



DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.083

SỬ DỤNG BỘT THÂN THANH LONG (*Hylocerus undatus*) ĐỂ LÊN MEN CHUA BẰNG VI KHUẨN *Bacillus* spp.

Võ Văn Song Toàn^{1*}, Tào Việt Hà², Nguyễn Thị Bảo Trân¹, Nguyễn Trương¹ và Nguyễn Huỳnh Khánh Duy¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường Đại học Tây Đô

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Võ Văn Song Toàn (email: vvstoan@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 06/04/2020

Ngày nhận bài sửa: 21/06/2020

Ngày duyệt đăng: 28/08/2020

Title:

Using of dragon (*Hylocerus undatus*) stem powder for sour fermentation by *Bacillus* spp.

Từ khóa:

Acid lactic, *Bacillus* spp., *Hylocerus undatus*, kỵ khí, lên men

Keywords:

Lactic acid, anaerobic, *Bacillus* spp., *Hylocerus undatus*, fermentation

ABSTRACT

Studying on sour fermentation of dragon stem powder (*Hylocerus undatus*) by *Bacillus* spp. in anaerobic conditions was conducted with main ingredients including dragon stem powder combined powder of corn and rice bran flour. Treatments with three ingredients mixed at different ratio, as well as effect of time (1, 3, 5 and 7 days) and ratio of *Bacillus* spp. suspension solution (0, 3, 6 and 9%) with starter including 10^7 CFU/mL were conducted for evaluation of a process of fermentation. The monitoring indicators are bacterial density, pH value, volatile fatty acid content, soluble protein and ammonia content. The results showed that three components including the ratio of stem dragon fruit powder: corn flour: rice bran powder was 70%: 15%: 15% were fermented sour by *Bacillus* spp. suspension solution with starter including 10^7 CFU/mL in anaerobic conditions at 37°C for 3 days. The results were also illustrated that the product of lactic fermentation included a bacterial density of 9.33log CFU/g, pH 4.7, the lactic acid content reaching 6.46 g/L, 204 mg/mL of soluble protein and 0,483 g/kg of ammonia content.

TÓM TẮT

Nghiên cứu lên men chua bột thân thanh long (*Hylocerus undatus*) ruột trắng bằng *Bacillus* spp. trong điều kiện kỵ khí được tiến hành với thành phần nguyên liệu chính là bột thân thanh long kết hợp với bột bắp và bột cám. Các nghiệm thức với thành phần nguyên liệu được phối trộn theo các tỷ lệ khác nhau; cũng như ảnh hưởng của thời gian (1, 3, 5, 7 ngày) và tỷ lệ dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. (0, 3, 6 và 9%) với mật số vi khuẩn ban đầu của chế phẩm là 10^7 CFU/mL được bố trí để đánh giá quá trình lên men chua. Các chỉ tiêu theo dõi là tổng số vi khuẩn, pH, hàm lượng lactic acid, protein hòa tan và hàm lượng amoniac sinh ra. Hỗn hợp nguyên liệu bột thanh long, bột bắp và bột cám phối trộn theo tỷ lệ 70%:15%:15% được bổ sung 6% dung dịch *Bacillus* spp. để lên men lactic acid trong 3 ngày ở điều kiện kỵ khí và nhiệt độ 37°C đã tạo ra sản phẩm lên men chua với các giá trị định dưỡng bao gồm 9,33 Log CFU/g vi khuẩn, pH 4,7, 6,46 g/L lactic acid, 204 mg/mL protein hòa tan sinh ra và 0,483 g/kg ammonia sinh ra.

Trích dẫn: Võ Văn Song Toàn, Tào Việt Hà, Nguyễn Thị Bảo Trân, Nguyễn Trương và Nguyễn Huỳnh Khánh Duy, 2020. Sử dụng bột thân thanh long (*Hylocerus undatus*) để lên men chua bằng vi khuẩn *Bacillus* spp. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(4B): 61-70.

1 GIỚI THIỆU

Chế phẩm probiotic được biết là những vi khuẩn đường ruột có lợi, tạo nên hàng rào chống lại những sinh vật gây bệnh. Những thực phẩm lên men này được sử dụng hàng ngày giúp vật chủ cải thiện khả năng tiêu hóa thức ăn, tăng cường sức khỏe, hạn chế một số bệnh đường tiêu hóa từ đó làm tăng năng suất và hiệu quả chăn nuôi (Heller, 2001). Lốp vi khuẩn Bacilli có mặt chủ yếu trong các chế phẩm vi sinh probiotic vì có những đặc tính có lợi như: làm sạch môi trường nhờ khả năng sinh các loại enzyme protease, amylase, cellulase, lipase phân hủy các hợp chất hữu cơ, kiểm soát sự phát triển quá mức của các vi sinh vật gây bệnh như Vibrio, giữ cho môi trường ở trạng thái cân bằng sinh học (Vũ Duy Giảng, 2009).

Cây thanh long là một trong những cây ăn trái quan trọng hàng đầu của Việt Nam. Đặc biệt diện tích và sản lượng tăng mạnh ở 3 tỉnh trọng điểm là Bình Thuận, Long An, Tiền Giang nơi chiếm đến gần 95% sản lượng thanh long cả nước. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu tận dụng cành thanh long thải bỏ để tạo thức ăn cho gia súc. Trong khi đó, phương pháp ủ chua để chế biến thức ăn gia súc, góp phần dự trữ thức ăn thô xanh đã được tiến hành cách đây hơn 100 năm. Ngày nay, thức ăn bổ sung dạng probiotic đã trở nên phổ biến như là thức ăn bổ sung hàng ngày. Thêm vào đó, doanh số giá trị kinh tế năm của chế phẩm probiotic theo xu hướng tăng dần từ 3,7 triệu USD trong năm 2016 và dự đoán tăng lên 17,4 triệu USD (tăng gấp khoảng 4,7 lần) trong năm 2027. Vì vậy, việc ứng dụng công nghệ vi sinh để lên men chua nhanh bột thanh long để làm thức ăn bổ sung cho bò cần được quan tâm nghiên cứu.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Thân thanh long (ruột trắng) được thu ở huyện Tiểu Cần, tỉnh Trà Vinh.

Bactozyme: Bột vi khuẩn bao gồm hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Lactobacillus* do Công ty Cổ phần Sản xuất Kinh doanh Vật tư và Thuốc Thú y Vemedim sản xuất. Hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* S20, *Bacillus subtilis* RC24 được lưu trữ tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Chuẩn bị nguyên liệu

Bột thanh long: thân thanh long (ruột trắng) được cắt lát khoảng 0,5 - 1 cm cùng với bột bắp và

bột cám được sấy ở 70°C trong thời gian 4 giờ, sau đó nghiền mịn tạo bột với kích thước rây 0,75 mm.

Giống vi khuẩn (vk) *Bacillus subtilis* có nguồn gốc từ dịch dạ cỏ bò và được nuôi cấy trong môi trường Ryckeboer *et al.* (2003) với cơ chất là bột thanh long ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày.

2.2.2 Phương pháp thí nghiệm

a. Phân tích phân tích

Bột thanh long, cám và bắp lần lượt được phân tích thành phần dinh dưỡng bao gồm hàm lượng vật chất khô (VCK): bột mẫu nguyên liệu được sấy khô ở nhiệt độ 70°C trong 2 ngày đến khối lượng không đổi (Horwitz, 2000). Đạm tổng (Kejdahl, 1883): hàm lượng đạm tổng x phần trăm vật chất khô. Lipid tổng (Horwitz, 2000): hàm lượng lipid tổng x phần trăm vật chất khô.

Phương pháp đếm sống: rút 10 µL dịch vi khuẩn đã pha loãng nhỏ giọt lên đĩa môi trường, để khô, ủ nhiệt độ 35°C trong 24 giờ và đếm khuẩn lạc (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2008). Mật số vi khuẩn được tính theo công thức:

$$CFU/g \text{ (mL)} = \frac{\text{Số khuẩn lạc trung bình} \times \text{Độ pha loãng} \times 1000}{\text{Thể tích giọt mẫu (5 hay 10 } \mu\text{L)}}$$

Phương pháp xác định hàm lượng acid tổng số: hỗn hợp 5 mL dung dịch lên men và 45 mL nước cất được định phân bằng NaOH 0,1N đến pH bằng 8,2. (Lê Thanh Mai và *ctv.*, 2007). Độ acid toàn phần tính theo công thức:

$$X = \frac{K \times n \times 1000}{v} \text{ (g/L)}$$

n: số mL NaOH 0,1N sử dụng, v: số mL mẫu, K: hệ số loại acid: lactic acid K = 0,009.

Phương pháp xác định hàm lượng protein hòa tan: dung dịch chuẩn bovine serum albumin (BSA) với dãy nồng độ từ 0 đến 300 µg/mL. Mỗi 100 µL BSA và dung dịch lên men được phản ứng với 2 mL dung dịch comassie brilliant blue G250 và được đo ở bước sóng 595 nm (Bradford, 1976).

Phương pháp xác định hàm lượng NH₃: Hỗn hợp 1 mL mẫu, 50 mL nước cất và 3 g MgO được đun sôi. Lượng NH₃ sinh ra được hấp thu vào bình tam giác chứa 30 mL dung dịch thuốc thử acid boric, sau đó được định phân bằng H₂SO₄ 0,05N. Hàm lượng ammoniac được tính theo công thức:

$$\text{Nitơ ammoniac (g/l) hay (g/kg)} = \frac{0,0007 \times (V - V_0) \times 1000}{m} = \frac{0,7 \times (V - V_0)}{m}$$

V: số mL H₂SO₄ 0,05N chuẩn độ mẫu, V₀: số mL H₂SO₄ 0,05N chuẩn độ mẫu thử không, 0,0007:

số gram nitơ tương ứng với 1 mL H₂SO₄ 0,05N, m: số mL mẫu (đối với mẫu nước) hay số gram mẫu khô, 1000: hệ số quy đổi từ mL sang lít hay từ gram sang kg (Horwitz, 2000).

b. Khảo sát tỷ lệ bổ sung bột cám và bột bắp trong ủ chua bột thanh long

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, 7 nghiệm thức (NT), Trong đó, từ NT1 đến NT5 có bổ sung lần lượt cùng một tỷ lệ vi khuẩn (có mật độ khoảng 10⁷ CFU/mL) nhưng khác nhau về tỷ lệ bột cám và bột bắp, nghiệm thức đối chứng (ĐC) âm chỉ có bột thanh

long, ĐC+ có bổ sung bột vi khuẩn Bactozyme (Bảng 1).

Thành phần dung dịch đệm được chuẩn bị theo Ryckeboer *et. al.* (2003), ủ ổn nhiệt ở 37°C trong 15 phút trước sử dụng. Mỗi đơn vị thí nghiệm là 10 g cơ chất theo tỷ lệ được trình bày trong Bảng 1. Chúng dung dịch vi khuẩn *Bacillus spp.* và Bactozyme có mật số 10⁷ CFU/mL lần lượt vào các nghiệm thức từ NT1 đến NT5, ĐC+, riêng nghiệm thức ĐC- không chủng vi khuẩn và lên men kỵ khí 3 ngày trong điều kiện 37°C.

Bảng 1: Thành phần mỗi nghiệm thức

Nghiệm thức (NT)	Bột thanh long (%)	Bột cám (%)	Bột bắp (%)	Dung dịch vi khuẩn (%)	Bactozyme (%)
ĐC-	100	-	-	-	-
ĐC+	100	-	-	-	6
NT 1	70	-	30	6	-
NT 2	70	10	20	6	-
NT 3	70	15	15	6	-
NT 4	70	20	10	6	-
NT 5	70	30	-	6	-

c. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và tỷ lệ bổ sung vi khuẩn Bacillus spp. đến lên men chua bột thanh long

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số 2 nhân tố là tỷ lệ thể tích dung dịch vi khuẩn (0, 3, 6 và 9% dung dịch vi khuẩn) và thời gian lên men (1, 3, 5 và 7 ngày), 3 lần lặp lại. Tổng đơn vị thí nghiệm là 48. Tỷ lệ thành phần bột thanh long, bột cám và bột bắp được chọn từ thí nghiệm trước.

d. Các chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm mật số vi sinh vật bằng phương pháp đếm sống, hàm lượng acid béo bay hơi, hàm lượng protein hòa tan và hàm lượng NH₃

2.2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu sẽ được tính toán và lưu trữ bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Số liệu thí nghiệm sẽ được phân tích phương sai một nhân tố ANOVA

(One Way Anova) và hai nhân tố theo mô hình tuyến tính tổng quát (Proc GLM) của phần mềm Minitab 16. Sự khác biệt thống kê giữa trung bình các nghiệm thức thí nghiệm sẽ được kiểm định bằng phương pháp Tukey với mức ý nghĩa là 0,05.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1.1 Thành phần hóa học nguyên liệu

Hàm lượng VCK của bột thanh long, bột cám, bột bắp lần lượt là 94,5%, là 89,0% và 89,6% (Bảng 2). Kết quả tương tự với nghiên cứu của Danh Mô (2009) khảo sát về hàm lượng VCK trên bột cám là 87,9% (13,1% ẩm độ), thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hữu Văn *và ctv.* (2015) là 98,3% (1,2% ẩm độ). Hàm lượng VCK của bột bắp cũng tương tự với nghiên cứu của Trương La *và ctv.* (2008), Nguyễn Hữu Văn *và ctv.* (2015) và Vũ Duy Giảng *và ctv.* (2008) lần lượt là 87,2% (12,8% ẩm độ), 89,3% (10,7% ẩm độ) và 87,7% (12,3% ẩm độ).

Bảng 2: Thành phần hóa học nguyên liệu

Nguyên liệu	Ẩm độ (%)	VCK (%)	Protein tổng (%)	Lipid (%)
Bột thanh long	5,5 ± 0,024	94,5 ± 0,024	4,41 ± 0,340	3,74 ± 0,156
Bột cám	11 ± 0,411	89,0 ± 0,411	2,63 ± 0,282	10,06 ± 0,398
Bột bắp	10,4 ± 0,070	89,6 ± 0,070	3,09 ± 0,182	2,28 ± 0,103

* Số liệu trong bảng là giá trị của 3 lần lặp lại.

Hàm lượng đạm tổng của bột thanh long, bột cám, bột bắp lần lượt là 4,41%, 2,63%, 3,09% (Bảng

2). Đạm tổng số của bột cám (Bảng 2) nhỏ hơn so với nghiên cứu của Danh Mô (2009), Nguyễn Thị

Hồng Nhân (1999) và Nguyễn Hữu Văn và ctv. (2015) với kết quả lần lượt là 9,2%, 9,9% và 8,7%. Đạm tổng số của bột bắp (Bảng 2) cũng nhỏ hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Hữu Văn và ctv. (2015), Trương La và ctv. (2008) và Vũ Duy Giảng và ctv. (2008) lần lượt là 7,2%, 8,2% và 9,1%.

Hàm lượng lipid tổng số của bột thanh long, bột cám và bột bắp lần lượt là 3,74%, 10,06%, 2,28% (Bảng 2). Như vậy, bột cám có hàm lượng lipid tổng cao nhất (10,06%). Hàm lượng lipid tổng và cao hơn kết quả nghiên cứu của Danh Mô (2009), Nguyễn Hữu Văn và ctv. (2015) là 2,4 và 9,7%.

Nguồn nitơ hữu cơ có vai trò quan trọng trong việc điều hòa tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ tổng hợp acid của vi khuẩn. Hujanen and Linko (1996) đã cho thấy bột trích nấm men (yeast extract) và nitơ của một số loại ngũ cốc có ảnh hưởng đến quá trình sản sinh lactic acid của vi khuẩn *Lactobacillus casei*. Một số nguồn nitơ khác như urea, dung dịch trích bắp, mạch nha cũng cho thấy góp phần gia tăng sản lượng lactic acid rõ rệt (Busairi, 2010). Sản phẩm thủy phân casein bằng protease (Zhang et al., 2011) cũng đã làm tăng mạnh hàm lượng lactic acid trong quá trình lên men của *S. thermophilus* và *L. bulgaricus*. Bắp, đậu nành cũng là một trong số nguồn quan trọng cung cấp tinh bột, protein và chất

béo. Mawgoud et al. (2016) đã cho thấy hai nguồn dinh dưỡng này được sử dụng để cung cấp đường chất cần thiết thay thế cho bột trích nấm men trong lên men lactic acid của *Lactobacillus bulgaricus* Lb-12 và góp phần tăng hiệu suất lên 322%, đồng thời tiết kiệm thời gian và năng lượng khoảng 27,7%.

Bên cạnh đó, theo Sugihara and Line (1975), lipid là thành phần nhỏ của nguyên liệu lúa mì và bột mì nhưng có ảnh hưởng đến chất lượng bánh mì. Các acid béo chưa bão hòa của bột mì thường bị oxi hóa trong quá trình bảo quản và sinh ra những hợp chất có mùi khi bị oxi hóa (Hansen and Schieberle, 2005), và những hợp chất mùi này giảm rõ rệt trong quá trình lên men bột chua (Czerny and Schieberle, 2002). Vermeulen et al. (2006a) đã cho thấy hai chủng vi khuẩn *L. sanfrancisco* và *L. reuteri* đã góp phần làm giảm những hợp chất có mùi trong suốt giai đoạn lên men chua.

3.2 Ảnh hưởng tỷ lệ bột cám và bột bắp trong lên men bột thanh long

Kết quả phân tích thống kê ảnh hưởng của tỷ lệ bột cám và bột bắp đến mật số vi khuẩn, pH của sản phẩm lên men, hàm lượng acid lactic, protein hòa tan, ammoniac của sản phẩm lên men bột thanh long được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng tỷ lệ bột cám và bột bắp trong lên men bột thanh long

Nghiệm thức	Chỉ tiêu đánh giá				
	Mật số vi khuẩn (log CFU/g)	pH	Acid lactic (g/L)	Protein hòa tan (mg/mL)	Ammoniac (NH ₃) (g/Kg)
ĐC-	8,96±0,357	6,40±0,000 ^c	0,84±0,104 ^c	366±16,5 ^a	0,599±0,075
ĐC+	9,01±0,216	6,20±0,000 ^c	1,08±0,00 ^c	338±19,4 ^{ab}	0,589±0,039
NT1	9,12±0,304	5,0±0,350 ^a	2,88±0,649 ^{ab}	230±29,8 ^d	0,521±0,050
NT2	8,99±0,049	5,03±0,060 ^a	3,00±0,209 ^{ab}	260±3,1 ^{cd}	0,504±0,032
NT3	8,95±0,183	5,03±0,060 ^a	3,15±0,238 ^a	301±19,8 ^{bc}	0,555±0,009
NT4	8,90±0,262	5,30±0,100 ^{ab}	2,79±0,27 ^{ab}	353±34,2 ^{ab}	0,502±0,012
NT5	9,01±0,212	5,70 ±0,170 ^b	2,13±0,462 ^b	395±12,7 ^a	0,589±0,029
CV (%)	2,71	2,79	15,8	6,7	7,43

*VK: bổ sung 6% dung dịch vi khuẩn *Bacillus spp.*, ĐC-: đối chứng âm, không bổ sung vi khuẩn, ĐC+: bổ sung 6% bột bactozyme. NT1 đến NT5: phần trăm thanh long, bột cám, và bắp lần lượt thay đổi theo tỷ lệ như sau: 70:0:30, 70:10:20, 70:15:15, 70:20:10, và 70:30:0. Trong cùng một cột, các giá trị theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05 theo phép thử Tukey

3.2.1 Mật số vi khuẩn

Mật số vi khuẩn được thể hiện đồng thời ở Bảng 3 đã cho thấy dao động trong khoảng 8,90 đến 9,12 log CFU/g và khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Sự hiện diện của các thành phần dinh dưỡng bao gồm vật chất khô, đạm tổng, lipid tổng của nguyên liệu đã cung cấp nguồn năng lượng cho quá trình phát triển, tăng mật số của vi khuẩn trong các nghiệm thức. Nguồn dinh dưỡng nitơ cần thiết cho

quá trình chuyển hóa thành protein, enzyme của tế bào vi khuẩn. Trong khi đó, lipid là nguồn cung cấp năng lượng cho tế bào vi khuẩn để tham gia vào quá trình chuyển hóa thành các acid béo bay hơi.

3.2.2 pH

Việc bổ sung cám và bắp đã dẫn đến sự thay đổi giá trị pH của sản phẩm lên men trong các nghiệm thức và khác biệt có ý nghĩa thống kê được thể hiện đồng thời ở Bảng 3. Nghiệm thức đối chứng âm

(100% bột thanh long) và nghiệm thức ĐC+ (100-0-0/Bactozyme) đều có mật số vi khuẩn cao (8,96 và 9,01 logCFU/g) và khác biệt không ý nghĩa không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, giá trị pH vẫn duy trì cao (6,4 và 6,2) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm nghiệm thức NT1 (70-0-30/vk), NT2 (70-10-20/vk), NT3 (70-15-15/vk) lần lượt dịch lên men có giá trị pH là 5,0, 5,03 và 5,03 tương ứng với các nghiệm thức có bổ sung cám 0, 15 và 20% và bổ sung bắp trong khoảng 30, 20,15% và 6% thể tích dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. có mật số 10^7 CFU/mL. Mặt khác, khi bổ sung tăng hàm lượng bột cám lên 20 và 30%, và giảm bột bắp 10 và 0% tương ứng với nghiệm thức NT4 (70-20-10/vk) và NT5 (70-30-0/vk), thì giá trị pH sản phẩm lên men tăng lên và lần lượt là 5,3 và 5,7. Như vậy, bổ sung 6% thể tích dung dịch *Bacillus* spp. đã góp phần làm giảm pH trong các nghiệm thức so với nghiệm thức ĐC- và ĐC+ (100-0-0/Bactozyme). Bên cạnh đó, sự điều chỉnh tỷ lệ bổ sung 0 - 15% bột cám và 30 - 15% bột bắp cũng đã cho thấy sự hiệu quả trong quá trình lên men chua bột thanh long khi pH của các nghiệm thức NT1 (70-0-30/vk), NT2 (70-10-20/vk), và NT3 (70-15-15/vk) được duy trì trong khoảng 5 đến 5,03.

3.2.3 Lactic acid

Giá trị pH ảnh hưởng nhiều đến hàm lượng acid béo bay hơi trong sản phẩm lên men. Giá trị pH càng thấp thì hàm lượng acid càng cao. Bảng 3 cho thấy hàm lượng acid béo bay hơi tăng lên từ 2,88 - 3,00 và 3,15 g/L khi bổ sung 6% thể tích dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. có mật số 10^7 CFU/mL vào các nghiệm thức NT1 (70-0-30/vk), NT2 (70-10-20/vk), và NT3 (70-15-15/vk) đồng thời với việc bổ sung tăng hàm lượng bột cám từ 0 - 10 - 20%; giảm hàm lượng bột bắp 30-20-15 và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức ĐC- (0,84 g/L) và nghiệm thức ĐC+ (1,08 g/L).

Bảng 3 cũng đồng thời cho thấy việc điều chỉnh tăng hàm lượng bột cám lên 20%, giảm hàm lượng bột bắp còn 10% (NT4) có khuynh hướng tăng giá trị pH lên 5,30 và giảm hàm lượng acid lactic còn 2,79 g/L mặc dù hàm lượng acid lactic giảm của nghiệm thức này khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm nghiệm thức NT1 (70-0-30/vk), NT2 (70-10-20/vk), và NT3 (70-15-15/vk). Tuy nhiên, khi tiếp tục bổ sung tăng tỷ lệ cám lên 30% và giảm tỷ lệ bột bắp về 0% thì hàm lượng lactic acid giảm đến mức 2,17 g/L và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm nghiệm thức NT1, NT2, và NT3 trong đó nghiệm thức NT3 (70-15-15/vk) có bổ sung 15% bột cám, 15% bột bắp và 6% thể tích dung

dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. đạt hàm lượng lactic acid cao nhất 3,15 (g/L).

3.2.4 Protein hòa tan

Bảng 3 cũng cho thấy nghiệm thức ĐC - (100-0-0) chỉ có bột thanh long, không bổ sung vi khuẩn *Bacillus* spp., không bổ sung bột cám và bột bắp nhưng hàm lượng protein cao nhất (366 mg/mL), mật số vi khuẩn cao đạt 8,96 logCFU/g, tuy nhiên giá trị pH đo được của sản phẩm lên men cao (pH 6,4) và hàm lượng acid lactic rất thấp (0,84 g/L). Tương tự, nghiệm thức ĐC + (100-0-0/Bactozyme) cũng thu được hàm lượng protein hòa tan cao (338 mg/mL), mật số vi khuẩn cao đạt 9,01 logCFU/g, tuy nhiên giá trị pH đo được của sản phẩm lên men cao (pH 6,2) và hàm lượng acid lactic rất thấp (1,08 g/L). Điều này cho thấy quá trình lên men chua lactic ở cả hai nghiệm thức đối chứng âm và đối chứng dương rất yếu mặc dù vi khuẩn vẫn phát triển với mật số cao.

Việc bổ sung thêm 6% thể tích dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. có mật số 10^7 CFU/mL vào các nghiệm thức NT1 (70-0-30/vk), và NT2 (70-10-20/vk), đồng thời với việc bổ sung tăng tỷ lệ bột cám từ 0 - 10%, giảm tỷ lệ bột bắp 30 - 20% đã cho thấy sự sụt giảm về hàm lượng protein hòa tan trong dịch men lần lượt là 230 và 260 mg/mL (Bảng 3) kèm theo đó là sự gia tăng hàm lượng acid lactic lên 2,88 và 3 g/L và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng âm và đối chứng dương. Bên cạnh đó, pH dung dịch lên men giảm xuống còn 5 và 5,03 trong khi mật số vi khuẩn vẫn được duy trì ở mật số cao 9,12 và 8,99 logCFU/g. Như vậy, bên cạnh việc bổ sung tỷ lệ cám, bắp vào nghiệm thức cùng với vi khuẩn *Bacillus* spp., quá trình lên men chua lactic trong điều kiện kỵ khí đã diễn ra nhanh chóng trong 3 ngày ở 37°C.

Hàm lượng protein tiếp tục tăng 301, 353, 395 mg/mL (Bảng 3) theo chiều hướng điều chỉnh tăng tỷ lệ bổ sung bột cám từ 15-20-30 và giảm tỷ lệ bột bắp 15-10-0 tương ứng của các nghiệm thức NT3 (70-15-15/vk), NT4 (70-20-10/vk), và NT5 (70-30-0/vk). Như vậy việc bổ sung tăng tỷ lệ bột cám và giảm tỷ lệ bột bắp đã ảnh hưởng nhiều đến quá trình lên men chua; tuy có tăng hàm lượng protein hòa tan, nhưng hàm lượng acid lactic sinh ra giảm từ 3,15 đến 2,13 g/L và kéo theo pH sản phẩm lên men tăng lên từ 5,03 đến 5,70.

3.2.5 Ammoniac sinh ra

Hàm lượng ammoniac trong sản phẩm lên men của các nghiệm thức (Bảng 3) dao động trong khoảng 504 đến 599 g/kg sau 3 ngày lên men nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Ammoniac là

nguồn đạm quan trọng để tế bào vi khuẩn có thể sử dụng cho quá trình chuyển hóa bên trong tế bào và cung cấp nguồn đạm cho quá trình tiêu hóa ở động vật nhai lại. Detsch and Jörg (2003) cho thấy *Bacillus subtilis* có thể hấp thụ ammonia nhờ protein vận chuyển NrgA, protein màng NrgB có nhiệm vụ đáp ứng cung cấp nitơ cho tế bào và được mã hóa bởi hệ điều hành operon nrgAB của *Bacillus subtilis* khi môi trường thiếu hụt glutamine.

Kết quả phân tích ảnh hưởng của tỷ lệ bột cám và bột bắp cho thấy ở nghiệm thức ĐC- mặc dù có mật số vi khuẩn cao nhất nhưng làm cho pH giảm đi ít nhất và hàm lượng acid lactic không cao. Ở các nghiệm thức còn lại, nghiệm thức NT3 (70-15-15/vk) cho kết quả lên men tốt nhất với mật số vi khuẩn đạt 8,95 log CFU/g, với giá trị pH đạt 5,03, hàm lượng acid lactic đạt 3,15 g/L, hàm lượng protein hòa tan là 301 mg/mL và hàm lượng ammonia sinh ra là 0,555 g/Kg.

Theo kết quả đó, với tỷ lệ bột thanh long, bột cám và bột bắp lần lượt là 70%, 15% và 15%, người chăn nuôi có thể thay thế đến 70% thức ăn truyền thống cho bò (cỏ, rơm, ...) bằng nguyên liệu thân thanh long. Kết quả thay thế thức ăn cũng cao hơn so với nghiên cứu của Oliver *et al.* (2004) khi kết hợp nguồn thức ăn gồm 40% thức ăn ngô ủ chua không bổ sung vi khuẩn, 10% cỏ linh lăng và 50% thức ăn hỗn hợp khi nghiên cứu trên bò sữa Holstein.

Theo Kunji *et al.* (1996), vi khuẩn lactic chủ yếu sử dụng peptide để đáp ứng nhu cầu nitơ phức tạp của tế bào. Kết quả phân tích peptide và amino acid trong bột mì xác định rằng chủng vi khuẩn *L. sanfranciscensis* LTH 2581 có xu hướng sử dụng peptide cho quá trình phát triển trong khối bột chua (Thiele *et al.*, 2004) nhờ enzyme nội bào peptidases thủy phân các phân tử protein. *L. plantarum* và *L. sanfranciscensis* được phát hiện có hệ thống vận chuyển oligo and dipeptides (Vermeulen *et al.*, 2005) vào bên trong tế bào. Kết quả phân tích sự điều hòa hệ thống hấp thụ peptide và enzyme peptidases của *L. sanfranciscensis* DSM20451 cho thấy gen mã hóa hệ thống hấp thụ peptide Opp and DtpT được biểu hiện suốt thời gian phát triển trong khối bột chua (Vermeulen *et al.*, 2005).

3.3 Ảnh hưởng thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến lên men bột thanh long

3.3.1 Mật số vi khuẩn

Kết quả phân tích ảnh hưởng của nhân tố thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đã cho thấy mật số vi khuẩn kể cả nghiệm thức đối chứng (0% vk) không bổ sung vi khuẩn cũng như nghiệm thức còn lại có bổ sung vi khuẩn 3, 6 và 9% đều đạt mật số khoảng 10⁹ CFU/g sau 1 ngày lên men và tiếp tục duy trì mật số vi khuẩn cao trong 5 ngày lên men. Bước vào ngày thứ 7 của quá trình lên men, mật số vi khuẩn có giảm so với thời điểm 5 ngày nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Bảng 4).

Bảng 4: Ảnh hưởng của thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến tổng số vi khuẩn trong sản phẩm lên men

Nghiệm thức	Mật số vi khuẩn (log CFU/g)			
	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
0% vk	8,86±0,491	9,06±0,081	9,34±0,018	9,20±0,495
3% vk	8,98±0,110	9,12±0,507	9,15±0,287	8,81±0,175
6% vk	9,06±0,116	8,98±0,229	9,33±0,133	9,03±0,307
9% vk	9,22±0,155	9,26±0,157	9,06±0,571	8,97±0,094

* VK: vi khuẩn *Bacillus spp.*. Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ theo phép thử Tukey. CV% = 3,29

3.3.2 Giá trị pH

Kết quả phân tích ảnh hưởng của hai nhân tố thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đã cho thấy giá trị pH đo được trong sản phẩm lên men ngày thứ 1 của nghiệm thức có bổ sung 3, 6 và 9% dung dịch vi khuẩn *Bacillus spp.* có sự giảm nhẹ pH so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, kể từ sau 3

ngày lên men, giá trị pH đều giảm nhanh về giá trị khoảng 4,7 ở các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cũng như nghiệm thức không bổ sung vi khuẩn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với giá trị pH ngày thứ 1 (pH 6,60) của nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn (Bảng 5). Theo McDonald (1995), chất lượng thức ăn ủ chua tốt khi pH nhỏ hơn 5, hàm lượng butyric acid thấp và lactic acid.

Bảng 5: Ảnh hưởng của thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến giá trị pH trong sản phẩm lên men

Nghiệm thức	Giá trị pH			
	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
0% vk	6,60±0,1 ^{bc}	4,87±0,21 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a
3% vk	6,63±0,01 ^c	4,77±0,06 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a
6% vk	6,33±0,23 ^b	4,70±0,1 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a
9% vk	6.57±0,06 ^{bc}	4,70±0,0 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a

VK: Vi khuẩn *Bacillus* spp.. số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ theo phép thử Tukey. CV% = 1,27.

3.3.3 Lactic acid

Kết quả phân tích ảnh hưởng của hai nhân tố thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến hàm lượng lactic acid sinh ra đã cho thấy hàm lượng lactic acid sinh ra sau 1 ngày lên men của các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn có tăng lên so với nghiệm thức đối chứng nhưng vẫn chưa cho thấy khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, hàm lượng lactic acid của các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn tăng lên nhanh sau 3 ngày lên men trong đó nghiệm thức 70-15-15/6% vk và 70-15-15/9% vk có hàm lượng acid lactic đo được cao lần lượt là 4,50; 4,68 và khác biệt so với nghiệm thức đối chứng tại thời điểm sau 1 và 3 ngày lên men (Bảng 6).

Bảng 6 cũng chỉ ra rằng nếu nghiệm thức có bổ sung 3% thể tích dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp., thì hàm lượng lactic acid tăng dần trong các ngày 3

(4,23 g/L), 5 (4,56 g/L), và đạt cao nhất vào ngày thứ 7 (4,68 g/L) của quá trình lên men kỵ khí. Nếu tỷ lệ vi khuẩn được bổ sung tăng lên 6%, thì hàm lượng lactic acid nhanh chóng đạt 4,5 g/L sau 3 ngày lên men và duy trì trong khoảng 7 ngày (4,5 g/L) lên men và khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 3 nghiệm thức này. Tuy nhiên, nếu tỷ lệ vi khuẩn được bổ sung tăng lên 9%, thì chỉ sau 3 ngày là hàm lượng lactic acid tăng lên 4,68 g/L; Sau đó, giảm dần ở thời điểm 5 ngày (4,14 g/L) và 7 ngày (4,17 g/L).

Như vậy, việc bổ sung 6% thể tích dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. vào nghiệm thức lên men là thích hợp đảm bảo cho vi khuẩn tăng nhanh mật số sau 1 ngày, lên men nhanh trong 3 ngày và tiếp tục duy trì mật số cũng như sản phẩm lên men có hàm lượng lactic acid cao.

Bảng 6: Ảnh hưởng của thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến hàm lượng lactic acid sinh ra trong sản phẩm lên men

Nghiệm thức	Hàm lượng lactic acid (g/L)			
	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
0% vk	0,51±0,05 ^d	3,90±0,27 ^c	4,14±0,18 ^{bc}	4,62±0,10 ^{ab}
3% vk	0,54±0,00 ^d	4,23±0,16 ^{abc}	4,56±0,20 ^{ab}	4,68±0,18 ^a
6% vk	0,81±0,16 ^d	4,50±0,36 ^{ab}	4,23±0,09 ^{abc}	4,50±0,18 ^{ab}
9% vk	0,66±0,05 ^d	4,68±0,00 ^a	4,14±0,00 ^{bc}	4,17±0,05 ^{bc}

* VK: Vi khuẩn *Bacillus* spp.. Số liệu trong bảng là giá trị của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ theo phép thử Tukey. CV% = 0,57.

3.3.4 Protein hòa tan

Kết quả phân tích ảnh hưởng của hai nhân tố thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến hàm lượng protein (Bảng 7) cho thấy hàm lượng protein sinh ra trong các nghiệm thức đối chứng không bổ sung dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. (70-15-15/0% vk) cũng như có bổ sung dung dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. (70-15-15/3% vk - 1 ngày, 70-15-15/6% vk - 1 ngày, 70-15-15/9% vk - 1 ngày) đều cao lần lượt là 400, 374, 363, 352 mg/mL sau 1 ngày lên men. Tuy hàm lượng protein sinh ra trong các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Bacillus* spp. thấp hơn so với đối chứng,

nhưng không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên xu thế này thể hiện rõ ở các thời điểm lên men tiếp theo bao gồm 3, 5 và 7 ngày. Các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn có sự sụt giảm nhanh chóng từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7; hàm lượng protein đo được là thấp nhất trong khoảng từ 137 đến 151 mg/mL và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng sau 1 ngày lên men. Điều này đã cho thấy quá trình lên men diễn ra mạnh sau 3 ngày lên men đã tạo ra xu hướng giảm nhanh hàm lượng protein sinh ra (Bảng 7) song song với quá trình giảm pH sản phẩm lên men (Bảng 5) đồng thời góp phần tăng nhanh hàm lượng lactic acid sinh ra (Bảng 6).

Bảng 7: Ảnh hưởng của thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến hàm lượng protein sinh ra trong sản phẩm lên men

Nghiệm thức	Hàm lượng protein sinh ra (mg/mL)			
	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
0% vk	400±14,1 ^a	236±36,9 ^b	203±13,2 ^{bcd}	164±6,9 ^{cde}
3% vk	374±35,9 ^a	210±15,2 ^{bc}	184±7,9 ^{bcd}	151±8,3 ^{de}
6% vk	363±14,3 ^a	188±31,6 ^{bcd}	184±1,8 ^{bcd}	145±14,0 ^e
9% vk	352±18,3 ^a	204±1,8 ^{bcd}	183±6,9 ^{bcd}	137±12,4 ^e

VK: Vi khuẩn *Bacillus* spp.. Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ theo phép thử Tukey. CV% = 7,95

3.3.5 Ammonia

Sự tương tác của thời gian và tỷ lệ bổ sung vi khuẩn *Bacillus* spp. ảnh hưởng đến hàm lượng ammonia sinh ra (Bảng 8). Nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn có hàm lượng ammonia sinh ra cao ở thời điểm 1 ngày và duy trì trong các ngày lên men tiếp theo. Hàm lượng ammonia sinh ra của các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *Bacillus* spp. cũng cao ngay từ ngày thứ 1 và phần lớn các nghiệm thức có sự khác biệt không có ý nghĩa thống

kê so với nghiệm thức đối chứng; ngoại trừ nghiệm thức có bổ sung 6% thể tích dung dịch vi khuẩn (6% vk) trong ngày thứ 1 và 3. Theo Leejeerajumnean *et al.* (2000), nồng độ muối amon cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của chủng vi khuẩn *Bacillus*. Trong trường hợp này, vẫn chưa thấy ảnh hưởng rõ về tác động của nồng độ muối amon trong sản phẩm lên men; Bởi vì theo kết quả Bảng 4, vi khuẩn trong các nghiệm thức từ ngày lên men thứ 1 đến ngày thứ 7 đều hiện diện ở trạng thái mật số cao trong khoảng 10^9 CFU/g sản phẩm lên men.

Bảng 8: Ảnh hưởng của thời gian và tỷ lệ vi khuẩn đến hàm lượng ammoniac sinh ra trong sản phẩm lên men

Nghiệm thức	Hàm lượng ammoniac (g/kg)			
	1 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày
0% vk	0,532±0,029 ^{abc}	0,550±0,041 ^a	0,531±0,017 ^{abc}	0,547±0,010 ^a
3% vk	0,542±0,014 ^{ab}	0,516±0,015 ^{a-d}	0,512±0,026 ^{a-d}	0,536±0,01 ^{abc}
6% vk	0,469±0,006 ^d	0,484±0,021 ^{bcd}	0,520±0,018 ^{a-d}	0,514±0,014 ^{a-d}
9% vk	0,497±0,020 ^{a-d}	0,483±0,022 ^{cd}	0,478±0,005 ^{cd}	0,517±0,008 ^{a-d}

VK: Vi khuẩn *Bacillus* spp.. Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau bởi một chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ theo phép thử Tukey. CV% = 3,8

Hai nhân tố thời gian và tỷ lệ bổ sung vi khuẩn vào bình lên men có mối liên hệ chặt chẽ với nhau. Qua phân tích mật số vi khuẩn (Bảng 4), giá trị pH dung dịch lên men (Bảng 5), hàm lượng lactic acid sinh ra (Bảng 6), hàm lượng protein sinh ra (Bảng 7) và hàm lượng ammoniac sinh ra (Bảng 8) cho thấy nghiệm thức 6% vk và 9% vk sau 3 ngày lên men đều đạt mật số cao 8,98 logCFU/g và 9,26 logCFU/g; pH sản phẩm lên men đạt 4,70. Hàm lượng lactic acid sinh ra lần lượt đạt 4,50 và 4,68 g/L. Hàm lượng protein hòa tan sinh ra 188 và 204 mg/mL. Hàm lượng ammoniac sinh ra 0,484 và 0,483 g/kg. Những kết quả này khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn, nhưng giữa hai nghiệm thức thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, tỷ lệ bổ sung 6% thể tích dung dịch *Bacillus* spp. được chọn để lên men chua nhanh bột thanh long.

Bacillus subtilis BSVN15 với kết quả là khi chủng vi khuẩn với tỷ lệ giống 7% cho mật độ tế bào chủng *B. subtilis* BSVN15 cao nhất. Bên cạnh đó, mật độ tế bào đạt cao nhất sau 24 giờ lên men với $18,37 \times 10^9$ CFU/mL và giảm dần khi kéo dài thời gian lên men tới 4 ngày nhưng không có sự sai khác ở mức ý nghĩa 0,05. Theo nghiên cứu của Danh Mô (2009), tỷ lệ tiêu hóa chất hữu cơ *in vitro* từ của 0 - 24 giờ khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong khi thời gian ủ từ 48 - 72 giờ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các mức nhiệt độ ủ 37°C, 40°C và 43°C. Điều này cho thấy thời gian ủ từ 48 - 72 giờ sẽ tạo điều kiện cho vi khuẩn phân giải xơ nhiều hơn.

4 KẾT LUẬN

Bột thân thanh long (*Hylocerus undatus*) ruột trắng có thể được sử dụng làm nguyên liệu chính phối trộn cùng với bột cám và bột bắp lên men chua làm thức ăn bổ sung vật nuôi.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Phụng Thị Hương và Vũ Văn Hạnh (2018) khi nghiên cứu lựa chọn điều kiện lên men cho sự sinh trưởng chủng

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* S20, *Bacillus subtilis* RC24 đã cho thấy có vai trò tích cực trong quá trình lên men chua nhanh khối bột hỗn hợp thanh long, cám và bắp trong 3 ngày ở điều kiện nhiệt độ 37°C.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành bày tỏ lòng biết ơn đến Trường Đại học Cần Thơ đã cấp kinh phí và Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện thực hiện nghiên cứu, các Phòng, Ban đã hỗ trợ tư vấn các thủ tục liên quan, hai phần biện đã dành nhiều thời gian để góp ý cho bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254.

Busairi, A.M., 2010. Effect of nitrogen source and initial sugar concentration on lactic acid fermentation of pineapple waste using *L. delbruekii* Teknik. *Jurnal Ilmiah Bidang Ilmu Kerekayasaan*. 31(1): 31-34.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2008. Bài giảng thực hành vi sinh vật đại cương. Nhà xuất bản Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ. 54 trang.

Czerny, M. and Schieberle, P., 2002. Important aroma compounds in freshly ground wholemeal and white wheat flour-identification and quantitative changes during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(23): 6835-6840.

Danh Mô, 2009. Nghiên cứu hoàn thiện qui trình xác định tỷ lệ tiêu hóa in vitro cho thức ăn thô và ứng dụng trong chăn nuôi gia súc nhai lại. Luận án Tiến sĩ ngành Chăn nuôi Động vật. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.

Detsch, C. and Jörg, S., 2003. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology*. 149(11): 3289-3297.

Hansen, A. and Schieberle, P., 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 16(1-3): 85-94.

Heller, K.J., 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2): 374S-379S.

Horwitz, W., 2000. The scientific sociation Dedicated to Analytical Excellence: Official methods of analysis. AOAC International, Washington D.C., USA. 255-275.

Hujanen H. and Linko, Y.Y., 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45(3): 307-313.

Kjeldahl, J., 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Analytical Chemistry*. 22(1): 366-382.

Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. and Konings, W.N., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70(2-4): 187-221.

Mawgoud, Y.A., Ibrahim, G.A. and El-ssayad, M.F., 2016. Studying the influence of nitrogen source on lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus bulgaricus* Lb-12. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 7(1): 693-705.

McDonald, P., Edwards, R.A. and Greenhalgh, J.F.D., 2002. *Animal Nutrition*. 6th Edition. Addison Wesley, Longman, UK. 543 pages.

Nguyễn Hữu Văn, Nguyễn Song Toàn, Nguyễn Xuân Bả và Nguyễn Tiến Vờn, 2015. Nghiên cứu sản xuất thức ăn hỗn hợp lên men (FTMR) từ nguồn phụ phẩm trồng trọt giàu xơ để nuôi bò thịt: II. Khảo sát hiệu quả của việc sử dụng thức ăn thức ăn FTMR sản xuất từ thân lá cây ngô. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. 24: 88-95.

Nguyễn Thị Hồng Nhân, 1999. Giáo trình thức ăn gia súc phần II và III, Khoa nông nghiệp. Trường Đại học Cần Thơ.

Oliver, A.L., Grant, R.J., Pedersen, J.F. and O'Rear J., 2004. Comparison of Brown Midrib-6 and -18 Forage Sorghum with Conventional Sorghum and Corn Silage in Diets of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 87(3): 637-644.

Ryckeboer, J., Megaert, J., Coosemans, J., Deprins K. and Swings, J., 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Apply Microbiology*. 94(1): 127-137.

Sugihara, F. and Line, K., 1975. Further studies on growth medium for *Lactobacillus sanfrancisco*. *Journal of Milk and Food Technology*. 38(11): 667-672.

Thiele, C., Grassl, S. and Gänzle, M.G., 2004. Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(5): 1307-1314.

Trương La, Vũ Văn Nội, Trịnh Xuân Cư và Vũ Chí Cường, 2008. Tiềm năng nguồn phụ phẩm nông công nghiệp làm thức ăn cho bò tại huyện Eakar, tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*. 11: 34-39.

- Vermeulen, N., Kretzer, J., Machalitz, H., Vogel, R.F. and Gänzle, M.G., 2006. Influence of redox-reactions catalysed by homo- and heterofermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*. 43(2): 137-143.
- Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G. and Vogel, R.F., 2005. Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10): 6260-6266.
- Vũ Duy Giảng, Nguyễn Xuân Bá, Lê Đức Ngoan, Nguyễn Xuân Trạch, Vũ Chí Cường, Nguyễn Hữu Văn, 2008. Dinh dưỡng và thức ăn cho bò. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà nội, 291 trang.
- Zhang Q., Ren, J., Zhao M., *et al.*, 2011. Isolation and characterization of three novel peptides from casein hydrolysates that stimulate the growth of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(13): 7045-7053.