

## THỬ NGHIỆM NƯỚC CHANH DÂY ĐỘ CÒN THẤP BỔ SUNG PROBIOTIC TỪ VI KHUẨN *Lactobacillus plantarum* LY-78

Huỳnh Phan Phương Trang\*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

\*Email: tranghpp@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/6/2017; Ngày chấp nhận đăng: 16/8/2018

### TÓM TẮT

Các sản phẩm probiotic có nguồn gốc trái cây ngày càng được quan tâm nghiên cứu. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về việc bổ sung probiotic vào nước trái cây lên men độ còn thấp trong khi loại nước này được đánh giá sẽ phát triển mạnh trong những năm sắp tới. Mục đích của nghiên cứu này là thử nghiệm bổ sung probiotic (vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* LY-78) vào nước chanh dây lên men có độ còn thấp. Kết quả nghiên cứu cho thấy, *Lactobacillus plantarum* LY-78 có khả năng kháng muối mật, chịu acid, kháng khuẩn, phát triển tốt trên môi trường nước chanh dây lên men độ còn thấp với mật độ đạt 8 log CFU/mL qua 4 tuần bảo quản ở 4 °C.

*Từ khóa:* Nước trái cây lên men, chanh dây, probiotic, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* LY-78.

### 1. MỞ ĐẦU

Probiotic là những vi sinh vật sống có ảnh hưởng tích cực đến sức khỏe con người hoặc động vật bằng cách thay đổi hệ vi khuẩn đường ruột của vật chủ [1]. Bên cạnh các sản phẩm probiotic phổ biến từ sữa [2-5] thì sản phẩm probiotic có nguồn gốc từ trái cây ngày càng được quan tâm vì nước trái cây chứa nhiều khoáng chất, vitamin, chất xơ và chất chống oxy hoá [6]. Nhiều sản phẩm nước uống probiotic từ nước trái cây như cà chua, chuối, xoài đã được nghiên cứu sản xuất [7-10]. Ưu điểm của nước trái cây là không chứa bất kỳ chất gây dị ứng sữa nào nên không hạn chế người sử dụng. Tuy nhiên, về mặt cảm quan, men probiotic có thể gây ra hương vị không mong muốn cho sản phẩm. Do đó, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện với mục đích làm giảm cảm giác khó chịu về mặt hương vị của nước trái cây probiotic. Luckow *et al.* đã công bố rằng hương vị không mong muốn do probiotic có thể bị che giấu bằng cách thêm 10% (v/v) nước trái cây nhiệt đới chủ yếu là dứa, xoài hoặc chanh dây [7]. Ngoài ra, sản phẩm nước trái cây lên men bổ sung probiotic bắt đầu được nghiên cứu trong thời gian gần đây [1]. Nước trái cây lên men là dạng sản phẩm nước uống có độ còn thấp (thường 4,5-5,5%) không qua chưng cất, chứa acid hữu cơ, chất khoáng, vitamin [11]. Kazakos *et al.* đã sử dụng nước ép quả lựu, hoặc hỗn hợp nước lựu với nước cam để sản xuất nước giải khát có độ còn thấp thông qua quá trình lên men sử dụng hạt kefir [1].

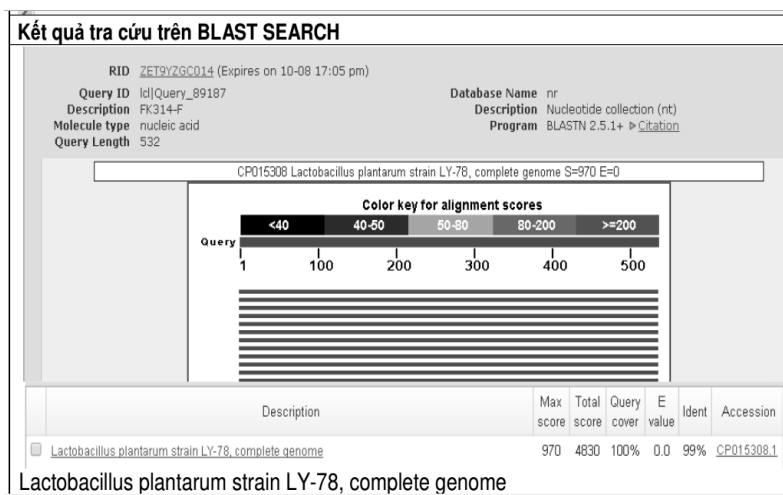
Nghiên cứu này nhằm thử nghiệm một loại nước trái cây lên men độ còn thấp đạt tiêu chuẩn probiotic từ nguyên liệu chanh dây thông qua việc khảo sát đặc tính probiotic của *Lactobacillus plantarum* LY-78, đánh giá khả năng phát triển của chủng trên môi trường nước chanh dây lên men độ còn thấp sau 4 tuần bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Chúng vi sinh vật

Giống *Lactobacillus plantarum* LY-78 được phân lập từ nem chua (Hình 1). Môi trường MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar) được sử dụng để giữ và nhân giống [12]. Vi khuẩn *L. plantarum* LY-78 từ ống giống được hoạt hóa, nhân giống cấp 1 và cấp 2 trong môi trường MRS lỏng, nhân giống cấp 3 trong môi trường dịch chanh dây đã vô khuẩn. Sau nhân giống, mật độ vi khuẩn đạt 6 log CFU/mL.



Hình 1. Kết quả định danh *Lactobacillus plantarum* LY-78

#### 2.1.2. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

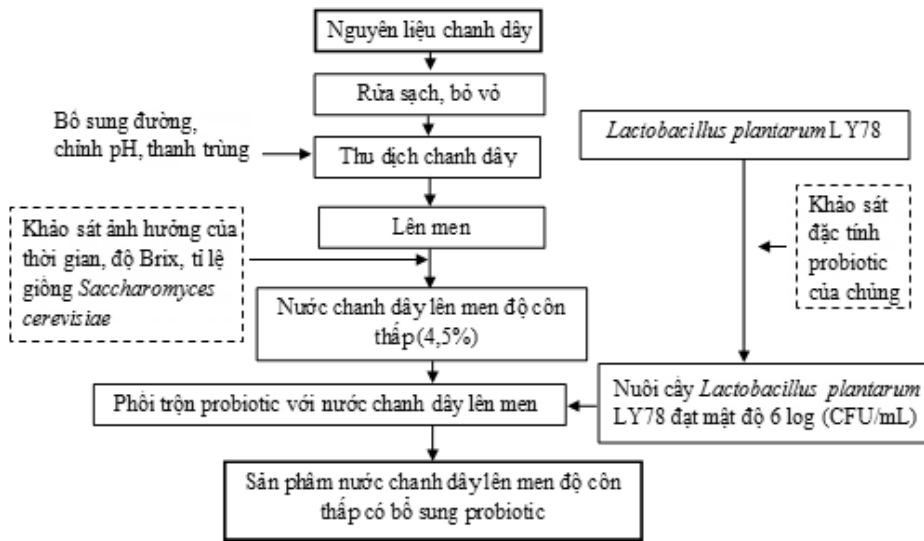
Giống *Saccharomyces cerevisiae* được cung cấp từ Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh. Môi trường PGA (Potato glucose agar) và PGB (Potato glucose broth) được sử dụng để giữ và nhân giống. Nấm men từ ống giống được hoạt hóa, nhân giống cấp 1, cấp 2 trong môi trường PGB, nhân giống cấp 3 trong môi trường dịch chanh dây đã vô khuẩn. Sau nhân giống, mật độ nấm men đạt  $2,3 \times 10^7$  tế bào/mL.

#### 2.1.3. Chanh dây

Chanh dây (*Passiflora flavicarpa*) được rửa sạch, bỏ đôi, nạo ruột, bỏ vỏ cho vào vợt lưới, bỏ hạt, lấy dịch cốt, pha loãng với nước theo tỷ lệ nước:chanh dây là 3:7 [13]. Tiến hành điều chỉnh dịch chanh dây về pH 4,5 bằng acid citric 10% và  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10% [14], điều chỉnh nồng độ chất khô 20 °Bx bằng cách bổ sung đường saccharose vào dịch chanh dây. Sau đó, dịch chanh dây được hấp thanh trùng Pasteur ở nhiệt độ 60-70 °C, trong thời gian 10-15 phút [15].

### 2.2. Phương pháp

Các thí nghiệm được thực hiện theo quy trình sản xuất nước chanh dây lên men độ cồn thấp có bổ sung thêm công đoạn nuôi cấy *L. plantarum* LY-78 đạt mật độ 6 log CFU/mL (Hình 2).



Hình 2. Quy trình thí nghiệm sản xuất nước chanh dây lên men độ cồn thấp có bổ sung probiotic [16]

### 2.2.1. Khảo sát quá trình lên men chanh dây

Khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố thời gian, nồng độ chất khô, tỷ lệ giống đến quá trình lên men chanh dây để đạt độ cồn thấp 4,5-5,5%. Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố, 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình.

**Khảo sát thời gian lên men:** Chuẩn bị bình tam giác chứa 100 mL dịch chanh dây với pH 4,5, nồng độ chất khô 20 °Bx, tỷ lệ giống nấm men 3% (v/v), nhiệt độ lên men 30 °C. Thực hiện lên men với 4 mức thời gian khác nhau: 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 24 giờ. Sau quá trình lên men, kiểm tra độ cồn, pH, nồng độ chất khô còn lại và xác định thời gian lên men phù hợp.

**Khảo sát nồng độ chất khô:** Chuẩn bị bình tam giác chứa 100 mL dịch chanh dây với pH 4,5, tỷ lệ giống nấm men 3% (v/v), nhiệt độ lên men 30 °C, dịch chanh dây có nồng độ chất khô thay đổi lần lượt là 16, 18, 20, 22 °Bx. Tiến hành lên men với thời gian tối ưu theo thí nghiệm trên. Sau quá trình lên men, kiểm tra độ cồn, pH, nồng độ chất khô còn lại và xác định nồng độ chất khô thích hợp cho quá trình lên men.

**Khảo sát tỷ lệ giống nấm men:** Chuẩn bị bình tam giác chứa 100 mL dịch chanh dây với tỷ lệ giống bổ sung lần lượt là 3, 5, 7, 9% (v/v), nồng độ chất khô và thời gian lên men phù hợp theo thí nghiệm trên, pH 4,5, nhiệt độ lên men 30 °C. Sau quá trình lên men, kiểm tra độ cồn, pH, nồng độ chất khô còn lại và xác định tỷ lệ giống thích hợp cho quá trình lên men.

### 2.2.2. Khảo sát đặc tính probiotic của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* LY-78

**Khảo sát khả năng chịu muối mật của *L. plantarum* LY-78:** Muối mật được gan sản xuất từ quá trình chuyển hóa cholesterol [18]. Đối với sinh lý cơ thể người, nồng độ muối mật 0,3% được xem là nồng độ trung bình hiện diện ở ruột non [19]. Muối mật tham gia vào quá trình tiêu hóa để phân cắt và hấp thụ chất béo ngoài ra chúng cũng ngăn cản sự tồn tại của các vi sinh vật trong ruột. Do đó, chủng probiotic cho người cần phải có khả năng kháng lại muối mật để chúng có thể duy trì các hoạt động trao đổi chất ổn định trong ruột non của vật chủ. Thí nghiệm tiến hành dựa trên phương pháp của Jacobsen *et al.* [17]. Chủng *L. plantarum* LY-78 được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng có bổ sung muối mật với nồng độ 0,3% (w/v). Muối mật được sử dụng có công thức tương tự NaCl 9 g/L, mật bò

3 g/L, pH 6,5. Sau các khoảng thời gian nuôi cấy 0, 1, 2, 3, 4 giờ ở 37 °C, tiến hành cấy trải lên đĩa petri chứa môi trường MRS rắn để xác định mật độ vi khuẩn.

*Khảo sát khả năng chịu acid dạ dày của Lactobacillus plantarum LY-78:* Hiện nay, các probiotic sử dụng cho người đều được nghiên cứu đưa vào cơ thể qua đường tiêu hóa. Để có thể vượt qua được dạ dày, chủng probiotic phải có khả năng chịu được môi trường khắc nghiệt của dịch vị bao gồm enzyme tiêu hóa và pH thấp [17, 20]. Nghiên cứu của Zhou *et al.* [21] cho rằng giá trị pH 2,0 được xem là giới hạn quyết định để sàng lọc các chủng vi sinh vật có khả năng sống sót trong môi trường acid của dạ dày. Thí nghiệm tiến hành dựa trên phương pháp của Jacobsen *et al.* [17]. *L. plantarum* LY-78 được nuôi cấy trong môi trường MRS với pH 2 (pH môi trường được điều chỉnh bằng HCl). Sau các khoảng thời gian nuôi cấy 0, 1, 2, 3, 4 giờ ở 37 °C, tiến hành cấy trải lên đĩa petri chứa môi trường MRS rắn để xác định mật độ vi khuẩn.

*Khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh:* Hoạt động đối kháng với vi khuẩn gây bệnh của vi khuẩn lactic là do các sản phẩm được tạo ra trong quá trình trao đổi chất như acid lactic, acid acetic. Các acid hữu cơ này ức chế sự phát triển của nhiều vi khuẩn gram âm gây bệnh [22]. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn lactic được tính bằng đường kính vòng vô khuẩn quanh khuẩn lạc. Tính kháng khuẩn được biểu hiện khi đường kính vòng vô khuẩn rộng hơn 2 mm. Tính kháng khuẩn yếu (đường kính vòng vô khuẩn < 5 mm), tính kháng khuẩn trung bình (đường kính vòng vô khuẩn từ 5-10 mm), tính kháng khuẩn mạnh (đường kính vòng vô khuẩn > 10 mm) [1]. Sử dụng phương pháp đục lỗ thạch để xác định hoạt tính kháng khuẩn của *L. plantarum* LY-78, vi sinh vật chỉ thị được sử dụng là *Escherichia coli* và *Salmonella* sp. Cấy chủng kiểm định *Escherichia coli* và *Salmonella* sp. lên môi trường MRS rắn trên đĩa petri. Sau đó, tiến hành đục lỗ thạch (3 lỗ/đĩa). Bơm 0,1 mL chủng giống *Lactobacillus plantarum* LY-78 vào 3 giếng thạch đã đục, giữ đĩa thạch ở 37 °C. Sau 2 ngày, xác định và đo kích thước vòng kháng khuẩn.

### 2.2.3. Bổ sung chủng *L. plantarum* LY-78 vào nước chanh dây sau lên men

Dịch chanh dây sau khi lên men với nấm men tạo độ cồn thấp được ly tâm trong điều kiện vô trùng ở 6000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ xác nấm men.

*Khảo sát khả năng sống sót của chủng L. plantarum LY-78 trong nước chanh dây sau lên men ở các khoảng thời gian khác nhau:* Dịch vi khuẩn *L. plantarum* LY-78 đạt mật độ 6 log CFU/mL được bổ sung vào dịch chanh dây sau lên men với tỷ lệ giống 3% (v/v). Sau các khoảng thời gian nuôi cấy 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 giờ ở nhiệt độ 37 °C, tiến hành kiểm tra mật độ tế bào để xác định thời gian phù hợp cho sự sinh trưởng của *L. plantarum* LY-78 trong nước chanh dây sau lên men.

*Khảo sát tỷ lệ chủng L. plantarum LY-78 phù hợp với dịch chanh dây sau lên men:* Dịch vi khuẩn *L. plantarum* LY-78 đạt mật độ 6 log CFU/mL được bổ sung vào dịch chanh dây sau lên men với các tỷ lệ giống 3, 5, 7, 9% (v/v). Sau thời gian nuôi cấy phù hợp, ở nhiệt độ 37 °C tiến hành kiểm tra mật độ tế bào và xác định tỷ lệ giống thích hợp.

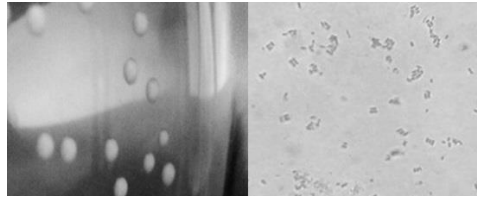
*Kiểm tra mật độ vi khuẩn L. plantarum LY-78:* Thực hiện xác định mật độ vi khuẩn *L. plantarum* LY-78 sau 0, 1, 2, 3, 4 tuần bảo quản ở 4 °C.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kiểm tra hình thái của vi khuẩn *L. plantarum* LY-78

*L. plantarum* LY-78 được cấy trên môi trường MRS rắn, ủ ở 37 °C trong 72 giờ để quan sát hình thái khuẩn lạc. Khuẩn lạc *L. plantarum* LY-78 có dạng chấm tròn nhỏ, bia nguyên, màu

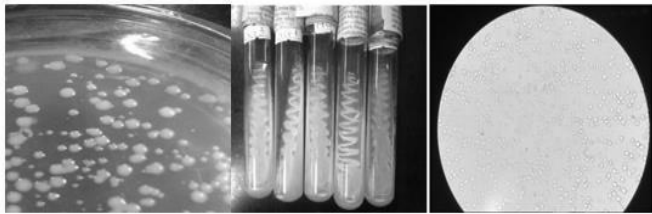
trắng sữa, bề mặt bóng, hơi nhô cao, đường kính 0,2-0,4 cm. *L. plantarum* LY-78 là vi khuẩn gram dương, hình que hơi dài, kết đôi hoặc kết chuỗi.



Hình 3. Hình ảnh đại thể và vi thể của *L. plantarum* LY-78 được phân lập

### 3.2. Kiểm tra hình thái của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Nấm men được cấy trên môi trường PGA, ủ ở nhiệt độ 30 °C trong 72 giờ để quan sát hình thái khuẩn lạc. Khuẩn lạc nấm men có dạng chấm tròn, màu trắng, bề mặt trơn láng, nhô cao.



Hình 4. Hình ảnh đại thể và vi thể của nấm men, hình ảnh giữ giống nấm men trên thạch nghiêng

### 3.3. Khảo sát quá trình lên men chanh dây

#### 3.3.1. Khảo sát thời gian lên men

Thời gian lên men khoảng 4-8 giờ là giai đoạn nấm men thích nghi với môi trường. Ở giai đoạn này, môi trường có một lượng oxy nhất định và nấm men đã sử dụng lượng oxy đó chủ yếu cho quá trình hô hấp hiếu khí để tăng sinh khối nên lượng còn tạo ra thấp. Từ 12 giờ đến 16 giờ nấm men chuyển sang hô hấp kỵ khí tạo ethanol làm nồng độ chất khô giảm đáng kể. Tại thời điểm 16 giờ lên men, độ còn đạt 5,47%, phù hợp với yêu cầu sản phẩm (khoảng 4,5-5,5%) nên 16 giờ được chọn là thời gian lên men thích hợp (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình lên men

Thời gian lên men (giờ)	Nồng độ chất khô ban đầu (°Bx)	pH ban đầu	Lượng men giống bổ sung (%)	Các thông số khảo sát		
				pH	Nồng độ chất khô (°Bx)	Độ còn (%)
4	20	4,5	3%	4,61 ± 0,01 <sup>c</sup>	19,67 ± 0,33 <sup>c</sup>	1,17 ± 0,17 <sup>a</sup>
8				4,55 ± 0,01 <sup>d</sup>	19,50 ± 0,29 <sup>c</sup>	1,67 ± 0,17 <sup>a</sup>
12				4,51 ± 0,01 <sup>c</sup>	19,17 ± 0,17 <sup>c</sup>	2,30 ± 0,17 <sup>b</sup>
16				4,47 ± 0,02 <sup>b</sup>	15,67 ± 0,67 <sup>b</sup>	5,47 ± 0,17 <sup>c</sup>
24				4,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	12,00 ± 0,58 <sup>a</sup>	8,33 ± 0,33 <sup>d</sup>

<sup>a, b, c, ...</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

### 3.3.2. Khảo sát nồng độ chất khô phù hợp cho quá trình lên men

Khi nồng độ chất khô đạt 18 °Bx, 20 °Bx, 22 °Bx, ngoài tăng sinh khối nấm men còn chuyển hóa chất dinh dưỡng thành cồn nhiều hơn nồng độ chất khô 16 °Bx. Ở 18 °Bx và 20 °Bx, độ cồn đạt 4,33% và 5,13% phù hợp yêu cầu sản phẩm, vì lý do kinh tế chọn 18 °Bx là nồng độ chất khô phù hợp cho lên men (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của lượng chất khô ban đầu đến quá trình lên men

Nồng độ chất khô ban đầu (°Bx)	Thời gian lên men (giờ)	pH ban đầu	Lượng men giống bổ sung (%)	Các thông số khảo sát		
				pH	Nồng độ chất khô (°Bx)	Độ cồn (%)
16	16	4,5	3%	4,41 ± 0,01 <sup>c</sup>	14,50 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,17 <sup>a</sup>
18				4,34 ± 0,02 <sup>b</sup>	15,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,33 <sup>b</sup>
20				4,32 ± 0,02 <sup>b</sup>	16,67 ± 0,44 <sup>b</sup>	5,13 ± 0,17 <sup>c</sup>
22				4,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	17,67 ± 0,33 <sup>c</sup>	6,97 ± 0,17 <sup>d</sup>

<sup>a, b, c, d</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

### 3.3.3. Khảo sát lượng giống bổ sung phù hợp

Tỷ lệ giống trong quá trình lên men thường dao động 3-10% (v/v) [16]. Do sản phẩm tạo ra cần độ cồn thấp nên thực hiện khảo sát tỷ lệ giống thay đổi 1-7% (v/v). Khi lượng giống tăng thì việc chuyển hóa đường thành cồn cũng tăng theo, do đó độ cồn tỷ lệ thuận với lượng giống có trong môi trường lên men (Bảng 3). Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về độ cồn tạo ra giữa các tỷ lệ giống 3%, 5%, 7% (v/v) có thể do thời gian lên men còn ngắn (16 giờ). Do đó, chọn tỷ lệ giống phù hợp là 3%.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của lượng giống bổ sung đến quá trình lên men

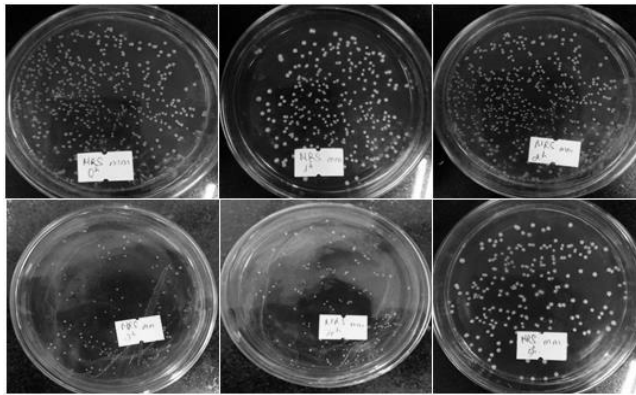
Lượng men giống bổ sung (%)	Thời gian lên men (giờ)	Nồng độ chất khô ban đầu (°Bx)	pH ban đầu	pH	Nồng độ chất khô (°Bx)	Độ cồn (%)
1	16	18	4,5	4,48 ± 0,00 <sup>c</sup>	16,0 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,17 <sup>a</sup>
3				4,42 ± 0,01 <sup>b</sup>	14,83 ± 0,44 <sup>b</sup>	4,50 ± 0,29 <sup>b</sup>
5				4,42 ± 0,01 <sup>b</sup>	14,50 ± 0,29 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,17 <sup>bc</sup>
7				4,40 ± 0,01 <sup>a</sup>	13,83 ± 0,17 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,17 <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

## 3.4. Khảo sát đặc tính probiotic của *L. plantarum* LY-78

### 3.4.1. Khảo sát khả năng chịu muối mật của *L. plantarum* LY-78

Ở thời điểm ban đầu, mật độ *L. plantarum* LY-78 đạt 8,32 log CFU/mL và giảm dần theo từng giờ khảo sát (Bảng 4). Sau 5 giờ mật độ *L. plantarum* LY-78 vẫn còn khá cao 7,83 log CFU/mL > 6 log (CFU/mL).



Hình 5. *L. plantarum* LY-78 trong môi trường muối mật 0,3% theo thời gian

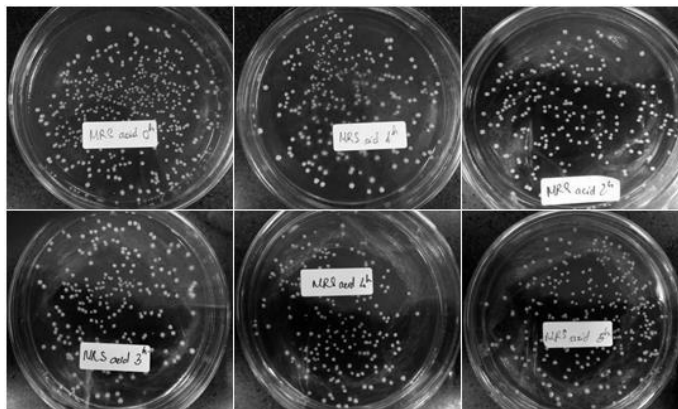
Khoảng thời gian từ 4 đến 5 giờ mật độ vi khuẩn giảm từ 7,87 log CFU/mL xuống còn 7,83 log CFU/mL, tuy nhiên thời gian này mật độ tế bào giảm ít hơn các giờ trước đó, có thể thấy chủng đã tạo sự thích nghi đối với môi trường có nồng độ muối mật 0,3%. Ở nồng độ muối mật 0,3% vi khuẩn probiotic cần có khả năng sống sót trong vòng 3-5 giờ [23]. Kết quả này cho thấy chủng *L. plantarum* LY-78 là chủng đạt tiêu chuẩn probiotic (Bảng 4).

Bảng 4. Mật độ *L. plantarum* LY-78 trong môi trường muối mật 0,3% theo thời gian

Sự sống sót của <i>L. plantarum</i> LY-78 log CFU/mL						
Muối mật	0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ
0,3%	8,32 ± 0,02 <sup>d</sup>	8,26 ± 0,02 <sup>d</sup>	8,12 ± 0,03 <sup>c</sup>	8,02 ± 0,06 <sup>b</sup>	7,87 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,83 ± 0,05 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c, d</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

### 3.4.2. Khảo sát khả năng chịu acid dạ dày của *Lactobacillus plantarum* LY-78



Hình 6. Mật độ *L. plantarum* LY-78 trong môi trường pH 2,0 theo thời gian

Ở thời điểm ban đầu, mật độ *L. plantarum* LY-78 đạt 8,29 log CFU/mL và giảm dần theo từng giờ khảo sát (Bảng 5). Sau 5 giờ, mật độ *L. plantarum* LY-78 còn lại khá cao 7,92 log CFU/mL > 6 log CFU/mL. Điều này cho thấy chủng *L. plantarum* LY-78 có khả năng chịu được pH 2,0 và đảm bảo tỷ lệ sống sót hơn 50% cho đến 5 giờ. Kết quả thực nghiệm cho thấy chủng này có tiềm năng probiotic tốt.

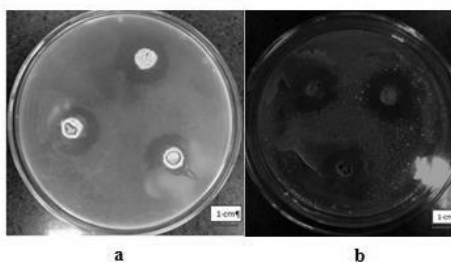
Bảng 5. Mật độ *L. plantarum* LY-78 trong môi trường pH 2,0 theo thời gian

Sự sống sót của <i>L. Plantarum</i> LY-78 log CFU/mL						
pH	0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ
2	8,29 ± 0,01 <sup>e</sup>	8,26 ± 0,02 <sup>d</sup>	8,24 ± 0,02 <sup>d</sup>	8,21 ± 0,02 <sup>c</sup>	8,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	7,92 ± 0,02 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c,...</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

### 3.4.3. Khảo sát đặc tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh

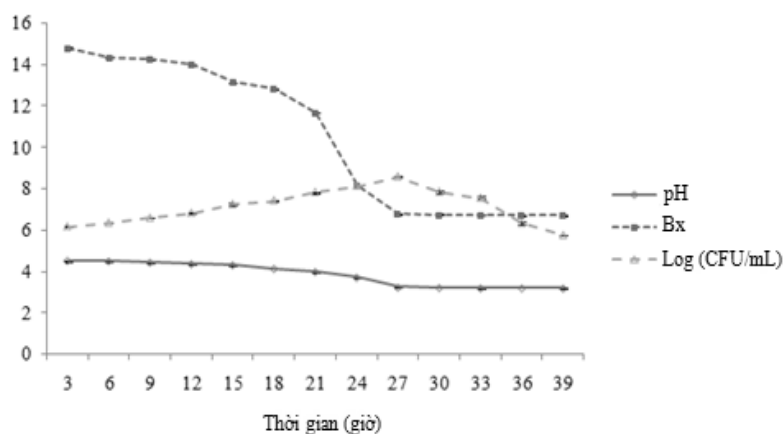
Đường kính vòng kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum* LY-78 đối với *E.coli* đo được trung bình là (12,3 ± 0,02 mm) > 10 mm và đối với *Salmonella* sp. đo được trung bình là (17,7 ± 0,02 mm) > 10 mm, cho thấy chủng có khả năng kháng khuẩn mạnh (Hình 7). Kết quả thực nghiệm này cho thấy *L. plantarum* LY-78 có đặc tính probiotic tốt.



Hình 7. (a) Vòng kháng khuẩn của *L. plantarum* LY-78 đối với *E.coli*  
(b) Vòng kháng khuẩn của *L. plantarum* LY-78 đối với *Salmonella* sp.

## 3.5. Khảo sát quá trình bổ sung chủng *Lactobacillus plantarum* LY-78 vào nước chanh dây lên men

### 3.5.1. Khảo sát khả năng sống sót của chủng *L. plantarum* LY-78 trong nước chanh dây sau lên men ở các khoảng thời gian khác nhau



Hình 8. Khảo sát khả năng sống sót của chủng *L. plantarum* LY-78 trong nước chanh dây sau lên men ở các khoảng thời gian khác nhau

Để đạt được hiệu quả tối ưu, lượng probiotic trong sản phẩm tối thiểu là 6 log CFU/mL. Từ 3 giờ đến 27 giờ, chủng *L. plantarum* LY-78 tăng sinh khối chậm và đạt cao nhất vào thời điểm 27 giờ, nồng độ chất khô giảm dần do lượng đường được vi khuẩn sử dụng cho



quá trình tăng trưởng tạo sinh khối, pH giảm dần do acid lactic được sinh ra. Từ 30 giờ trở đi nồng độ chất khô và pH vẫn giảm nhưng ít hơn giai đoạn trước đồng thời mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm dần (Hình 8). Do giai đoạn từ 3 giờ tới 27 giờ tương ứng với pha thích nghi và tăng trưởng của vi khuẩn *L. plantarum* LY-78, vi khuẩn phát triển mạnh mẽ và sử dụng lượng đường còn lại trong dịch chanh dây sau lên men để tăng sinh khối. Tuy nhiên, từ 30 giờ trở đi nồng độ chất khô giảm xuống thấp đã ức chế sự tăng trưởng vi khuẩn làm mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm dần, acid lactic không được sinh ra nhiều nên pH gần như giảm rất ít. Ngoài ra, lượng acid lactic được tạo ra từ trước cũng đã kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn lactic [24]. Vì vậy, 27 giờ là thời gian lên men phù hợp, vì ở thời gian này mật độ *L. plantarum* LY-78 cao nhất.

### 3.5.2. Khảo sát tỷ lệ chủng *L. plantarum* LY-78 phù hợp với dịch chanh dây sau lên men

Sau thời gian lên men 27 giờ, ở tỷ lệ giống 3% mật độ vi khuẩn tăng lên đạt 7,55 log CFU/mL, tỷ lệ giống 5% (v/v) mật độ vi khuẩn đạt 8,13 log CFU/mL trong khi tỷ lệ giống 7% và 9% (v/v) thì mật độ vi khuẩn tăng ít hơn (Bảng 6). Điều này được giải thích như sau: nồng độ chất khô còn lại trong dịch chanh dây sau lên men chỉ đạt 14,83 °Bx (Bảng 3) trong khi nồng độ chất khô phù hợp cho vi khuẩn lactic là 18 °Bx. Nếu nồng độ chất khô thấp và mật độ giống lớn (7% và 9%) thì không đủ chất dinh dưỡng cho vi khuẩn tăng trưởng, sự phát triển của vi khuẩn bị ức chế do nồng độ cơ chất thấp. Đối với 2 tỷ lệ giống còn lại thì nồng độ chất dinh dưỡng phù hợp và có sự tăng số lượng tế bào nên chọn tỷ lệ giống là 5% với mật độ tế bào đạt cao nhất.

Bảng 6. Mật độ của vi khuẩn ở các tỷ lệ giống khác nhau

Tỷ lệ giống	pH	Nồng độ chất khô (°Bx)	Mật độ <i>L. plantarum</i> LY-78 log (CFU/mL)
3%	3,61 ± 0,0 <sup>d</sup>	8,31 ± 0,02 <sup>c</sup>	7,55 ± 0,03 <sup>b</sup>
5%	3,43 ± 0,02 <sup>c</sup>	7,73 ± 0,09 <sup>b</sup>	8,13 ± 0,02 <sup>c</sup>
7%	3,2 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,33 ± 0,02 <sup>a</sup>
9%	3,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,66 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,29 ± 0,03 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c, d</sup>: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

### 3.6. Kiểm tra mật độ tế bào sau 4 tuần bảo quản ở 4 °C

Xác định mật độ tế bào sau 4 tuần bảo quản ở 4 °C thu được kết quả như sau: ở thời gian bảo quản là 0, 1, 2, 3, 4 tuần thì mật độ tế bào tương ứng lần lượt là 8,12; 8,09; 8,07; 8,02; 8,02 log CFU/mL. Mật độ tế bào sau 4 tuần bảo quản ở 4 °C vẫn đạt từ 8 log CFU/mL trở lên chứng tỏ sản phẩm đạt tiêu chuẩn probiotic.

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đề xuất quy trình thử nghiệm nước chanh dây lên men độ cồn thấp có bổ sung probiotic là vi khuẩn *L. plantarum* LY-78 và xác định được các điều kiện tỷ lệ giống 3%, nồng độ chất khô 18 °Bx, thời gian lên men 16 giờ thì nước chanh dây đạt độ cồn sau lên men là 4,5%. Kết quả khảo sát thực nghiệm đã chứng minh chủng *L. plantarum* LY-78 phân lập từ nem chua có đặc tính probiotic tốt, có khả năng sống sót trong nước chanh dây lên men độ cồn thấp và đảm bảo mật độ 8 log CFU/mL sau 4 tuần bảo quản ở 4 °C.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Stavros K., Ioanna M., Chrysanthi N., Athanasios A., Eugenia B., Argyro B., Stavros P. and Theodoros V. - Production of low-alcohol fruit beverages through fermentation of pomegranate and orange juices with kefir grains, *Current Research in Nutrition and Food Science* **4** (1) (2016) 19-26.
2. Ngô Thị Phương Dung - Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có khả năng sinh chất kháng khuẩn, *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ* **19** (2011) 176-184.
3. Farnworth E. R., Mainville I., Desjardins M. P., Gardner N., Fliss I., Champagne C. - Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation, *International Journal of Food Microbiology* **116** (1) (2007) 174-181.
4. Rui X., Xing G., Zhang Q., Zare F., Li W., Dong M. - Protein bioaccessibility of soymilk and soymilk curd prepared with two *Lactobacillus plantarum* strains as assessed by in vitro gastrointestinal digestion, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **38** (2016) 155-159.
5. Quách Đức Tính, Tống Thành Trung, Nguyễn Ngọc Duy, Nguyễn Thúy Hương - Khảo sát một số hoạt tính probiotic của Kefir chanh dây truyền thống và Kefir chanh dây bổ sung *Lactobacillus casei* VTCC186, *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ* **16** (T3) (2013) 40-47.
6. Lu K., Lin W., Liu J. - The characteristics of nutrient removal and inhibitory effect of *Ulva clathrata* on *Vibrio anguillarum*, *Journal of Applied Phycology* **20** (6) (2008) 1061-1068.
7. Luckow T., Delahunty C. - Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients, *Food Research International* **37** (2004) 805-814.
8. Tsen J. H., Lin Y. P., King A. E. - Fermentation of banana media by using K-carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*, *International Journal of Food Microbiology* **91** (2004) 215- 220.
9. Yoon K. Y., Woodams E. E., Hang Y. D. - Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria, *Journal of Microbiology* **42** (2004) 315-318.
10. Reddy L. V., Min J. H., Wee Y. J. - Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria, *Microbiology and Biotechnology Letter* **43** (2) (2015) 120-125.
11. Bates R. P., Morris J. R., Crandall P.G. - Principles and practices of small-and medium-scale fruit juice processing, *FAO Agricultural Services Bulletin* (2001).
12. Trần Linh Thuộc - Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, Nhà xuất bản Giáo dục (2006).
13. Vũ Công Hậu - Làm rượu vang trái cây ở gia đình, Nhà xuất bản Nông nghiệp (2004).
14. Đàm Sao Mai - Phụ gia thực phẩm, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia (2012).
15. Lương Đức Phẩm - Nấm men công nghiệp, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội (2009).
16. Nguyễn Đức Lượng - Công nghệ Vi sinh vật Tập 2, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh (2002).
17. Jacobsen C. N., Nielsen V. R., Hayford A. E. *et al* - Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by in vitro techniques and evaluation of

- the colonization ability of five selected strains in humans, *Applied and Environmental Microbiology* **65** (11) (1999) 4949-4956.
18. Baron S.F., Hylemon P.B. (1997) - Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones, *gastrointestinal microbiology*, Chapman & Hall Microbiology Series, Springer (1997) 470-510.
  19. Gilliland S. E., Nelson C. R. and Maxwell C. - Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology* **49** (2) (1985) 377-381.
  20. Arthur C. O., Elina M. T., Satu T., Seppo S. - Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus, *International Journal of Food Microbiology* **64** (1–2) (2001) 119-126.
  21. Zhou T., Li B., Peng C., Ji P. B., Chen G., Ren Ya-Li. - Assessment of the sequential simulated gastrointestinal tolerance of lactic acid bacteria from kefir grains by response surface methodology, *Journal of Food Science* **74** (6) (2009) M328–M334.
  22. Daniel Demeyer - Meat fermentation: Principles and applications, in: *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* **20** (2004).
  23. Irena R., Bojana B. M., Andreja Čanžek M., Saša S. - The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems, *International Journal of Food Microbiology* **76** (1–2) (2002) 83-91.
  24. Lê Ngọc Thùy Trang, Phạm Minh Nhật. - Phân lập và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh hợp chất kháng khuẩn của *Lactobacillus plantarum*, *Tạp chí Sinh học* **36** (1se) (2014) 97-106.

## ABSTRACT

### STUDY ON LOW-ALCOHOL FERMENTED PASSION FRUITS JUICE WITH ADDING PROBIOTICS LACTOBACILLUS PLANTARUM LY-78

Huỳnh Phan Phương Trang\*

*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

\*Email: [tranghpp@cntp.edu.vn](mailto:tranghpp@cntp.edu.vn)

Fruit probiotic products are increasingly being studied. However, there are not many works which add probiotics to low-alcohol fermented juices, while this drink is expected to grow in the coming years. The purpose of this study was to test the probiotic supplement (*Lactobacillus plantarum* LY-78) on low-alcohol fermented passion fruit juice. Research results showed that *Lactobacillus plantarum* LY-78 was resistant to bile salts, acid, antimicrobial, and grew well in low alcohol fermented passion fruits juice with a density of 8 log (CFU/mL) over four weeks at 4 °C.

**Keywords:** Fermented fruits, passion fruits, probiotic, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*.