra những biến đổi vật lý, hóa học và sinh hóa bên trong hạt ca cao để tạo ra các tiền chất hóa học tạo màu và mùi vị đặc trưng của sôcôla [1]. Trên thế giới và ở Việt Nam, ca cao thường được lên men đơn giản bằng cách sử dụng nguồn nấm men và vi khuẩn tự nhiên từ môi trường xâm nhập vào lớp com nhầy hay còn gọi là lên men tự nhiên. Với phương pháp lên men này, giá trị kinh tế thu được không cao, đặc biệt là trong trường hợp điều kiện phát triển của hệ vi sinh vật không thể kiểm soát một cách ổn định. Vì vậy, có thể nói việc xác định thành phần và vai trò của vi sinh vật tham gia quá trình lên men hạt ca cao là rất cần thiết, đặc biệt là các chủng vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn axit acetic có ảnh hưởng quyết định tới hương vị và màu sắc của bột ca cao thành phẩm. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn axit lactic, vi khuẩn axit acetic tham gia vào quá trình lên men hạt ca cao tự nhiên để sản xuất chế phẩm vi khuẩn bổ sung vào quá trình lên men, giúp ổn định và nâng cao chất lượng sản phẩm ca cao sau lên men.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu: mẫu ca cao thu thập tại huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre.

Môi trường phân lập và nhân sinh khối vi khuẩn: môi trường MRS, môi trường YPGD, môi trường TSA, môi trường TSB, môi trường bán rắn: cám bắp, cám gạo...

Phương pháp

Phân lập các chủng vi khuẩn axit lactic và axit acetic trong quá trình lên men hạt ca cao tự nhiên: tiến hành lấy mẫu hạt ca cao để phân lập các chủng vi khuẩn trong suốt quá trình lên men. Lấy mẫu tại 5 điểm chéo góc của thùng lên men, mỗi điểm lấy 400 g hạt ca cao ở độ sâu 15 cm, khối lượng mẫu hạt ca cao cần lấy để phân tích các chỉ tiêu là 2 kg.

Vi khuẩn axit acetic được phân lập và đếm mật số trên môi trường YPGD có bổ sung CaCO_3 bổ sung kháng sinh cycloheximide với nồng độ 100 ppm.

Vi khuẩn axit lactic được phân lập và đếm mật số trên môi trường thạch MRS chứa kháng sinh cycloheximide nồng độ 100 ppm.

*Tác giả liên hệ: Email: thuyhue@hcmuaf.edu.vn

Isolation and identification of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria for the process of cocoa bean fermentation

Thi Thuy Hue Vo*, Thi Quynh Diep Tran,
Minh Quang Nguyen

Nong lam University Ho Chi Minh City

Received 19 March 2018; accepted 4 May 2018

Abstract:

The fermentation of cocoa beans is one of the important factors that determine the quality of the commercial cocoa products. Each species of microorganisms has an important role to help improve the quality of fermented cocoa beans, especially lactic acid bacteria and acetic acid bacteria.

Therefore, 8 strains of lactic acid bacteria and 3 strains of acetic acid bacteria were isolated. *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum* and *Acetobacter lovaniensis* strains exhibited to be better acid producers than the others. The optimal parameters of the semi-solid medium for the biomass production of *Bacillus coagulans* were 85% corn bran + 15% rice bran for 48 hours of fermentation (population of bacteria was 1.61×10^{12} Cfug); those of *Lactobacillus plantarum* were 90% corn bran + 10% rice bran for 48 hours of fermentation (population of bacteria was 2.15×10^{10} Cfug); those of *Acetobacter lovaniensis* were 90% corn bran + 10% rice bran for 48 hours of fermentation (population of bacteria was 2.19×10^{11} Cfug).

Keywords: acetic acid bacteria, cocoa fermentation, lactic acid bacteria.

Classification number: 2.8

Quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào, tiến hành nhuộm gram và một số phản ứng sinh hóa đặc trưng cho từng loại vi sinh vật. Định danh các chủng vi khuẩn phân lập được bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA (phân tích giải trình tự bởi Công ty Nam Khoa, TP Hồ Chí Minh).

Khảo sát khả năng sinh axit lactic và axit acetic của các chủng vi khuẩn: định tính axit bằng phương pháp dùng thuốc thử và định lượng axit bằng phương pháp chuẩn độ Therne.

Khảo sát sự sinh trưởng của các chủng vi khuẩn: khảo sát sự sinh trưởng của vi khuẩn trên các môi trường nuôi cấy bán rắn khác nhau, thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức với 3 lần lặp lại (NT1: 100% cám bắp; NT2: 95% cám bắp + 5% cám gạo; NT3: 90% cám bắp + 10% cám gạo; NT4: 85% cám bắp + 15% cám gạo). Khối lượng của mỗi nghiệm thức là 20 kg, mật số vi khuẩn bổ sung vào các nghiệm thức đạt 10^6 Cfug cơ chất.

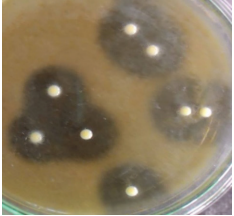
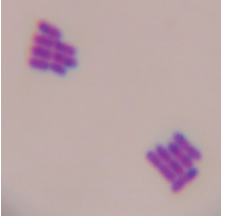
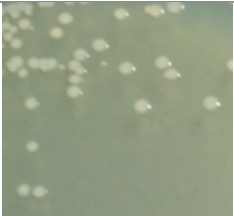
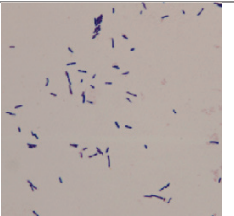
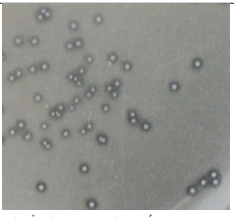
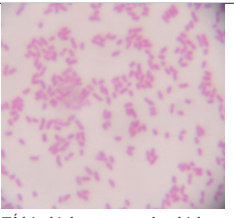
Phương pháp xử lý số liệu: kết quả nhận được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel.

Kết quả và thảo luận

Mẫu hạt ca cao lên men được lấy tại huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre. Tiến hành lấy mẫu ca cao được ủ lên men tự nhiên 6 lần vào các thời điểm 0, 24, 48, 72, 96, 120 giờ.

Kết quả phân lập và làm thuần vi khuẩn từ mẫu hạt ca cao lên men

Mẫu ca cao sau khi thu nhận được chuyển về phòng thí

Ký hiệu	Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy	Hình dạng tế bào	Định danh
A			<i>Lactobacillus plantarum</i> *
B			<i>Bacillus coagulans</i> *
I			<i>Acetobacter lovaniensis</i> *

Hình 1. Đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn và hình thái tế bào quan sát dưới kính hiển vi.

*Tên của vi khuẩn sau khi định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và tra cứu trên BLAST SEARCH.

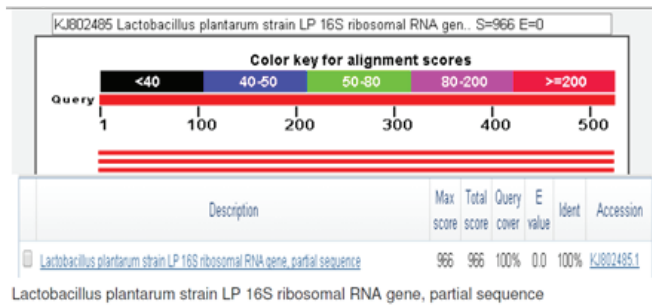
nghiệm, tiến hành pha loãng ở nồng độ thích hợp, cấy trang trên môi trường thạch (có bổ sung CaCO_3) để phân lập vi khuẩn có khả năng sinh axit lactic và axit acetic.

Nghiên cứu đã phân lập được 8 mẫu vi khuẩn lần lượt có ký hiệu là A, B, C, D, E, F, G, H có đặc điểm: gram dương, không sinh enzyme catalase, tạo vòng trong đối với môi trường MRS có bổ sung CaCO_3 và làm đổi màu thuốc thử uphermen, vì vậy bước đầu xác định 8 mẫu này thuộc nhóm vi khuẩn lactic.

Đã phân lập được 3 mẫu vi khuẩn có ký hiệu I, II, III với gram âm, sinh enzyme catalase, tạo vòng trong đối với môi trường YPGD có bổ sung CaCO_3 và tạo màu đỏ thẫm khi tiến hành phản ứng định tính axit acetic nên xác định 3 mẫu này thuộc vi khuẩn acetic.

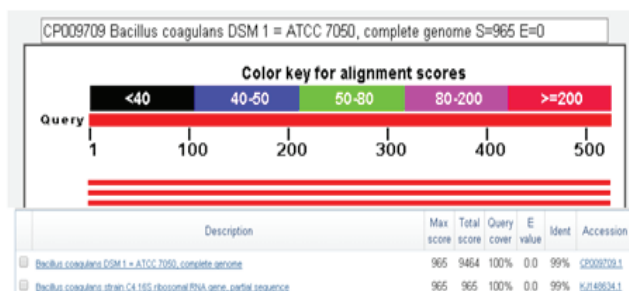
Hình thái của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở hình 1.

Khi so sánh trình tự 16S rDNA của các dòng vi khuẩn với dữ liệu ngân hàng gen bằng chương trình BLAST kết quả cho thấy, trình tự gen của dòng vi khuẩn ký hiệu A tương đồng với trình tự gen của loài *Lactobacillus plantarum*, với mức độ tương đồng là 100% (hình 2).

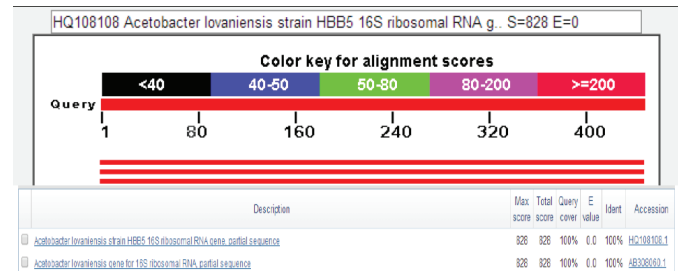


Hình 2. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn DNA của dòng vi khuẩn A với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI.

Kết quả tra cứu bằng BLAST trình tự gen dòng vi khuẩn ký hiệu B tương đồng với trình tự gen của loài vi khuẩn *Bacillus coagulans* với mức tương đồng 99% (hình 3) và dòng vi khuẩn ký hiệu I tương đồng loài *Acetobacter lovaniensis* với độ tương đồng 100% (hình 4).



Hình 3. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn DNA của dòng vi khuẩn B với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI.

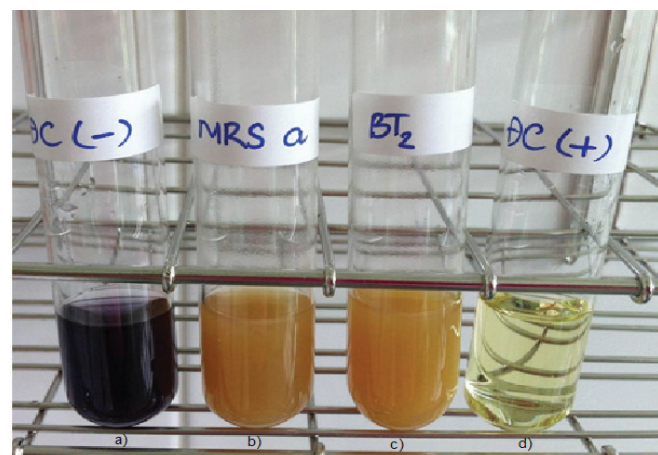


Hình 4. Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn DNA của dòng vi khuẩn I với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI.

Đa số các khuẩn lạc có dạng tròn, trơn bóng và có màu trắng đục hoặc trắng sữa, khuẩn lạc tỏa ra mùi chua của axit. Tế bào dạng que, xếp đơn, gram dương đối với vi khuẩn lactic và gram âm đối với vi khuẩn acetic. Trong quá trình phát triển của vi khuẩn đã tạo ra các chất biến dưỡng cùng với các sản phẩm của trao đổi chất, cụ thể là axit lactic và acetic. Axit này tác dụng với CaCO_3 được bổ sung vào môi trường trong quá trình nuôi cấy, lượng CaCO_3 xung quanh khuẩn lạc bị chuyển hóa thành muối canxi, CO_2 và H_2O nhờ thế mà duy trì được pH ở mức 5,5-6, trả lại môi trường xung quanh khuẩn lạc trong như ban đầu. Bề dày vùng trong này biểu thị lượng axit sinh ra nhiều hay ít [2].

Khảo sát khả năng sinh axit lactic của các mẫu vi khuẩn phân lập từ hạt ca cao lên men tự nhiên

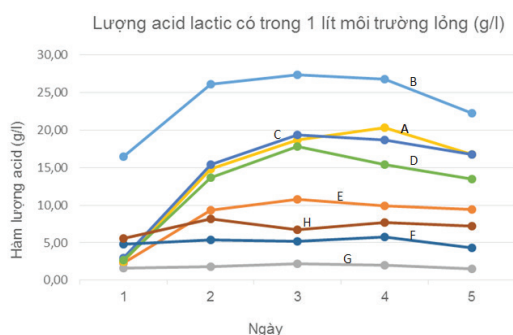
Kết quả định tính axit lactic (hình 5) cho thấy, các ống nghiệm chứa dịch nuôi cấy vi khuẩn chủng phân lập được ký hiệu là A và B sau phản ứng với thuốc thử uphenmen làm đổi màu thuốc thử từ màu tím (giống đối chứng âm) thành màu vàng, chứng tỏ có axit lactic sinh ra. Tuy nhiên, do dung dịch nuôi cấy ngoài axit lactic được tạo ra thì còn chứa thành phần môi trường nuôi cấy nên màu vàng của dung dịch ở ống nghiệm b, c không sáng bằng ống d (đối chứng dương).



Hình 5. Kết quả phản ứng định tính axit lactic.

a) đối chứng âm (-), b) vi khuẩn ký hiệu A, c) vi khuẩn ký hiệu B, d) đối chứng dương (+).

Hàm lượng axit lactic sinh ra trong môi trường nuôi cấy ở các chủng vi khuẩn là khác nhau (hình 6). Vi khuẩn ký hiệu B sinh axit lactic cao nhất sau 3 ngày nuôi cấy (27,36 g/l) và vi khuẩn ký hiệu A sau 4 ngày nuôi cấy, lượng axit lactic sinh ra khá cao (20,34 g/l). Lượng axit sinh tăng dần từ ngày nuôi cấy thứ nhất và đạt mức cao nhất vào ngày 3, ngày 4, sau đó giảm dần.

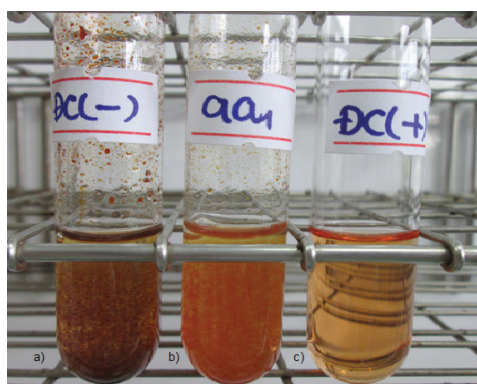


Hình 6. Kết quả định lượng axit lactic sinh ra trong 5 ngày nuôi cấy.

Hai chủng vi khuẩn ký hiệu A, B có lượng axit lactic sinh ra cao nhất được chọn để thực hiện định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

Khảo sát khả năng sinh axit acetic của các mẫu vi khuẩn phân lập từ hạt ca cao lên men tự nhiên

Sau khi tiến hành thử phản ứng định tính axit acetic các mẫu vi khuẩn phân lập được, xác định có 3 mẫu vi khuẩn ký hiệu lần lượt là I, II, III khi phản ứng với NaOH và FeCl₃ cho màu đỏ thẫm, chứng tỏ có axit acetic sinh ra trong quá trình nuôi cấy. Kết quả định tính axit acetic của dòng vi khuẩn ký hiệu I thể hiện qua hình 7.



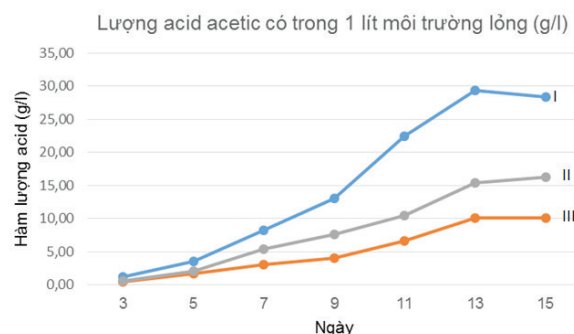
Hình 7. Kết quả phản ứng định tính axit acetic.

a) đối chứng âm (-), b) vi khuẩn ký hiệu I, c) đối chứng dương (+).

Kết quả định lượng axit acetic (hình 8) cho thấy, lượng axit sinh ra tăng dần qua các ngày nuôi cấy. Mẫu I có lượng axit acetic sinh ra cao nhất đạt 29,4 g/l sau 13 ngày nuôi

cấy, tiếp đến là mẫu III đạt 16,32 g/l sau 15 ngày nuôi cấy và mẫu II đạt thấp nhất với 10,1 g/l sau 15 ngày nuôi cấy.

Chọn mẫu I có lượng axit acetic sinh ra cao nhất tiến hành định danh bằng sinh học phân tử.



Hình 8. Kết quả định lượng axit acetic sinh ra trong 15 ngày nuôi cấy.

Kết quả định danh bằng sinh học phân tử của các mẫu vi khuẩn phân lập từ hạt ca cao lên men tự nhiên

Quan sát đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc và các đặc điểm sinh hóa của các vi khuẩn như phản ứng catalase, khả năng sinh axit lactic và khả năng sinh axit acetic, chọn các chủng có khả năng sinh axit cao tiến hành gửi mẫu định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự gen) các chủng vi khuẩn trên tại Công ty Nam Khoa, kết quả: các chủng phân lập là vi khuẩn ký hiệu A thuộc chủng *Lactobacillus plantarum*, vi khuẩn ký hiệu B thuộc chủng *Bacillus coagulans*, vi khuẩn ký hiệu I thuộc chủng *Acetobacter lovaniensis*.

Đây là các chủng vi khuẩn thường gặp trong quá trình lên men hạt ca cao tự nhiên. Kết quả nghiên cứu ở Ghana, cũng đã phân lập được chủng *Lactobacillus plantarum* hiện diện trong quá trình lên men hạt ca cao [3]. Nghiên cứu ở Malaysia của [4] cũng đã phân lập được chủng *Acetobacter lovaniensis* hiện diện trong quá trình lên men hạt ca cao. Ngoài vi khuẩn *Lactobacillus* sp. và *Acetobacter* sp. thì *Bacillus* sp. cũng tham gia vào quá trình lên men và góp phần tạo nên hương vị của sôcôla. Kết quả nghiên cứu [5] và [6] đã phân lập được chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* và một số chủng *Bacillus* như *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*.

Dựa vào kết quả khảo sát khả năng sinh axit và định danh bằng sinh học phân tử xác định chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans* và chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* là 2 chủng vi khuẩn sinh axit lactic cao (lần lượt là 27,36 và 20,34 g/l), chủng *Acetobacter lovaniensis* là chủng có khả năng sinh axit acetic cao (29,40 g/l). Vì vậy chọn 2 chủng vi khuẩn lactic là *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum*

và 1 chủng vi khuẩn acetic là *Acetobacter lovaniensis* tiến hành nhân sinh khối trên môi trường bán rắn.

Kết quả khảo sát mật số vi khuẩn *Bacillus coagulans* trên môi trường bán rắn

Khả năng sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn *Bacillus coagulans* là khác nhau trên các môi trường nuôi cấy khác nhau. Kết quả ghi nhận ở bảng 1 cho thấy, vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường 85% cám bắp + 15% cám gạo đạt mật số cao nhất ($1,61 \times 10^{12}$ Cfug) ở thời điểm 48 giờ.

Bảng 1. Mật số vi khuẩn *Bacillus coagulans* trên các môi trường bán rắn trong 72 giờ nuôi cấy.

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Mật số vi khuẩn trên môi trường bán rắn (Cfu/g)			
	100% cám bắp	95% cám bắp + 5% cám gạo	90% cám bắp + 10% cám gạo	85% cám bắp + 15% cám gạo
24	$1,14 \times 10^{11}$	$7,13 \times 10^{10}$	$5,70 \times 10^{10}$	$6,90 \times 10^{10}$
48	$1,48 \times 10^{12}$	$4,13 \times 10^{11}$	$2,60 \times 10^{11}$	$1,61 \times 10^{12}$
72	$4,10 \times 10^{11}$	$3,17 \times 10^{11}$	$2,57 \times 10^{11}$	$2,80 \times 10^{11}$

Kết quả khảo sát mật số vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* trên môi trường bán rắn

Sau 72 giờ nuôi cấy trên các môi trường bán rắn khác nhau, kết quả cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* sinh trưởng, phát triển mạnh nhất ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy trên môi trường 90% cám bắp + 10% cám gạo, mật số đạt $2,15 \times 10^{10}$ Cfug (bảng 2). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của [7] khi thực hiện nhân sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* trên môi trường gạo lức và cám gạo, sau 48 giờ nuôi cấy, vi khuẩn đạt mật số $2,5 \times 10^{10}$ Cfug.

Bảng 2. Mật số vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* trên môi trường bán rắn trong 72 giờ nuôi cấy.

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Mật số vi khuẩn trên môi trường bán rắn (Cfu/g)			
	100% cám bắp	95% cám bắp + 5% cám gạo	90% cám bắp + 10% cám gạo	85% cám bắp + 15% cám gạo
24	$1,07 \times 10^9$	$1,47 \times 10^9$	$2,14 \times 10^{10}$	$3,67 \times 10^9$
48	$1,53 \times 10^{10}$	$5,57 \times 10^9$	$2,15 \times 10^{10}$	$1,49 \times 10^{10}$
72	$1,48 \times 10^{10}$	$3,20 \times 10^9$	$4,67 \times 10^9$	$1,35 \times 10^{10}$

Kết quả khảo sát mật số vi khuẩn *Acetobacter lovaniensis* trên môi trường bán rắn

Qua kết quả ở bảng 3 cho thấy, mật số vi khuẩn *Acetobacter lovaniensis* ở nghiệm thức 90% cám bắp + 10% cám gạo sau 48 giờ nuôi cấy đạt mật số cao nhất là $2,19 \times 10^{11}$ Cfug.

Bảng 3. Mật số vi khuẩn *Acetobacter lovaniensis* trên môi trường bán rắn trong 72 giờ nuôi cấy.

Thời gian (giờ)	Mật số vi khuẩn trên môi trường bán rắn (Cfu/g)			
	100% cám bắp	95% cám bắp + 5% cám gạo	90% cám bắp + 10% cám gạo	85% cám bắp + 15% cám gạo
24	$1,19 \times 10^{10}$	$5,57 \times 10^8$	$1,62 \times 10^{10}$	$4,03 \times 10^{10}$
48	$1,92 \times 10^{11}$	$1,39 \times 10^{10}$	$2,19 \times 10^{11}$	$7,17 \times 10^{10}$
72	$8,13 \times 10^8$	$1,02 \times 10^8$	$4,23 \times 10^8$	$3,47 \times 10^8$

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus plantarum* có khả năng sinh axit lactic cao và 1 chủng *Acetobacter lovaniensis* có khả năng sinh axit acetic cao. Mỗi chủng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển trên các điều kiện môi trường nhân sinh khối khác nhau. Vi khuẩn *Bacillus coagulans* phát triển tốt trên môi trường 85% cám bắp + 15% cám gạo, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* phát triển tốt trên môi trường 90% cám bắp + 10% cám gạo, trong khi vi khuẩn *Acetobacter lovaniensis* thì phát triển tốt trên môi trường 90% cám bắp + 10% cám gạo. Thời gian nhân sinh khối tối ưu cho các chủng vi khuẩn là 48 giờ.

Xác định thành phần và vai trò của vi sinh vật tham gia vào quá trình lên men hạt ca cao là rất cần thiết, trên cơ sở đó thiết lập quy trình lên men có bổ sung các chủng vi sinh vật thích hợp giúp tạo ra sản phẩm ca cao lên men có chất lượng cao và ổn định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lương Đức Phẩm (2004), *Công nghệ vi sinh vật*, Nxb Nông nghiệp, tr.243-287.
- [2] E.O. Afoakwa, A. Paterson, M. Fowler, A. Ryan (2008), "Flavour formation and character in cocoa and chocolate: a critical review", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **48**, pp.840-857.
- [3] L. Jespersen, D.S. Nielsen, S. Honholt, and M. Jakobsen (2005), "Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans", *FEMS Yeast Res.*, **5**, pp.441-453.
- [4] J.G. Carr, P.A. Davies, and J. Dougan (1979), *Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia*, in Proc, 7th Int, Cocoa Ré. Conf., pp.6-573.
- [5] M.M. Ardhana, and G.H. Fleet (2003), "The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia", *J. Food Microbiol.*, **86**, pp.87-99
- [6] Rosane F. Schwan, Alan E. Wheals (2004), "The microbiology of Cocoa fermentation and its role in chocolate quality", *Food Science and Nutrition*, **44**, pp.1-17.
- [7] Premsuda Saman¹, Pablo Fuciños², José A. Vázquez³ and Severino S. Pandiella¹ (2009), "Fermentability of Brown Rice and Rice Bran for Growth of Human *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826", *Food Technol. Biotechnol.*, **49**(1), pp.128-132.