

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LACTIC ỨNG DỤNG TRONG LÊN MEN SỮA CHUA ĐẬU TƯƠNG

Trần Thị Định^{1*}, Thân Thị Hương¹,
Nguyễn Thị Hoàng Lan¹, Lê Minh Nguyệt¹, Đặng Thu Hương², Nguyễn Thị Minh³

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

²Bộ môn Công nghệ sinh học vi sinh, Viện Công nghệ thực phẩm

³Khoa Tài Nguyên - Môi Trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tt dinh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.05.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.10.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic ứng dụng cho lên men sữa chua đậu tương. Từ 17 nguồn mẫu lên men tự nhiên, 51 chủng vi khuẩn lactic được phân lập, tất cả các chủng đều có khả năng lên men sữa đậu tương. Từ kết quả phân tích chất lượng sữa chua, 10 chủng vi khuẩn tiềm năng nhất được sàng lọc. Kết quả định danh bằng phương pháp MALDI-TOF/MS cho thấy 10 chủng vi khuẩn này thuộc 3 loài *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* và *Streptococcus equinus*, trong đó, chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1 là chủng được đánh giá tốt nhất cho lên men sữa chua đậu tương vì sở hữu những đặc điểm nổi trội như khả năng sinh trưởng, phát triển mạnh, đảm bảo an toàn sinh học và lên men sữa chua có chất lượng tốt, đặc biệt chủng vi khuẩn có khả năng sinh hàm lượng exopolysaccharide rất cao (1.381,7 mg/kg). Sữa chua đậu tương bước đầu nhận được sự ưa thích của người tiêu dùng.

Từ khóa: Vi khuẩn lactic, đặc tính sinh hóa, sữa chua đậu tương.

Isolation and Selection of Lactic Acid Bacteria for use in Soy Yogurt Production

ABSTRACT

This study was conducted to isolate and select potential lactic acid bacteria for soy yogurt production. From 17 natural fermentation samples, 51 lactic acid strains capable of fermenting soy milk into soy yogurt were isolated. Based on the quality analysis of soy yogurt, 10 strains were selected. Using MALDI-TOF/MS technique, these 10 strains were classified into 3 species: *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, and *Streptococcus equinus*. Among them, *Lactococcus lactis* K1 was evaluated as the best strain for soymilk fermentation due to its outstanding characteristics such as high growth rate, biological safety, and production of high-quality yogurt, especially with the ability to produce a high amount of exopolysaccharide (1,381.7 mg/kg). The soy yogurt initially received positive responses from consumers.

Keywords: Lactic acid bacteria, biochemical characterization, soy yogurt.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương (*Glycine max* L. Merrill) là cây công nghiệp ngắn ngày và có vị trí quan trọng trong nền nông nghiệp Việt Nam và nhiều nước trên thế giới (Trần Văn Điền, 2007). Đậu tương rất giàu dinh dưỡng và được coi là nguồn cung cấp protein hoàn chỉnh và chứa một lượng đáng kể các axit amin không thay thế, cần thiết cho

cơ thể như isoleucin, leucin, lysin, metionin, phenylalanin, tryptophan, valin (Lokuruka, 2010). Bên cạnh đó, đậu tương cũng chứa nhiều axit béo không no, isoflavone và không chứa cholesterol và lactose. Vì vậy, các sản phẩm từ đậu tương rất phù hợp để thay thế các sản phẩm từ sữa động vật dành cho người không dung nạp lactose hay bị dị ứng với protein trong sữa (Lin & cs., 2004).

Mặc dù đậu tương là loại thực phẩm bổ dưỡng, tốt cho sức khỏe nhưng sự tiêu thụ các sản phẩm từ đậu tương còn hạn chế vì sản phẩm có mùi ngái đặc trưng do enzyme lipoxygenase xúc tác cho phản ứng oxy hóa chất béo tạo thành các hợp chất bay hơi gây mùi khó chịu như hexanal, pentanal, đồng thời chứa một số chất kháng dinh dưỡng, khó tiêu hóa điển hình là axit phytic, raffinose và stachyose (Li & cs., 2014). Để khắc phục những hạn chế này, lên men sữa đậu tương bằng vi khuẩn lactic là giải pháp công nghệ phù hợp vì quá trình lên men giúp cải thiện đặc tính hóa lý, cảm quan và mang lại lợi ích sức khỏe cho người sử dụng (Manorama & cs., 2012). Nhiều nghiên cứu đã công bố các chủng vi khuẩn lactic có khả năng sinh tổng hợp α -galactosidase, kích hoạt enzyme phytase có tác dụng xúc tác thủy phân những hợp chất carbohydrate gây mùi ngái, làm giảm giá trị và khả năng hấp thu dinh dưỡng (Donkor & Shah, 2006). Sử dụng sữa chua đậu tương được chứng minh có khả năng gia tăng hấp thu isoflavone và các axit amin tự do, tăng hoạt tính kháng oxy hóa, ngăn ngừa tình trạng gan nhiễm mỡ, điều chỉnh sự chuyển hóa cholesterol, giảm huyết áp bảo vệ sức khỏe tim mạch, phòng chống ung thư, cải thiện hương vị và giá trị dinh dưỡng cho sản phẩm (Drake & cs., 2006).

Vi khuẩn lactic có yêu cầu cao về dinh dưỡng, thành phần môi trường có chứa các hợp chất cacbohydrat đơn giản, axit amin, peptit, dẫn xuất của axit nucleic và vitamin là cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của chúng (Hati & cs., 2018). Sữa bò có thành phần gồm đường lactose (5%), protein (3,3%) và pH 6,6-6,7 là một môi trường phát triển lý tưởng cho hầu hết các loại vi sinh vật, trong đó có vi khuẩn lactic (Hati & cs., 2018). Sữa đậu tương mặc dù cũng khá giàu dinh dưỡng với hàm lượng protein cao, chứa nhiều vitamin (A, B₁₂, D) và chất khoáng nhưng thành phần có sự khác biệt so với sữa bò đặc biệt về thành phần và hàm lượng cacbohydrat, do đó sự trao đổi chất của vi khuẩn lactic trong sữa đậu tương và sữa bò cũng khác nhau (Horáčková & cs., 2015; Hati & cs., 2018).

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng lên men đặc hiệu, giảm mùi ngái của đậu

tương, sinh tổng hợp các chất có tác dụng cải thiện cấu trúc và hương vị của sản phẩm và an toàn cho người sử dụng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Đậu tương được trồng tại Hà Nội, làm nguyên liệu cho nguồn mẫu phân lập và chế biến sữa đậu tương cho lên men lactic. Nguồn mẫu cho phân lập được lên men tự nhiên gồm mẻ (1 mẫu), nước chua thu nhận từ quá trình làm đậu phụ (3 mẫu), đậu phụ lên men (2 mẫu), sữa đậu tương thủ công lên men (2 mẫu), bã đậu lên men (2 mẫu), sữa đậu tương Fami lên men (2 mẫu), đậu tương luộc lên men (2 mẫu), tương bần (1 mẫu), dưa muối (1 mẫu), nem chua (1 mẫu).

Hóa chất chuẩn bị môi trường MRS cho nuôi cấy vi khuẩn lactic và phân tích các chỉ tiêu gồm kit tách chiết DNA G-spin™ cung cấp bởi iNtRON Bio (Hàn Quốc); kit API 50 CHL cung cấp bởi BioMérieux (Pháp); kháng sinh và các cặp môi đặc hiệu; peptone, cao thịt cung cấp bởi Himedia (Ấn Độ). Những hóa chất thông dụng khác được cung cấp bởi Samchun (Hàn Quốc) đạt độ tinh khiết phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn lactic

Vi khuẩn lactic được phân lập theo phương pháp mô tả bởi (Đàm Sao Mai & cs., 2011).

2.2.2. Xác định đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn lactic

Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn lactic được xác định theo phương pháp mô tả bởi Jame (2002).

2.2.3. Tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic cho lên men sữa chua đậu tương

Chủng vi khuẩn lactic đã phân lập được thử nghiệm làm giống khởi động cho lên men sữa chua đậu tương. Trước tiên, các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường MRS lỏng, nuôi ở nhiệt độ 30°C trong 24h, tỷ lệ tiếp giống 10%. Sau đó, dịch giống được ly tâm thu sinh khối rồi bổ sung vào sữa đậu tương.

Sữa đậu tương có pH 6,5, hàm lượng axit 0,82 g/l được bổ sung sucrose để đạt hàm lượng chất khô hòa tan tổng số là 16°Bx và thanh trùng ở 95°C trong 10 phút. Sau khi xử lý nhiệt, sữa đậu tương được làm nguội đến 40-43°C rồi tiếp giống vi khuẩn. Quá trình lên men được thực hiện ở 37°C trong 8h. Sau khi lên men kết thúc, sữa chua đậu tương được bảo quản ở 4°C trong 12h để ổn định trạng thái trước khi phân tích. Sữa chua đậu tương được đánh giá chất lượng gồm các chỉ tiêu pH, hàm lượng axit tổng số, nhận xét cảm quan (trạng thái đông tụ và mùi vị của sản phẩm) để tuyển chọn những chủng vi khuẩn có khả năng lên men sữa chua đậu tương.

Những chủng vi khuẩn lactic đã tuyển chọn được định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF MS (Vũ Quỳnh Hương, 2022). Một chủng vi khuẩn tiềm năng nhất được lựa chọn dựa trên kết quả định danh bằng giải trình tự gen, khả năng sinh trưởng, phát triển và chất lượng sữa chua đậu tương. Mẫu sữa chua đậu tương lên men từ chủng vi khuẩn tiềm năng này sẽ được đánh giá chất lượng sâu hơn, với các chỉ tiêu gồm nồng độ chất khô hòa tan tổng số (TSS), pH, axit tổng số, khả năng giữ nước, hàm lượng exopolysaccharide (EPS) và đánh giá cảm quan bằng phép thử thị hiếu.

2.2.4. Phân tích chất lượng sữa chua đậu tương

Hàm lượng chất khô hòa tan tổng số được xác định theo TCVN 7771:2007 (ISO 2173:2003).

Hàm lượng axit hữu cơ tổng số được xác định theo TCVN 5483-1991 (ISO 750-1981).

Hàm lượng EPS trong sữa chua đậu tương được phân tích theo phương pháp mô tả bởi Enikeev (2012) và Nielsen (2010).

Khả năng giữ nước của sữa chua đậu tương được xác định theo phương pháp mô tả bởi Korkmaz & cs. (2021).

Chất lượng cảm quan của sữa chua đậu tương được đánh giá theo phương pháp cho điểm thị hiếu trên thang điểm từ 1-9 (Hà Duyên Tư, 2006).

2.2.5. Đánh giá tính đặc tính an toàn sinh học của chủng vi khuẩn lactic

Đánh giá đặc điểm tan máu: Khả năng làm tan máu của vi khuẩn lactic được xác định theo phương pháp của Gómez & cs. (2016). Môi trường dùng để đánh giá khả năng làm tan máu của vi khuẩn lactic là Blood Agar Base bổ sung thêm 5% máu cừu.

Bảng 1. Danh sách các môi sử dụng trong phân loại

Môi	Trình tự (5'→3')
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1492R	5' TACGGYTACCTTGTACACTT 3'

Bảng 2. Đặc tính của sữa chua đậu tương lên men bởi các chủng vi khuẩn lactic tiềm năng

Ký hiệu chủng	TSS (°Bx)	Axit tổng số (%)	pH	Trạng thái đông tụ	Mùi vị
K1	12,53 ± 0,06	0,62 ± 0,02	4,45 ± 0,01	++++	+++
K3	12,73 ± 0,06	0,50 ± 0,01	4,84 ± 0,01	++++	++
NCDN2.1	12,60 ± 0,10	0,52 ± 0,01	4,78 ± 0,00	+++	++
NCDN2.3	12,70 ± 0,10	0,61 ± 0,01	4,65 ± 0,01	+++	+++
SD2.1	12,63 ± 0,12	0,44 ± 0,00	4,91 ± 0,01	+++	+++
SD2.2	13,17 ± 0,06	0,48 ± 0,00	4,87 ± 0,05	+++	+++
FAM2.2	13,30 ± 0,10	0,60 ± 0,00	4,52 ± 0,00	+++	+++
FAM2.3	12,43 ± 0,12	0,44 ± 0,01	4,92 ± 0,01	+++	+++
TBHY3	12,57 ± 0,12	0,48 ± 0,02	4,88 ± 0,01	+++	+++
MEDN2.4	12,80 ± 0,10	0,43 ± 0,01	4,99 ± 0,01	+++	++

Ghi chú: (++++): Rất tốt; (+++): Tốt, (++): Trung bình, (+): Kém.

Đánh giá phát hiện gen kháng kháng sinh: Phát hiện gen kháng kháng sinh của chủng vi khuẩn lactic được thực hiện theo phương pháp của Guo & cs. (2017).

2.2.6. Xác định đặc tính sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn lactic

Đánh giá khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate: Khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate của vi khuẩn lactic được đánh giá bằng cách sử dụng bộ kit API 50 CHL (BioMérieux, Pháp), chứa 49 loại carbohydrate khác nhau.

Đánh giá khả năng phát triển của vi khuẩn khi nuôi cấy ở nhiệt độ và pH khác nhau: Chủng vi khuẩn lactic được cấy rìa trên đĩa thạch MRS, sau đó nuôi ở dải nhiệt độ từ 15-42°C và pH từ 4,0-9,5. Sau 48h nuôi cấy quan sát khả năng sinh trưởng phát triển của vi khuẩn.

2.2.7. Định danh bằng giải trình tự gen

Phân đoạn rADN của vi sinh vật sau khi tách chiết được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu sử dụng trong phân loại (Bảng 1). Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được phân tích trình tự tại hãng 1st BASE (Malaysia). Các chuỗi DNA được so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank thông qua giao diện tìm kiếm giao diện tìm kiếm BLAST nucleotide-nucleotide. Các chuỗi liên quan được chuyển tải về sau đó xử lý bằng phần mềm BioEdit (Hall, 1999).

2.2.8. Xử lý số liệu

Số liệu về chỉ tiêu chất lượng được biểu diễn bằng giá trị trung bình của ba lần phân tích lặp lại và độ lệch chuẩn. Điểm thị hiếu cho mỗi chỉ tiêu cảm quan của sữa chua đậu tương được thể hiện bởi giá trị trung bình và sai số chuẩn của 90 người thử.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic từ nguồn mẫu lên men tự nhiên

Từ 17 nguồn mẫu, chúng tôi thu nhận được 51 chủng vi khuẩn lactic. Những chủng này có các đặc điểm điển hình như khuẩn lạc tròn, lồi,

có màu trắng trong, trắng đục, hoặc trắng sữa tạo vòng phân giải khi nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch MRS có bổ sung CaCO₃. Quan sát hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn này cho thấy có 14 chủng thuộc nhóm trực khuẩn, tế bào xếp đơn, xếp đôi và xếp chuỗi; 37 chủng vi khuẩn thuộc nhóm cầu khuẩn, tế bào xếp đơn, xếp đôi và kết đám. Kết quả phân tích một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa cũng cho thấy 51 chủng vi khuẩn này đều mang những đặc điểm của vi khuẩn lactic theo mô tả của Vinderola & cs. (2019) đó là vi khuẩn Gram dương, không có khả năng di động và không sinh catalase.

Để tuyển chọn chủng vi khuẩn tiềm năng cho lên men sữa chua đậu tương, 51 chủng vi khuẩn lactic đã phân lập được sử dụng làm giống khởi động cho lên men sữa chua đậu tương. Kết quả cho thấy 51 chủng này đều có khả năng lên men sữa đậu tương, chuyển hóa đường thành axit lactic, giảm pH đến điểm đẳng điện của protein, giúp đông tụ sữa và tạo vị chua, giảm mùi ngái đặc trưng của đậu tương. Tuy nhiên, đặc tính cảm quan của các mẫu sữa chua có sự khác biệt. Các chủng vi khuẩn được đánh giá cao là những chủng tạo hương thơm cho sữa chua, có khả năng đông tụ tốt, cấu trúc mịn và không bị tách nước. Bảng 2 thể hiện kết quả đánh giá chất lượng sữa chua đậu tương được lên men bởi 10 chủng vi khuẩn lactic tiềm năng nhất.

Kết quả phân tích chất lượng của 10 mẫu sữa chua đậu tương cho thấy nồng độ chất khô hòa tan tổng số của các mẫu sữa chua đậu tương đều giảm xuống, từ 16°Bx đến 12,5-13,3°Bx. Nguyên nhân TSS giảm trong quá trình lên men là do vi khuẩn lactic bài tiết các enzyme xúc tác cho các phản ứng hóa sinh trong chu trình đường phân để phân giải đường thành axit lactic và một số sản phẩm phụ.

Các chủng vi khuẩn khác nhau có khả năng sinh axit lactic không như nhau. Kết quả Bảng 2 cho thấy hàm lượng axit tổng số tính theo axit lactic trong các mẫu sữa chua biến động từ 0,43-0,62%. Mẫu sữa chua lên men từ chủng K1, NCDN2.3, FAM2.2 có giá trị axit cao nhất (0,60-0,62%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với những mẫu sữa chua còn lại. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Chun & cs. (2007)

khi lên men sữa đậu tương với 4 chủng vi khuẩn lactic *Lactobacillus paraplantarum* KM, *Enterococcus durans* KH, *Streptococcus salivarius* HM và *Weissella confusa* JY, hàm lượng axit tổng số của sản phẩm đạt 0,62%.

Cùng với sự tăng lên của axit tổng số, pH của sữa chua cũng giảm xuống, từ 6,4 đến 4,5-4,9. Đây là khoảng pH rất phù hợp cho quá trình đông tụ protein, tạo cấu trúc đặc trưng cho sữa chua. Kết quả này tương tự như số liệu công bố bởi Li & cs. (2014) khi lên men sữa đậu tương bằng một số chủng vi khuẩn lactic, trong đó pH của sữa chua đậu tương trong nghiên cứu này là 4,6-5,1.

Kết quả nhận xét các đặc tính cảm quan về trạng thái đông tụ và mùi vị của sữa chua đậu tương cho thấy trong số 51 chủng vi khuẩn phân lập được thì 10 chủng ở bảng 2 được đánh giá là có tiềm năng cho lên men sữa chua đậu tương. Bảng 3 mô tả đặc điểm và kết quả định danh của 10 chủng này. Kết quả định danh cho thấy 10 chủng vi khuẩn thuộc 3 loài gồm *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* và *Streptococcus equinus*.

Căn cứ kết quả định danh vi khuẩn, khả năng sinh trưởng, tính ổn định về sinh trưởng, phát triển trong suốt quá trình phân lập và tuyển chọn cũng như chất lượng sữa chua đậu tương, chủng vi khuẩn K1 thuộc loài *Lactococcus lactis* được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Đánh giá đặc tính an toàn sinh học của chủng *Lactococcus lactis* K1

Đánh giá khả năng làm tan máu: Sự vắng mặt của khả năng làm tan máu được coi là điều kiện an toàn tiên quyết cho việc lựa chọn chủng vi khuẩn probiotic bởi đây là một yếu tố độc lực được biết đến ở các vi sinh vật gây bệnh. Kết quả nuôi cấy chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1 trên môi trường Blood Agar Base bổ sung 5% máu cừu cho thấy có sự xuất hiện của khuẩn lạc trên đĩa thạch, tuy nhiên màu môi trường không thay đổi, do đó phản ứng là âm tính (gamma hemolysis). Như vậy, chúng tôi kết luận chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1 không có khả năng làm tan máu và đủ điều kiện an toàn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3. Đặc điểm của 10 chủng vi khuẩn lactic tiềm năng cho lên men sữa chua đậu tương

Ký hiệu chủng	Nguồn phân lập	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Khả năng di động	Catalase	Gram	Định danh
K1	Bã đậu lên men	Tròn, lồi, trắng đục, bóng	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i>
K3	Bã đậu lên men	Tròn, hơi lồi, trắng trong, bóng	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>
NCDN2.1	Nước chua làm đậu phụ	Tròn, lồi, trắng sữa, bóng	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>
NCDN2.3	Nước chua làm đậu phụ	Tròn, lồi, trắng đục, bóng	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Streptococcus equinus</i>
SD2.1	Sữa đậu tương thủ công lên men	Tròn, lồi, trắng đục, bóng	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>
SD2.2	Sữa đậu tương thủ công lên men	Tròn, lồi, trắng sữa, bóng	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>
FAM2.2	Sữa đậu tương Fami lên men	Tròn, lồi, trắng đục, viền trong, bóng	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Lactococcus lactis</i>
FAM2.3	Sữa đậu tương Fami lên men	Tròn, lồi, trắng đục	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>
TBHY3	Tương bản	Tròn, lồi, trắng trong	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>
MEDN2.4	Mê	Tròn, lồi, trắng sữa	Cầu khuẩn, xếp đơn/xếp đôi/xếp đám	-	-	+	<i>Enterococcus faecium</i>

Bảng 4. Kết quả kiểm tra gen kháng kháng sinh của chủng *Lactococcus lactis* K1

Loại kháng sinh	Gen kháng kháng sinh	Sự có mặt gen kháng kháng sinh	Kích thước đoạn khuếch đại (bp)
Gentamicin	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	-	220
	<i>ac(6')leaph(2'')</i> <i>la</i>	-	348
Streptomycin	<i>aadA</i>	-	597
	<i>aadE</i>	-	282
	<i>ant(6)</i>	-	565
Kanamycin	<i>aph(3'')-III</i>	-	292
	<i>ant(2'')-I</i>	-	329
Tetracycline	<i>tet(K)</i>	-	697
	<i>tet(W)</i>	-	168
Erythromycin	<i>erm(B)</i>	-	639
	<i>erm(B)-1</i>	-	405
	<i>erm(C)</i>	-	642
Clindamycin	<i>lnu(A)</i>	-	323
	<i>lnu(B)</i>	-	925
Chloramphenicol	<i>catA</i>	-	486
	<i>cat</i>	-	300
Ampicillin	<i>blaZ</i>	-	240
	<i>bla</i>	-	297
	<i>mecA</i>	-	1429
Vancomycin	<i>vanE</i>	-	513
	<i>vanX</i>	-	454

Ghi chú: (-): Không phát hiện gen kháng kháng sinh; (+): Có gen kháng kháng sinh.

Kiểm tra gen kháng kháng sinh: Kiểu hình kháng kháng sinh của vi sinh vật có thể được quy định bởi kiểu gen. Bên cạnh đó, kiểu hình nhạy cảm với kháng sinh vẫn có thể mang gen kháng kháng sinh ở trạng thái không biểu hiện (Anisimova & cs., 2019). Vi khuẩn mang gen kháng kháng sinh trong thực phẩm có thể trở thành mối nguy đối với con người khi chúng trở thành vật trung gian truyền những gen kháng kháng sinh này cho các vi sinh vật gây bệnh thông qua chuỗi thực phẩm. Trước đây các chủng vi khuẩn lactic thuộc chi *Lactococcus* thường được coi là an toàn và có thể sử dụng trong thực phẩm (GRAS). Tuy nhiên, một số chủng vi khuẩn thuộc loài *Lactococcus lactis* đã được phát hiện có mang gen kháng kháng sinh tetracycline và erythromycin (Ahsraf, 2011). Do đó, trong nghiên cứu này, 21 gen quy định sự đề kháng với 9 loại kháng sinh (gentamicin, streptomycin, kanamycin, tetracycline, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol, ampicillin, vancomycin) được kiểm tra trên

chủng vi khuẩn lactic *Lactococcus lactis* K1. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

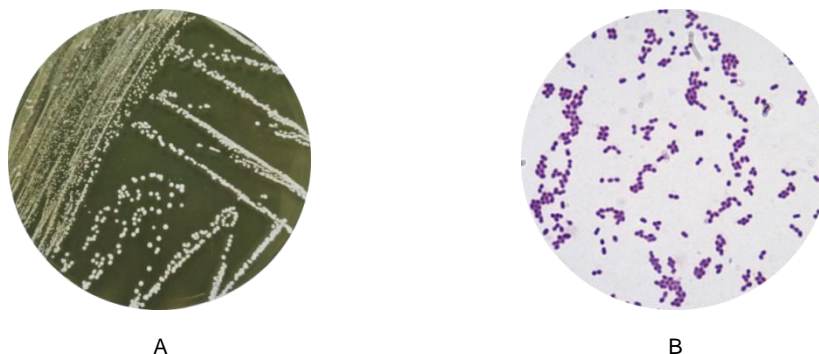
Kết quả ở bảng 4 cho thấy chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1 không mang các gen kháng kháng sinh trong phạm vi nghiên cứu. Từ kết quả kiểm tra khả năng làm tan máu và gen kháng kháng sinh của chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1, chúng tôi kết luận chủng vi khuẩn này an toàn và có thể sử dụng được trong thực phẩm. Hình 1 thể hiện hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng *Lactococcus lactis* K1.

3.3. Xác định đặc tính sinh trưởng, phát triển của chủng vi khuẩn lactic *Lactococcus lactis* K1

Khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate: Kết quả xác định phổ lên men các loại đường của chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1 cho thấy sau 24 giờ chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng 13 loại đường, sau 48 giờ

chủng vi khuẩn có khả năng sử dụng 17 loại đường làm cơ chất cho quá trình lên men (Bảng 5). Như vậy, phổ sử dụng carbohydrate của chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1 khá

rộng, trong đó phải kể đến sucrose, glucose, fructose là những loại đường quan trọng phục vụ cho nghiên cứu ứng dụng chủng vi khuẩn cho lên men sữa chua đậu tương.



Hình 1. (A) Hình thái khuẩn lạc; (B) Hình thái tế bào của *Lactococcus lactis* K1

Bảng 5. Khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate của chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1

Nguồn carbohydrate	Thời gian		Nguồn carbohydrate	Thời gian	
	24 giờ	48 giờ		24 giờ	48 giờ
Đối chứng	-		Esculin	-	-
Glycerol	-		Salicin	-/+	+/-
Erythritol	-		Cellobiose	+	+
D-Arabinose	-		Maltose	+	+
L-Arabinose	-		Lactose	+	+
Ribose	-	+/-	Melibiose	-	-
D-Xylose	-	-/+	Sucrose	+	+
L-Xylose	-		Trehalose	+	+
Adonitol	-	-	Inulin	-	-
β Methyl - D- Xyloside	-	-	Melezitose	-	-
Galactose	+	+	Raffinose	-	-
Glucose	+	+	Starch	-	-/+
Fructose	+	+	Glycogen	-	-
Mannose	+	+	Xylitol	-	-
Sorbose	-	-	Gentiobiose	+	+
Rhamnose	-	-	D-Turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D- tagatose	-	-
Mannitol	+	+	D-Fucose	-	-
Sorbitol	-	-	L-Fucose	-	-
α -Metyl-D-Mannoside	-	-	D-Arabitol	-	-
α -Metyl-D-Glucoside	-	-	L-Arabitol	-	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	+	Gluconate	-	-/+
Amygdalin	-	-	2-keto- Gluconate	-	-
Arbutin	-	-	5- keto- Gluconate	-	-

Ghi chú: (+): Lên men tốt; (+/-): Lên men khá; (-/+): Lên men yếu; (-): Không sử dụng.

Phổ pH và nhiệt độ sinh trưởng phát triển: Kết quả kiểm tra khả năng phát triển của *Lactococcus lactis* K1 trong môi trường có pH ban đầu khác nhau cho thấy ở pH 4,0 và pH 5,0 chủng vi khuẩn có khả năng phát triển nhưng tương đối yếu, trong khi đó phát triển mạnh ở pH 6,0; 7,0; 8,5; và 9,5. Về ảnh hưởng của nhiệt độ, *Lactococcus lactis* K1 không sinh trưởng ở 15°C nhưng phát triển tốt ở 25°C, 30°C, 37°C và 42°C (Bảng 6). Điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn thuộc nhóm ưa ấm và nhiệt độ lên men tối thích của nó tương tự như các chủng vi khuẩn lactic thương mại cho lên men sữa chua động vật.

3.4. Đánh giá chất lượng sữa chua đậu tương lên men bởi chủng *Lactococcus lactis* K1

Để khẳng định tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* K1 làm giống khởi động cho sản xuất sữa chua đậu tương, chủng vi khuẩn được hoạt hóa và cấy vào sữa

đậu tương với tỉ lệ tiếp giống 10%, sau đó lên men ở nhiệt độ 38°C trong 8h. Kết quả phân tích chất lượng sữa chua đậu tương được trình bày trong bảng 7.

Sữa chua đậu tương lên men bởi chủng *Lactococcus lactis* K1 có TSS là 12,87°Bx và hàm lượng axit tổng số là 0,61%. Như vậy trong quá trình lên men chủng vi khuẩn này đã sử dụng cơ chất trong sữa để tạo axit lactic và một số hợp chất thứ cấp, tạo hương thơm và vị hài hòa cho sản phẩm. Giá trị pH của mẫu sữa chua đậu tương là 4,46; tương đồng với các nghiên cứu khác về sữa chua đậu tương với giá trị pH trong khoảng 4,1-4,7 (Chun & cs., 2007). Theo báo cáo của Chun & cs. (2007) sự đông tụ xảy ra và cấu trúc của sữa chua đậu tương được hình thành khi đạt đến pH phù hợp. Các mẫu sữa chua động vật thương mại trên thị trường có giá trị pH trong khoảng 4,2-4,4. Như vậy chủng *Lactococcus lactis* K1 có khả năng lên men tốt sữa đậu tương.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra phổ pH và nhiệt độ sinh trưởng, phát triển của chủng *Lactococcus lactis* K1

pH ban đầu						Nhiệt độ sinh trưởng (°C)				
4	5	6	7	8,5	9,5	15	25	30	37	42
-/+	+/-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Ghi chú: (+): Khả năng sinh trưởng tốt; (+/-): Khả năng sinh trưởng khá; (-/+): Khả năng sinh trưởng yếu; (-): Không phát triển được.

Bảng 7. Kết quả đánh giá chất lượng sữa chua đậu tương lên men bởi chủng *Lactococcus lactis* K1

Chỉ tiêu	Giá trị	Đơn vị
TSS	12,87 ± 0,06	°Bx
pH	4,46 ± 0,01	
Hàm lượng axit tổng số	0,61 ± 0,01	%
Hàm lượng EPS	1381,7 ± 59,6	mg/kg
Khả năng giữ nước	40,24 ± 1,42	%

Bảng 8. Kết quả đánh giá cảm quan sữa chua đậu tương lên men từ chủng *Lactococcus lactis* K1

Cấu trúc	Mùi hương	Vị	Cảm giác trong miệng	Chất lượng tổng thể
5,9 ± 2,2	5,8 ± 2,1	6,0 ± 2,2	5,9 ± 2,0	6,0 ± 2,0

Khả năng giữ nước của sữa chua lên men từ *Lactococcus lactis* K1 là 40,24%, tương đương với kết quả công bố bởi Nguyễn Đức Doan & Đỗ Thị Hà (2020) trong đó khả năng giữ nước của mẫu sữa chua của nhóm này là 40,0-42,0%. Tuy nhiên trong nghiên cứu này tác giả sử dụng nguyên liệu đậu tương nảy mầm và sữa đậu tương được bổ sung nguyên liệu phụ là sữa bột gầy (3%) và bột whey (2%), lên men bằng chủng vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* là sản phẩm thương mại của công ty CHR Hansen (Đan Mạch). Một nghiên cứu khác của Park (2015) cũng ghi nhận khả năng giữ nước của sữa chua đậu tương là 41,3-45,5%. Nghiên cứu cũng kết luận rằng khả năng giữ nước càng cao, độ nhớt của sản phẩm sữa chua đậu tương càng lớn.

Sữa chua lên men bởi chủng *Lactococcus lactis* K1 có hàm lượng EPS là 1.381,7 mg/kg. So sánh với kết quả nghiên cứu của Li & cs. (2014) trong đó sữa chua đậu tương lên men bởi các chủng vi khuẩn lactic DVS YC-X11 là 287,08 mg/l; *L. rhamnosus* 6005 là 635,75 mg/l; *L. plantarum* 70810 là 832,15 mg/l, thì *Lactococcus lactis* K1 bài tiết EPS cao hơn. EPS là một polysaccharide mạch dài, có tác dụng cải thiện cấu trúc của sữa chua, tăng độ kết dính, tạo nên sự ổn định của hệ nhũ tương, do đó hạn chế hiện tượng tách nước. Ngoài ra, EPS được công nhận là an toàn cho sức khỏe và có các hoạt tính sinh học giúp ngăn ngừa, điều trị các bệnh như tiêu chảy và nhiễm trùng, chống ung thư, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa (Li, 2014).

Sữa chua đậu tương lên men bởi *Lactococcus lactis* K1 còn được đánh giá cảm quan bằng phép thử thị hiếu. Kết quả cho thấy đặc tính về mùi vị và chất lượng tổng thể của sữa chua đậu tương được hội đồng cảm quan đánh giá ở mức thích, trong khi đó điểm cấu trúc được đánh giá ở mức tương đối thích (Bảng 8). Như vậy, sữa chua đậu tương lên men bởi *Lactococcus lactis* K1 bước đầu đã được người tiêu dùng chấp nhận và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất. Tuy nhiên, các giải pháp công nghệ như sử dụng nguyên liệu phụ gồm rau, trái cây, bột sữa gầy, kem béo và phụ gia cải thiện cấu trúc bổ sung vào sữa chua đậu tương cần tiếp tục được nghiên cứu để cải thiện giá trị

đinh dưỡng và nâng cao chất lượng cảm quan cho sản phẩm.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập được 51 chủng vi khuẩn lactic từ 17 nguồn mẫu lên men tự nhiên. Sau quá trình tuyển chọn, 10 chủng vi khuẩn lactic đã được đánh giá là có tiềm năng lên men sữa chua đậu tương. Trong số đó chủng vi khuẩn lactic *Lactococcus lactis* K1 được lựa chọn vì chất lượng sữa chua đậu tương được tạo thành bởi chủng là tốt nhất. *Lactococcus lactis* K1 đảm bảo tính an toàn sinh học như không gây tan máu và không mang gen kháng kháng sinh, ứng dụng được trong lên men thực phẩm, có khả năng sử dụng 17 nguồn carbohydrate khác nhau, sinh trưởng tốt trong khoảng nhiệt độ 25-42°C, thích hợp với môi trường nuôi cấy có pH trung tính và kiềm. Hơn nữa, sữa chua đậu tương lên men từ *Lactococcus lactis* K1 có chất lượng tốt, các chỉ tiêu hóa lý phù hợp với sản phẩm sữa chua đậu tương, bước đầu nhận được sự ưa thích của người tiêu dùng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hà Nội trong đề tài mã số 01C - 06. Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn tới Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hà Nội đã tài trợ kinh phí và Bộ môn Vi sinh vật, Khoa Tài nguyên và Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anisimova E.A. & Yarullina D.R. (2019). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. *Current microbiology*. 76: 1407-1416.
- Ashraf R. & Shah N.P. (2011). Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*. 18(3).
- Chun J., Kim G.M., Lee K.W., Choi I.D., Kwon G.H., Park J.Y. & Kim J.H. (2007). Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*. 72(2): M39-M44.

- Donkor O.N. & Shah N.P. (2008). Production of β -Glucosidase and Hydrolysis of Isoflavone Phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in Soymilk. *Journal of Food Science*. 73(1): M15-M20.
- Drake M.A., Chen X.Q., Tamarapu S. & Leenanon B. (2000). Soy protein fortification affects sensory, chemical, and microbiological properties of dairy yogurts. *Journal of Food Science*. 65(7): 1244-1247.
- Đàm Sao Mai, Trịnh Ngọc Nam, Bùi Hồng Quân, Lê Hồng Thía & Đào Hồng Hà (2011). Thực tập Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh.
- Enikeev R. (2012). Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of kefir production. *Food Chemistry*. 134(4): 2437-2441.
- Gómez N.C., Ramiro J.M., Quecan B.X. & de Melo Franco B.D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*. 863.
- Guo H., Pan L., Li L., Lu J., Kwok L., Menghe B. & Zhang W. (2017). Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. *Journal of food science*. 82(3): 724-730.
- Hà Duyên Tư (2006). Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Hati S., Patel N. & Mandal S. (2018). Comparative growth behaviour and biofunctionality of lactic acid bacteria during fermentation of soy milk and bovine milk. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 10: 277-283.
- Horáčková Š., Muehlhansova A., Slukova M., Schulzová V. & Plockova M. (2015). Fermentation of soymilk by yoghurt and bifidobacteria strains. *Czech Journal of Food Sciences*. 33(4): 313-319.
- James C. & Natalie S. (2014). *Microbiology. A laboratory manual*. Pearson Education.
- Korkmaz I.O., Bilici C. & Korkmaz S. (2021). Sensory, pH, syneresis, water-holding capacity, and microbiological changes in homemade yogurt prepared with maca (*Lepidium meyenii*) powder and propolis extract. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 23: 100291.
- Li C., Li W., Chen X., Feng M., Rui X., Jiang M. & Dong M. (2014). Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT-Food Science and Technology*. 57(2): 477-485.
- Lin F.M., Chiu C.H. & Pan T.M. (2004). Fermentation of a milk - soymilk and *Lycium chinense* Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NTU101 and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 31(12): 559-564.
- Lokuruka M.N.I. (2010). Soybean nutritional properties: The good and the bad about soy foods consumption - A review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 10(4).
- Nielsen S.S. (2010). Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. *Food analysis laboratory manual*. pp. 47-53.
- 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 nẩy mầm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 18(5): 367-377.
- Park M.J. & Lee S.Y. (2015). Quality characteristics of soy yogurt produced using proteases and mixed microbial consortia. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 58: 761-769.
- Trần Văn Điền (2007). *Cây đậu tương*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội. tr. 3-4.
- Vinderola G., Ouwehand A, Salminen S. Wright A.V. (2019). *Lactic acid bacteria Microbiological and Functional Aspect*. 5th edition. CRC Press. 764p.
- Vũ Quỳnh Hương, Vũ Thị Yên & Nguyễn Thị Thanh Thủy (2022). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn lactic để ứng dụng trong sản xuất đồ uống probiotic từ gừng. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 20(12): 1581-1590.