

# Chương 1. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU

## 1.1. SỮA CHUA

### 1.1.1. Giới thiệu



Hình 1.1 Sữa chua Nguồn: <https://giamcanthai.com/>.

Sữa chua là sản phẩm sữa lên men phổ biến nhất trên thế giới. Bởi được tạo ra từ quá trình acid hóa vi khuẩn acid lactic (LAB), dẫn đến nhiều thay đổi quan trọng về hóa lý, cảm quan và vi sinh trong sữa (Cheng, 2010). Sữa chua thường được lên men qua hoạt động nuôi cấy cộng sinh của hai chủng LAB, đó là *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii subsp* (Tian et al., 2019). So với protein trong sữa, protein trong sữa chua phân giải thành acid amin và peptit (Yang et al., 2021).

Sử dụng vi khuẩn *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus bulgaricus* một phần là nguồn gốc lịch sử vì chúng thường được phân lập từ sữa chua tự nhiên được sản xuất ở Trung Đông nơi nhiệt độ môi trường cao đã dẫn đến việc lựa chọn vi sinh vật ưa nhiệt trong sản phẩm sữa lên men. Tiếp nối truyền thống là hợp lý vì sự tương tác hiệp đồng của các sinh vật này (Robinson, 1999). Khi vi khuẩn phát triển, thì lactose làm nguồn năng lượng và tạo ra lactic acid làm giảm độ pH và làm cho sữa chua có vị chua. Ban đầu *S. thermophilus* lên men đường lactose. *L. bulgaricus*, có khả năng chịu acid cao hơn, tiếp tục lên men lactose còn lại. Trong quá trình này, độ pH

giảm từ 6.5 xuống còn khoảng 4.5 và ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây hư hỏng. Vi khuẩn acid lactic gây ra cấu trúc của protein sữa thay đổi khiến sữa chua có kết cấu đặc biệt. Acid lactic cũng mang lại cho sữa chua hương vị đậm đà. Các sản phẩm khác của acid lactic quá trình lên men như acetaldehyde mang lại cho sữa chua mùi thơm đặc trưng (Tamime & Robinson, 1985). Sữa chua đã là một phần trong chế độ ăn uống của con người trong nhiều thiên niên kỷ và trải qua nhiều những cái tên trên khắp thế giới. Từ "sữa chua" được cho là có nguồn gốc từ Từ tiếng Thổ Nhĩ Kỳ “yogurtmak,” có nghĩa là làm đặc, đông lại hoặc đông lại. Tiêu thụ ít sữa chua thể hiện một cơ hội bị bỏ lỡ để đóng góp cho một lối sống lành mạnh, vì sữa chua mang lại lợi ích tuyệt vời nguồn protein có giá trị sinh học cao và nguồn canxi tuyệt vời cũng như một nguồn men vi sinh mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe (Fisberg & Machado, 2015). Sữa chua là một sản phẩm thực phẩm bán rắn được acid hóa được làm từ quá trình lên men sữa với vi khuẩn acid lactic (LAB). Tiêu thụ sữa chua đã tăng lên trên khắp thế giới vì tác dụng tăng cường sức khỏe. Trong quá trình lên men sữa chua và tạo ra acid lactic đóng vai trò quan trọng trong quá trình đông tụ protein sữa, loại bỏ độ ẩm, hình thành kết cấu và bắt đầu hình thành hương vị (Shori et al., 2021).

#### 1.1.2. .Tình hình tiêu thụ

Tiêu thụ sữa chua và các sản phẩm lên men khác có liên quan đến kết quả sức khỏe được cải thiện. Mặc dù tiêu thụ sữa được bao gồm trong hầu hết các hướng dẫn chế độ ăn uống, nhưng có rất ít khuyến nghị cụ thể đối với sữa chua và các sản phẩm từ sữa được nuôi cấy (Savaiano & Hutkins, 2021).

Vi khuẩn acid lactic là những vi khuẩn chính được sử dụng trong quá trình lên men sữa chua và sữa, mặc dù một loạt các sinh vật khác được sử dụng trong các quá trình lên men khác. Trong số các vi khuẩn acid lactic, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* và *Leuconostoc* thường được tìm thấy nhiều nhất trong thực phẩm lên men từ sữa hoặc là vi khuẩn khởi động hay là xuất hiện tự nhiên của nguyên liệu thô (Hill et al., 2014).

#### 1.1.3. Vai trò

Các cơ chế tiềm ẩn đằng sau nhiều lợi ích được mô tả trong chương này có liên quan đến mật độ dinh dưỡng của sữa chua (ví dụ: canxi, vitamin D) và sự hiện diện

của LAB trong sữa chua. Mặc dù kiến thức của chúng ta còn tồn tại những lỗ hổng về cơ chế nuôi cấy sữa chua và các chất dinh dưỡng của nó điều chỉnh hệ vi sinh vật và các chức năng sinh lý khác nhau, bằng chứng mới nổi cho thấy hệ vi sinh vật đường ruột đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sinh lý vật chủ và cả LAB và một số chất dinh dưỡng nhất định có thể có tác động đến hệ vi sinh vật đường ruột và các chức năng sinh lý đường ruột khác. Các phần sau đây mô tả tuyển tập các nghiên cứu đánh giá lợi ích của sữa chua liên quan đến mật độ dinh dưỡng, chế độ ăn uống cân bằng, không dung nạp đường sữa, kiểm soát cân nặng, sức khỏe tim mạch, bệnh tiêu đường, chức năng miễn dịch và chức năng tiêu hóa (Freitas, 2017).

## 1.2. VI SINH VẬT

### 1.2.1. *Streptococcus thermophilus* & *Lactobacillus bulgaricus*

Vi khuẩn *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus bulgaricus* là hai giống được sử dụng làm môi trường nuôi cấy khởi động trong sản xuất sữa chua (Gezginc et al., 2015).

*Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) thuộc nhóm vi khuẩn acid lactic ưa nhiệt, là vi khuẩn Gram dương, hình cầu đến hình trứng, không di động, đường kính 0,7-0,9  $\mu\text{m}$ , mọc thành cặp và chuỗi. Vi khuẩn có nhiệt độ phát triển tối ưu là 37 – 42  $^{\circ}\text{C}$ . Vi khuẩn *S. thermophilus* lên men một số lượng đường hạn chế bao gồm lactose, fructose, sucrose và glucose. Vi khuẩn *S. thermophilus* có khả năng thích nghi cao với môi trường sữa và trong tự nhiên, chỉ có thể phân lập được từ sữa. Vi khuẩn *S. thermophilus* có nhiều đặc điểm về kiểu hình và di truyền giống với các vi khuẩn acid lactic khác, chủ yếu là *S. Salivarius*, mặc dù có sự khác biệt về cấp độ loài do lai DNA-DNA (Kılıç, 2001). *S. thermophilus* là một loại vi khuẩn lên men đồng nhất, thực hiện quá trình chuyển hóa lactose thông qua con đường Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) thành acid lactic L(+). Mặc dù *S. thermophilus* có môi trường sống giàu protein nhưng hoạt động phân giải protein của nó còn hạn chế (Robinson, 1999).

Vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) được nhà khoa học người Bulgaria Grigoroff định nghĩa lần đầu tiên vào năm 1900. Do có những điểm tương đồng như tỷ lệ G+C trong cấu trúc DNA, khả năng sản xuất và tập trung acid lactic,

cấu trúc thành tế bào, gần giống với vi khuẩn *Lactobacillus delbrueckii spp. lactis*, rất khó để phân biệt vi khuẩn *L. bulgaricus* về mặt hình thái. Tuy nhiên, vi khuẩn *L. bulgaricus* không thể sử dụng maltose pho mát và các sản phẩm sữa lên men trên môi trường chứa một lượng nhỏ carbohydrate (glucose, lactose và fructose). Vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* cũng được xác định là vi khuẩn Gram dương, dạng que ngắn 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  x 2,0-9,0  $\mu\text{m}$  với các đầu tròn, có khả năng quá trình lên men đồng nhất và hình thành tạo ra acid lactic D(-) và phát triển tốt nhất ở PH 6.0 (Desai, 2014). Nhiệt độ tăng trưởng tối ưu là 42 – 45 °C (Robinson, 1999). Khi phát triển trong sữa, vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* vận chuyển lactose vào tế bào cùng với việc giải phóng galactose thông qua hệ thống phản ứng, tương tự như *S. thermophilus*. Bên trong tế bào, lactose bị thủy phân bởi  $\beta$ galactosidase, chỉ có glucose được lên men thành D(-) lactate thông qua EMP. Vi khuẩn *L. bulgaricus* có khả năng phân giải protein cao hơn vi khuẩn *S. thermophilus* và sữa cung cấp nhiều loại acid amin kích thích sự phát triển của các chủng *S. thermophilus*. Sự phát triển của *L. bulgaricus* trong sữa ảnh hưởng nhờ sự kích thích của acid formic và có thể cả carbon dioxide và pyruvate do *S. thermophilus* tạo ra (Robinson, 2002).

Trong môi trường nuôi cấy hỗn hợp, lượng acid sinh ra lớn hơn nhiều so với tổng lượng của một môi trường nuôi cấy đơn lẻ. Hai chủng vi khuẩn trong sữa chua (*L. bulgaricus* và *Strep. thermophilus*) kích thích lẫn nhau trong quá trình tăng trưởng liên kết của chúng cho rằng mối quan hệ cộng sinh giữa *Strep. thermophilus* và *L. bulgaricus* rất quan trọng đối với sản xuất sữa chua và pho mát vì làm giảm thời gian lên men. Sự kích thích của *lactobacilli* được gây ra chủ yếu bởi việc sản xuất formate bởi *streptococci* cho rằng chất kích thích vi khuẩn *L. bulgaricus* và nó được sản xuất bởi vi khuẩn *Strep. thermophilus* trong sữa chua là acid formic (Horiuchi & Sasaki, 2012).

### **1.2.2. *Weissella cibaria***

*Weissella* là một loại vi khuẩn acid lactic mới được tách ra thuộc họ *Lactobacillus*, vi khuẩn *Weissella* có chức năng và cải thiện các đặc tính cảm quan của sản phẩm thực phẩm lên men lactic. Đặc biệt, vi khuẩn *Weissella cibaria* và *Weissella confusa* đã được mô tả là sản xuất EPS với năng suất cao, chúng có thể chuyển đổi

sucrose thành dextran với tỷ lệ cao (Korc & Varga, 2021). Vi khuẩn *Weissella cibaria* thường sử dụng con đường sinh tổng hợp EPS ngoại bào để tổng hợp HoPS (Homopolysaccharide), con đường này tuân theo hai bước, đầu tiên là phản ứng trùng hợp theo đó một monosaccharide được định vị lại thành chuỗi polysaccharide, quá trình này được hỗ trợ bởi các enzyme như glucansucrase hoặc fructansucrase. Trong bước thứ hai chuỗi HoPS trùng hợp giải phóng trực tiếp vào môi trường tế bào bổ sung (Korc & Varga, 2021). Vi khuẩn *W. cibaria* thể hiện khả năng sản xuất EPS cao hơn, điều này cho thấy khả năng kháng acid cao hơn. *W. cibaria* được báo cáo là có khả năng sản sinh các hoạt chất có hoạt tính chống ung thư, hoạt tính điều hòa miễn dịch, hoạt tính chống viêm và hoạt tính chống oxy hóa (Kwak et al., 2014).

### **1.2.3. *Leuconotoc lactics***

Vi khuẩn *Leuconostocs* được tìm thấy trong thực vật, các sản phẩm từ sữa, thịt và các loại các sản phẩm thực phẩm lên men. *Leuconostoc spp.* là vi khuẩn kỵ khí, Gram dương, không sinh enzyme catalase, không di động và không có khả năng chuyển hóa arginine. Chúng là cầu khuẩn dị hợp bắt buộc, thường là hình elip (Dellaglio et al., 1995).

Các loài *Leuconostoc* được sử dụng làm giống khởi động cho các sản phẩm thực phẩm thương mại, chẳng hạn như *L. mesenteroides subsp. cremoris* cho viili ở Phần Lan, các loài *Leuconostoc* khác nhau cho kefir ở nhiều quốc gia và *L. mesenteroides* DRC cho kim chi ở Hàn Quốc. Tuy nhiên, mặc dù có vai trò quan trọng nhưng *Leuconostoc sp.* không được coi là một loại vi khuẩn có lợi vì khả năng xâm chiếm ruột già thấp, chủ yếu là do không có khả năng kháng acid và muối mật (Cho et al., 2015).

### **1.2.4. *Lactiplantillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* là vi khuẩn gram dương dị dưỡng, có dạng hình que, xuất hiện đơn lẻ hoặc nhóm thành chuỗi ngắn. (Todorov & Franco, 2010). Vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*), trước đây gọi là *Lactobacillus plantarum*, là một loài lactobacilli linh hoạt (Rocchetti et al., 2021). Vi khuẩn *L. plantarum* đã được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như các sản phẩm thực phẩm lên men như phô mai, kefir, dưa cải bắp, v.v... (Singhal, Singh, Mohanty, Kumar, et al.,

2021). Hơn nữa, một số chủng *L. plantarum* được biết đến với khả năng sản xuất một số chất kháng khuẩn tự nhiên, do đó ức chế các đối thủ cạnh tranh có cùng phân khúc. Cấu trúc bộ gen tự nhiên là cơ sở cho tính linh hoạt và thành công trong các ứng dụng công nghiệp, không chỉ là nuôi cấy khởi động mà còn là tác nhân bảo vệ sinh học (Iorizzo et al., 2020). *Lactobacillus plantarum* có chức năng chống oxy hóa, giảm cholesterol và tăng cường miễn dịch (Ismael et al., 2022). Lợi khuẩn đã được kiểm tra đặc điểm hình thái và các thử nghiệm sau: hoạt tính kháng khuẩn, tính nhạy cảm với kháng sinh, hoạt tính tan máu, catalase, tính kỵ nước, khả năng tồn tại ở độ pH thấp và khả năng chịu muối mật (Yanez-Lemus et al., 2022). Khả năng sống sót của tất cả các chủng *L. plantarum* trong môi trường nuôi cấy có pH 1,5 giảm mạnh và không có chủng nào sống sót sau 1 – 3 giờ (Singhal, Singh, Mohanty, & Kumar, 2021). *Lb. plantarum* đã được chứng minh là có một số đặc tính sinh học đã đề cập trước đó như khả năng chịu acid tốt, khả năng sống sót ở nồng độ mật (0,3 – 1%), đặc tính bám dính, tỷ lệ loại bỏ cholesterol tốt (58%), tỷ lệ suy giảm natri nitrit cao nhất và khả năng kháng khuẩn và các hoạt động chống oxy hóa (Jo et al., 2022).

#### **1.2.5. *Pediococcus acidilactici***

*Pediococcus acidilactici* là vi khuẩn kỵ khí tùy ý có nguồn gốc từ sữa sữ hữu tất cả các thuộc tính lợi khuẩn và một số hoạt tính enzym hữu ích. Toàn bộ bộ gen của nó đã được giải trình tự và phân tích mối quan hệ tiến hóa của nó với các vi khuẩn acid lactic (LAB) khác. Đây là một trình tự mới và là báo cáo đầu tiên về trình tự bộ gen của *P. acidilactici* có nguồn gốc từ sữa (Bansal et al., 2019). *P. acidilactici*, là một lợi khuẩn tiềm năng vì nó có tác dụng tích cực và có lợi đối với hệ vi khuẩn đường ruột, bao gồm khả năng chịu muối mật (0,3%) và điều kiện acid (pH 3), tạo ra galactosidase, ổn định trong môi trường khoảng pH rộng (2– 9) và không kháng vancomycin (Abbasiliasi et al., 2017). *P. acidilactici*, bao gồm phổ ức chế của các hoạt động chống lại các vi khuẩn gram dương và gram âm khác nhau, tính kỵ nước trên bề mặt tế bào, khả năng chống lại phenol, các hoạt động tan máu, phân giải tinh bột và phân giải protein, khả năng tạo ra acid và làm đông tụ sữa và đặc tính enzyme cùng với các đặc tính kết dính (Abbasiliasi et al., 2017).

### 1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU

Zhao & Liang (2022) đánh giá ảnh hưởng của men vi sinh *Lactobacillus plantarum* MC5 đến chất lượng, hoạt tính chống oxy hóa và độ ổn định bảo quản của sữa chua, để xác định khả năng ứng dụng trong quá trình lên men sữa. Được làm với các tỷ lệ khác nhau của lợi khuẩn *L. plantarum* MC5 và các loại men thương mại. Các đặc tính lưu biến, đặc tính kết cấu, hoạt tính chống oxy hóa, độ ổn định khi bảo quản và hàm lượng exopolysaccharide (EPS) của các mẫu sữa chua trong thời gian bảo quản đã được xác định. Kết quả cho thấy mẫu sữa chua 2:1 và 1:1 (bổ sung *L. plantarum* MC5) đạt hàm lượng EPS cao nhất (982.42 mg/L và 751.71 mg/L) trong quá trình bảo quản. Độ nhớt biểu kiến, độ đặc, độ kết dính và khả năng giữ nước (WHC) của các mẫu sữa chua được bổ sung *L. plantarum* MC5 cao hơn đáng kể so với các mẫu của nhóm đối chứng ( $p < 0,05$ ).

An (2021) xác định ảnh hưởng của EPS sản xuất *L. garlicum* KCCM 43211 về đặc tính lưu biến của sữa lên men và khảo sát các đặc tính hóa lý của EPS sau đó tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của quá trình lên men lên men sơ bộ của *L. garlicum* KCCM 43211 trong quá trình bảo quản 4 °C trong 28 ngày do khả năng ứng dụng của *L. garlicum* KCCM 43211 cho sản xuất sữa chua. Kết quả cho thấy rằng EPS cải thiện độ nhớt của sữa lên men trong giai đoạn tạo gel sơ bộ ( $> \text{pH } 4,6$ ). Tuy nhiên, EPS có thể được sàng lọc trong mạng lưới gel mạnh ( $< \text{pH } 4,6$ ). Kết quả thu được, EPS sản xuất bởi *L. garlicum* KCCM 43211 có thể điều chỉnh vật lý và tính chất lưu biến của sữa lên men mạng gel yếu.

Trong nghiên cứu X.-W. Li et al (2020) khảo sát cho thấy *Lactobacillus paracasei* có thể giải phóng exopolysaccharide (EPS), được sử dụng làm chất khởi động để chuẩn bị sữa chua trong điều kiện lên men tối ưu, sự gắn kết của EPS-S11 được chiết xuất và tinh chế từ sữa chua với casein được đánh giá bằng phân tích độ đục và kích thước hạt, nghiên cứu điện thế zeta, quét laze đồng tiêu mi hình ảnh nội soi và xác định phép đo nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt. Kết quả chỉ ra rằng EPS S11 có khối lượng phân tử trung bình là  $1,68 \div 107 \text{ Da}$ , có thành phần chủ yếu là mannose, glucose, galactose và acid glucuronic theo tỷ lệ mol là 0,87:0,92:1:0,24. Khi bổ sung EPS-S11, cả độ đục và kích thước hạt của dung dịch casein đều giảm theo cách phụ

thuộc vào liều lượng, trong khi điện thế zeta tăng lên một cách phụ thuộc vào liều lượng, kết quả cho thấy rằng EPS-S11 có thể ức chế sự tổng hợp của casein và do đó tăng cường tính ổn định. Chuẩn độ ITC và hình ảnh CLSM đã xác nhận sự tồn tại của các tương tác giữa EPS-S11 và casein, chủ yếu liên quan đến tương tác tĩnh điện cũng như tương tác kỵ nước.

Nghiên cứu Yeung et al (2019) tìm hiểu các đặc tính hóa lý, cấu trúc và chất chống oxy hóa của sữa chua ít béo. Kết quả chỉ ra rằng nồng độ thấp của FSE (1,2 hoặc 2,4%) làm tăng hoạt tính chống oxy hóa, thúc đẩy sự phát triển của *S. thermophilus*, khả năng giữ nước (WHC), và các đặc tính về kết cấu và cảm quan, đồng thời rút ngắn thời gian lên men, nhưng làm giảm tính lưu biến. tính chất của sữa chua so với đối chứng.

Trong nghiên cứu của Du et al (2022) chủng vi khuẩn HDE-9 được phân lập từ dưa cải bắp và được xác định là *Levilactobacillus brevis*. Một exopolysaccharide (EPS) đã được phân lập và tinh chế từ *L. brevis* HDE-9. EPS thể hiện giá trị cao về tính ổn định nhiệt, khả năng hòa tan trong nước, khả năng giữ nước (WHC) và hoạt tính khử hóa. Tính tiếp xúc với nước của EPS cho thấy tính kỵ nước tương đối cao khi có mặt sucrose. Kết quả cho thấy EPS có khả năng đông đặc sữa mạnh theo cách phụ thuộc vào liều lượng và EPS có thể cải thiện đáng kể kết cấu của sữa chua, cho thấy ứng dụng tiềm năng như một chất khởi động chức năng trong sản xuất các sản phẩm sữa lên men.

Nghiên cứu của L. Wang et al (2022) kiểm tra các đặc tính lên men của chủng *Leuconostoc mesenteroides* (XR1) và điều tra tác động của XR1 exopolysaccharide (EPS) đối với cấu trúc vi mô, kết cấu và đặc tính lưu biến của sữa chua. Việc bổ sung XR1 EPS vào sữa lên men đã cải thiện hiệu quả khả năng giữ nước (WHC) của sữa lên men và thay đổi cấu trúc vi mô. Kết quả thu được rằng XR1 EPS hữu ích như một chất phụ gia hữu cơ tự nhiên có thể thay thế các chất phụ gia hóa học trong các sản phẩm sữa.

## Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. NGUYÊN LIỆU

#### 2.1.1. Sữa bột nguyên kem

Sử dụng sữa bột Nguyên kem có đường Vinamilk (Việt Nam) có thành phần dinh dưỡng (Sữa bột nguyên chất (84%), đường (9,2%), chất xơ hòa tan oligofructose, chất béo MCT, chất nhũ hóa (lecithin đậu nành), hương vani tổng hợp dùng cho thực phẩm). Sữa bột được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

#### 2.1.2. Đường

Sử dụng sản phẩm đường mía thượng hạng thương hiệu Biên Hòa (Việt Nam) có những thành phần dinh dưỡng như: Năng lượng, carbohydrate. Theo đó, trong 100g đường mía Biên Hòa có khoảng 399.2 kcal. Đường được bảo quản ở nhiệt độ phòng.



Hình 2.1 Sữa bột nguyên kem & Đường mía. Nguồn: <https://holcim/> và <https://genshai.com/>

### 2.2. DỤNG CỤ – THIẾT BỊ – HÓA CHẤT

#### 2.2.1. Dụng cụ

Bảng 2.1 Thiết bị dụng cụ

Becher	Erlen	Pipet
Đũa thủy tinh	Ống nghiệm	Micropipet
Buret	Giá ống nghiệm	Bếp hồng ngoại

### 2.2.2. Thiết bị



**Hình 2.2** Cân kỹ thuật 2 số lẻ PA2102 (Ohaus Corporation, New Jersey, USA).



**Hình 2.3** Máy đo pH để bàn MI 150 (Milwaukee Instruments, Romania).



**Hình 2.4** Máy lắc vortex kỹ thuật số ZX4 (Velp Scientifica, Usmate, Italia)



**Hình 2.5** Khúc xạ kế đo độ ngọt Master-53M (Atago, Nhật Bản).



**Hình 2.6** Máy quang phổ UV/VIS-9000S (Metash, Thượng Hải, Trung Quốc).



**Hình 2.7** Bể điều nhiệt WB-22 (DaiHan Scientific, Hàn Quốc).



**Hình 2.8 Bếp điện hồng ngoại MIR-B2017DD (Midea, Trung Quốc)**



**Hình 2.9 Nồi hấp tiệt trùng HAC080 (LK LAB, Hàn Quốc)**



**Hình 2.10 Tủ sấy đối lưu cưỡng bức LO-FS100 (LK LAB – Hàn Quốc)**



**Hình 2.11 Tủ an toàn sinh học cấp II 11235BBC86 (Biobase - Trung Quốc)**

### 2.2.3. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu gồm glucose ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ ) (Trung Quốc), yeast extract powder (Ấn Độ), peptone (Trung Quốc), glycerol ( $C_3H_8O_3$ ) (Trung Quốc), ethanol (Tây Ban Nha), sodium hydroxide (NaOH) (Trung Quốc), Lactobacillus MRS Broth (Himedia- Ấn Độ), agar (Trung Quốc) và chất chỉ thị phenolphthalein 2%.

## 2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

### 2.3.1. Thời gian nghiên cứu

Từ ngày 15/02/2023 đến ngày 30/08/2023.

### 2.3.2. Địa điểm nghiên cứu

Phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Kỹ thuật Thực phẩm và Môi trường, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, 331 Quốc lộ 1A, Phường An Phú Đông, Quận 12, Thành phố Hồ Chí Minh.

## 2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

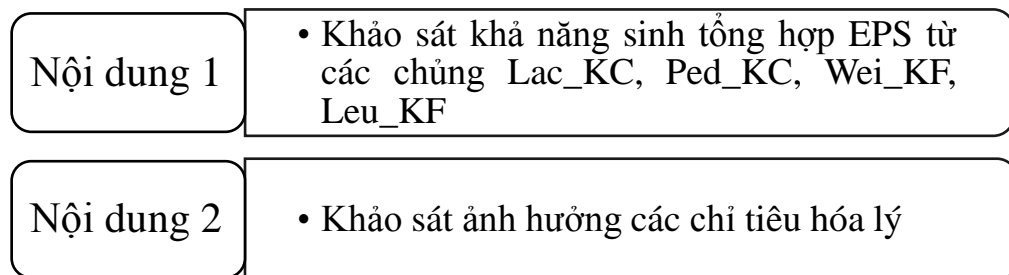
### 2.4.1. Quy trình thu nhận EPS trong môi trường MRS lỏng

Trong nghiên cứu này, các giống vi khuẩn acid lactic được đồng lên men với giống sữa chua truyền thông bao gồm: *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC) phân lập từ kim chi, *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC) phân lập từ kim chi, *Weisella cibaria* (Wei\_KF) phân lập từ yến mạch, *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF) phân lập từ kefir. Để chuẩn bị giống vi khuẩn acid lactic sinh EPS, sử dụng hai vòng ria khuẩn tăng sinh trong 9 mL hỗn hợp dịch sữa tươi đã chuẩn bị và ủ ở nhiệt độ 37 °C. Sau khi thu được giống vi khuẩn đồng lên lên tiếp tục tăng sinh vào 90 mL hỗn hợp dịch sữa tươi đã chuẩn bị tiến hành ủ ở nhiệt độ 40 °C trong 24 h.

#### 2.4.2. Quy trình lên men yogurt

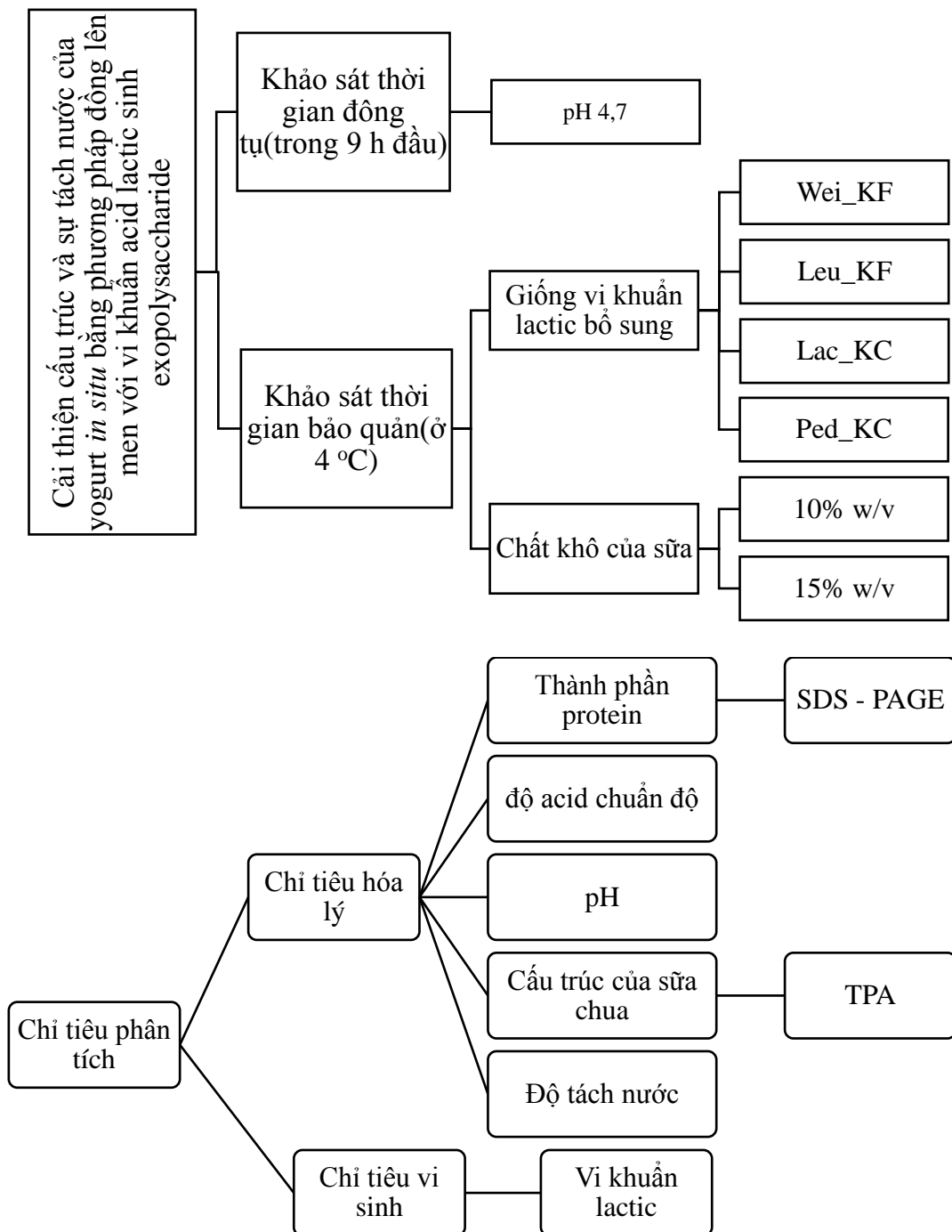
Sữa bột nguyên kem (10 và 15% w/v) được hòa tan trong nước 70 °C trước khi hòa tan 150 g đường sucrose. Sau khi khuấy thu được hỗn hợp đồng nhất, hỗn hợp được làm nguội về 40 – 42 °C, bổ sung giống vi khuẩn acid lactic (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* và chủng vi khuẩn acid lactic sinh EPS ở tỉ lệ 1:1:1 với mật độ ban đầu  $10^8$  CFU/mL) ở tỉ lệ giống cấy 10% và rót vào hũ thủy tinh để lên men ở 40 °C trong 8 h sử dụng tủ vi khí hậu RGX-80B (Xingchen SHKT, Trung Quốc). Chủng vi khuẩn lactic sinh EPS được đồng lên men với giống sữa chua truyền thống được khảo sát bao gồm *Weissella cibaria*, *Leuconotoc lactics*, *Lactiplantillus plantarum* và *Pediococcus acidilactici*.

#### 2.4.3. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.12 Sơ đồ nghiên cứu

## 2.4.4. Bố trí thí nghiệm



Hình 2.13 Sơ đồ thí nghiệm

## **2.5. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH**

### **2.5.1. Phương pháp xác định pH và độ acid chuẩn độ**

pH được đo bằng máy đo pH HI 2211-02 (Hanna Instruments, Mauritius, Romania). Độ acid chuẩn độ được xác định bằng cách chuẩn độ 10 mL mẫu bằng NaOH 0.1 N cho tới khi chỉ thị phenolphthalein chuyển sang màu hồng nhạt bền trong 30 s và được biểu diễn theo đơn vị g lactic acid/L.

### **2.5.2. Phương pháp xác định cấu trúc sữa chua (firmness, cohesiveness, adhesiveness, elasticity, gumminess)**

Các phép đo cấu trúc được thực hiện bằng Máy phân tích kết cấu CT3 (AMETEK Brookfield Inc., Middleboro, USA) với đầu đo hình trụ (TA4/1000, đường kính 38.1 mm). Dữ liệu được ghi lại bằng cách sử dụng phần mềm Texture Proc CT V1.3 Build 15. Khoảng cách giữa đầu đo và mẫu là 30 mm trong khi trigger load là 10 g di chuyển với tốc độ 1 mm/s và trở lại với tốc độ 1 mm/s. Các thông số được ghi lại sau khi đo bao gồm độ cứng, độ dính, độ kết dính, độ dai, độ dẻo và độ đàn hồi.

### **2.5.3. Phương pháp xác định mức độ tách nước của sữa chua**

Mức độ tách nước của sữa chua (%) được đo bằng cách đặt 30 g mẫu trên khay ở 4°C trong 5 h để tách whey tự nhiên và được tính toán theo tỷ lệ giữa lượng whey tách ra với khối lượng mẫu.

### **2.5.4. Phương pháp điện di SDS – PAGE**

Thành phần protein của các mẫu sữa chua được phát hiện bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE 12.5%. Trước khi điện di, các mẫu sữa chua được biến tính bằng cách trộn với dung dịch đệm tải 3X theo tỷ lệ 2:1, ủ ở 100 °C trong 3 phút và làm lạnh trong 2 phút. Quá trình biến tính protein được lặp lại 3 lần ở 100 °C và 2 lần làm lạnh. Sau đó, 10 µL dung dịch biến tính được bơm vào các giếng gel 4% (30% acrylamide – 0,5 mL, dung dịch đệm Tris-HCl 0,5 mM ở pH 6,8 – 0,62 mL, nước – 1.37 mL, 10% SDS). – 25 µL, APS 10% – 12.5 µL, và TEMED – 2.5 µL) và được phân tách bằng dòng điện 70 V trước khi chuyển sang gel phân giải 12.5% (30% acrylamide – 2.5 mL, dung dịch đệm Tris-HCl 0.5 mM ở pH 8.8 – 1.5 mL, nước – 1.9 mL, 10% SDS – 60 µL, APS 10% – 27 µL và TEMED – 4.5 µL) sử dụng dòng điện

90 V. Cuối cùng, gel được nhuộm bằng dung dịch Coomassie Blue R-250 0,23% trong 30 phút và khử màu trong hỗn hợp acid axetic 5% metanol-7% cho đến khi gel trong suốt trước khi chụp ảnh bằng hệ thống BioDoc-It UVP (Analytik Jena AG, Đức). Các dải màu xanh lam được coi là protein và được so sánh với các protein tiêu chuẩn có trọng lượng phân tử cụ thể trong khoảng 10–170 kDa.

#### **2.5.5. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn lactic**

Mật độ vi khuẩn sinh acid lactic được xác định bằng phương pháp trang đĩa trên môi trường thạch MRS (g/L): peptone 5.0, glyxerol 5.0, cao nấm men 5.0, glucose 5.0, agar 20.0 và CaCO<sub>3</sub> 5.0) pH = 4.5. Ban đầu, 1 mL sữa chua được thêm vào 9 mL nước muối sinh lý 0.9% và tiếp tục pha loãng thành dãy nồng độ 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>. Sau đó, 100 µL dịch pha loãng của mỗi nồng độ được trang trên bề mặt của thạch MRS. Các đĩa thạch sẽ được ủ trong 48 giờ ở 30 °C và tiến hành đếm khuẩn lạc để xác định mật độ vi khuẩn theo đơn vị CFU/mL.

#### **2.6. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU**

Tất cả xử lý thống kê được thực hiện trên R version 4.1.2 (Team, 2013) sử dụng gói lệnh FactoMineR (Lê et al., 2008); (Holste, 2016). Phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Tukey được thực hiện để xác định sự khác biệt có nghĩa giữa điểm ưa thích chung và điểm thị hiếu theo từng thuộc tính của người thử đối với các sản phẩm ở mức ý nghĩa 5%.

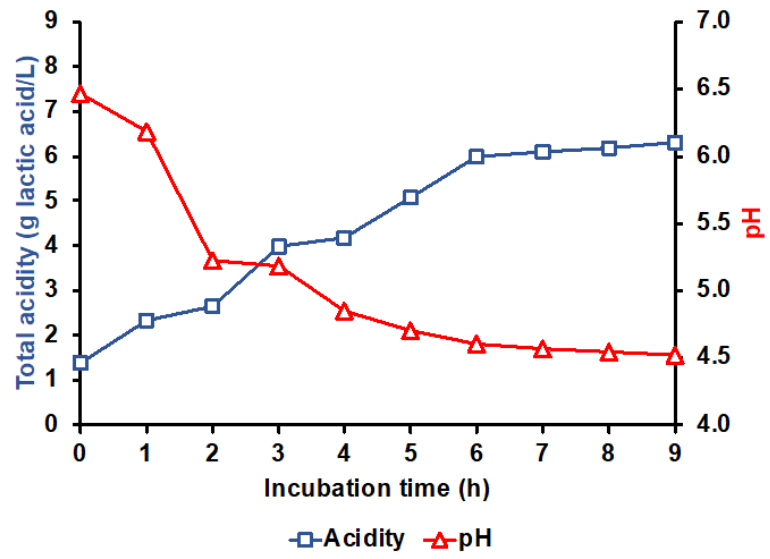
## Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. SỰ THAY ĐỔI VỀ PH VÀ ĐỘ ACID TỔNG CỦA SỮA TRONG QUÁ TRÌNH Ủ

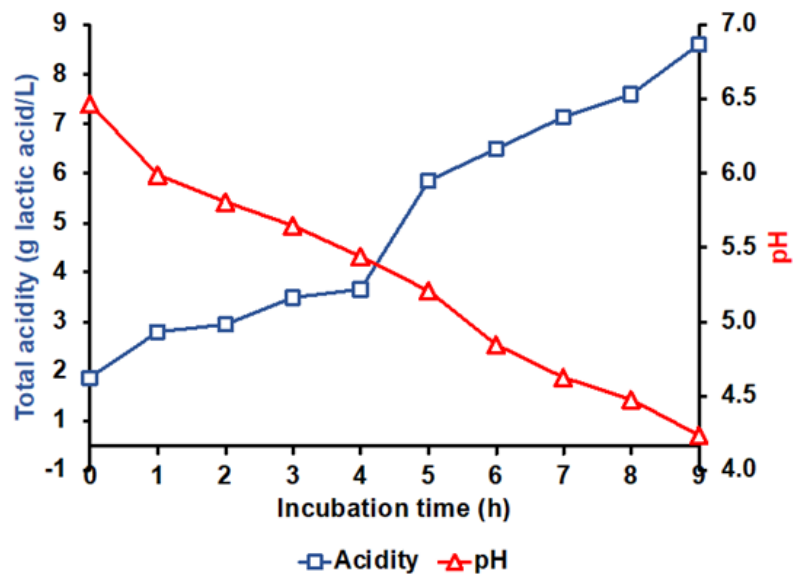
Quá trình lên men được thực hiện nhờ hoạt động của hai loại vi khuẩn acid lactic (LAB): *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*; những vi sinh vật này, trong sản phẩm cuối cùng, phải tồn tại và phong phú để mang lại những tác dụng có lợi cho sức khỏe (Rodriguez et al., 2013). Cấu trúc của sữa đông trong quá trình đông tụ là một yếu tố quan trọng đặc tính của sữa chua nguyên chất quyết định bản sắc và khả năng chấp nhận của sản phẩm. Đông tụ sữa bằng acid là kết quả của việc loại bỏ liên kết canxi giữa các micelle casein, gây mất ổn định của casein tập hợp lại và tạo thành sữa đông (Shaker et al., 2000).

Thực phẩm có chứa vi khuẩn acid lactic như sữa chua rất quan trọng đến lợi ích sức khỏe vì chúng có thể giảm thiểu tác động bất lợi của vi khuẩn gây bệnh trong ruột. Vai trò của các chủng nuôi cấy khởi động có thể được thể hiện thông qua tác động của chúng trong các biến đổi vật lý (hình thái) và hóa học (cấu trúc). Quá trình giảm độ pH của sữa (quá trình acid hóa) do vi khuẩn thực hiện sẽ tạo ra các phân tử exopolysaccharide (EPS) và làm mất ổn định sự phân tán của các mixen casein (Rodriguez et al., 2013). Trong quá trình lên men sữa chua, vi khuẩn có mặt trong sữa sẽ biến đường lactose thành acid lactic, acid lactic sinh ra làm giảm pH và xảy ra quá trình kết tụ gel hình thành quá trình đông tụ.

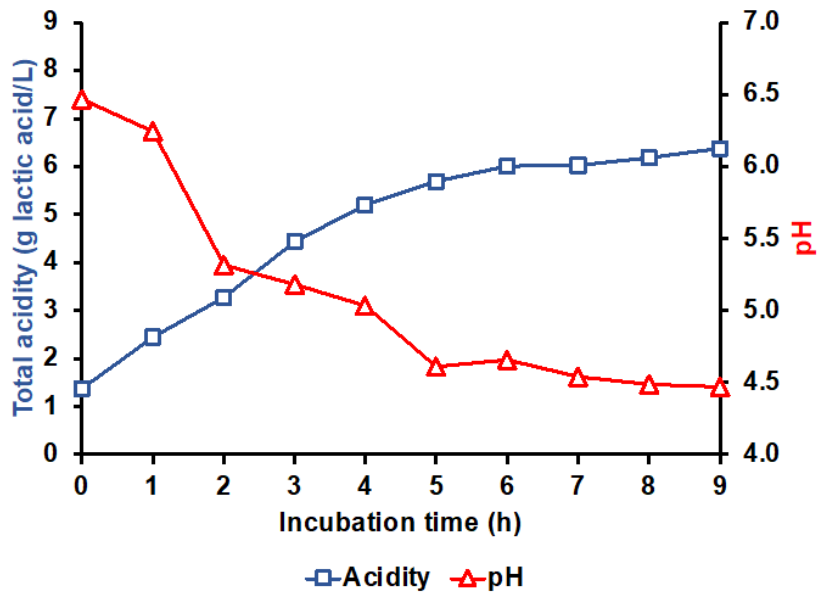
Ảnh hưởng của thời gian ủ ấm ở 37 °C của sữa chua chứa 10% và 15% chất khô được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chua chứa 10% chất khô được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weissella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF) lên sự thay đổi pH và độ acid chuẩn độ được trình bày trong **Hình 3.1**.



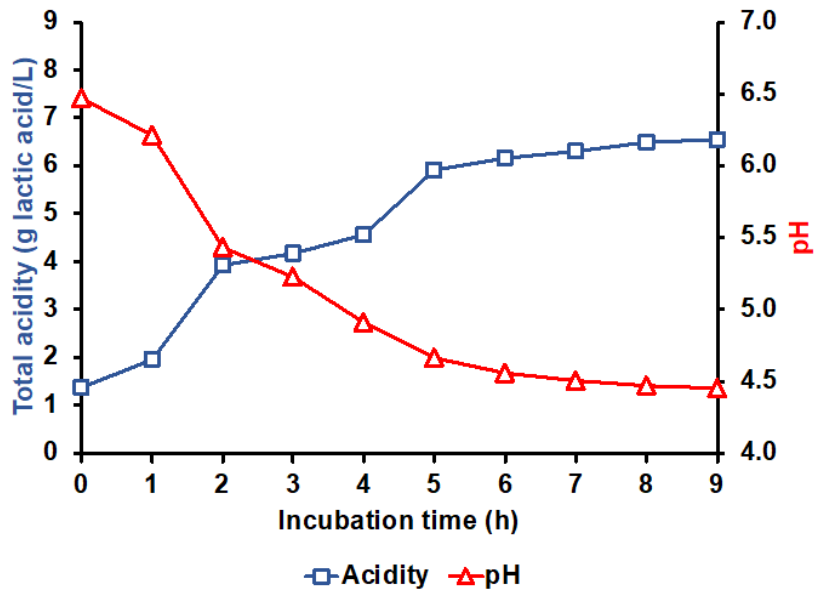
(A)



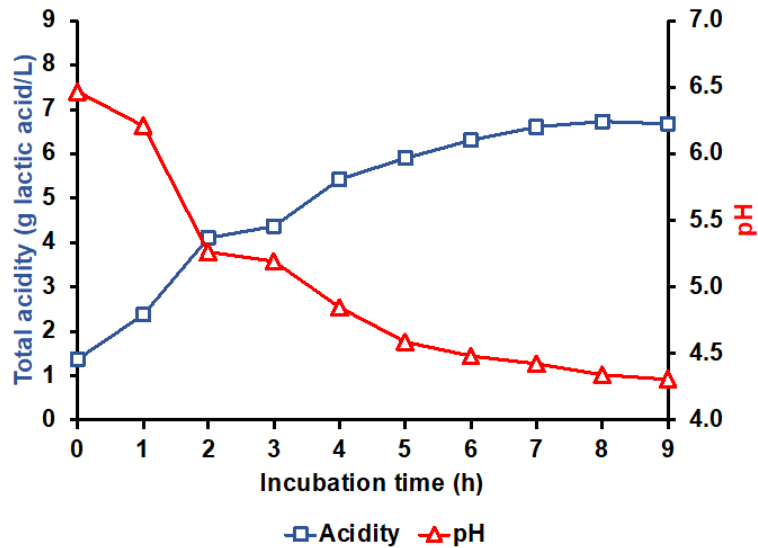
(B)



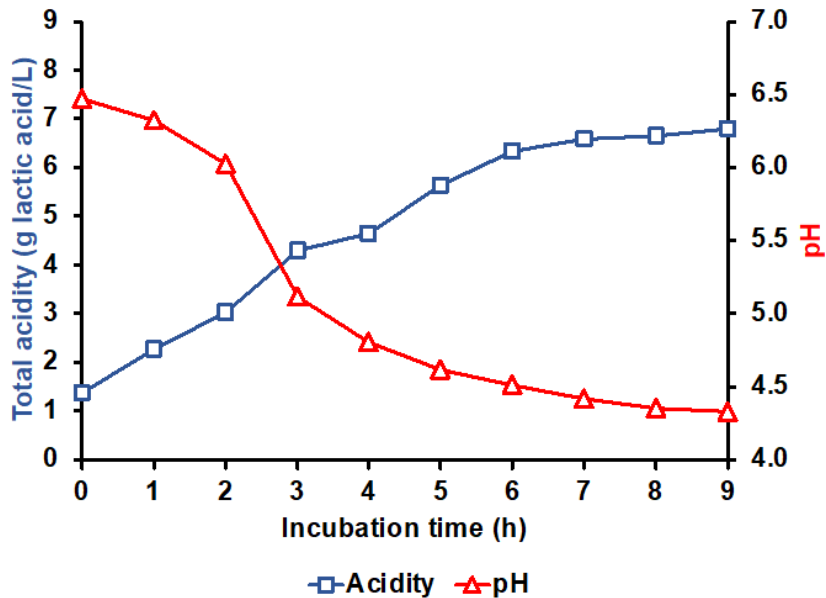
(C)



(D)



(E)



(F)

**Hình 3.1** Sự thay đổi pH và độ acid tổng (g lactic acid/L) theo thời gian ủ ấm ở 40 °C của sữa chứa 10% (A) và 15% (B) chất khô sữa được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với (C) *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), (D) *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), (E) *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và (F) *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF)

Khi thời gian ủ ấm ở 40 °C tăng thì pH của mẫu sữa chua chứa 15% chất khô được cấy giống truyền thống giảm mạnh theo thời gian ủ từ tiếng thứ nhất, giảm đều từ những tiếng còn lại. Những mẫu sữa còn lại cũng giảm mạnh từ tiếng thứ nhất.

Riêng mẫu sữa chua chứa 10% chất khô đồng lên men với *Weissella cibaria*, pH giảm mạnh từ tiếng thứ 2, pH cuối của tất cả các mẫu sữa chua nằm trong khoảng từ 4.23 đến 4.52. Có thể thấy rằng acid tổng của tất cả các mẫu tăng đều theo thời gian. Riêng mẫu sữa chua chứa 15% chất khô được cấy giống truyền thống tăng mạnh, nồng độ cuối của mẫu 15% chất khô cao vượt trội 8.11 (g lactic/L) so với những mẫu còn lại lần lượt là 6.31; 6.37; 6.55; 6.67; 6.8 (g lactic/ L).

### 3.2. SỰ THAY ĐỔI VỀ PH VÀ ĐỘ ACID TỔNG CỦA SỮA TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN

Quá trình thay đổi của pH là kết quả của quá trình sinh tổng hợp acid lactic, một trong những chức năng chính của acid lactic trong các sản phẩm từ sữa. Ngoài ra, độ chua chuẩn độ là một tiêu chuẩn dùng để đo lường chất lượng của sữa chua và có thể phản ánh quá trình lên men sữa chua ở một mức độ nhất định (J. Wang et al., 2022).

Ảnh hưởng của thời gian lên men bảo quản lên sự thay đổi pH, độ acid tổng (g lactic acid/L) và độ tách nước (%) của sữa chua chứa 10% và 15% chất khô sữa bột được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chua chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weissella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF) được trình bày trong **Bảng 3.1** Có thể thấy rằng quá trình lên men sau 35 ngày bảo quản của tất cả các mẫu sữa chua, độ pH tất cả các mẫu giảm đều nằm trong khoảng từ 3.75 – 3.95. Tương tự, độ acid tổng tăng đáng kể theo thời bảo quản sau 35 ngày thì độ acid tổng từ 10.04 – 11.61 (g lactic/L). Trong khi đó, mẫu sữa chua 15% chất khô sữa cấy giống truyền thống đã nằm trong khoảng 10.0 (g lactic/L) vào ngày đầu tiên bảo quản. Độ pH giảm có thể là nguyên nhân đối với sự biến thiên của độ acid chuẩn độ. Ngoài ra, việc sản xuất acid có liên quan trực tiếp đến chuyển hóa lactose bằng sữa chua và acid amin (Özer & Atasoy, 2002).

**Bảng 3.1** Sự thay đổi pH, độ acid tổng (g lactic acid/L) và độ tách nước (%) theo thời gian lên men của sữa chua chứa 10% và 15% chất khô sữa được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chua chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weissella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF).

		Ngày lên men					
		1	7	14	21	28	35
<b>pH</b>							
10%		4.09 (0.02) <sup>aA</sup>	3.98 (0.03) <sup>bA</sup>	3.91 (0.01) <sup>cA</sup>	3.89 (0.01) <sup>cA</sup>	3.96 (0.05) <sup>bcA</sup>	3.95 (0.02) <sup>bcA</sup>
15%		4.00 (0.01) <sup>aAB</sup>	3.89 (0.03) <sup>bA</sup>	3.87 (0.04) <sup>bAB</sup>	3.86 (0.04) <sup>bA</sup>	3.92 (0.02) <sup>bAB</sup>	3.85 (0.01) <sup>bAB</sup>
Lac_ KC		3.87 (0.08) <sup>aC</sup>	3.77 (0.02) <sup>abA</sup>	3.77 (0.01) <sup>abB</sup>	3.72 (0.04) <sup>abB</sup>	3.68 (0.01) <sup>bc</sup>	3.78 (0.10) <sup>abB</sup>
Ped_ KC		3.92 (0.02) <sup>aBC</sup>	4.07 (0.28) <sup>aA</sup>	3.79 (0.01) <sup>ab</sup>	3.75 (0.01) <sup>ab</sup>	3.90 (0.14) <sup>aAB</sup>	3.75 (0.02) <sup>aB</sup>
Wei_ KF		3.90 (0.06) <sup>aBC</sup>	3.89 (0.04) <sup>aA</sup>	3.84 (0.02) <sup>abB</sup>	3.73 (0.02) <sup>cAB</sup>	3.77 (0.03) <sup>bcBC</sup>	3.84 (0.04) <sup>abAB</sup>
Leu_ KF		3.93 (0.01) <sup>aBC</sup>	4.00 (0.11) <sup>abA</sup>	3.90 (0.07) <sup>abA</sup>	3.75 (0.01) <sup>bB</sup>	3.86 (0.05) <sup>abABC</sup>	3.78 (0.07) <sup>bB</sup>
<b>Độ acid tổng (g lactic acid/L)</b>							
10%		7.52 (0.14) <sup>aA</sup>	7.44 (0.18) <sup>aA</sup>	8.30 (0.12) <sup>bA</sup>	8.24 (0.06) <sup>bA</sup>	8.57 (0.15) <sup>bA</sup>	10.04 (0.06) <sup>cA</sup>
15%		10.29 (0.05) <sup>aB</sup>	10.4 (0.09) <sup>bB</sup>	10.78 (0.25) <sup>bB</sup>	10.64 (0.15) <sup>bB</sup>	10.00 (0.15) <sup>bB</sup>	11.61 (0.06) <sup>bB</sup>
Lac_ KC		8.89 (0.23) <sup>aC</sup>	10.2 (0.32) <sup>bB</sup>	10.83 (0.28) <sup>cB</sup>	10.74 (0.21) <sup>bcB</sup>	10.45 (0.06) <sup>bcC</sup>	10.66 (0.10) <sup>bcC</sup>
Ped_ KC		8.89 (0.23) <sup>aC</sup>	7.76 (0.09) <sup>bA</sup>	8.46 (0.05) <sup>cA</sup>	9.14 (0.06) <sup>aC</sup>	9.88 (0.15) <sup>dB</sup>	10.04 (0.06) <sup>dA</sup>
Wei_ KF		9.83 (0.45) <sup>abB</sup>	9.15 (0.84) <sup>aC</sup>	9.73 (0.12) <sup>abC</sup>	9.50 (0.10) <sup>aD</sup>	9.91 (0.15) <sup>abB</sup>	10.73 (0.20) <sup>bc</sup>
Leu_ KF		8.8 (0.14) <sup>aC</sup>	8.41 (0.13) <sup>bAC</sup>	8.06 (0.09) <sup>cA</sup>	8.40 (0.10) <sup>bA</sup>	9.88 (0.15) <sup>dB</sup>	10.08 (0.10) <sup>dA</sup>
<b>Sự tách nước (%)</b>							
10%		43.73 (1.98) <sup>aA</sup>	37.78 (1.36) <sup>bcA</sup>	36.27 (1.43) <sup>bA</sup>	40.52 (2.32) <sup>cdA</sup>	41.90 (2.31) <sup>adA</sup>	38.06 (1.93) <sup>bcA</sup>
15%		32.85	21.40	25.85	32.27	33.02	27.60

		Ngày lên men					
		1	7	14	21	28	35
		(2.20) <sup>aB</sup>	(1.56) <sup>bB</sup>	(1.03) <sup>cB</sup>	(2.37) <sup>aB</sup>	(1.33) <sup>aB</sup>	(1.12) <sup>cB</sup>
Lac_	40.53	43.33	36.32	42.20	45.84	39.81	
KC	(3.54) <sup>acA</sup>	(2.94) <sup>bcC</sup>	(0.70) <sup>aC</sup>	(2.29) <sup>bcA</sup>	(2.65) <sup>bA</sup>	(1.67) <sup>acAC</sup>	
Ped_	48.92	40.30	40.22	42.93	40.31	42.33	
KC	(1.32) <sup>aC</sup>	(1.19) <sup>bAC</sup>	(1.77) <sup>bAC</sup>	(1.28) <sup>bA</sup>	(2.15) <sup>bA</sup>	(1.57) <sup>bC</sup>	
Wei_	42.06	33.33	33.66	44.22	45.01	39.44	
KF	(2.47) <sup>abA</sup>	(0.82) <sup>cD</sup>	(1.86) <sup>cD</sup>	(1.09) <sup>aA</sup>	(2.80) <sup>aA</sup>	(1.89) <sup>bAC</sup>	
Leu_	43.52	43.27	36.13	42.75	43.57	39.45	
KF	(1.40) <sup>bA</sup>	(2.29) <sup>bc</sup>	(0.98) <sup>bc</sup>	(1.43) <sup>bA</sup>	(2.95) <sup>bA</sup>	(2.50) <sup>abAC</sup>	

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình (độ lệch chuẩn). Đối với từng chỉ tiêu đo, giá trị trong cùng một hàng có chữ cái thường giống nhau và giá trị trong cùng một cột có chữ cái in hoa giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. SỰ THAY ĐỔI VỀ HÌNH THÁI VÀ ĐỘ TÁCH NƯỚC CỦA YOGURT TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN













Sữa chua có kết cấu đồng nhất mịn màng. Mỗi thìa phải giữ nguyên hình dạng, không có cạnh sắc. Màu sắc sạch sẽ, tự nhiên với bề ngoài mịn, bề mặt phải mịn và không có hiện tượng tách whey quá mức hoặc tăng trưởng hoặc đổi màu bề mặt (Karagül- Yüceer & Drake, 2013). Kết cấu của sữa chua là kết quả của sự kết tụ acid của các micelle casein và việc tạo ra EPS, điều này rất quan trọng đối với chất lượng của sản phẩm (Beal et al., 1999).

















































Sự thay đổi hình thái bị ảnh hưởng bởi thời gian lên men của sữa chua chứa 10% và 15% chất khô được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chua chứa 10% chất khô được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF) được trình bày trong **Bảng 3.2**.

Sự thay đổi hình thái của mẫu sữa chua chứa 15% chất khô sữa được cấy giống sữa chua truyền thống sau 35 ngày bảo quản không có sự khác so với ngày đầu tiên bảo quản. Tuy nhiên, mẫu sữa chua chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC) có cấu trúc tốt, rắn chắc hơn so với mẫu sữa chua chứa 10% chất khô sữa được cấy giống sữa chua truyền thống. Những mẫu còn lại có cấu trúc bở dần theo thời gian bảo quản, mức độ tách nước nhiều sau 35 ngày.

Sự tách nước của các mẫu sữa chua giảm đều theo thời gian bảo quản sau đó tăng lại vào những ngày bảo quản tiếp theo. Mẫu sữa chua 10% chất khô sữa đồng lên men với mẫu *Weisella cibaria* cho kết quả độ tách nước thấp so với những mẫu đồng lên men khác là 39.44% cũng cao hơn mẫu 10% chất khô sữa được cấy giống truyền thống. Nhưng mẫu sữa chua 15% chất khô sữa cấy giống truyền thống tốt hơn có sự tách nước thấp nhất do có độ cứng tốt 27.60 %.

**Bảng 3.2 Sự thay đổi hình thái theo thời gian lên men của sữa chua chứa 10% và 15% chất khô sữa được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chua chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF).**

	Ngày 1		Ngày 7		Ngày 14		Ngày 21		Ngày 28		Ngày 35	
	Cấu trúc	Tách nước	Cấu trúc	Tách nước	Cấu trúc	Tách nước	Cấu trúc	Tách nước	Cấu trúc	Tách nước	Cấu trúc	Tách nước
<b>10%</b>												
	Bắt đầu bị rỗ bề mặt	<b>XX</b>	Bị rỗ nhẹ	<b>XX</b>	Bị rỗ, bỏ nhẹ	<b>XX</b>	Bị rỗ, bỏ	<b>XX</b>	Bị bỏ	<b>XX</b>	Bị bỏ nhiều	<b>XXX</b>
<b>15%</b>												
	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>

<b>Lac_KC</b>												
	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>XX</b>	Mịn	<b>XX</b>
<b>Ped_KC</b>												
	Bị rỗ li ti	<b>X</b>	Bị rỗ	<b>XX</b>	Bị rỗ	<b>XX</b>	Bị rỗ	<b>XXX</b>	Bị rỗ	<b>XXX</b>	Bị rỗ	<b>XXX</b>
<b>Wei_KF</b>												
	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>
<b>Leu_KF</b>												
	Xuất hiện phần rỗ nhỏ	<b>X</b>	Mịn	<b>X</b>	Bị rỗ nhẹ	<b>XX</b>	Bị rỗ ít	<b>XX</b>	Bị rỗ	<b>XX</b>	Bị rỗ nhiều	<b>XX</b>

Ghi chú: Mức độ tách nước: không – **X**, nhẹ – **XX**, nặng – **XXX**

### 3.4. SỰ THAY ĐỔI VỀ CẤU TRÚC CỦA YOGURT TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN

Kết cấu của sữa chua là một thuộc tính quan trọng để người tiêu dùng chấp nhận (Britten & Giroux, 2001). Kết cấu của sữa chua dựa trên số lượng và chức năng của các thành phần riêng lẻ bao gồm gel sữa chua và sự tương tác giữa thành phần cũng như các bước công nghệ trong quá trình sản xuất. Hơn thế nữa, thành phần và quy trình sữa ảnh hưởng đến độ ổn định và tính chất lưu biến của sữa chua như độ cứng, tính nhất quán, độ bám dính và tính gắn kết (Tamime & Robinson, 1985).

Độ cứng của sữa chua là rất quan trọng trong việc thiết lập sự ưa thích. Đặc điểm kết cấu quan trọng nhất của sữa chua có độ cứng và khả năng giữ nước (Izadi et al., 2015).

Sự thay đổi cấu trúc theo thời gian lên men của sữa chua chứa 10% và 15% chất khô được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chua chứa 10% chất khô được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF) được trình bày trong **Bảng 3.3**.

**Bảng 3.3 Sự thay đổi cấu trúc theo thời gian lên men của sữa chua chứa 10% và 15% chất khô sữa được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chua chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF).**

		Ngày lên men		
		1	14	35
Hardness (g)	10%	20.5 (0.7) <sup>aA</sup>	33.3 (1.2) <sup>bA</sup>	39.0 (2.8) <sup>cA</sup>
	15%	98.3 (1.5) <sup>aB</sup>	108.0 (4.2) <sup>bB</sup>	152.5 (2.1) <sup>cB</sup>
	Lac_KC	29.0 (1.4) <sup>aC</sup>	40.0 (2.8) <sup>bA</sup>	50.3 (0.6) <sup>cC</sup>
	Ped_KC	15.3 (0.6) <sup>aD</sup>	22.5 (2.1) <sup>bC</sup>	19.0 (2.8) <sup>abD</sup>
	Wei_KF	50.0 (2.8) <sup>aE</sup>	75.0 (2.8) <sup>bD</sup>	75.0 (2.7) <sup>bE</sup>
	Leu_KF	32.7 (1.5) <sup>aC</sup>	53.5 (0.7) <sup>bE</sup>	33.0 (1.4) <sup>aA</sup>
Adhesiveness (mJ)	10%	0.35 (0.07) <sup>abA</sup>	0.55 (0.07) <sup>bA</sup>	0.30 (0.02) <sup>aA</sup>

	15%	0.45 (0.07) <sup>aAB</sup>	0.45 (0.07) <sup>aAB</sup>	0.45 (0.07) <sup>aA</sup>
	Lac_KC	0.35 (0.07) <sup>aA</sup>	0.30 (0.02) <sup>aB</sup>	0.35 (0.07) <sup>aA</sup>
	Ped_KC	0.53 (0.12) <sup>aAB</sup>	1.00 (0.10) <sup>bC</sup>	0.40 (0.01) <sup>aA</sup>
	Wei_KF	0.75 (0.07) <sup>aBC</sup>	0.33 (0.06) <sup>bAB</sup>	0.37 (0.06) <sup>bA</sup>
	Leu_KF	0.93 (0.12) <sup>aC</sup>	0.35 (0.07) <sup>bAB</sup>	0.80 (0.01) <sup>aB</sup>
Springiness (mm)	10%	3.20 (0.13) <sup>aA</sup>	3.40 (0.21) <sup>aAB</sup>	2.65 (0.12) <sup>bA</sup>
	15%	3.61 (0.10) <sup>aB</sup>	3.69 (0.06) <sup>aB</sup>	3.7 (0.13) <sup>aB</sup>
	Lac_KC	3.42 (0.03) <sup>aAB</sup>	3.35 (0.01) <sup>aAB</sup>	3.42 (0.14) <sup>aBC</sup>
	Ped_KC	2.42 (0.18) <sup>aC</sup>	2.98 (0.09) <sup>bA</sup>	3.09 (0.08) <sup>bC</sup>
	Wei_KF	3.49 (0.15) <sup>aAB</sup>	3.54 (0.17) <sup>aB</sup>	3.74 (0.09) <sup>aB</sup>
	Leu_KF	3.30 (0.02) <sup>aAB</sup>	3.47 (0.24) <sup>aAB</sup>	3.17 (0.17) <sup>aC</sup>
Cohesiveness	10%	0.51 (0.11) <sup>aA</sup>	0.51 (0.21) <sup>aA</sup>	0.41 (0.03) <sup>aA</sup>
	15%	0.48 (0.01) <sup>aA</sup>	0.58 (0.05) <sup>aB</sup>	0.61 (0.10) <sup>aA</sup>
	Lac_KC	0.29 (0.92) <sup>aA</sup>	0.14 (0.41) <sup>aABC</sup>	0.48 (0.05) <sup>aA</sup>
	Ped_KC	-0.58 (0.01) <sup>aA</sup>	-0.31 (0.04) <sup>bAC</sup>	0.35 (0.04) <sup>cA</sup>
	Wei_KF	0.32 (0.01) <sup>aA</sup>	0.46 (0.03) <sup>aAB</sup>	0.35 (0.17) <sup>aA</sup>
	Leu_KF	-0.82 (0.12) <sup>aA</sup>	-0.54 (0.04) <sup>aC</sup>	0.56 (0.03) <sup>bA</sup>

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình (độ lệch chuẩn). Đối với từng chỉ tiêu đo, giá trị trong cùng một hàng có chữ cái thường giống nhau và giá trị trong cùng một cột có chữ cái in hoa giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $p > 0.05$ ).

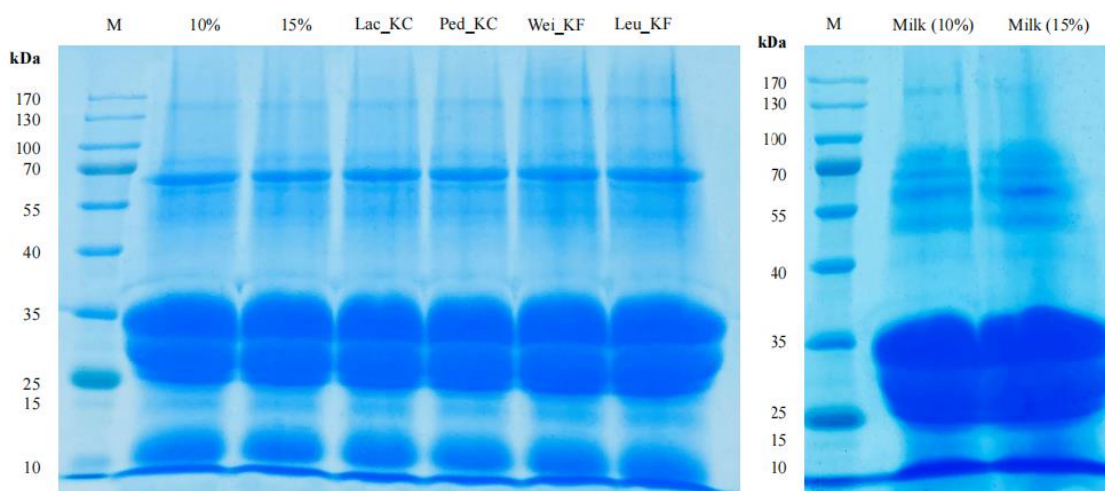
Có thể thấy rằng, xu hướng đối với mẫu 10% chất khô cây giống truyền thống và sữa chua 10% chất khô đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* có độ cứng tăng cao theo thời gian bảo quản.

Riêng mẫu sữa chua 10% chất khô đồng lên men với *Pediococcus acidilactici* và mẫu sữa chua 10% chất khô đồng lên men với *Leuconostoc lactis* khi bảo quản có độ cứng giảm dẫn đến tách nước nhiều. Đối với mẫu sữa chua 15% chất khô cây giống truyền thống có độ cứng cao nhất. Mẫu sữa chua 10% chất khô đồng lên men với *Weissella cibaria* có độ cứng tăng không đổi sau 2 tuần bảo quản tốt hơn so với mẫu sữa chua và mẫu 10% chất khô cây giống truyền thống. Nhưng mẫu sữa chua 15% chất khô cây giống truyền thống có độ cứng tốt nhất.

### 3.5. THÀNH PHẦN PROTEIN

Phương pháp phân tách protein bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE được sử dụng để xác định tổ hợp protein có trong sữa chua và sự khác nhau giữa các mẫu sữa chua đồng lên men với các giống vi khuẩn lactic khác nhau lần lượt là *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF) được thể hiện trong Hình 3.2.

Phần protein sữa gồm có một lượng lớn casein và whey protein ( $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, lactoferrin, và BSA). Casein được chia thành 4 nhóm ( $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - và  $\kappa$ -CN) chiếm gần 80% protein, đông tụ ở pH 4.6 và bền nhiệt (Lucey, 2002).



**Hình 3.2 Thành phần protein trên SDS-PAGE gel của sữa chua 10% và 15% chất khô được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa 10% chất khô được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF). Ghi chú: M – protein chuẩn với khối lượng phân tử (kDa) xác định.**

Phần lớn casein trong sữa do sự biến đổi xảy ra trong quá trình lên men và sản xuất sữa chua, có thể được chuyển hóa thành các peptide có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 10kD (Preci et al., 2021)

Kết quả điện di phân tách thành phần protein trong sữa và sữa sau lên men cho thấy rằng thành phần protein có trong sữa bột bao gồm  $\alpha$ -La (14.2 kDa), p-Lg (18

kDa), K-casein (19 kDa), p-casein (26.6 kDa),  $\alpha$ -casein (32.4 kDa), BSA (66 kDa) (Li et al., 2017).

Thành phần protein sữa sau lên men gồm có immunoglobulins (Igs, X110 kDa); lactoferrin (Lf, 78 kDa); BSA (66 kDa),  $\beta$ -Lg di-/trimers (33–40 kDa); caseins (~29–32 kDa);  $\beta$ -Lg monomers (18.4 kDa);  $\alpha$ -La (14.4 kDa) (Grácia-Juliá et al., 2008) và Ig-HC immunoglobulin heavy chain (55 kDa) (Hovjecki et al., 2021).

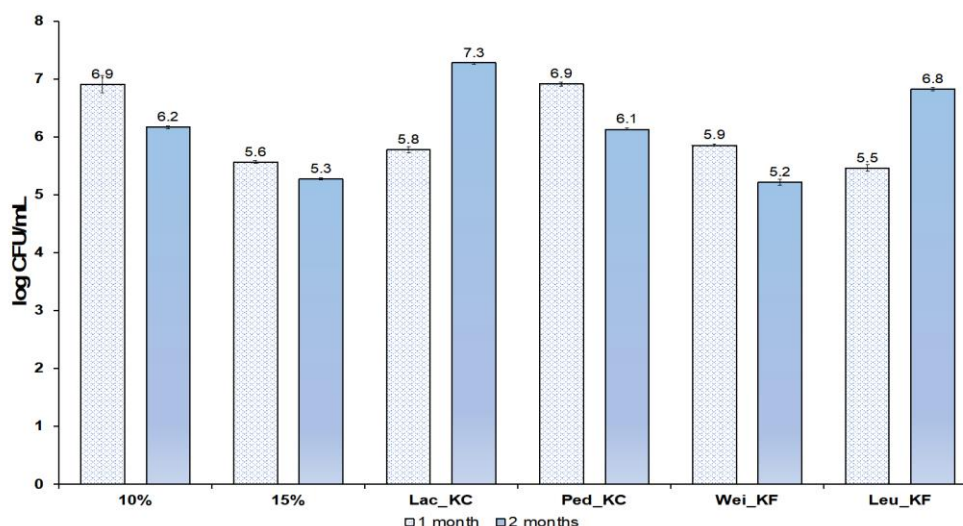
Trong quá trình lên men dựa theo kết quả điện di, dải 10% và 15% hàm lượng sữa được sử dụng làm đối chứng thành phần protein trải dài từ 55-72 kDa, 25-37 kDa và 10-14 kDa cho thấy độ bắt màu giảm dần ở 55-72 kDa (BSA) và 10-14 kDa ( $\alpha$ -lactalbumin) do vi khuẩn acid lactic phân hủy protein. Sau quá trình lên men sữa bởi vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Weisella cibaria*, *Leuconostoc lactis*, cho thấy quá trình lên men sữa chua vi khuẩn LAB giúp phân hủy thành phần casein (ở 25-37 kDa) thành các phân tử nhỏ hơn, Casein được chia thành 4 nhóm ( $\alpha$ s1- ,  $\alpha$ s2,  $\beta$ - và  $\kappa$ -CN) chiếm gần 80% protein. Trong đó sữa chua được chế biến từ các vi khuẩn lactic các dải giảm độ dày cho thấy sự hiện diện thấp hơn. Sự phân chia giữa  $\alpha$  và  $\beta$ -casein khó có thể nhìn thấy trong gel điện di do lượng protein này trong sữa nhiều hơn, dải cường độ tối hơn được coi là chiếm tỷ lệ lớn nhất của casein ( $\alpha$  s-casein). và  $\beta$ -casein).

Trong quá trình lên men, độ pH giảm, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thủy phân protein ở dạng peptide nhỏ hơn có đặc tính hoạt tính sinh học, trong đó sữa chua được chế biến từ các vi khuẩn lactic các dải giảm độ dày cho thấy sự hiện diện thấp hơn. Sự phân chia giữa  $\alpha$  và  $\beta$ -casein khó có thể nhìn thấy trong gel điện di do lượng protein này trong sữa nhiều hơn, dải cường độ tối hơn được coi là chiếm tỷ lệ lớn nhất của casein ( $\alpha$  s-casein). và  $\beta$ -casein) được quan sát.

### 3.6. MẬT ĐỘ VI KHUẨN ACID LACTIC

Kết quả nghiên cứu của Vinderola et al (2000) cũng cho thấy hiệu quả của việc kết hợp giữa dòng vi khuẩn probiotic với giống thương mại giúp cải thiện và giữ ổn định chất lượng của sữa chua trong thời gian bảo quản 4 tuần, ở nhiệt độ 5°C.

Kết quả mật độ vi khuẩn lactic sau 1 – 2 tháng bảo quản lạnh của mẫu sữa chua chứa 10% và 15% chất khô sữa được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Weisella cibaria* và *Leuconostoc lactis* được định lượng được trình bày trong **Hình 3.3**.



**Hình 3.3** Mật độ vi khuẩn acid lactic sau 1 và 2 tháng bảo quản lạnh của sữa chua chứa 10% (A) và 15% (B) chất khô được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chứa 10% chất khô sữa được đồng lên men với (C) *Lactiplantibacillus plantarum* (Lac\_KC), (D) *Pediococcus acidilactici* (Ped\_KC), (E) *Weisella cibaria* (Wei\_KF) và (F) *Leuconostoc lactis* (Leu\_KF)

**Hình 3.3.** cho thấy rằng thời gian bảo quản sữa chua (1 – 2 tháng), mật độ vi khuẩn lactic của mẫu 10% và 15% chất khô được cấy giống sữa chua truyền thống và sữa chứa 10% chất khô được đồng lên men với *Pediococcus acidilactici* và *Weisella cibaria* giảm dần theo thời gian. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn của mẫu sữa chứa 10% chất khô được đồng lên men *Lactiplantibacillus plantarum* và *Leuconostoc* vẫn tăng trong thời gian bảo quản.

Tóm lại, qua khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ hàm lượng chất khô sữa và chủng vi khuẩn đồng lên men, sự thay đổi pH trong quá trình lên men và cấu trúc, khả năng giữ nước thích hợp cho quá trình lên men và sản phẩm có chất lượng tốt.

# KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

## 1. Kết luận

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu là cải thiện cấu trúc và sự tách nước của yogurt in situ bằng phương pháp đồng lên men với vi khuẩn acid lactic sinh exopolysaccharide. Khảo sát quá trình đông tụ ở 9 h đầu và quá trình bảo quản lạnh trong 1 – 2 tháng.

Sau khi nghiên cứu, kết quả từ đề tài cho thấy hàm lượng chất khô sữa trong quá trình chế biến sữa chua có ảnh hưởng đến thời gian lên men, độ cứng, khả năng giữ nước và hàm lượng lipid phân cực cũng như protein trong sản phẩm sữa chua. Sản phẩm sữa chua lên men tạo thành có cấu trúc tốt, rắn chắc khi được chuẩn hóa đạt 15% chất khô được cấy giống truyền thống. Bên cạnh đó, việc bổ sung 10% chất khô được đồng lên men với *Weissella cibaria* vào sản phẩm giúp tăng độ cứng, khả năng giữ nước còn hạn chế cho sản phẩm. Đồng thời, quá trình bảo quản cho ra kết quả độ pH của tất cả các mẫu sữa chua giảm dần sau thời gian bảo quản 1 tháng dao động trong khoảng 3.75 – 3.95, độ acid chuẩn độ thì tăng dần theo thời gian bảo quản lạnh 10.04 – 11.61 (g lactic acid/L) và sự tách nước cũng giảm đều theo thời gian bảo quản. Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy bổ sung *Weissella cibaria* vào sữa chua giúp cải thiện cấu trúc sản phẩm. Như vậy, vi khuẩn lactic *Weissella cibaria* có thể được sử dụng như nguyên liệu tiềm năng dùng trong phát triển sản phẩm sữa chua chức năng. Ngoài ra, nghiên cứu cho thấy rằng hàm lượng chất khô sữa càng cao thì các đặc tính vật lý của sữa chua càng được cải thiện bởi hàm lượng chất khô sữa càng cao thì hàm lượng protein cũng sẽ tăng cao giúp sữa chua tăng khả năng giữ nước và có cấu trúc rắn chắc cho sản phẩm hơn.

## 2. Kiến nghị

Tìm giải pháp hạn chế sự tách nước khi bảo quản lạnh sữa của mẫu sữa chua 10% chất khô được đồng lên men với *Weissella cibaria*. Ngoài ra, cần tìm nồng độ chất khô sữa thích hợp để cải thiện cấu trúc và sự tách nước trong quá trình bảo quản lạnh của những mẫu sữa chua 10% chất khô được đồng lên men với *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Weissella cibaria* và *Leuconostoc lactis* đồng lên

men sữa chua. Bên cạnh đó, trong quá trình thực nghiệm còn một số chỉ tiêu dự định đo trên các mẫu sữa chua đồng lên men chưa hoàn thành được là CLSM – SEM, thành phần hợp chất bay hơi bởi khó tìm được nơi nhận mẫu phân tích.