

Phân lập, tuyển chọn chủng *Lactobacillus* ứng dụng cho lên men sữa chua đậu xanh

Nguyễn Thị Mai Hương*, Phạm Thị Thu Hoài

Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp, 456 Minh Khai, phường Vĩnh Tuy, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/10/2024; ngày chuyển phản biện 15/10/2024; ngày nhận phản biện 6/11/2024; ngày chấp nhận đăng 9/11/2024

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập và sàng lọc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* từ các sản phẩm lên men để ứng dụng trong quy trình sản xuất sữa chua đậu xanh. Kết quả từ 10 nguồn phân lập đã thu được 19 khuẩn lạc vi khuẩn lactic trên môi trường nuôi cấy vi khuẩn chuyên biệt (MRS), trong đó 7 chủng được sơ tuyển dựa trên các tiêu chí: gram dương, catalase âm tính, có khả năng phân hủy CaCO_3 , không có khả năng di động, hình thái tế bào dạng que hoặc cầu và khả năng tạo axit lactic mạnh (15,60-17,67 g/l). Sau khi đánh giá hoạt tính probiotic, hai chủng DC1 và KC2 đã được lựa chọn nhờ khả năng tạo enzyme protease, amylase và ức chế vi khuẩn gây bệnh. Điều kiện phát triển tối ưu cho hai chủng này là môi trường MRS với pH 6,5, nhiệt độ 37°C, thời gian nuôi cấy 24 giờ và tốc độ lắc 200 vòng/phút. Ngoài ra, chủng KC2 sử dụng nguồn carbon thay thế là saccarose, trong khi DC1 giữ nguyên nguồn carbon và nitơ ban đầu. Kết quả thử nghiệm bước đầu chỉ ra rằng, chủng KC2 có tiềm năng lớn trong việc lên men sữa chua đậu xanh, đáp ứng tốt cho sản xuất thực tiễn.

Từ khóa: đậu xanh, *Lactobacillus*, lên men, probiotic, sữa chua đậu xanh.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8, 2.10

Isolation and selection of *Lactobacillus* strains for fermentation of mung bean yoghurt

Thi Mai Huong Nguyen*, Thi Thu Hoai Pham

Faculty of Food Technology, University of Economics - Technology for Industries, 456 Minh Khai Street, Vinh Tuy Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

Received 12 October 2024; revised 6 November 2024; accepted 9 November 2024

Abstract:

This study aims to isolate and screen *Lactobacillus* strains from fermented products for application in the production of mung bean yoghurt. The results from 10 isolation sources yielded 19 lactic acid bacterial colonies on De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium, of which seven strains were pre-selected based on criteria such as gram-positive, catalase-negative, ability to degrade CaCO_3 , non-motile, rod- or coccus-shaped cell morphology, and strong lactic acid production (15.60-17.67 g/l). After evaluating their probiotic activity, two strains, DC1 and KC2, were selected due to their ability to produce protease and amylase enzymes and inhibit pathogenic bacteria. The optimal growth conditions for these strains were MRS medium with a pH of 6.5, a temperature of 37°C, an incubation time of 24 hours, and a shaking speed of 200 rpm. Additionally, strain KC2 utilised sucrose as an alternative carbon source, whereas DC1 maintained the original carbon and nitrogen sources. Preliminary testing results indicated that strain KC2 has great potential for fermenting mung bean yoghurt, making it a promising candidate for practical production.

Keywords: fermentation, *Lactobacillus*, mung bean, mung bean yoghurt, probiotic.

Classification numbers: 1.6, 2.8, 2.10

*Tác giả liên hệ: Email: ntmhuong@uneti.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Sữa chua là một sản phẩm lên men phổ biến, nổi tiếng với nhiều lợi ích sức khỏe, bao gồm khả năng hỗ trợ giảm huyết áp [1], hỗ trợ điều trị đái tháo đường và chống ung thư [2]. Trong quy trình sản xuất sữa chua truyền thống, hai chủng vi khuẩn lactic *Lactobacillus bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* được sử dụng phổ biến trong công nghiệp để tạo ra các sản phẩm sữa chua truyền thống [3].

Tuy nhiên, hiện nay theo xu hướng các sản phẩm sữa chua không chỉ dừng lại ở những dòng truyền thống mà còn mở rộng sang các sản phẩm chức năng, đặc biệt là sữa chua bổ sung probiotic. Probiotic là các vi sinh vật sống và khi được sử dụng với liều lượng hợp lý, chúng có thể mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe người tiêu dùng [4]. Việc bổ sung này không chỉ nâng cao chất lượng và giá trị dinh dưỡng của sản phẩm mà còn góp phần cải thiện hệ tiêu hóa và tăng cường hệ miễn dịch.

Mặc dù việc sử dụng các chủng vi khuẩn khởi động truyền thống trong quá trình lên men sữa chua có thể đảm bảo tính ổn định của sản phẩm nhưng lại hạn chế về mặt cảm quan [5]. Điều này tạo ra nhu cầu khám phá và ứng dụng các loài vi khuẩn mới, đặc biệt là *Lactobacillus*, nhằm phát triển các sản phẩm sữa chua với hương vị phong phú và giá trị chức năng cao hơn.

Nghiên cứu về phân lập các chủng *Lactobacillus* từ nguồn lên men truyền thống tại Việt Nam và trên thế giới đã ghi nhận nhiều tiềm năng ứng dụng trong sản xuất sữa chua. Các chủng *Lactobacillus* được phân lập chủ yếu từ các sản phẩm lên men như sữa chua, thực phẩm lên men từ rau củ và thịt truyền thống [6]. Tại Việt Nam, nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các chủng *Lactobacillus* được phân lập từ các loại sữa chua truyền thống có khả năng acid hóa tốt và kháng khuẩn, góp phần nâng cao chất lượng sản phẩm cuối cùng [7]. Trên thế giới, *Lactobacillus* cũng đã được chứng minh là có khả năng chịu đựng các điều kiện khó khăn trong quá trình lên men. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, ứng dụng các chủng này không chỉ cải thiện hương vị mà còn gia tăng giá trị dinh dưỡng cho sản phẩm. D.D. Pan và cs (2014) [8] đã chứng minh rằng, *Lactobacillus pentosus* giúp tạo ra hương vị đặc biệt cho sữa chua thông qua khả năng tạo ra nhiều hợp chất hữu cơ dễ bay hơi trong quá trình lên men. Các nghiên cứu đã cho thấy, *Lactobacillus fermentum* được phân lập từ thực phẩm lên men như dưa cải và kim chi, có khả năng sản xuất gamma aminobutyric acid (GABA) cao, từ đó tăng cường giá trị dinh dưỡng cho sản phẩm [9]. Việc tối ưu hóa

quy trình lên men bằng các chủng *Lactobacillus* phù hợp từ nguồn lên men truyền thống có thể mang lại những sản phẩm sữa chua chất lượng cao hơn, giàu probiotic và có lợi cho sức khỏe.

Đậu xanh là một nguồn thực phẩm giàu dinh dưỡng với hàm lượng protein và chất xơ cao, cùng với các loại vitamin và khoáng chất phong phú, có thể trở thành nguồn nguyên liệu tiềm năng cho quá trình lên men lactic. Đặc biệt, việc sử dụng đậu xanh để lên men lactic không chỉ giúp gia tăng giá trị dinh dưỡng mà còn mở ra triển vọng cho các sản phẩm từ thực vật thay thế sữa chua từ sữa động vật. Tiềm năng thành công của việc lên men lactic từ đậu xanh là rất lớn, đặc biệt trong bối cảnh người tiêu dùng ngày càng quan tâm đến các sản phẩm từ thực vật và lợi ích sức khỏe của chúng [10].

Vì vậy, để sản xuất sữa chua từ đậu xanh, việc phân lập và sàng lọc thêm các chủng *Lactobacillus* có khả năng lên men hiệu quả là rất quan trọng. Những chủng vi khuẩn này không chỉ giúp nâng cao hương vị mà còn mang lại nhiều lợi ích sức khỏe cho người sử dụng.

Ngoài ra, gần đây *Lactobacillus* đã được phân loại lại thành nhiều chi mới, nhằm phân loại một cách chính xác hơn dựa trên sự khác biệt về đặc điểm di truyền và sinh lý học. Việc phân loại lại này mở rộng khả năng nghiên cứu và ứng dụng của từng chi cụ thể trong công nghệ thực phẩm và sức khỏe. Những chi mới này có thể đem đến các đặc tính lên men khác biệt, tạo cơ hội mới cho việc phát triển các sản phẩm sữa chua từ đậu xanh và các nguyên liệu thực vật khác.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và môi trường nuôi cấy

Sung muối, dưa muối, đậu tương, đậu xanh lên men, đậu xanh + đường lên men, đậu xanh + muối lên men, sữa chua, sữa chua uống probi, sữa chua uống yakult và kim chi thu mua tại các chợ, siêu thị trên địa bàn TP Hà Nội được sử dụng là nguồn phân lập vi sinh vật.

Chủng vi khuẩn kiểm định bao gồm *Salmonella* sp., *Escherichia coli* và *Staphylococcus* cung cấp bởi Khoa Tài nguyên và Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Sữa là sữa bò tươi nguyên chất 100% của Công ty Cổ phần Sữa Ba Vì.

Hạt đậu xanh PMT được sản xuất bởi Công ty TNHH Thương mại Dịch vụ Phú Minh Tâm.

Đường: Đường kính trắng, có dạng tinh thể màu trắng tinh khiết, sản xuất tại Công ty Cổ phần Đường Quảng Ngãi, nhãn hiệu Select.

Chủng vi khuẩn lactic thương mại *Lactobacillus* YC35 của Công ty Daniso, Pháp.

Môi trường MRS để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn với thành phần (g/l): glucose (20 g), peptone (10 g), cao thịt (10 g), cao nấm men (5 g), CaCO₃ (5 g), tween 80 (1 g), diamoniumcitrat (2 g), MgSO₄.7H₂O (0,58 g), MnSO₄.4H₂O (0,28 g), K₂HPO₄ (2 g), thạch (15 g), nước cất [11].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng vi khuẩn Lactobacillus từ thực phẩm lên men: Mẫu dịch lên men (ml) được pha loãng với nước cất vô trùng theo tỷ lệ 10:90 và sau đó thực hiện pha loãng tuần tự. Từ dung dịch đã được pha loãng, lấy 0,1 ml và nhỏ đều lên đĩa thạch có chứa môi trường MRS, sau đó trang đều bề mặt cho đến khi khô. Mẫu được ủ ở 37°C trong 24 đến 48 giờ. Quá trình cấy truyền được thực hiện nhiều lần để đảm bảo thu được các khuẩn lạc đồng nhất trên mỗi đĩa petri [12].

Xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa: Tế bào vi khuẩn được nhận diện bằng kính hiển vi với vật kính 100X. Các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm gram, xác định khả năng phân giải CaCO₃, thử nghiệm catalase và xác định khả năng di động.

Tuyển chọn chủng vi khuẩn Lactobacillus: Khả năng sinh axit lactic: Tiến hành nuôi cấy các chủng vi khuẩn phân lập được trong môi trường MRS lỏng. Sau đó, sử dụng phương pháp chuẩn độ Therner xác định hàm lượng axit tạo ra. Từ đó, xác định ra các chủng sinh axit cao nhất.

Khả năng tạo enzyme ngoại bào được xác định bằng phương pháp đục lỗ thạch [12]. Các chủng vi khuẩn lactic được hoạt hóa trong môi trường MRS lỏng và nuôi trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, dịch nuôi được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C để thu lấy dịch nổi. Đục lỗ có đường kính 5 mm trên đĩa thạch môi trường. Mỗi lỗ thạch được nhỏ 0,1 ml dịch nổi và để ở 4°C trong 2 giờ để dịch thấm vào thạch. Tiếp theo, đĩa thạch được ủ ở 37°C trong 48 giờ để cơ chất quanh lỗ thạch bị phân giải. Hoạt tính enzyme được đánh giá bằng cách đo đường kính vùng phân giải cơ chất quanh lỗ thạch, theo công thức D-d, trong đó D là đường kính vùng phân giải và d là đường kính lỗ thạch (5 mm).

Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh được thực hiện thông qua phương pháp khuếch tán thạch của M.A. Herreros và cs (2005) [13]. Các chủng nghiên cứu được nuôi trong môi trường MRS lỏng ở 30°C trong khoảng 18-20 giờ. Vi khuẩn kiểm định được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 30°C. Mật độ vi khuẩn gây bệnh được điều chỉnh đến 10⁸ CFU/ml (McFarland 0,5) và 30 µl dịch vi khuẩn được trải đều lên toàn bộ bề mặt đĩa thạch. Lỗ thạch được khoan và dịch ly tâm đã chỉnh pH được nhỏ vào các lỗ này, sau đó giữ ở 4°C trong 4 giờ để dịch khuếch tán. Đĩa thạch sau đó được ủ ở 30°C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định dựa trên vòng ức chế quanh lỗ thạch, hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi sinh vật được tính theo công thức $\Delta D = D-d$, trong đó D là đường kính vòng kháng khuẩn và d là đường kính lỗ thạch.

Xác định điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn Lactobacillus thích hợp: Chủng *Lactobacillus* đã sàng lọc sẽ được nuôi cấy tinh trong môi trường MRS lỏng đến khi mật độ đạt 10⁸ CFU/ml. Các yếu tố về nguồn dinh dưỡng, pH, nhiệt độ, thời gian, tốc độ lắc và tỷ lệ tiếp giống sẽ được khảo sát tại các khoảng cụ thể như sau:

- Nguồn dinh dưỡng: Hàm lượng các thành phần trong môi trường nuôi cấy MRS đã được trình bày ở phần 2.1. Trong thí nghiệm này, các nguồn cung cấp nitơ và carbon khác sẽ được khảo sát để tìm nguồn dinh dưỡng phù hợp nhất. Hàm lượng nitơ và carbon lần lượt là 10 và 20 g (trung đương môi trường MRS chuẩn).

+ Nguồn nitơ: peptone, CNM, cao thịt, tryptone.

+ Nguồn carbon: glucose, saccharose, lactose, fructose.

- pH: 4, 5, 6, 7 và 8.

- Nhiệt độ: 25, 30, 35, 40, 45°C.

- Thời gian: Sau 8 giờ nuôi cấy lấy mẫu xác định mật độ quang để lập đường cong sinh trưởng từ đó xác định thời gian nuôi cấy thích hợp.

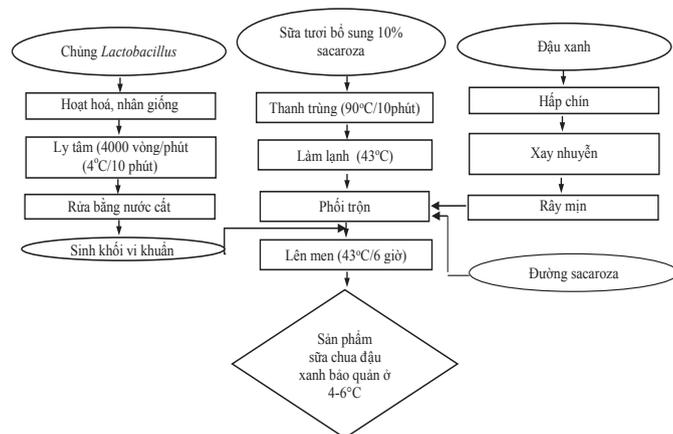
- Tốc độ lắc: 150, 200, 250 vòng/phút.

- Tỷ lệ tiếp giống: 3, 5, 7, 10, 12%.

Chỉ tiêu theo dõi của các thí nghiệm: mật độ vi khuẩn, khả năng sinh axit lactic.

Thử nghiệm sản xuất sữa chua đậu xanh từ chủng Lactobacillus: Sữa tươi được thanh trùng ở 90°C trong 10 phút để loại bỏ các vi sinh vật gây hại. Sau đó, sữa được làm nguội xuống 43°C để bắt đầu quá trình lên men. Đồng thời,

đậu xanh được hấp chín, nghiền nhuyễn và bổ sung vào sữa với tỷ lệ 10% (w/v), tương ứng 100 g đậu xanh cho mỗi 1 lít sữa. Quá trình nghiền nhuyễn giúp đậu xanh dễ dàng hoà quyện vào sữa, tạo độ sánh mịn và cung cấp thêm chất dinh dưỡng như protein và chất xơ. Sau khi hỗn hợp sữa và đậu xanh được chuẩn bị, chủng vi khuẩn *Lactobacillus* đã phân lập được bổ sung vào hỗn hợp. Quá trình lên men diễn ra ở nhiệt độ 43°C trong 6 giờ. Trong thời gian này, vi khuẩn sẽ chuyển đổi đường thành axit lactic, làm đông đặc hỗn hợp và tạo độ chua cho sữa chua. Khi quá trình lên men hoàn tất, sữa chua đậu xanh được làm nguội và bảo quản ở nhiệt độ 4-6°C để duy trì chất lượng và ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật không mong muốn (hình 1). Sản phẩm cuối cùng mong muốn có cấu trúc đặc, mịn và có hương vị hài hòa giữa vị chua nhẹ và vị bùi của đậu xanh. Chất lượng cảm quan và hóa lý của sữa được đánh giá để lựa chọn công thức phù hợp.



Hình 1. Quy trình dự kiến sản xuất sữa chua đậu xanh.

Phương pháp phân tích: Hàm lượng protein xác định theo TCVN 8099-1:2015 - Sữa và sản phẩm sữa - xác định hàm lượng nitơ - phần 1: nguyên tắc Kjeldahl và tính protein thô; hàm lượng chất khô hòa tan tổng số được xác định theo TCVN 7771:2007; hàm lượng axit hữu cơ tổng số được xác định theo TCVN 5483:1991.

Phương pháp đánh giá cảm quan: Mẫu sản phẩm sữa chua đậu xanh sẽ được đánh giá cảm quan theo thang điểm 9 Hedonic. Số lượng thành viên đánh giá là 12 người ở các độ tuổi và giới tính khác nhau, đã được đào tạo về phương pháp đánh giá cảm quan thực phẩm. Các mẫu sữa chua được mã hóa trước khi đưa cho các thành viên. Thang điểm 1-9 được mô tả như sau: điểm 1: cực kỳ không thích; điểm 2: rất không thích; điểm 3: không thích; điểm 4: tương đối không thích; điểm 5: không thích cũng không ghét; điểm 6: tương đối thích; điểm 7: thích; điểm 8: rất thích; điểm 9: cực kỳ thích.

Phương pháp xử lý số liệu: Kết quả là số liệu trung bình 3 lần phân tích lặp lại và độ lệch chuẩn. Sự khác biệt của giá trị trung bình giữa các công thức được đánh giá nhờ ANOVA, so sánh Tukey ($p \leq 0,05$).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập chủng vi khuẩn *Lactobacillus*

Từ các mẫu thực phẩm lên men đã phân lập được 19 khuẩn lạc vi khuẩn nghi ngờ là chủng *Lactobacillus*, kết quả xác định một số đặc điểm sinh lý và khả năng sinh axit lactic của các chủng được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập và xác định đặc điểm sinh lý của các chủng vi khuẩn.

TT	Mẫu	Ký hiệu chủng	Hình thái tế bào	Gram	Khả năng phân giải CaCO ₃	Catalase	Khả năng di động	Hàm lượng axit (g/l)
1	Cà pháo muối	CP1	Hình cầu, xếp chuỗi	+	+	-	-	-
2		CP2	Hình cầu, đơn lẻ	+	+	-	-	-
3		DC1	Que ngắn, kết đôi	+	+	-	-	17,67
4	Dưa chua	DC2	Que ngắn, đơn lẻ	+	+	-	-	6,70
5		DC3	Que dài, đơn lẻ	+	+	-	-	6,02
6	Đậu tương	DT1	Que ngắn, đơn lẻ, xếp chuỗi	+	+	-	-	12,94
7		DT2	Cầu, đơn	+	+	-	-	-
8	Đậu xanh	DX1	Que ngắn, đơn lẻ	+	+	-	-	16,92
9	lên men	DX2	Que ngắn, kết đôi	+	+	-	-	9,16
10	Đậu xanh+đường	DD1	Que ngắn, đơn lẻ, xếp chuỗi	+	+	-	-	18,50
11		DD2	Que dài, xếp chuỗi	+	+	+	-	9,01
12	Đậu xanh+muối	DM1	Cầu, đơn	+	+	-	-	-
13		DM2	Que dài, kết đôi	+	+	-	-	10,21
14	Sữa chua	SC	Cầu, xếp chuỗi	+	+	-	-	-
15	Sữa chua uống Probi	PB	Que ngắn, kết đôi	+	+	-	-	15,60
16	Sữa chua uống Yakult	YK	Que ngắn, đơn	+	+	-	-	16,92
17		KC1	Que dài, đơn	+	+	-	-	12,18
18	Kim chi	KC2	Que ngắn, xếp chuỗi	+	+	-	-	16,80
19		KC3	Que dài, kết đôi	+	+	-	-	15,66

Ghi chú: (+) có khả năng; (-) không có khả năng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, có 14 chủng vi khuẩn phân lập được có hình thái tế bào dạng que và hầu hết đều không có khả năng di động. Đây là những đặc điểm sinh học quan trọng để định hướng sàng lọc các chủng thuộc chi *Lactobacillus*. Đáng chú ý, tất cả 14 chủng này đều có

khả năng sinh axit lactic, với nồng độ dao động từ 6,02 đến 18,50 g/l. Trong số đó, chủng DC3 có khả năng sinh axit thấp nhất (6,02 g/l), trong khi chủng DD1 có khả năng sinh axit lactic cao nhất 18,50 g/l. Những kết quả này tương đồng với nghiên cứu trước đây về hàm lượng axit lactic do các chủng *Lactobacillus* sinh ra [14].

Tiếp theo, đặc điểm probiotic bao gồm: khả năng sinh enzyme ngoại bào và khả năng kháng các vi sinh vật gây bệnh của 7 chủng có khả năng sinh axit lactic cao nhất sẽ được xác định để lựa chọn ra những chủng phù hợp nhất sử dụng cho lên men sữa chua đậu xanh. Kết quả được trình bày trong các phần tiếp theo.

3.2. Xác định hoạt tính probiotic của các chủng tuyển chọn

Khả năng sinh enzyme ngoại bào: Sữa chua đậu xanh chứa nhiều thành phần dinh dưỡng như tinh bột, protein từ các loại hạt, vậy để vi khuẩn sinh trưởng và lên men tốt trong môi trường sữa hạt đòi hỏi vi khuẩn cần có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào như protease (phân giải protein) và amylase (phân giải tinh bột). Kết quả xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của 7 chủng vi sinh vật phân lập được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng *Lactobacillus*.

STT	Ký hiệu chủng	Hoạt tính enzyme (D-d, mm)	
		Phân giải protein	Phân giải tinh bột
1	DC1	5,28	-
2	DX1	3,17	2,97
3	DD1	3,62	4,20
4	KC2	8,23	5,40
5	KC3	2,20	-
6	YK	5,33	-
7	PB	4,12	-

Ghi chú: D: Đường kính phân giải; d: Đường kính lỗ thạch; (-): Không thể hiện hoạt tính.

Kết quả từ bảng 2 cho thấy, cả 7 chủng *Lactobacillus* phân lập được đều thể hiện khả năng sinh enzyme protease với đường kính phân giải từ 2,20 đến 8,23 mm và có 3 chủng sinh enzyme amylase là DX1, DD1, KC2 với đường kính vòng phân giải dao động từ 2,97 đến 5,40 mm. Trong đó, chủng KC2 có hoạt tính hai loại enzyme mạnh. Kết quả về khả năng phân giải protein tương tự với nghiên cứu khả năng sinh enzyme ngoại bào của N.T.T. Huynh và cs (2019) [15].

Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh: Khả năng kháng các vi sinh vật gây bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh của các chủng *Lactobacillus*.

STT	Chủng	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>
1	DC1	7,50	8,33	14,75
2	DX1	3,10	6,17	-
3	DD1	3,63	5,73	13,67
4	KC2	6,27	6,63	17,17
5	KC3	4,17	5,17	-
6	YK	3,17	7,17	8,83
7	PB	4,70	3,67	11,50

Ghi chú: (-): Không thể hiện hoạt tính.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, cả 7 chủng vi khuẩn phân lập đều tạo vòng vô khuẩn khi tương tác với *E. coli*, với đường kính vô khuẩn từ 3,10-7,50 mm. Hai chủng DC1 và KC2 có khả năng kháng *E. coli* mạnh nhất, đạt đường kính vô khuẩn lần lượt là 7,50 và 6,27 mm, trong khi chủng DX1 có khả năng kháng yếu nhất (3,10 mm). Theo quy ước của A.B. Galindo (2004) [16], cả 7 chủng đều kháng *E. coli*, trong đó 5 chủng (DX1, DD1, KC3, YK, PB) có mức kháng yếu (đường kính vô khuẩn 1-5 mm), còn 2 chủng (DC1, KC2) kháng ở mức trung bình (đường kính vô khuẩn 6-20 mm).

Đối với *Staphylococcus*, 5/7 chủng có khả năng đối kháng, với đường kính vô khuẩn 8,83-17,17 mm. Chủng KC2 thể hiện khả năng kháng tốt nhất với đường kính vô khuẩn 17,17 mm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu về khả năng kháng *Staphylococcus* của các chủng *Lactobacillus* trong sữa chua truyền thống Ma-rốc (đường kính vô khuẩn ≥ 6 mm) [17].

Ngoài ra, tất cả các chủng vi khuẩn phân lập đều kháng *Salmonella*, với đường kính vô khuẩn 3,67-8,33 mm và chủng DC1 có đường kính vô khuẩn lớn nhất là 8,33 mm. Các nghiên cứu trước đây cũng đã ghi nhận nhiều loài *Lactobacillus* có khả năng tạo ra protein diệt khuẩn mạnh như nghiên cứu của Q.K. Hoang và cs (2011) [18] về hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus*.

Như vậy, trong số 19 chủng vi khuẩn phân lập được từ 10 nguồn lên men khác nhau, chúng tôi chọn được 2 chủng vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* là DC1 và KC2 có khả năng sinh axit lactic cao và đặc tính probiotic phù hợp sử dụng để lên men sữa chua đậu xanh. Kết quả xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp để nhân giống 2 chủng này được trình bày trong các phần kế tiếp.

3.3. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Thành phần môi trường: Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng sinh trưởng và khả năng sinh axit trong môi trường nuôi cấy của hai chủng được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy đến khả năng lên men và mật độ tế bào của hai chủng DC1 và KC2.

Chủng	Yếu tố	Mật độ vi khuẩn (10 ⁸ CFU/ml)	Hàm lượng axit (g/l)	
DC1	Đối chứng	MRS (glucose hoặc peptone)	7,17	17,30
		Saccarose	5,97	15,94
	Nguồn C	Lactose	2,83	14,68
		Fructose	1,89	13,51
		CNM	5,565	15,67
Nguồn N	Cao thịt	7,315	16,62	
	Tryptone	3,38	13,60	
KC2	Đối chứng	MRS (glucose hoặc peptone)	10,15	16,62
		Saccarose	10,7	15,04
	Nguồn C	Lactose	5,655	15,45
		Fructose	1,71	10,31
		CNM	5,95	15,99
Nguồn N	Cao thịt	4,355	15,58	
	Tryptone	2,695	14,91	

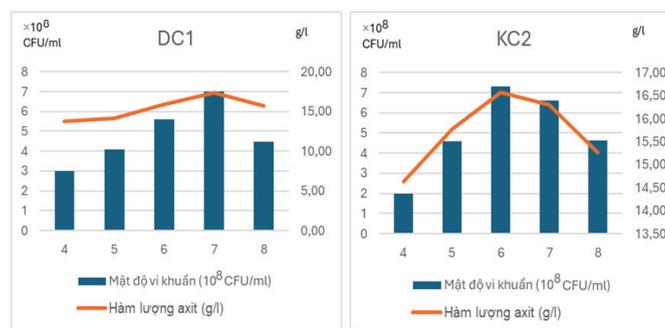
Các nguồn carbon khác nhau đã được sử dụng để nuôi cấy hai chủng DC1 và KC2, bao gồm glucose (MRS chuẩn), saccarose, lactose và fructose. Trong đó, MRS chuẩn là nguồn carbon tốt nhất, với hàm lượng axit tạo thành ở DC1 và KC2 lần lượt là 17,30 và 16,62 g/l, mật độ vi khuẩn đạt $7,17 \times 10^8$ và $10,15 \times 10^8$ CFU/ml.

Tuy nhiên, ở chủng KC2, môi trường saccarose thay thế tạo ra mật độ vi khuẩn cao hơn so với MRS chuẩn, đạt $10,7 \times 10^8$ CFU/ml, trong khi hàm lượng axit lactic giảm không đáng kể so với MRS chuẩn.

Hầu hết các môi trường nuôi vi khuẩn lactic thường được bổ sung nguồn nitơ, yếu tố quan trọng cho việc sản xuất sinh khối. Khi thay thế các nguồn nitơ hữu cơ trong MRS bằng cao nấm men, cao thịt và tryptone, mật độ tế bào và hàm lượng axit của cả hai chủng DC1 và KC2 giảm dần theo thứ tự: peptone > cao nấm men > cao thịt > tryptone.

Như vậy, sau quá trình khảo sát, chúng tôi đã chọn môi trường MRS chuẩn cho DC1 và môi trường MRS thay thế saccarose cho KC2 để áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

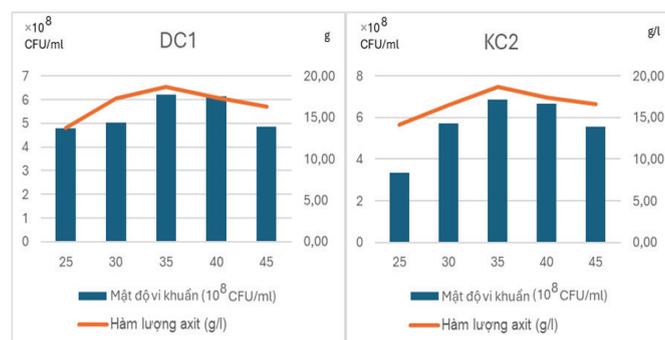
pH: pH đóng vai trò quan trọng đối với sinh khối và sản phẩm bacteriocin của vi khuẩn lactic vì quá trình tổng hợp, hấp phụ và phân hủy protein đều phụ thuộc vào pH. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của hai chủng DC1 và KC2 được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng lên men và mật độ tế bào của hai chủng DC1 và KC2.

Chủng DC1 sinh trưởng tốt trong khoảng pH 5-8, với mật độ vi khuẩn tăng từ pH 5-7 và giảm từ pH 7-8, đạt cao nhất ở pH 6-7. Tại pH 7, mật độ tế bào đạt $6,985 \times 10^8$ CFU/ml và hàm lượng axit 17,39 g/l, cho thấy khả năng chịu pH thấp tốt. Chủng KC2 cũng đạt mật độ vi khuẩn và hàm lượng axit cao nhất ở pH 6-7, với mật độ tế bào $7,3 \times 10^8$ CFU/ml và hàm lượng axit 16,57 g/l ở pH 6. Do đó, pH 6,5 được chọn để nuôi cấy cả hai chủng. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của G. Enan và cs (2006) [19] về *L. plantarum* ở pH 6,5 là điều kiện tối ưu cho sinh khối và hợp chất kháng khuẩn.

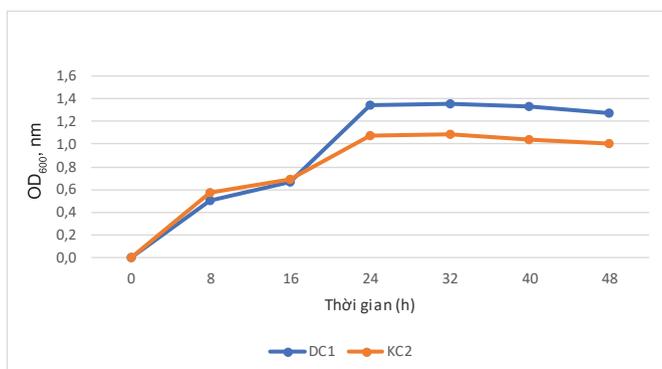
Nhiệt độ: Tiến hành nuôi cấy hai chủng DC1 và KC2 trong môi trường MRS tại các nhiệt độ 25, 30, 35, 40 và 45°C. Khả năng sinh trưởng của hai chủng ở các nhiệt độ khác nhau thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng lên men và mật độ tế bào của hai chủng DC1 và KC2.

Mật độ vi khuẩn và hàm lượng axit tăng khi nhiệt độ đạt đến 40°C, với giá trị cao nhất quan sát được trong khoảng 35-40°C. Quá 40°C nhiệt độ ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng vì hầu hết vi khuẩn lactic ưa trung bình, phát triển tối ưu ở 35-40°C và các hoạt động trao đổi chất, bao gồm sản xuất bacteriocin, cũng diễn ra trong khoảng nhiệt độ này. Nhiệt độ 37°C được chọn để nuôi cấy cả hai chủng trong các nghiên cứu tiếp theo.

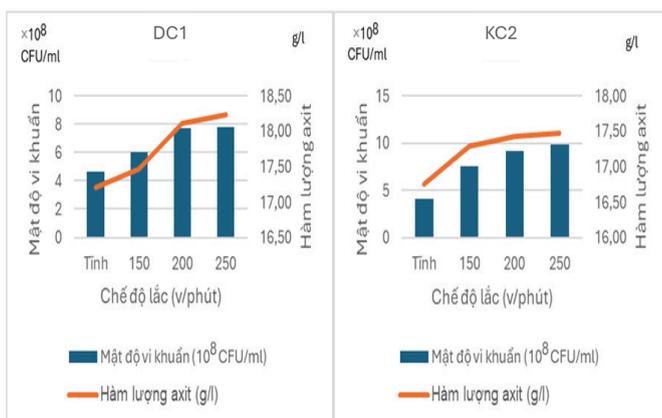
Thời gian: Để thu được hàm lượng sinh khối tối đa, cần xác định được thời gian lên men hiệu quả. Đường cong sinh trưởng của hai chủng DC1 và KC2 được thể hiện trong hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh trưởng của hai chủng DC1 và KC2.

Dựa trên kết quả hình 4, thời gian nuôi cấy tối ưu là 24-32 giờ. Với DC1, mật độ tế bào cao nhất đạt OD₆₀₀=1,34 nm sau 24 giờ, kèm theo hàm lượng axit cao nhất. Mặc dù KC2 có OD cao hơn sau 32 giờ so với 24 giờ, sự chênh lệch này không đáng kể. Do đó, để rút ngắn thời gian lên men, cả hai chủng sẽ được nuôi cấy trong 24 giờ.

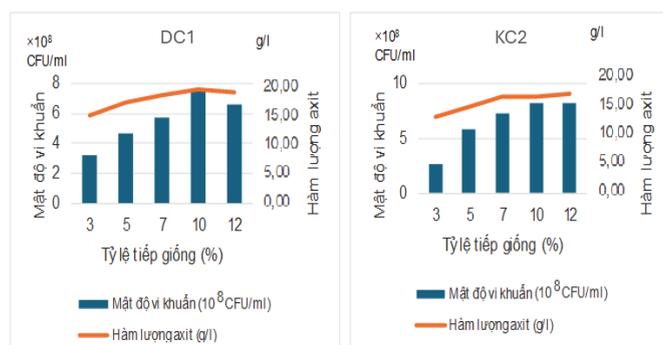
Tốc độ lắc: Tốc độ lắc có tác dụng đảo trộn môi trường và phân tán đều dinh dưỡng, làm tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng của tế bào (hình 5). Hình 5 cho thấy ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của hai chủng DC1 và KC2.



Hình 5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng lên men và mật độ tế bào của hai chủng DC1 và KC2.

Kết quả cho thấy, mật độ vi khuẩn và hàm lượng axit trong môi trường nuôi cấy tăng dần khi tăng tốc độ lắc. Trong trường hợp nuôi cấy tĩnh, vi khuẩn vẫn phát triển nhưng phát triển kém hơn so với nuôi lắc. Tốc độ lắc thích hợp cho cả hai chủng DC1 và KC2 là 200 vòng/phút.

Tỷ lệ tiếp giống ảnh hưởng rất nhiều đến thời gian nuôi cấy và hiệu quả kinh tế. Một tỷ lệ tiếp giống thích hợp sẽ rút ngắn được thời gian nuôi cấy, tạo được lượng sinh khối lớn. Ảnh hưởng này được thể hiện trong hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến khả năng lên men và mật độ tế bào của hai chủng DC1 và KC2.

Tỷ lệ tiếp giống và hàm lượng axit có mối quan hệ tỷ lệ thuận. Đối với chủng DC1, khi tỷ lệ tiếp giống vượt quá 10%, mật độ vi khuẩn giảm, có khả năng do tác động ức chế sinh trưởng từ nồng độ giống quá cao. Do đó, tỷ lệ tiếp giống 10% được xác định là tối ưu cho DC1. Đối với chủng KC2, mật độ vi khuẩn và hàm lượng axit tiếp tục tăng theo tỷ lệ tiếp giống nhưng sự khác biệt giữa tỷ lệ 10 và 12% là không đáng kể. Để đạt hiệu quả kinh tế và tối ưu sử dụng giống, tỷ lệ tiếp giống 10% được lựa chọn cho KC2.

3.4. Ứng dụng lên men sữa chua đậu xanh

Sữa chua đậu xanh được sản xuất theo quy trình như hình 1 ở trên. Sau khi chuẩn bị xong bố trí 3 công thức thí nghiệm bao gồm: ĐC (đối chứng): Sử dụng chủng vi khuẩn thương mại; CT1 (công thức 1): Sử dụng chủng DC1 và CT2 (công thức 2): Sử dụng chủng KC2. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Chất lượng cảm quan của sữa chua đậu xanh.

Mẫu	Màu sắc	Mùi	Vị	Trạng thái
ĐC	5,15 ^c	4,98 ^c	5,16 ^c	5,98 ^c
CT1	4,23 ^d	4,25 ^d	4,04 ^d	4,73 ^d
CT2	5,81 ^a	5,29 ^a	5,64 ^a	6,95 ^a

Các số liệu theo cột có chữ cái khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$); ĐC: Sử dụng chủng thương mại; CT1: Sử dụng chủng *Lactobacillus* DC1; CT2: *Lactobacillus* KC2.

Công thức ĐC sử dụng giống thương mại YC35 với tỷ lệ bổ sung 0,02%, cho ra sản phẩm sữa chua có chất lượng cảm quan tốt, mang hương vị đặc trưng hài hòa của sữa chua kết hợp với đậu xanh. Công thức CT1, sử dụng chủng *Lactobacillus* DC1, mặc dù tạo ra axit lactic, nhưng không đạt được hương vị và cấu trúc mong muốn. Ngược lại, CT2 sử dụng chủng *Lactobacillus* KC2 đã cho ra sản phẩm sữa chua ổn định nhất trong các công thức, với hương vị dễ chịu và trạng thái đồng mịn hấp dẫn. Sản phẩm sữa chua CT2 được phân tích đánh giá thêm một số chỉ tiêu hóa lý cơ bản để so sánh với công thức ĐC. Kết quả thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Một số chỉ tiêu hóa lý của sữa chua công thức 2 và đối chứng.

Chỉ tiêu	CT2	ĐC
Hàm lượng protein (%)	3,5±0,1	3,2±0,1
TSS (°Bx)	12,0±0,2	12,5±0,2
Hàm lượng axit tổng số (%)	1,1±0,05	1,0±0,05

Kết quả phân tích hóa lý cho thấy, sữa chua CT2 có một số ưu điểm nổi bật so với sữa chua ĐC, phù hợp với kết quả đánh giá cảm quan. Chất khô hòa tan tổng số (TSS) của CT2 thấp hơn một chút (12,0±0,2 °Brix so với 12,5±0,2 °Brix), cho thấy sản phẩm có độ ngọt dịu và hương vị hài hòa, phù hợp với đánh giá cảm quan về hương vị. Hàm lượng axit hữu cơ tổng số cao hơn (1,1±0,05% so với 1,0±0,05%) tạo độ chua cân đối, tạo cảm giác tươi mát, được đánh giá tích cực hơn trong cảm quan. Các chỉ tiêu này góp phần khẳng định sự phù hợp của chủng *Lactobacillus* mới trong sản xuất sữa chua đậu xanh chất lượng cao.

4. Kết luận

Từ 10 nguồn phân lập, đã thu được 19 khuẩn lạc vi khuẩn lactic, trong đó 7 chủng có khả năng sinh axit cao nhất (15,60-17,67 g/l) được tuyển chọn. Đáng chú ý, hai chủng *Lactobacillus* DC1 và KC2 thể hiện hoạt tính enzyme protease, amylase, cùng khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh vượt trội. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho hai chủng này bao gồm: môi trường MRS chuẩn với pH 6,5, nhiệt độ 37°C, thời gian 24 giờ, tốc độ lắc 200 vòng/phút, nguồn nitơ và carbon giữ nguyên đối với DC1, trong khi nguồn carbon của KC2 được thay thế bằng saccarose. Thử nghiệm lên men sữa chua đậu xanh cho thấy, sản phẩm từ chủng KC2 đạt chất lượng cảm quan và hóa lý tốt, thể hiện tiềm năng ứng dụng trong sản xuất quy mô lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L.B. Barrientos, A.H. Mendoza, M.T. Llanez, et al. (2016), "Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food", *Journal of Dairy Science*, **99**(6), pp.4099-4110, DOI: 10.3168/jds.2015-10054.

[2] M. Ayyash, A.S.A. Dhaheri, S.A. Mahadin, et al. (2018), "In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk", *Journal of Dairy Science*, **101**(2), pp.900-911, DOI: 10.3168/jds.2017-13400.

[3] L.H. Jimenez, I. Guillouard, E. Guedon, et al. (2009), "Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism", *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(7), pp.2062-2073, DOI: 10.1128/aem.01984-08.

[4] A.N. Hassan, R. Ipsen, T. Jansen, et al. (2003), "Microstructure and rheology of yoghurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharide", *Journal of Dairy Science*, **86**(5), pp.1632-1638, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73748-5.

[5] X. Ao, X. Zhang, X.L. Shi, et al. (2012), "Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products", *Journal of Dairy Science*, **95**(3), pp.1073-1084, DOI: 10.3168/jds.2011-4224.

[6] K. Çakmakoglu, S. Vurmaz, M. Bezirci, et al. (2023), "Isolation and characterization of yogurt starter cultures from traditional yogurts and growth kinetics of selected cultures under lab-scale fermentation", *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **53**(4), DOI: 10.1080/10826068.2022.2098325.

[7] B.N. Ong, T.D. Lam, T.L. Le, et al. (2020), "Isolation, identification and evaluation of lactic acid synthesis of bacteria in traditional fermented products in Vietnam", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **991**(1), DOI: 10.1088/1757-899X/991/1/012059.

[8] D.D. Pan, Z. Wu, T. Peng, et al. (2014), "Volatile organic compounds profile during milk fermentation by *Lactobacillus pentosus* and correlations between volatiles flavor and carbohydrate metabolism", *Journal of Dairy Science*, **97**(2), pp.624-631, DOI: 10.3168/jds.2013-7131.

[9] C.T. Phuc, D.T. Vinh, T.K. My, et al. (2021), "Study on conditions for gamma butyric acid (GABA) production in *Lactobacillus fermentum* A01 isolated from human", *Research Journal of Pharmacy and Technology*, **14**(4), pp.2188-2190.

[10] S.M.N. Sudhakaran, D.S. Bukkan (2021), "A review on nutritional composition, antinutritional components and health benefits of green gram (*Vigna radiata* (L.) *Wilczek*)", *Journal of Food Biochemistry*, **45**(6), DOI: 10.1111/jfbc.13743.

[11] R.D. Ayivi, S.A. Ibrahim, A.I. Krastanov, et al. (2022), "Nitrogen source: An effective component for the growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*", *Journal of Dairy Research*, **89**(3), pp.316-322, DOI: 10.1017/S0022029922000541.

[12] Q.H. Vu, T.Y. Vu, T.T.T. Nguyen (2022), "Isolation and selection of lactic acid bacteria for probiotic beverage production from ginger", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **20**(12), pp.1581-1590 (in Vietnamese).

[13] M.A. Herreros, H. Sandoval, L. Gonzalez, et al. (2005), "Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese)", *Food Microbiol.*, **22**(5), pp.455-459, DOI: 10.1016/j.fm.2004.11.007.

[14] M.D. Linh, D.M. Phuong, P.T. Tuyet, et al. (2008), "Biological characteristics of lactic acid bacterial strains isolated from Hanoi area", *Journal of Science - Vietnam National University - Hanoi*, **24**, pp.211-226 (in Vietnamese).

[15] N.T.T. Huynh, L.H.D. Nguyen, T.T.S. Pham (2019), "Isolation and selection of probiotic potential *Lactobacillus* strains from taro (*Colocasia esculenta* (L.) Shott)", *CTU Journal of Science*, **55**(1), pp.15-23 (in Vietnamese).

[16] A.B. Galindo (2004), *Lactobacillus Plantarum 44A as a Live Feed Supplement for Freshwater Fish*, Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, ISBN 90-5808-943-6.

[17] J. Naoual, A. Benjouad, M. Bouksaim (2011), "Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products", *Microbiology Research Journal International*, **1**(4), pp.79-94, DOI: 10.9734/BMRJ/2011/438.

[18] Q.K. Hoang, T.L.T. Pham (2011), "Isolation, classification and identification of potential probiotic *Lactobacillus* strains from infant faeces", *Science and Technology Development Journal*, **14**(1), pp.1-8 (in Vietnamese).

[19] G. Enan, A. Alamri (2006), "Novel plantaricin UG1 production by *Lactobacillus plantarum* UG1 in enriched whey permeate in batch fermentation process", *The Journal of Food, Agriculture and Environment*, **4**(2), pp.84-88.