

SỬ DỤNG VI KHUẨN PROBIOTIC *Lactobacillus* TRONG LÊN MEN SỮA ĐẬU NÀNH

Nguyễn Thị Lâm Đoàn^{1*}, Đào Thị Mỹ Hạnh¹, Nguyễn Tiến Thành², Nguyễn Hoàng Anh¹

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội

*Tác giả liên hệ: nlddoan@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.10.2022

Ngày chấp nhận đăng: 20.12.2022

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là tạo sự đa dạng về sản phẩm thực phẩm từ đậu nành. Nghiên cứu này đã thử nghiệm bổ sung các chủng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* trong việc tạo sản phẩm sữa đậu nành lên men probiotic. Bằng phương pháp nuôi cấy xác định mật độ tế bào, khả năng lên men sữa đậu nành của 3 chủng probiotic *Lactobacillus*: *Lactobacillus plantarum* D4.3, *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 được phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống đã được khảo sát. Kết quả nghiên cứu chỉ ra chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3 0,02% (v/v) với nồng độ tế bào 10^{10} CFU/ml sau 6h lên men cho mật độ tế bào cao nhất 10^5 CFU/ml có khả năng thích nghi với môi trường sữa đậu nành. Chủng này được bổ sung vào sữa đậu nành, tiến hành lên men và xác định pH, độ axit, mật độ tế bào và đánh giá cảm quan cho thấy *Lactobacillus plantarum* D4.3 tỉ lệ tiếp giống 0,5% (v/v) với nồng độ tế bào 10^{10} CFU/ml và thời gian lên men 12h cho sản phẩm sữa đậu nành sau 15 ngày bảo quản ở nhiệt độ 4-6°C đảm bảo về chất lượng cảm quan, lượng vi khuẩn probiotic là 10^8 CFU/ml.

Từ khóa: *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum*, probiotic, sữa đậu nành lên men.

Application of Probiotic *Lactobacillus* in Production of Soymilk Yoghurt

ABSTRACT

The purpose of this study is to create a variety of soy food products. This research supplemented *Lactobacillus* probiotic to produce probiotic soymilk yoghurt. Using culture method to determine the density of cells, the soymilk fermentation capacity of 3 *Lactobacillus* probiotic strains, *Lactobacillus plantarum* D4.3, *Lactobacillus pentosus* D4.10, and *Lactobacillus fermentum* D5.5 isolated from traditional fermented foods was investigated. The results showed that *Lactobacillus plantarum* D4.3 0.02% (v/v) with cell concentration 10^{10} CFU/ml after 6 hours of fermentation yielded the highest cell density 10^5 CFU/ml. This strain was able to adapt to soy milk environment. Preliminary application of this strain for soymilk fermentation and determination of pH, acidity, cells density and sensory evaluation indicated that *Lactobacillus plantarum* D4.3 with 0.5% (v/v) with cell concentration 10^{10} CFU/ml at fermented time 12h was suitable for soymilk yoghurt. The sensory quality and concentration of probiotic bacteria with 10^8 CFU/ml of this product were kept after 15 days preserved at 4-6°C.

Keywords: *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum*, probiotic, fermented soymilk.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu nành là một trong những loại hạt với hàm lượng dinh dưỡng cao. Theo Li & cs. (2015), hầu hết các giống đậu tương thương mại được trồng ở các bang miền Tây của Hoa Kỳ có hàm lượng là 40% protein, 20% thành phần lipid và 30% carbohydrate. Ngoài ra, trong hạt đậu nành còn có nhiều chất có hoạt tính sinh học

bao gồm isoflavone, saponin, flavonoid, axit phytic, phytosterol và chất ức chế trypsin (Sanjukta & Rai, 2016). Các chất này có chức năng sinh học khác nhau như chống ung thư, làm thay đổi hormone, hạ cholesterol máu và chống oxy hóa, giảm huyết áp... (Medic & cs., 2014). Chính vì vậy, sữa đậu nành được coi là đồ uống giảm thiểu các bệnh như ung thư tuyến tiền liệt, các bệnh tim mạch, tiểu đường và kiểm

soát huyết áp (Jayachandran & Xu., 2019). Chúng có thể thay thế sữa bò và là một sản phẩm bổ sung dinh dưỡng cho những người không dung nạp được lactose (Trần Thị Hà Ny & cs., 2015).

Tuy nhiên, việc tiêu thụ sữa đậu nành cũng mang lại vấn đề cho người tiêu dùng là hiện tượng đầy hơi do sự có mặt của raffinose, stachyose (Lawrence & cs., 2008). Theo Mital & Steinkraus (1975), quá trình lên men sữa đậu nành bằng cách sử dụng vi khuẩn lactic có thể loại bỏ được raffinose và stachyose, làm giảm chứng đầy hơi, khó chịu, ngăn ngừa gan nhiễm mỡ (Kitawaki & cs., 2009), điều chỉnh sự chuyển hóa cholesterol (Mitsuru & cs., 2012) và tăng cường hoạt tính chống ung thư (Lai & cs., 2013). Ngoài ra, quá trình lên men sữa đậu nành được coi là quá trình quan trọng để cải thiện thời hạn sử dụng, kết cấu, hương thơm và hương vị sản phẩm (Ahsan & cs., 2020). Chính vì vậy, sản phẩm lên men lactic từ sữa đậu nành được nhiều nhà khoa học quan tâm, ngoài việc sử dụng giống khởi động truyền thống *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus bulgaricus* (Trindade & cs., 2001; Karleskind & cs., 1991; Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà, 2020), ngày nay, người tiêu dùng còn quan tâm đến các sản phẩm có giá trị chức năng là đậu nành lên men bổ sung probiotic. Vi khuẩn probiotic được định nghĩa là các vi sinh vật sống mà khi được sử dụng với số lượng vừa đủ, sẽ gia tăng các lợi ích về sức khỏe của người tiêu dùng (Hassan & cs., 2003). Đa số các vi khuẩn probiotic bổ sung vào đồ uống đều thuộc dòng vi khuẩn *Lactobacillus* (Lourens & Viljoen, 2001). Quá trình lên men sữa đậu nành bởi các loài thuộc chi *Lactobacillus* tạo enzyme thủy phân protein, carbohydrate và lipid giúp quá trình tiêu hóa dễ dàng hơn góp phần làm tăng giá trị của sản phẩm (Rai & Jeyaram, 2015; Sanjukta & cs., 2015). Do đó, việc nghiên cứu tạo ra sản phẩm sữa đậu nành lên men bởi các chủng *Lactobacillus* có hoạt tính probiotic có lợi cho sức khỏe là cần thiết. Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu sữa đậu nành lên men bởi các chủng probiotic *Lactobacillus* như Ahsan & cs. (2020) đã sử dụng *Lactobacillus acidophilus* và *Lactobacillus casei* có hoạt tính probiotic

trong lên men sữa đậu nành tạo ra sản phẩm lợi khuẩn tốt cho sức khỏe đường ruột. Nghiên cứu khác của Rekha & Vijayalakshmi (2011) đã lên men sữa đậu nành bởi một số chủng probiotic *Lactobacillus acidophilus* B4496, *Lactobacillus bulgaricus* CFR2028, *Lactobacillus casei* B1922, *Lactobacillus plantarum* B4495 và *Lactobacillus fermentum* B4655.

Tuy nhiên, ứng dụng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* để lên men sữa đậu nành ở Việt Nam còn hạn chế. Trên cơ sở một số chủng *Lactobacillus* đã được xác định loài có một số đặc tính probiotic (Nguyen & cs., 2013; Nguyễn Thị Lâm Đoàn, 2018). Nghiên cứu này đã sử dụng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* trong tạo sản phẩm sữa đậu nành lên men góp phần đa dạng hóa sản phẩm sữa đậu nành tận dụng được nguồn nguyên liệu đậu nành có giá trị dinh dưỡng cao.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hạt đậu nành Phương Lâm được cung cấp bởi Công ty Nông sản gia vị Phương Trang (hạt đậu tròn mẩy, đồng đều, có màu vàng sáng, hạt kém chất lượng như sâu mọt, hư hỏng ít, tỉ lệ hạt lép, hạt nứt vỡ thấp).

Vi khuẩn *Lactobacillus* có hoạt tính probiotic bao gồm *Lactobacillus plantarum* D4.3, *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 được phân lập từ nem chua và dưa muối lưu giữ tại Bộ môn Hóa sinh - Công nghệ sinh học thực phẩm, Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Nguyen & cs., 2013; Nguyễn Thị Lâm Đoàn, 2018)

Môi trường De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) dịch thể và MRS agar nuôi cấy và hoạt hóa *Lactobacillus* (De Man & cs., 1960).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị chủng vi khuẩn probiotic

Các chủng vi khuẩn được tiến hành nuôi cấy, nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường MRS ở nhiệt độ 37°C để xác định thời gian thu sinh khối tốt nhất bổ

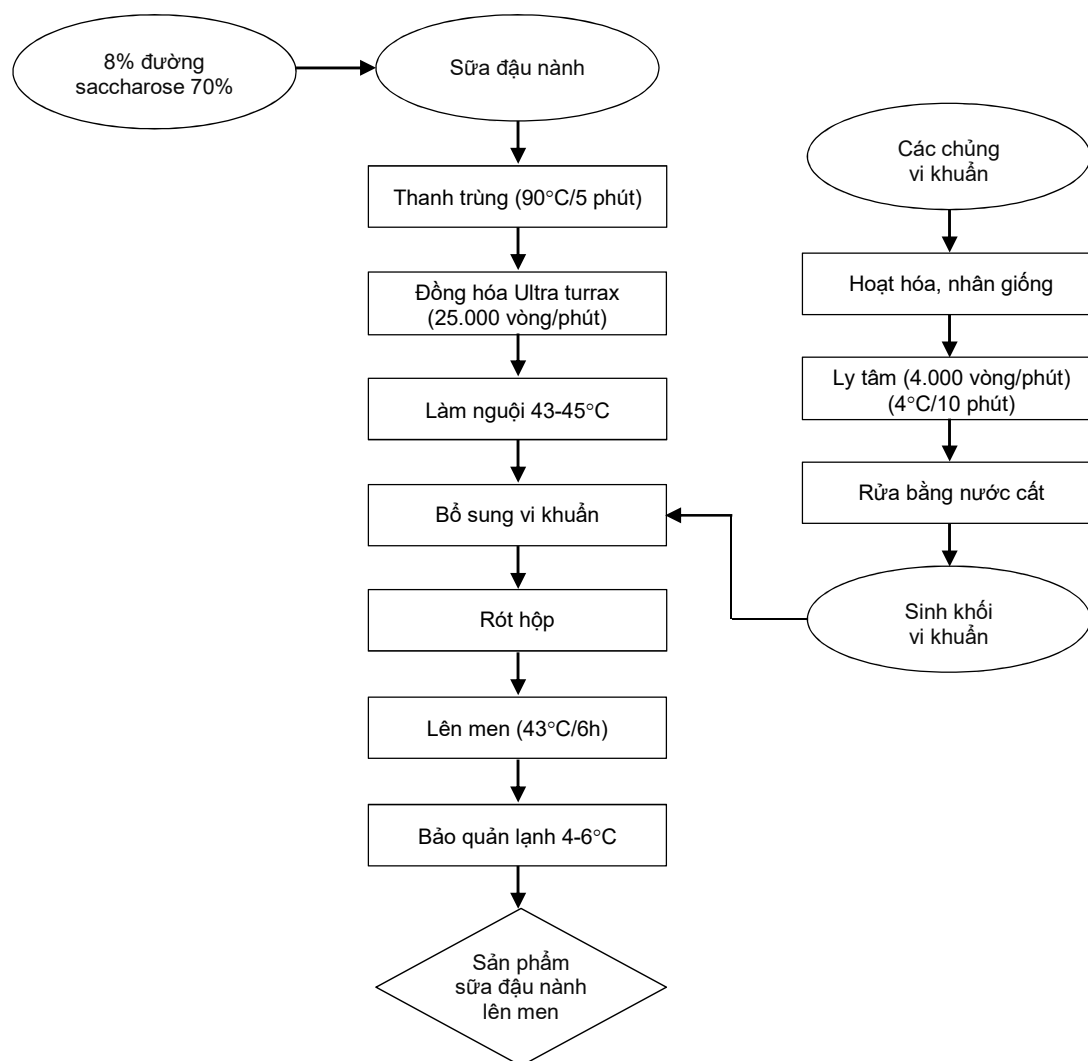
sung vào dịch sữa đậu nành. Dịch vi khuẩn thu được tiến hành ly tâm 4.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, loại bỏ dịch thu được cặn vi khuẩn, rửa sạch lại bằng nước cất từ 2-3 lần và tiến hành bổ sung vào dịch sữa đậu nành (Nguyễn Thị Lâm Đoàn & cs., 2021).

2.2.2. Chuẩn bị dịch sữa đậu nành

Đậu nành được làm sạch, loại bỏ tạp chất và hạt không đảm bảo chất lượng, ngâm trong nước ở nhiệt độ phòng trong 6-8h, cứ 2h thay nước một lần để tránh xảy ra quá trình lên men. Hạt đậu nành sau đó được tách vỏ, nghiền với nước theo tỉ lệ đậu: nước là 1:5 (w/w) bằng máy xay trong 5 phút và sau đó được lọc bằng vải lọc (Nguyễn Đức Doan & cs., 2009).

2.2.3. Chuẩn bị sữa đậu nành lên men

Quy trình sản xuất sữa đậu nành lên men bổ sung vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* thể hiện trong hình 1. Đường saccharose nồng độ 70% được bổ sung vào sữa đậu nành theo tỉ lệ 8% (v/v) (Trần Thị Hà Ny & cs., 2015) và thanh trùng ở 90°C trong 5 phút. Dịch sữa sau khi thanh trùng được tiến hành đồng hóa nhằm tạo nên hỗn hợp sữa đồng nhất làm nguội dịch sữa xuống 43 - 45°C rồi tiến hành bổ sung các chủng *Lactobacillus* vào sữa đậu nành theo tỉ lệ thích hợp và tiến hành lên men. Kết thúc quá trình lên men sữa đậu nành được bảo quản lạnh ở 4-6°C (Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà, 2020; Nguyễn Đức Doan & cs., 2009).



Nguồn: Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà (2020); Nguyễn Đức Doan & cs. (2009).

Hình 1. Quy trình thí nghiệm tạo đậu nành lên men bổ sung probiotic *Lactobacillus*

2.2.4. Bố trí thí nghiệm

2.2.4.1. Xác định thời gian nhân giống các chủng vi khuẩn *Lactobacillus*

Chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3, *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 được nuôi cấy tăng sinh, pha loãng và cấy vào môi trường MRS để có mật độ ban đầu khoảng 10^6 CFU/ml trong bình nuôi cấy. Sau đó tiến hành khảo sát sự tăng trưởng của chủng tại thời điểm 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 40h trong môi trường MRS lỏng nuôi ở 37°C. Tại mỗi thời điểm tiến hành thu mẫu và khảo sát khả năng sinh trưởng bằng cách đo OD_{620nm} , xây dựng đường cong sinh trưởng của các chủng (Lê Ngọc Thùy Trang & Phạm Minh Nhựt, 2014).

2.2.4.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Lactobacillus* phù hợp cho lên men sữa đậu nành thông qua mật độ tế bào chủng sau lên men

Để tuyển chọn được chủng *Lactobacillus* phù hợp cho lên men sữa đậu nành, các chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* D4.3, *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 có hoạt tính probiotic được sử dụng để tạo ra sản phẩm sữa đậu nành lên men như mô tả ở hình 1. Dịch sữa đậu nành được thanh trùng ở 90°C trong 5 phút rồi làm nguội xuống 43-45°C. Sữa đậu nành được chia làm 3 phần bằng nhau và lần lượt bổ sung các chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3, *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 ở mật độ vi khuẩn ban đầu là 10^{10} CFU/ml với tỉ lệ 0,02 % (v/v) tiến hành lên men ở nhiệt độ 43°C trong vòng 6h (Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà, 2020; Nguyễn Đức Doan & cs., 2009). Sau khi lên men, theo dõi chỉ tiêu mật độ vi khuẩn probiotic của sản phẩm để chọn ra chủng vi khuẩn thích hợp cho lên men.

2.2.4.3. Khảo sát ảnh hưởng tỉ lệ tiếp giống và thời gian lên men thích hợp đến quá trình lên men sữa đậu nành của chủng tuyển chọn

Chủng được tuyển chọn ở thí nghiệm 2.2.4.2. Nếu kết quả chủng tuyển chọn đó có mật độ tế bào CFU/ml chưa đạt được mức tối thiểu probiotic trong sản phẩm thì nghiên cứu

tiến hành nâng tỉ lệ tiếp giống của chủng tuyển chọn lên 0,1 và 0,5% và khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ tiếp giống đó và thời gian lên men đến quá trình lên men sữa đậu nành. Ở thí nghiệm này sản phẩm sữa đậu nành lên men được tiến hành như mô tả ở hình 1 với chủng được tuyển chọn tỉ lệ tiếp giống 0,1% và 0,5% (v/v) và lên men các thời gian 6, 12, 18 và 24h (Huỳnh Phan Phương Trang, 2018). Sản phẩm sau các thời gian lên men sẽ được đánh giá các tiêu chí: pH, độ axit, mật độ vi khuẩn để chọn ra tỉ lệ tiếp giống và thời gian lên men thích hợp.

2.2.4.4. Đánh giá chất lượng cảm quan sản phẩm

Sản phẩm sữa đậu nành lên men bởi chủng, tỉ lệ và thời gian lên men đã lựa chọn ở thí nghiệm 2.2.4.3. được bảo quản ở nhiệt độ 4-6°C trong 15 ngày. Sau đó tiến hành đánh giá cảm quan tại thời điểm sau lên men và bảo quản 15 ngày (Nguyễn Đức Doan & cs., 2009).

2.2.4.5. Khảo sát sự biến thiên mật độ vi khuẩn probiotic trong quá trình bảo quản sản phẩm

Sản phẩm đậu nành lên men được bảo quản ở nhiệt độ 4-6°C trong 15 ngày (Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà, 2020). Theo dõi mật độ tế bào vi khuẩn probiotic trong sản phẩm theo các ngày 0, 3, 6, 9, 12, 15 ngày bảo quản.

2.2.5. Phương pháp phân tích

Xác định mật độ tế bào vi khuẩn probiotic: Đếm mật độ vi khuẩn trên môi trường MRS agar theo TCVN 7906: 2008.

Xác định pH: Xác định bằng máy đo pH (ORION 230A⁺)

Xác định axit lactic sinh ra (%): Chuẩn độ dung dịch NaOH 0,1N theo TCVN 4589-88.

Đánh giá cảm quan: Mẫu sữa đậu nành lên men bằng chủng vi khuẩn probiotic được đánh giá cảm quan về các chỉ tiêu màu sắc, mùi, vị và trạng thái, theo thang điểm 9 Hedonic. Số lượng thành viên tham gia đánh giá là 30 người. Các mẫu sữa chua uống 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 kì thích (Hà Duyên Tư, 2010; Ahsan & cs., 2020).

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai một nhân tố (oneway ANOVA) và so sánh cặp đôi các giá trị trung bình theo tiêu chuẩn Turkey bằng phần mềm Minitab 16.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định thời gian nhân giống các chủng vi khuẩn *Lactobacillus*

Kết quả hình 2 cho thấy mỗi chủng vi khuẩn đều có thời gian sinh trưởng và phát triển khác nhau. Tuy nhiên, cả 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* D4.3, *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 từ 0-4h với mật độ tế bào tăng không đáng kể, trong khoảng từ 4-28h chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* D4.3 và 4-32h đối với chủng *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 sinh trưởng và phát triển mạnh. Sau khi tế bào đạt cực đại thì hàm lượng các chất dinh dưỡng trong môi trường bị giảm, tế bào tự phân và bị ức chế bởi các sản phẩm trao đổi chất tạo ra trong môi trường làm cho mật độ tế bào giảm dần (Nguyễn Lâm Dũng & cs., 2017). Do đó, thời gian lên men thu hồi sinh khối của các chủng probiotic D4.3 là 28h, hai chủng D4.10 và D5.5 là 32h. Nghiên cứu này cũng đồng nhất với kết quả nghiên cứu Lê Ngọc Thùy Trang & Phạm Minh Nhựt (2014), tác giả cũng xác định 28h là thời điểm chủng *Lactobacillus plantarum* SC01 sinh trưởng mạnh nhất với mật độ tế bào của chủng này trong môi trường cao nhất.

3.2. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn *Lactobacillus* phù hợp cho lên men sữa đậu nành thông qua mật độ tế bào chủng sau lên men sữa đậu nành

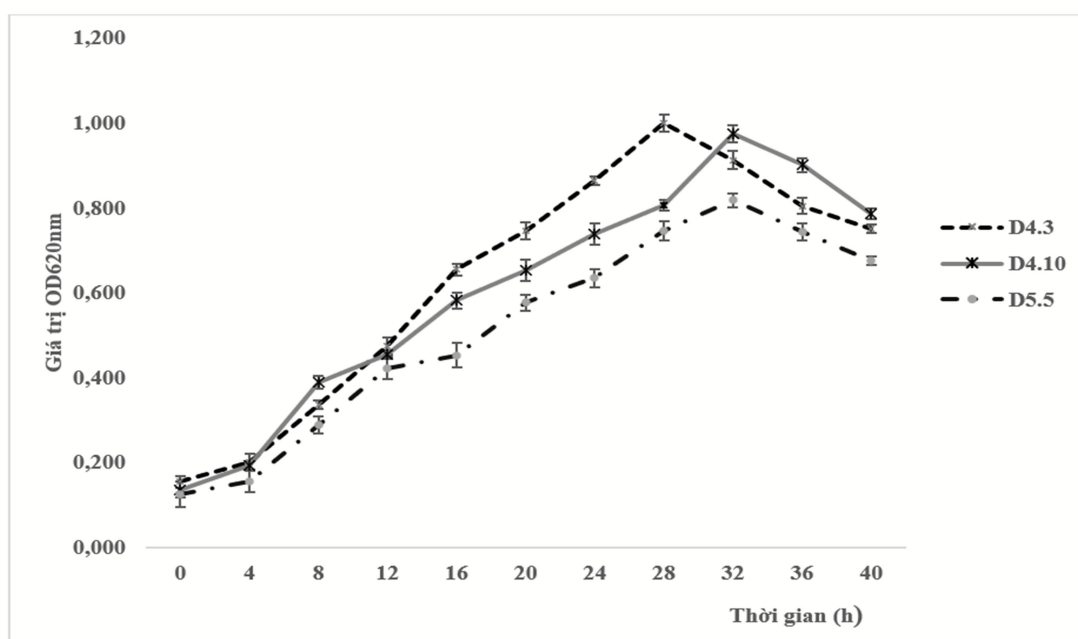
Kế thừa nghiên cứu của Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà (2020) tạo sản phẩm sữa chua đậu nành nảy mầm lên men bởi *Lactobacillus bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* với tỉ lệ tiếp giống 0,02% và thời gian lên men 6h. Các chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* D4.3,

Lactobacillus pentosus D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 trong nghiên cứu này cũng được lên men 6h và tỉ lệ tiếp giống 0,02%. Kết quả cho thấy sau khi kết thúc lên men mật độ vi khuẩn của chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3 là 10^5 CFU/ml còn chủng *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5 đều đạt 10^4 CFU/ml trong sản phẩm sữa đậu nành lên men. Như vậy, chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3 đạt mật độ tế bào cao hơn so với hai chủng *Lactobacillus pentosus* D4.10, *Lactobacillus fermentum* D5.5. Như vậy, chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3 thích nghi với môi trường sữa đậu nành hơn chủng D4.10 và D5.5 và sẽ được sử dụng cho lên men sữa đậu nành ở các thí nghiệm tiếp theo. Tuy nhiên, *Lactobacillus plantarum* D4.3 thích nghi với môi trường sữa đậu nành nhưng để mang lại lợi ích cho sức khỏe, mật độ vi khuẩn probiotic trong sản phẩm tối thiểu là 10^6 - 10^7 CFU/ml (Shah, 2000; Dinh & Shah, 2008). Harish & Varghese (2006) cũng cho rằng ở ngưỡng này, các vi khuẩn probiotic có khả năng mang lại lợi ích cho sức khỏe con người. Ngoài ra, theo TCVN 7030:2016 về sữa lên men, mật độ tế bào vi khuẩn trong sữa lên men cũng phải đạt tối thiểu 10^6 CFU/ml. Vì vậy, việc tăng tỉ lệ tiếp giống chủng probiotic *Lactobacillus plantarum* D4.3 cho sản phẩm sữa đậu nành lên men là cần thiết.

3.3. Ảnh hưởng tỉ lệ giống *Lactobacillus plantarum* D4.3 đến quá trình lên men sữa đậu nành

3.3.1. Ảnh hưởng tỉ lệ giống *Lactobacillus plantarum* D4.3 tới chỉ tiêu mật độ vi khuẩn probiotic qua thời gian lên men

Bảng 2 cho thấy các chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3 phát triển tốt trong dịch sữa đậu nành lên men ở hai tỉ lệ tiếp giống 0,1% và 0,5%. Sau 6 giờ lên men dịch sữa đậu nành, các chủng có mật độ tế bào đạt lần lượt là 10^7 và 10^9 CFU/ml. Mật độ tế bào đạt giá trị cao ở tỉ lệ giống 0,1% tại thời gian lên men 18h là $7,1 \times 10^8$ CFU/ml và 0,5% giống tại thời gian lên men 12h là $7,4 \times 10^9$ CFU/ml. Như vậy mật độ tế bào cao nhất với tỉ lệ giống 0,5% tại thời điểm lên men là 12h.



Hình 2. Đường cong sinh trưởng của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus*

Bảng 1. Mật độ của chủng *Lactobacillus* sau lên men với tỉ lệ tiếp giống 0,02%

Chủng vi khuẩn	<i>Lactobacillus plantarum</i> D4.3	<i>Lactobacillus pentosus</i> D4.10	<i>Lactobacillus fermentum</i> D5.5
Mật độ vi khuẩn (CFU/ml)	$5,2 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$

Bảng 2. Mật độ *Lactobacillus plantarum* D4.3 với các tỉ lệ tiếp giống theo thời gian lên men

Tỉ lệ tiếp giống tại các thời điểm		Mật độ vi khuẩn (CFU/ml)
0,1% (v/v)	6h	$6,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
	12h	$5,3 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$
	18h	$7,1 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	24h	$7,4 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
0,5% (v/v)	6h	$6,2 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
	12h	$7,4 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^9$
	18h	$7,9 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$
	24h	$4,8 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$

Ở các thời điểm lên men, cả hai tỉ lệ tiếp giống 0,1% và 0,5% đều đạt yêu cầu về mật độ tối thiểu tế bào probiotic trong sữa lên men là 10^6 - 10^7 CFU/ml. Theo TCVN 7030:2016 và một số nghiên cứu đã chỉ ra, để mang lại lợi ích cho sức khỏe, mật độ vi khuẩn probiotic trong sản phẩm tối thiểu là 10^6 - 10^7 CFU/ml (Shah, 2000; Dinh & Shah, 2008). Sản phẩm sữa đậu nành lên men tiếp tục được đánh giá chỉ tiêu pH và

hàm lượng axit lactic (%) để xác định tỉ lệ giống thích hợp.

3.3.2. Ảnh hưởng tỉ lệ giống *Lactobacillus plantarum* D4.3 tới các chỉ tiêu pH, hàm lượng axit qua thời gian lên men

Sự biến đổi pH và hàm lượng axit lactic của sữa đậu nành lên men ở tỉ lệ tiếp giống 0,1% và 0,5% theo thời gian được thể hiện qua

hình 3. Kết quả cho thấy độ axit tăng và pH giảm theo thời gian lên men. Khi bổ sung vào sữa đậu nành ở các tỉ lệ tiếp giống khác nhau có sự tạo thành axit và pH cũng khác nhau. Do số lượng giống cấy vào trong sữa đậu nành ở tỉ lệ 0,5% cao hơn tỉ lệ 0,1%, nên vi khuẩn phát triển dồi dào, quá trình hoạt động tạo ra axit lactic diễn ra nhanh hơn dẫn đến độ pH thấp hơn so với mẫu được cấy *Lactobacillus plantarum* D4.3 ở tỉ lệ 0,1%. Tại 6h lên men ở tỉ lệ tiếp giống 0,5% pH của sản phẩm sữa đậu nành là 4,4 còn ở tỉ lệ tiếp giống 0,1% pH vẫn còn cao là 5,0. pH giảm mạnh tại thời điểm 6-12h ở 2 tỉ lệ tiếp giống 0,5% và 0,1% (Hình 3). Điều này có thể là do vi sinh vật phát triển mạnh trong giai đoạn này tương ứng ở pha logarit theo lí thuyết, số lượng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* D4.3 tăng dần và đạt cực đại, dẫn đến làm giảm pH tại thời điểm 12h đạt 4,2-4,6. Sau 12h giá trị pH giảm không đáng kể. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Trần Thị Hà Ny & cs. (2015) khi nghiên cứu sản xuất sữa chua đậu nành đã cho rằng từ 4-16h pH giảm mạnh, sau 16h giá trị pH giảm không đáng kể. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã chỉ ra sữa lên men có chất lượng tốt thường có pH là 4,2-4,6 (Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà, 2020; Thien Trung Le, 2012).

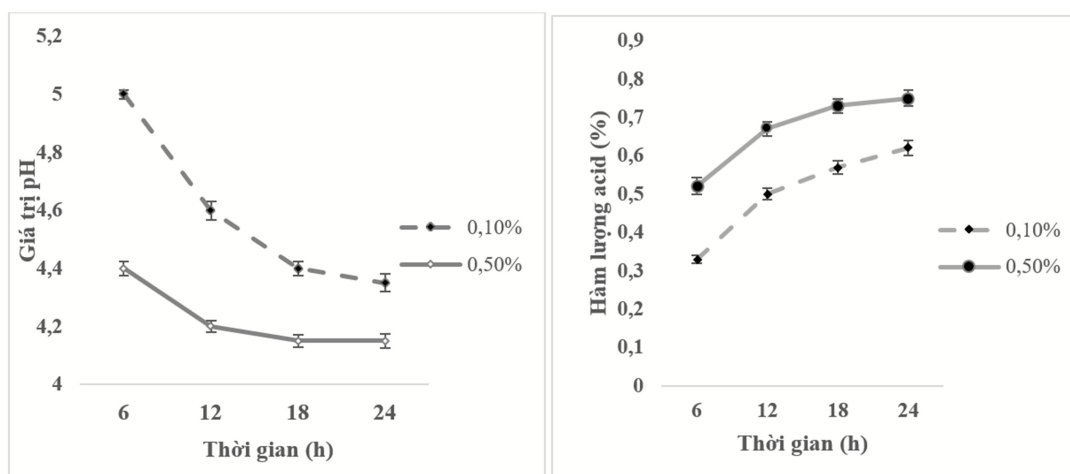
Hình 3 chỉ ra hàm lượng axit lactic của các mẫu sữa được lên men bởi chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3 ở tỉ lệ tiếp giống 0,5% tại 6h và

12h có độ axit lần lượt là 0,52% và 0,67% cao hơn ở tỉ lệ tiếp giống là 0,1% độ axit 0,33% và 0,5%. Axit lactic được sinh ra tạo hương vị cho sản phẩm đồ uống lên men. Phần lớn các vi khuẩn lactic có khả năng tạo thành từ 0,5 đến 1,5 % axit lactic, một số loài có thể tạo ra tới 3% (Lâm Xuân Thanh, 2003). Ngoài ra, theo TCVN 7030:2016 về sữa lên men hàm lượng axit lactic tối thiểu là 0,3%. Do đó, ở cả 2 tỉ lệ tiếp giống 0,1 và 0,5%, giá trị pH, hàm lượng axit lactic trong sản phẩm sữa đậu nành lên men đều đạt ngưỡng cho phép.

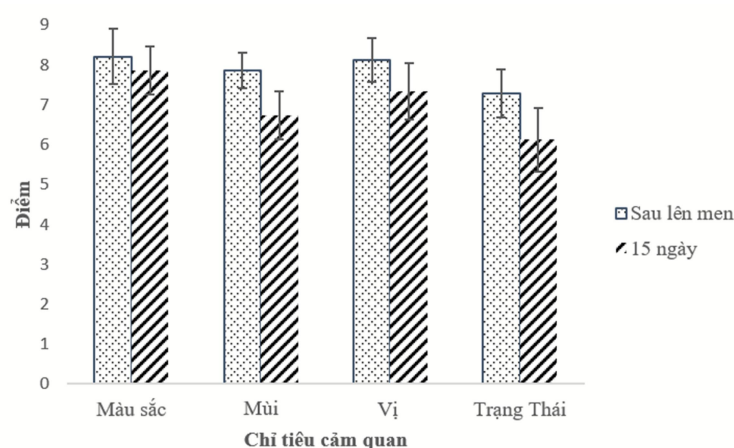
Tuy nhiên, để rút ngắn thời gian lên men tỉ lệ tiếp giống *Lactobacillus plantarum* D4.3 0,5% và thời gian lên men 12h được chọn và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Việc rút ngắn thời gian lên men giúp giảm chi phí sản xuất và tránh tạp nhiễm vì khi thời gian lên men kéo dài thì các vi sinh vật tạp nhiễm trong môi trường lên men dễ phát triển và sẽ gây hư hỏng sản phẩm (Trần Thị Hà Ny & cs., 2015).

3.4. Các chỉ tiêu cảm quan của sản phẩm sữa đậu nành bổ sung *Lactobacillus plantarum* D4.3

Kết quả đánh giá cảm quan về các chỉ tiêu màu sắc, mùi, vị và trạng thái của sản phẩm sữa đậu nành lên men bởi *Lactobacillus plantarum* D4.3 ở tỉ lệ tiếp giống 0,5% tại thời điểm sau 12h lên men và thời gian bảo quản 15 ngày thể hiện hình 4.



Hình 3. Sự thay đổi giá trị pH và hàm lượng axit của sữa đậu nành lên men bởi *Lactobacillus plantarum* D4.3 theo thời gian



Hình 4. Các chỉ tiêu cảm quan của sữa chua đậu nành sau lên men và 15 ngày bảo quản

Trong bất kỳ sản phẩm thực phẩm nào, màu sắc là những thuộc tính chính ảnh hưởng đến quan điểm, nhận thức và sự chấp nhận của người tiêu dùng (Granato & cs., 2010). Nói chung, người tiêu dùng mong muốn sản phẩm sữa đậu nành có màu trắng ngà. Do đó, các nhà sản xuất thương mại có xu hướng duy trì màu sắc tự nhiên này của đậu tương mà không cần thêm chất tạo màu (Ahsan & cs., 2020). Trong nghiên cứu này, màu sắc của sữa đậu nành sau lên men và 15 ngày bảo quản không có sự thay đổi nhiều vẫn giữ được màu trắng ngà của đậu nành, điểm đánh giá cảm quan màu sắc sau 15 ngày bảo quản là 7,86.

Ngoài ra, sự nhận biết về sản phẩm còn phụ thuộc vào mùi, vị. Điểm đánh giá của chỉ tiêu mùi và vị của sản phẩm tuy có giảm nhẹ theo thời gian bảo quản nhưng vẫn giữ được chất lượng ở mức tương đối thích đối với mùi là 6,73 và thích đối với vị là 7,34. Quá trình lên men sữa đậu nành tạo cơ hội thay đổi các đặc điểm cảm quan của thực phẩm làm từ đậu nành đặc biệt mùi và vị do tạo axit lactic (Ahsan & cs., 2020). Một nhóm các nhà khoa học Khiralla & cs. (2009) đã nghiên cứu về sữa đậu nành lên men probiotic và phát hiện ra những cải thiện đáng kể về mùi và hương vị do sử dụng probiotics trong quá trình lên men sữa đậu nành so với sữa đậu nành chưa lên men. Ara & cs. (2002) cho rằng điều này có thể là do các axit hữu cơ và chất tạo hương vị được tạo ra bởi vi khuẩn probiotic trong sữa đậu nành. Hơn thế nữa, lên men trong sữa đậu nành

cải thiện chất lượng cảm quan của sản phẩm cuối cùng bằng cách chuyển hóa n-hexanal gây ra hương vị béo ngậy trong sữa đậu nành (Mühlhans & cs., 2015).

Trong 4 chỉ tiêu này, chỉ tiêu về trạng thái sau lên men và sau 15 ngày bảo quản có điểm cảm quan thấp hơn các chỉ tiêu khác. Sau 15 ngày bảo quản bắt đầu có hiện tượng tách lớp nhẹ với điểm đánh giá cảm quan là 6,12 tương đối thích. Điều này có thể lý giải trong sữa đậu nành không có đường lactose như trong sữa bò, là một loại disaccharide có thể được chuyển hóa dễ dàng bởi nhiều loại vi sinh vật khác nhau ảnh hưởng đến sản phẩm sữa đậu nành lên men (Je & Chin, 2000). Ngoài ra, trong sữa đậu nành không có protein casein như trong sữa bò, mà thay vào đó là các protein có phân tử lượng cao, nên khả năng tạo gel trong quá trình lên men cũng kém hơn trong sữa bò (Trần Thị Hà Ny & cs., 2015). Tuy nhiên, mẫu sữa đậu nành lên men sau 15 ngày bảo quản vẫn đạt ở mức đánh giá cảm quan tương đối thích.

Như vậy, sau khi kết thúc lên men: sản phẩm sữa chua đậu nành có màu trắng ngà, kết cấu đồng nhất, sánh mịn và không tách nước. Sữa chua có mùi thơm đặc trưng của đậu nành và vị chua ngọt hài hòa. Sau 15 ngày bảo quản: sản phẩm sữa chua vẫn giữ màu trắng ngà nhưng kết cấu sản phẩm xuất hiện hiện tượng tách nước nhẹ. Sữa chua vẫn giữ được mùi thơm đặc trưng của đậu nành và vị chua ngọt hài hòa.

Bảng 3. Mật độ *L. plantarum* D4.3 trong sữa đậu nành lên men trong thời gian bảo quản

Thời gian (ngày)	CFU/ml
0	$7,4 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^9$
3	$7,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
6	$6,5 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
9	$8,9 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
12	$5,6 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
15	$1,3 \times 10^8 \pm 0,5 \times 10^8$

3.5. Sự biến thiên mật độ vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum* D4.3 trong thời gian bảo quản

Kết quả mật độ probiotic trong sản phẩm đậu nành lên men *Lactobacillus plantarum* D4.3 trong 15 ngày được chỉ ra ở bảng 3. Trong 6 ngày đầu bảo quản, mật độ vi khuẩn có giảm nhẹ, từ ngày 9-15 mật độ vi khuẩn có giảm nhiều hơn. Nguyên nhân do thời gian bảo quản càng dài thì các chất dinh dưỡng trong môi trường được vi sinh vật sử dụng để tăng sinh khối ngày càng giảm, số tế bào chết đi nhiều hơn làm giảm mật số vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* (Đoàn Anh Dũng & cs., 2015). Một số nghiên cứu đã chỉ ra khả năng tồn tại của các vi khuẩn probiotic trong sản phẩm trên thị trường thường thấp hơn nồng độ quy định 10^6 - 10^7 CFU/ml và ít mang lại lợi ích cho sức khỏe (Anonymous, 1992; Shah & cs., 1995; Dinh & Shah, 2008). Tuy nhiên, sau 15 ngày số lượng chủng *Lactobacillus plantarum* D4.3 là $1,3 \times 10^8$ CFU/ml sản phẩm đạt tiêu chuẩn probiotic.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tuyển chọn chủng probiotic *Lactobacillus plantarum* D4.3 có khả năng thích nghi với môi trường sữa đậu nành. Sữa đậu nành lên men bởi vi khuẩn *L. plantarum* D4.3 với tỉ lệ 0,5%, lên men trong 12h có chất lượng cảm quan, lượng vi khuẩn probiotic *L. plantarum* D4.3 trên 10^8 CFU/ml đạt yêu cầu sau 15 ngày bảo quản. Kết quả này sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo để ứng dụng chủng *L. plantarum* D4.3 trong sản xuất đồ uống lên men với các nguồn nguyên liệu khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahsan S., Adnan K., Muhammad F.J.C., Muhammad N., Amir A.D., Miroslava H, Maksim R., Mars K., Ivan M., Larisa M. & Mohammad A.S. (2020). Functional exploration of bioactive moieties of fermented and non-fermented soy milk with reference to nutritional attributes. *Journal of Microbiology Biotechnology Food Sciences*. 10(1): 145-149.
- Ara K., Yoshimatsu T., Ojima M., Kawai S. & Okubo K. (2002). Effect of new lactic acid fermentation on sensory taste of fermented soy milk. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*. 49(6): 377-387.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2008). TCVN 7906:2008. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - phương pháp định lượng vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình - kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2008). TCVN 4589 - 88 về Đồ hộp - Phương pháp xác định hàm lượng axit tổng số và axit bay hơi.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2016). TCVN 7030:2016. Tiêu chuẩn về sữa lên men.
- Ding W.K. & Shah N.P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*. 15(2): 219-232.
- De Man J.C., Rogosa M. & Sharpe M.E. (1960). Medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* (23): 130-135.
- Đoàn Anh Dũng, Nguyễn Công Hà, Lý Nguyễn Bình & Lê Nguyễn Đoàn Duy (2015). Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum* trong chế biến sữa chua. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 36: 14-20.
- Granato D., Masson M.L. & Fritas R.J.S.D. (2010). Stability studies and shelf life estimation of a soy-based dessert. *Food Science and Technology*. 30: 797-807.

- Hà Duyên Tư (2010). Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Harish K. & Varghese T. (2006). Probiotics in humans - Evidence based review. *Calicut Medical Journal*. 4(4): e3.
- Hassan A.N., Ipsen R., Jansen T. & Qvist K.B. (2003). Microstructure and rheology of yoghurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharide. *Journal of Dairy Science*. 86: 1632-1638.
- Huỳnh Phan Phương Trang (2018). Thử nghiệm nước chanh dây độ cồn thấp bổ sung probiotic từ vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* LY - 78. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ thực phẩm*. 16(1): 56-66.
- Jayachandran M. & Xu B. (2019). An insight into the health benefits of fermented soy products. *Food Chemistry*. 271: 362-371.
- Je R. & Chin. W. (2000). Production of Kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*. 65(4): 716-719.
- Karleskind D., Laye I., Halpin E. & Morr C.V. (1991). Improving axit production in soy-based yogurt by adding cheese whey proteins and mineral salts. *Journal of Food Science*. 55: 999-1001.
- Kitawaki R., Nishimura Y., Takagi N., Iwasaki M., Tsuzuki K. & Fukuda M. (2009). Effects of *Lactobacillus* fermented soymilk and soy yogurt on hepatic lipid accumulation in rats fed a cholesterol free diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 73(7): 1484-1488.
- Khiralla G.M., Rasmy N.M.H., El - Malky W.A. & Ibrahim M.T. (2009). The role of fermented soy milk with potential probiotic properties in the treatment of diarrhea in young rats. *Pakistan Journal of Biotechnology*. 6: 89-100.
- Lai L.R., Hsieh S.C., Huang H.Y. & Chou C.C. (2013). Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic axit contents as well as anticolon cancer cell proliferation activity of soymilk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115(5): 552-556.
- Lâm Xuân Thanh (2003). Giáo trình công nghệ chế biến Sữa và các sản phẩm chế biến Sữa. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Lê Ngọc Thùy Trang & Phạm Minh Nhựt (2014). Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh hợp chất kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum*. *Tạp chí Sinh học*. 36(1): 97-106.
- Lawrence A.J., Pamela J.W. & Richard G. (2008). Soybeans - Chemistry, production, processing, and utilization. AOCS Press, United States.
- Li L., Hur M., Lee J.Y., Zhou W., Song Z., Ransom N., Demirkale C.Y., Nettleton D., Arendsee M.Z. & Iyer V. (2015). A systems biology approach toward understanding seed composition in soybean. *BMC Genomics*. 16(3): 1-9.
- Lourens H.A. & Viljoen B.C. (2001). Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11: 1-17.
- Medic J., Atkinson C., & Hurburgh C.R. (2014). Current knowledge in soybean composition. *Journal of American oil chemistry*. 91(3): 363-384.
- Mital B.K. & Steinkraus K.H. (1975). Utilization of oligosaccharides by lactic axit bacteria during fermentation of soymilk. *Journal of Food Science*. 40: 114-118.
- Mitsuru F., Shintaro E., Rie H. & Maki K. (2012). Hypocholesterolemic effects of lactic acidfermented soymilk on rats fed a high cholesterol diet. *Nutrients*. 4(9): 1304-1316.
- Mühlhansová A., Sluková M., Schulzová V. & Plocková M. (2015). Fermentation of soy milk by yoghurt and Bifidobacteria strains. *Czech Journal of Food Science*. 33: 313-319.
- Nguyễn Đức Doan, Lê Thị Hà, Bùi Thị Kim Huế & Phạm Thị Thắm (2009). Nghiên cứu ảnh hưởng của whey đến một số tính chất và cảm quan của sữa chua đậu nành. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 7(6): 764-771.
- Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà (2020). Ảnh hưởng của các phương pháp xử lý nhiệt kết hợp với lên men đến hàm lượng axit gamma - aminobutyric, axit phytic và tính chất lý - hóa của sữa chua đậu nành này mầm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 18(5): 367-377.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển & Phạm Văn Ty (2017). Sách Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
- Nguyễn Thị Lâm Đoàn (2018). Khảo sát và định tên vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có đặc tính probiotic từ một số thực phẩm lên men truyền thống. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 10 (95): 90-97.
- Nguyễn Thị Lâm Đoàn, Đặng Thảo Yến Linh, Trịnh Thị Thu Thủy & Nguyễn Đức Doan (2021). Phát triển sữa chua uống bổ sung xoài sử dụng chủng vi khuẩn *Lactobacillus pentosus* DH7.8 lên men. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn*. 412(13): 52-58.
- Nguyen T.L.D., Van H.K., Cnockaert M., De B.E., Maarten A., Le T.B. & Vandamme P. (2013). A culture-dependent and-independent approach for the identification of lactic axit bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. *Journal of Food Research International*. 50: 232-240.

- Rai A.K., Sanjukta S. & Jeyaram K. (2015). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. *Critical Review Food Science and Nutrition*. 57: 2789-2800.
- Rekha C.R. & Vijayalakshmi G. (2011). Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with β -glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 62(2): 111-120.
- Sanjukta S., Rai A.K., Muhammed A., Jeyaram K. & Talukdar N.C. (2015). Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. *Journal of Functional Food*. 14: 650-658.
- Shah N.P., Lankaputhra W.E.V., Britz M. & Kyle W.S.A. (1995). Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*. 5: 515 - 521
- Shah N.P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83: 894-907.
- Thien Trung Le (2012). Purification, analysis and applications of bioactive milk fat globule membrane material.. PhD thesis, Ghent University, Belgium. 257p.
- Trần Thị Hà Ny, Nguyễn Quang Đạt, Nguyễn Thị Lan Anh, Trương Văn Thiên & Phạm Thị Hương (2015). Nghiên cứu quá trình sản xuất sữa chua đậu nành bằng hệ vi sinh vật trong kefir. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ đại học Đà Nẵng*. 11(96): 105-109.
- Trindade F.S.C., Tei S.C., Trugo L.C., Modesta D.R.C. & Couri S. (2001). Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 51(1): 1-7.