

KIỂM SOÁT *Bacillus* SINH BÀO TỬ KHÁNG NHIỆT ĐỂ SẢN XUẤT SỮA AN TOÀN VÀ GIẢM THIỂU DẤU CHÂN CÁC BON

Trần Hữu Thanh Huy¹, Bùi Thế Vinh^{1*}, Huỳnh Lê Đạt¹,
Huỳnh Văn Tiền², Lương Thị Phương Liên³, Lê Thị Kim Loan⁴

TÓM TẮT

Trong ngành chế biến sữa, việc áp dụng phổ biến các phương pháp nhiệt để xử lý nhiệt sữa như thanh trùng và tiệt trùng nhằm tiêu diệt vi khuẩn mục tiêu *Bacillus* hình thành bào tử kháng nhiệt và màng sinh học, sản sinh các enzyme protease và lipase ngoại bào ổn định nhiệt có mặt trong sữa bò tươi nguyên liệu gây ra hư hỏng các sản phẩm sữa. Tuy nhiên, việc áp dụng các chế độ xử lý nhiệt không phù hợp dẫn đến tiêu thụ năng lượng nhiệt và phát thải khí nhà kính (dấu chân các bon) nhiều hơn. Tại Việt Nam, áp dụng nhiệt để chế biến 1.124,7 triệu lít sữa bò tươi thu gom, ước tính sơ bộ chi phí thất thoát khoảng 3,2 tỷ đồng khi nhiệt độ chế biến cao hơn yêu cầu 1°C. Do vậy, để loại bỏ hoàn toàn *Bacillus* sinh bào tử kháng nhiệt từ sữa bò nguyên liệu bằng phương pháp xử lý nhiệt, việc kiểm soát nguồn lây nhiễm và nhận diện chúng để từ đó chọn chế độ xử lý nhiệt phù hợp nhằm sản xuất ra các sản phẩm sữa an toàn, đồng thời tiết kiệm chi phí năng lượng nhiệt sử dụng cũng như giảm thiểu lượng khí thải các bon trong nhà máy sản xuất sữa trong tương lai.

Từ khóa: *Bacillus*, bào tử kháng nhiệt, dấu chân các bon, sữa bò tươi nguyên liệu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sữa là thực phẩm có màu trắng thường được sản xuất bởi các tế bào tiết của tuyến vú con cái đang trong quá trình tiết sữa và là nguồn cung cấp chất dinh dưỡng đáng kể gồm 4 thành phần chính gồm nước, chất béo, protein và đường lactose. Bên cạnh đó, các thành phần phụ gồm chất khoáng, vitamin, enzyme, chất khí hòa tan [1].

Sữa bò tươi nguyên liệu là môi trường dinh dưỡng lý tưởng cho nhiều vi sinh vật. Hàm lượng vi sinh vật trong sữa là đặc tính quyết định chất lượng sữa cũng như đặc tính cảm quan và chất lượng sản phẩm [2]. Sữa bò tươi nguyên liệu bị nhiễm vi khuẩn qua các con đường khác nhau từ

môi trường, bản thân con bò, tiếp xúc với các dụng cụ thiết bị vắt sữa, chứa sữa. Các loại vi khuẩn trong sữa rất đa dạng như các loài thuộc chi *Pseudomonas* ưa lạnh phát triển ở nhiệt độ thấp sinh ra các enzyme ngoại bào bền nhiệt; các loại vi khuẩn hình thành bào tử chịu nhiệt sống sót qua quá trình xử lý nhiệt như *Bacillus* spp. ở dạng bào tử, chúng có nguồn gốc từ môi trường tự nhiên ở các trang trại nuôi bò sữa chuyển vào sữa bò tươi nguyên liệu dẫn đến gây hư hỏng sữa và sản phẩm sữa [3]. Vi khuẩn hình thành bào tử là đa dạng nhất và phức tạp nhất để loại bỏ khỏi chuỗi sản xuất sữa, chủ yếu là do khả năng biến đổi sang trạng thái không hoạt động - bào tử. Bào tử có thể tồn tại trong điều kiện môi trường khắc nghiệt, chẳng hạn như chất dinh dưỡng thâm hụt, áp suất thẩm thấu và độ lệch nhiệt độ, do cấu trúc đa lớp của chúng. Trong khi lớp ngoài cùng bảo vệ bào tử khỏi sự tấn công của enzyme, lớp bên trong duy trì trạng thái mất nước và cung cấp sự bảo vệ bổ sung chống lại hóa chất. Khi điều kiện môi trường

¹ Trường Đại học Cửu Long

² Trường Đại học Cần Thơ

³ Trường Cao đẳng Cơ điện và Nông nghiệp Nam bộ

⁴ Trường Đại học Tiền Giang

* Email: btvinhvn@yahoo.com.vn

thuận lợi thì bào tử có thể nảy mầm ở trạng thái sinh dưỡng [4].

Trong ngành chế biến sữa, việc áp dụng phổ biến các phương pháp nhiệt để xử lý nhiệt sữa như thanh trùng và tiệt trùng nhằm tiêu diệt vi khuẩn mục tiêu là *Bacillus* spp. hình thành các bào tử kháng nhiệt gây có mặt trong sữa bò tươi nguyên liệu gây ra hư hỏng các sản phẩm sữa. Số lượng sản xuất các sản phẩm sữa tăng trưởng cùng với tăng doanh số kinh doanh, nhưng chi phí năng lượng tiêu thụ tăng cao cũng là một vấn đề nan giải đối với ngành sữa. Việc tìm kiếm và đề xuất các giải pháp để giảm mức năng lượng tiêu thụ gồm nhiệt, điện, nước cho quá trình chế biến sữa thật sự cần thiết trong nhà máy sữa để tiết giảm chi phí năng lượng và chi phí sản xuất [5].

Năng lượng được sử dụng để gia nhiệt, vận hành máy móc thiết bị chủ yếu đến từ năng lượng hóa thạch như dầu mỏ, than, khí đốt. Tuy nhiên, nguồn năng lượng này ngày một cạn kiệt và không thể đáp ứng nhu cầu của người dùng. Hơn thế nữa, việc sử dụng năng lượng hóa thạch sẽ tạo ra chất độc hại lớn cho môi trường. Do vậy, cần thiết nghiên cứu các giải pháp làm giảm lượng nhiệt sử dụng cho quá trình xử lý nhiệt sữa nhằm góp phần làm giảm ô nhiễm môi trường đồng nghĩa với việc tìm giải pháp làm giảm “dấu chân các bon” trong quá trình sản xuất các sản phẩm sữa từ sữa bò tươi nguyên liệu. “Dấu chân các bon” đề cập đến tác động tiềm tàng đến khí hậu do khí nhà kính phát thải trực tiếp hoặc gián tiếp xuất phát từ các hoạt động của tổ chức [6]. Theo nghiên cứu của Kazimirová (2013) [7] cho thấy, suất tiêu thụ năng lượng nhiệt lý thuyết để thanh trùng sữa là 287,15 kJ/kg.

Nhằm thu được sản phẩm sữa an toàn, tiết kiệm năng lượng và giảm thiểu lượng phát thải khí nhà kính trong nhà máy sản xuất sữa, nghiên cứu kiểm soát nguồn lây nhiễm và nhận diện *Bacillus* spp. sinh bào tử kháng nhiệt trong sữa bò tươi nguyên liệu được thực hiện.

2. *Bacillus* spp. SINH BÀO TỬ KHÁNG NHIỆT TRONG SỮA BÒ TƯƠI NGUYÊN LIỆU

2.1. Đặc điểm về *Bacillus* spp.

Theo khóa phân loại của Bergey, chi *Bacillus* là một chi lớn và đa dạng, được phân loại như sau: Giới: Bacteria; Ngành: Firmicutes; lớp: Bacilli; Bộ: Bacillales; họ: Bacillaceae; chi: *Bacillus*. Vi khuẩn *Bacillus* được Ehrenberg mô tả lần đầu tiên năm 1835 là “*Virbrio subtilis*”. Họ Bacillaceae được chia làm 5 chi gồm: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, đặc trưng của họ này là hình thành nội bào tử [8]. Vi khuẩn *Bacillus* spp. là vi khuẩn Gram dương, hình que, hiếu khí hoặc kỵ khí, đặc biệt có khả năng hình thành bào tử, thường được sắp xếp thành từng cặp hoặc chuỗi. *Bacillus* spp. là vi khuẩn sống tự do, chúng hiện diện khắp nơi trong đất, trong nước, thực vật, động vật, một số làm hỏng thực phẩm, chúng chuyển hóa các cơ chất hữu cơ, chẳng hạn như axit amin, axit hữu cơ và đường, bằng hô hấp hiếu khí, hô hấp kỵ khí hoặc lên men, tùy thuộc vào loài và môi trường. Nhiệt độ thích hợp cho chúng phát triển trong phạm vi 30 - 45°C, các biến thể ưa nhiệt phát triển tối ưu ở 65°C [9].

Vi *Bacillus* spp. có thể được phân lập từ đất, cho đến gần đây vẫn được coi là nguồn chính của chúng môi trường sống và môi trường bị ô nhiễm đất, sự hiện diện của chúng ở các trang trại bò sữa là không thể tránh khỏi. Đáng chú ý là nhiều *Bacillus* spp. có thể tạo ra các enzyme phân hủy chất béo chịu nhiệt có thể tạo ra sữa hư hỏng. Các enzyme này có nhiệt độ tối ưu từ 60 - 75°C, tương tự như nhiệt độ được sử dụng để nhiệt hóa và thanh trùng trong ngành công nghiệp sữa.

Vi khuẩn hình thành bào tử cũng có thể tồn tại trong quá trình xử lý nhiệt trong suốt quá trình sản xuất sữa có thời gian bảo quản kéo dài ESL (extended shelf-life) được xử lý nhiệt được áp dụng thường nằm trong khoảng 125 - 130°C trong 2 - 6 giây. Trong quá trình sản xuất sữa ESL, tất cả

các tế bào sinh dưỡng đều bị bất hoạt, nhưng tuy nhiên có một số bào tử có thể tồn tại. *Bacillus* spp. có thể hiện diện dưới dạng hư hỏng hình thành bào tử vi sinh vật trong sữa ESL.

Sữa được tiệt trùng ở nhiệt độ cực cao UHT (Ultra-High Temperature) là sản phẩm “vô trùng thương mại”, dùng để bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong thời gian dài. Tuy nhiên, một số bào tử chịu nhiệt cao có thể sống sót trong quá trình xử lý UHT. Sự hư hỏng tiếp theo có thể xảy ra, đặc biệt khi sản phẩm được bảo quản ở nhiệt độ trên 40°C. Bào tử phân lập từ sữa UHT thường thuộc loài *Bacillus sporothermodurans* và *Geobacillus stearothermophilus*. Mặc dù những vi khuẩn này có mặt trong nguyên liệu sữa với số lượng rất thấp, xử lý nhiệt trong quá trình sản xuất sữa UHT sẽ tạo điều kiện cho chúng nảy mầm, phát triển và tăng trưởng tiếp theo. Vì một số chủng có khả năng phân giải protein nên chúng có thể gây ra sự hư hỏng của sản phẩm cuối cùng. Các loài *Bacillus* khác và *Paenibacillus lactis* đôi khi cũng có thể gây hư hỏng sữa UHT [4].

2.2. Nhận diện vi khuẩn *Bacillus* spp. sinh bào tử kháng nhiệt từ sữa bò tươi nguyên liệu

Quá trình nhận diện vi khuẩn *Bacillus* spp. sinh bào tử kháng nhiệt từ sữa bò tươi nguyên liệu được thực hiện qua các bước: Tiêu diệt tế bào sinh dưỡng, phân lập bào tử *Bacillus* spp. chịu nhiệt, đánh giá khả năng chịu nhiệt và nhận diện chúng bằng phương pháp sinh hóa hay sinh học phân tử.

2.2.1. Phân lập *Bacillus* spp. sinh bào tử kháng nhiệt

Qui trình phân lập, quan sát vi khuẩn, khuẩn lạc vi khuẩn, trừ mẫu vi khuẩn rỗng được thực hiện theo qui trình của Luong và cs (2006) [10]; Trần Linh Thuộc (2007) [11]. Trước khi phân lập, mẫu sữa bò tươi nguyên liệu được gia nhiệt để loại bỏ tế bào sinh dưỡng, chỉ giữ lại những dòng vi khuẩn có khả năng sinh bào tử sống sót qua quá trình xử lý nhiệt để chọn lọc và làm thuần: 150 mL mẫu sữa tươi nguyên liệu được chuyển vào các

chai 250 mL có nắp vặn vô trùng, đun nóng mẫu ở 80°C trong 12 phút, sử dụng nồi cách thủy được kiểm soát nhiệt độ. Sau khi xử lý nhiệt, các chai chứa mẫu được làm lạnh ngay lập tức bằng cách sử dụng bể nước đá [12].

Pha loãng mẫu, trải lên đĩa petri có môi trường phân lập thạch Luria Bertani (LB) bổ sung 2% sữa gầy. Đĩa môi trường được ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ để vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc. Chọn và cấy chuyển nhiều lần từ các khuẩn lạc riêng lẻ để tách rỗng (làm thuần) các dòng (chủng) vi sinh vật. Một số môi trường dùng trong phân lập *Bacillus* spp. như Luria Bertani (25 g Luria Bertani Broth, 15g agar và 2 g bột sữa gầy) [13]; Nutrient agar (5 g Peptone, 3 g Yeast Extract, 20 g agar) [14]; Nutrient Broth (5 g Pepton, 3 g chiết xuất thịt bò) [15]; Cetrinide agar (25 g Luria Bertani Broth, 15g agar và 2 g bột sữa gầy) [16]; Brain heartinfusion agar (BHI) (BHI, 1 mg/L vitamin B12) [17]; [18].

2.2.2. Đánh giá khả năng kháng nhiệt *Bacillus* spp. sinh bào tử

Khả năng kháng nhiệt là khả năng sống sót của một quần thể vi sinh vật khi tiếp xúc với nhiệt độ cao như tiệt trùng. Hiệu quả của mỗi phương pháp thanh trùng, tiệt trùng đối với một chủng vi sinh vật đặc hiệu có thể được đánh giá qua tỷ lệ chết của vi sinh vật hay bằng đường cong sống sót, biểu diễn bằng logarit số vi sinh vật theo thời gian tiệt khuẩn. Thời gian chết nhiệt D biểu thị tỷ lệ giết chết vi khuẩn của một phương pháp thanh trùng, tiệt trùng cụ thể. D được định nghĩa là thời gian cần thiết (tính bằng phút) ở một nhiệt độ xác định để làm giảm 90% số lượng vi khuẩn ban đầu hay nói theo cách khác là đem tỷ lệ vi khuẩn sống sót còn 1/10 số lượng ban đầu hoặc làm giảm một đơn vị logarit của lượng vi khuẩn hiện diện.

Giá trị D tại 1 nhiệt độ không đổi được tính theo công thức:

$$D_T = -\frac{t}{\lg N - \lg N_0}$$

Trong đó: D_T là thời gian tiêu diệt thập phân tại nhiệt độ T (phút); N là lượng vi sinh vật trong sản phẩm ở thời điểm t (cfu/ml); N_0 là lượng vi sinh vật ban đầu (cfu/ml); t là thời gian gia nhiệt (phút).

Xác định khả năng kháng nhiệt của bào tử: Sử dụng ống nghiệm có kích thước 10×100 mm chứa 2,5 mL dung dịch bào tử đem xử lý nhiệt trong bể điều nhiệt có kiểm soát nhiệt độ. Chế độ xử lý nhiệt ở các mức nhiệt độ và thời gian giữ nhiệt cho mỗi mức nhiệt độ thực hiện. Sau đó được làm lạnh trong bể nước đá, xác định số lượng bào tử trước và sau xử lý nhiệt bằng phương pháp đổ đĩa đếm số khuẩn lạc, lặp lại 3 lần ghi nhận kết quả trung bình [19]; [20]; [21]. Một số chế độ nhiệt sử dụng để đánh giá khả năng chịu nhiệt của dịch bào tử *Bacillus* spp. phân lập được từ một số sản phẩm sữa: Sữa bò tươi nguyên liệu được xử lý ở 3 mức nhiệt độ 80, 90, 100°C và thời gian giữ nhiệt cho mỗi mức nhiệt độ lần lượt là 12, 15, 20, 25, 30 phút [22]; sữa bột được xử lý với 4 phương pháp nhiệt khác nhau: 63°C trong 30 phút, 72°C trong 15 giây, 76°C trong 15 giây và 82°C trong 30 phút [23]; sữa bò tươi nguyên liệu xử lý với 4 phương pháp nhiệt khác nhau: 100°C trong 10, 30, 40 và 50 phút [24]; sữa tiệt trùng thương mại xử lý ở 3 mức nhiệt 110, 120, 125°C trong 30 phút [25].

2.2.3. Nhận diện *Bacillus* spp. sinh bào tử kháng nhiệt

Nhận diện bằng cách xác định các đặc điểm hình thái và đặc tính sinh hóa: Các mẫu rỗng được cấy trở lại môi trường thạch LB để kiểm tra một số đặc điểm sinh hóa như: Nhuộm Gram, nhuộm bào tử, khả năng di động, catalase, oxidase, gelatinase [10, 11]. Một số đặc điểm hình thái như màu sắc, hình dạng, độ nổi và bìa khuẩn lạc được kiểm tra và ghi nhận là đặc điểm hình thái của khuẩn lạc. Các đặc điểm kính hiển vi được ghi lại cho tất cả các chủng phân lập thông qua giao thức nhuộm Gram.

Nhận diện bằng phương pháp sinh học phân tử: Các phương pháp phân nhóm bằng sinh học phân tử được sử dụng để nhận diện các phân nhóm trong một loài vi khuẩn có thể là công cụ nhạy cảm để theo dõi các nguồn ô nhiễm của vi khuẩn hình thành bào tử trong các môi trường liên quan đến sản phẩm sữa. Cụ thể, các trình tự gen *rpoB*, mã hóa cho tiểu đơn vị β của RNA, được sử dụng để phân biệt các chủng vi khuẩn hình thành bào tử trong toàn bộ hệ thống sữa. Phương pháp sinh học phân tử được áp dụng nhằm xác định mối liên quan của vi khuẩn hình thành bào tử trong các môi trường khác nhau của dây chuyền sản xuất sữa (bồn chứa sữa bò tươi, xe vận chuyển sữa bò tươi, sản phẩm đóng gói). Một số loại vi khuẩn sinh bào tử có mặt trong dạng đóng gói sản phẩm được tìm thấy ở cấp độ trang trại cho thấy rằng, những vi khuẩn hình thành bào tử đó có nguồn gốc từ trang trại và tồn tại trong quá trình thanh trùng. Những loại vi khuẩn khác chỉ hiện diện trong sản phẩm đóng gói, có nghĩa là sự nhiễm bẩn, hoặc tái nhiễm xảy ra tại nhà máy chế biến. Bằng cách áp dụng trình tự gen *rpoB* xác định rằng các chủng phân lập bào tử có nguồn gốc từ sữa nguyên liệu [4]. Ngoài ra, các bào tử kháng nhiệt cao tạo thành *Bacillus* spp. phân lập từ sữa bò tươi nguyên liệu được chọn lọc để giải trình tự bằng phương pháp 16S rRNA. Cặp mồi được sử dụng: 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') và 1540R (3'AAGGAGGTGATCCAAACCGCA5'). Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được thiết kế như sau: biến tính ở 95°C trong 15 phút; sau khi biến tính trong 30 giây; ủ ở 60°C trong 30 giây; kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Số chu kỳ là 40 chu kỳ. Kết quả giải trình tự 16S rRNA của vi khuẩn được so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ trực tuyến NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) [22].

3. SỬ DỤNG NĂNG LƯỢNG VÀ PHÁT THẢI KHÍ NHÀ KÍNH TRONG NHÀ MÁY SẢN XUẤT SỮA

Quá trình xử lý nhiệt thực phẩm được thực hiện để tiêu diệt vi khuẩn mục tiêu hoặc bào tử của chúng có khả năng gây hại đến chất lượng thực phẩm. Bên cạnh đó, chất lượng sản phẩm bị ảnh hưởng bởi các quá trình nhiệt và cặn bẩn tích tụ trên các bề mặt của thiết bị trao đổi nhiệt được hình thành bởi phản ứng của các thành phần sữa đối với nhiệt độ [26].

Công nghiệp chế biến sữa chủ yếu dựa vào truyền nhiệt đòi hỏi phải có năng lượng nhiệt. Sự khan hiếm các nguồn năng lượng không tái tạo như dầu mỏ, khí gas,... nên phải đảm bảo việc sử dụng năng lượng có hiệu quả và không ngừng nâng cao ý thức tiết kiệm năng lượng của tất cả người tiêu dùng trên toàn thế giới. Công nghiệp sữa tiêu thụ số lượng năng lượng đáng kể để chế biến sữa, sản xuất và lưu trữ các loại sản phẩm. Trung bình, chi phí năng lượng chiếm khoảng 30 - 50% chi phí sản xuất tổng thể của sản phẩm. Sử dụng năng lượng tiết kiệm và hiệu quả của nhà máy sản xuất sữa là chìa khóa thành công cho quá trình sản xuất, kinh doanh và công việc quản lý. Điện và nhiên liệu được sử dụng để sản xuất các loại năng lượng tiện ích khác, bơm các chất lỏng khác nhau và chiếu sáng. Nước được sử dụng để làm mát, gia nhiệt, làm sạch, pha loãng dung dịch, tạo hơi nước, sản xuất nước đá/nước lạnh và tham gia trực tiếp quy trình sản xuất. Hơi nước được sử dụng để gia nhiệt, làm sạch và thanh trùng, tiết trùng. Theo nghiên cứu của Kumar và cs (2017) [27], trong một nhà máy sản xuất nhiều sản phẩm sữa thương mại, mỗi ngày tiêu thụ nước, hơi nước, điện lạnh và điện trong nhà máy lần lượt là 238,2 lít; 12,95 kg; 11,94 kJ và 5,98 kWh tương ứng cho sản xuất 100 L sữa.

Tiếp đó theo nghiên cứu của Prasad (2022) [28], trong nhà máy chế biến sữa, hơi nước được sử dụng cho xử lý nhiệt trong quá trình thanh trùng sữa, thanh trùng kem, bơ chế biến, chế biến ghee, chế biến dahi, bơ sữa được tìm thấy lần lượt

là 16,70; 26,60; 47,22; 540,0; 72,50 và 59,90 kg trên 1.000 kg sản phẩm với nhiệt năng tương ứng là 45,1; 71,8; 127,9; 1458,0; 195,8 và 161,7 MJ trên 1.000 kg sản phẩm chế biến.

Theo Maliaroudaki và cs (2020) [29], khi tính toán lượng phát thải CO₂-eq trên một đơn vị sản phẩm cho thấy, nhu cầu về điện và dầu diesel của nhà máy chế biến sữa có công suất xử lý 60 m³/h sữa nguyên liệu cho thấy: Lượng khí thải các bon, lượng các bon dioxide tương đương (CO₂-eq) lượng khí thải phát sinh từ việc sử dụng điện và dầu diesel trên một đơn vị sản phẩm được sản xuất và phân phối. Hệ số phát thải được sử dụng là 2,69 kg CO₂-eq trên mỗi lít dầu diesel bị đốt cháy, trong khi hệ số phát thải dùng cho điện là 598 g CO₂-eq trên mỗi kWh điện.

Lượng khí thải các bon của quá trình sản xuất sữa gây phát ra trung bình 44,5 g CO₂-eq trên mỗi đơn vị trong khi kem có phát thải trung bình 12,4 g CO₂-eq trên mỗi đơn vị. Về nguồn phát thải, động cơ diesel phát thải trung bình nhiều hơn so với điện; mức tiêu thụ dầu diesel bao gồm 83,3% và 63% tổng lượng khí thải tương ứng của của sữa gầy và kem.

+ Ước tính chi phí thất thoát khí xử lý nhiệt sữa bò tươi nguyên liệu

Nhiệt năng cần thiết để tăng 1 độ C khi gia nhiệt sữa:

$$Q = m.C.D.Dt = 1.124,7 \times 10^6 \times 1,03 \times 3,95 = 4,58 \times 10^9 \text{ KJ}$$

Trong đó: Nhiệt dung riêng của sữa: C = 3,95 kJ/kg.K

Khối lượng riêng của sữa: D = 1,03 kg/lít

Lượng sữa tươi sơ bộ năm 2022: m = 1.124,7 x 10⁶ lít

Mức tăng nhiệt Dt: 1 độ C

Ước tính sơ bộ chi phí tổn thất do sử dụng nhiệt độ cho quá trình xử lý nhiệt 1.124,7 triệu lít sữa bò tươi của năm 2022 [30] tăng hơn 1°C so với yêu cầu nhiệt độ xử lý nhiệt cần thiết và thực tế

gần 3,2 tỷ đồng khi sử dụng điện (đơn giá điện sản xuất trung bình 2022: 2.500 đồng).

Kết quả cho thấy, ngành công nghiệp sữa tiêu thụ nhiều năng lượng. Do vậy, các vấn đề liên quan đến tiêu thụ năng lượng cao trong quá trình chế biến sữa, đề xuất các phương pháp để giảm năng lượng tiêu thụ như kiểm toán năng lượng, điều chỉnh chế độ xử lý nhiệt sữa gồm nhiệt độ và thời gian xử lý nhiệt phù hợp và chính xác dựa trên khả năng chịu nhiệt của *Bacillus* spp. sinh tạo bào tử kháng nhiệt mục tiêu và kiểm soát chúng là việc làm thiết thực giúp tiết kiệm chi phí năng lượng, đồng thời giảm dấu chân các bon, hạn chế ô nhiễm môi trường.

4. KIỂM SOÁT *Bacillus* spp. SINH BÀO TỬ KHÁNG NHIỆT TRONG SỮA BÒ TƯƠI NGUYÊN LIỆU

4.1. Nguồn gốc sữa bị nhiễm sinh bào tử

Bacillus spp. thường có trong sữa bò tươi nguyên liệu, làm ô nhiễm sữa nguyên liệu chủ yếu ở cấp độ trang trại (như ở trong quá trình vắt sữa, sữa tươi nguyên liệu, tồn trữ và xử lý tại trang trại) và có khả năng tái nhiễm xảy ra ở nhiều điểm khác nhau dọc theo quá trình sản xuất sữa từ trang trại đến trong quá trình vận chuyển hoặc tại nhà máy chế biến sản phẩm cuối cùng. Núm vú bò được coi là nguồn cung cấp bào tử chính trong sữa bò tươi nguyên liệu, chủ yếu là do bị nhiễm bản từ chất độn chuồng, thức ăn và bụi. Các thành viên của chi *Bacillus* có mặt khắp nơi và đã được cách ly khỏi môi trường trang trại chăn nuôi bò sữa, bao gồm thức ăn ủ chua, đồng cỏ, đất, vật liệu lót chuồng, nước và thức ăn [4].

4.2. Phương pháp loại bỏ *Bacillus* spp. sinh bào tử kháng nhiệt trong sữa bò tươi nguyên liệu

Xử lý nhiệt là công nghệ chế biến được sử dụng rộng rãi nhất trong ngành sữa nhằm giảm số lượng vi khuẩn trong sữa. Tuy nhiên, vì bào tử có thể tồn tại trong quá trình xử lý nhiệt nên biện pháp hiệu quả nhất là để giảm số lượng bào tử nên được áp dụng ở cấp độ trang trại. Vì các vi sinh vật tạo bào tử rất có thể có nguồn gốc từ bụi bản và

phân dính vào núm vú vào thời điểm vắt sữa, biện pháp hiệu quả nhất trong việc giảm số lượng bào tử là chuẩn bị đầy đủ núm vú trước khi vắt sữa.

Theo nghiên cứu của Ledina và cs (2021) [4], làm sạch đầu vú trước khi vắt sữa bằng khăn ẩm có thể giặt được và sau đó lau khô bằng khăn giấy có thể làm giảm số lượng bào tử trong sữa tới 96%. Hướng dẫn nhân viên cách vệ sinh núm vú đúng cách và thiết lập các quy trình vệ sinh khăn tắm (giặt bằng chất tẩy rửa và thuốc tẩy chlorine và khăn khô hoàn toàn), cũng có thể làm giảm bào tử trong sữa bò tươi nguyên liệu [31]. Phòng vắt sữa phải được vệ sinh, sát khuẩn thường xuyên, nhưng không được thực hiện khi bò đang cho sữa có mặt tại sàn chuồng trại. Bên cạnh đó, sữa sau khi vắt cần được làm lạnh nhanh hoặc đưa vào chế biến các sản phẩm sữa trong thời gian quy định [32].

Để loại bỏ *Bacillus* tạo bào tử ở cấp độ nhà máy sữa, quá trình ly tâm tách khuẩn và vi lọc được áp dụng thực hiện. Quá trình ly tâm tách khuẩn (Bactofugation) sử dụng phương pháp ly tâm tốc độ cao để tách các thành phần sữa tỷ trọng khác nhau, có thể loại bỏ từ 90 - 98% bào tử khỏi sữa bò tươi nguyên liệu Theo nghiên cứu của Ribeiro và cs (2022) [33] thì quá trình ly tâm giảm đáng kể khoảng 99,52% tổng số vi khuẩn và 95% tổng số bào tử ưa nhiệt hiếu khí. Bên cạnh đó, áp dụng vi lọc màng bán thấm để phân tách vi khuẩn và các thành phần sữa dựa trên kích thước của vật rất nhỏ để đạt hiệu quả loại bỏ bào tử cao hơn so với phương pháp ly tâm tách khuẩn, với 99,1 - 99,99% bào tử được loại bỏ thành công khỏi sữa bò tươi nguyên liệu [34]. Trong thực tế, vi lọc được đề xuất như một kỹ thuật chính sử dụng để loại bỏ vi khuẩn trong quá trình sản xuất sữa sau khi tách chất béo để loại bỏ các thành phần có đường kính từ 0,1 - 10 μm [35]. Vi lọc với kích thước lỗ từ 0,2 - 2 μm có thể tách các phần tử có trọng lượng lớn hơn 200 kDa được dùng để loại bỏ vi khuẩn, tách protein và các hạt khác. Số lượng tế bào soma có thể giảm tới 100% bằng cách áp dụng các quy trình kết hợp vi lọc và xử lý nhiệt cao [36]. Tuy nhiên,

quá trình xử lý nhiệt sữa để kiểm soát vi sinh và vô hiệu hóa enzyme sẽ tác động đến chất lượng, dinh dưỡng và cảm quan của sữa. Do đó, quá trình tối ưu hóa trong việc kết hợp giữa nhiệt độ và thời gian xử lý nhiệt sữa là quan trọng để kéo dài thời hạn sử dụng của sản phẩm và hạn chế việc suy giảm chất lượng thấp nhất so với chất lượng sữa ban đầu [37]. Áp dụng thực hành sản xuất tốt (GMP) và kết hợp quá trình làm lạnh sữa ở nhiệt độ phù hợp là một trong những biện pháp hữu hiệu để kiểm soát vi khuẩn ưa nhiệt trong sữa. Làm lạnh sữa cần được thực hiện ngay sau khi vắt và nhiệt độ phải nhanh chóng đạt tới 4°C hoặc thấp hơn để kiểm soát sự phát triển lên của hệ vi sinh vật cho đến khi xử lý nhiệt [38]. Việc kích thích sự nảy mầm của bào tử trước khi xử lý nhiệt cũng có thể là một phương pháp hiệu quả để loại bỏ bào tử khỏi sữa và đảm bảo tính ổn định của sản phẩm [4].

5. KẾT LUẬN

Biện pháp hữu hiệu nhất để giảm lượng bào tử *Bacillus* spp. ở trang trại chăn nuôi bò sữa là chuẩn bị vệ sinh, sát trùng các đầu hút sữa trước khi vắt sữa và hạn chế tái nhiễm *Bacillus* spp. Tạo bào tử chịu nhiệt từ môi trường và kiểm soát chúng thông qua việc áp dụng các hệ thống đảm bảo chất lượng GAP (Good Agricultural Practices) trong chăn nuôi bò sữa nói riêng, trong nông nghiệp nói chung và áp dụng GMP (Good Manufacturing Practices) trong thu hoạch, GDP (Good Distribution Practices) trong vận chuyển sữa tươi nguyên liệu từ nông trại nuôi bò về đến nhà máy sản xuất; áp dụng hệ thống quản trị chất lượng từ HACCP trở lên trong sản xuất sữa tươi tiệt trùng và các sản phẩm khác từ sữa đồng thời cũng cần áp dụng quá trình ly tâm tách khuẩn và vi lọc tại nhà máy. Trước khi thực hiện quá trình xử lý nhiệt sữa, việc nhận diện *Bacillus* spp. sinh bào tử kháng nhiệt có mặt trong sữa bò tươi nguyên liệu ở cấp độ trang trại, hay trong quá trình vận chuyển sữa sẽ giúp chọn ra được chế độ xử lý nhiệt sữa (nhiệt độ và thời gian) cùng với việc bảo quản sữa ở nhiệt độ

lạnh phù hợp sẽ giúp nhà máy giúp tiết kiệm chi phí năng lượng và đồng thời giảm dấu chân carbon, hạn chế ô nhiễm môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mourad G., Bettache G. and Samir M. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2 (10), 15 - 122.
2. Yuan H., Han S., Zhang S., *et al* (2022). Microbial properties of raw milk throughout the year and their relationships to quality parameters. *Foods*, 11 (19): 3077.
3. Martin N. H., Evanowski R. L. and Wiedmann M. (2023). Invited review: Redefining raw milk quality - Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products. *Journal of Dairy Science*, 106 (3), 1502 - 1517.
4. Ledina T, Djordjevic J. and Bulajic S. (2021). Spore-forming bacteria in the dairy chain. *61st International meat Industry Conference*, IOP Conf, Series: Earth and Environmental Science, 854, 12051.
5. Modi.A, Prajapat R. (2014). Pasterization process energy optimization for a milk dairy plant by energy audit approach. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 3 (6), 181 - 188.
6. Chopra H., Goel P., Shimrah T. *et al*. (2020). Carbon footprint as climate change disclosure: Opportunities for performance improvement. *Journal of Thematic Analysis*, 1(1), 161 -166).
7. Kazimirová V. (2013). Heat consumption and quality of milk pasteurization. *Acta technologica agriculturae*, 2, 55 - 58.
8. Lee A. Bulla Jr., Ralph N. Costilow and Eugene S. Sharpe (1978). *Biology of Bacillus*

- popilliae. Advances in Applied Microbiology*, 23, 1 - 18.
9. Grutsch, A. A., Nimmer, P. S., Pittsley, R.H. and McKillip, J. L. (2018). *Bacillus* spp. as pathogens in the dairy industry. *Foodborne Diseases, Academic Press*, London, 15, 193 - 211.
10. Luong, N. D., Huyen, P. T. and Tuyet, N. A. (2006). *Microbiological laboratory techniques*, Vietnam National University Ho Chi Minh city publishing House. Ho Chi Minh, Vietnam.
11. Trần Linh Thuớc (2007). *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Tái bản lần thứ 3, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
12. Martinez, B. A., J. Stratton and Bianchini, A. (2017). Isolation and genetic identification of spore- formers associated with concentrated-milk processing in Nebraska. *Journal of Dairy Science*, 100 (2): 1 - 14.
13. Dat Huynh Le, Ngan Phan Ngoc Thuy, Thy Vuong Bao *et al* (2002). Determination of extracellular enzyme activities of *Bacillus* spp. spores isolated from raw milk. *International Journal of current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 11 (10): 78-84.
14. JanÚtová, B., and LukáUová J. (2001). Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Veterinaria Brno*, 70, 179 - 184.
15. Sevgi Ertuğrul, Gönül Dönmez and Serpil Takaç (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149 (3), 720 - 724.
16. Ngo Thanh Phong, Bui Huynh Lien, Pham Thi Binh Nguyen *et al.* (2023). Identifying biofilm forming Bacteria in cow milk in Mekong Delta, Viet Nam, *Can Tho University Journal of Science*, 15 (1): 84 - 90.
17. Pasty S., Annelies P., Lieve H. *et al* (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms", *ASM Journals, Applied and Environmental Microbiology*, 71(3).
18. Marina W., Genia L. C., Zeynep A. *et al* (2011). Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. *International Journal of Dairy Technology*, 64 (4), 486 - 493.
19. Baril E., Coroller L., Couvert O. *et al* (2012). Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology*, 30: 29 - 36.
20. Petersen J. and McLaughlin S. (2016). *Laboratory exercises in Microbiology: Discovering the unseen world through hands-on investigation*. City University of New York.
21. Eijlander R. T., Hekezen R. V., Bienvenue A. *et al.* (2019). Spores in dairy - new insights in detection, enumeration and risk assessment. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 1- 13.
22. The Vinh Bui, Lien Luong Thi Phuong, Loan Le Thi Kim *et al.* (2023). Heat resistance assay and identification for *Bacillus* spp. spores isolated from raw milk. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. ISSN: 2319 - 7706, 12 (3).
23. Robyn T. E., Rina V. H., Annie B. *et al.* (2019). Spores in dairy - new insights in detection, enumeration and risk assessment. *International Journal of Dairy Technology*, 72 (2), 303 - 315.

24. S. Kmiha, C. Aouadhi, A. Klibi *et al.* (2017). Seasonal and regional occurrence of heat-resistant spore-forming bacteria in the course of ultra-high temperature milk production in Tunisia. *Journal of Dairy Science*, 100: 6090 - 6099.
25. Marina S., Melanie L., Veronika A. *et al.* (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*, 59, 20 - 28.
26. Janusz W., Agnieszka K., Bogdan D. *et al.* (2012). Factors influencing the energy efficiency in dairy processing plants. *Teka Commission of Motorization and Energetics in Agriculture*, 12 (1), 307 - 313.
27. Kumar N., Prabhakar P. K., Meena G. *et al.* (2017). Effective energy management in a commercial multi-product dairy plant through a graphical user interface. *The Pharma Innovation Journal*, 6 (11): 193 - 198.
28. Prasad S., (2022). Thermal energy consumption during milk processing in a commercial dairy plant: a case study. *International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology*, 7 (8), 160.165.1.
29. Malliaroudaki M. I. M, Gomes R. L, Ferrari R. *et al.* (2020). Modelling energy consumption in the Dairy supply chain: Single and Multi-product Manufacturing and Distribution. Predictive modelling tools to evaluate the effects of climate change on food safety”, *MSCA-ITN-ETN - European Training Network*, Project URL: www.protect-itn.eu.
30. Tổng cục Thống kê (2022). Báo cáo của Tổng cục Thống kê Việt Nam.
31. Rachel L. E., David J. K., Martin W. *et al.* (2020). Milking time hygiene interventions on dairy farms reduce spore counts in raw milk. *J. Dairy Sci*, 103: 4088 - 4099.
32. FAO and IDF (2011). Guide to good dairy farming practice. *Animal Production and Health Guidelines*, No 8, Rome.
33. Ribeiro J.J.C, Tamanini R, Alfieri A.A. *et al.* (2022). Effect of raw milk bacto-fugation on total bacterial counts, aerobic spores and spore-forming microbial diversity. *Semina: Agricultural Sciences*, 43, 3, 1187 -1196.
34. Gésan-Guiziou G. (2010). Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. INRA-Agrocampus Ouest, France.
35. Mònica R, Xanel V, José L. C. (2021). Use of membrane technologies in dairy industry: An Overview. *Foods*, 10 (11), 2768.
36. Pavan K., Neelesh S., Rajeev R. *et al.* (2013). Perspective of membrane technology in dairy Industry: A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*, 26 (9): 1347 - 1358.
37. Luana M. P, Juliano G. P, Luciano S. B. *et al.* (2019). Chapter 3: The microbiology of raw milk. *Raw milk balance between hazards and benefits*, pages 45 - 64.
38. Tim C., Nathalie J., Rachel T. *et al.* (2022). Heat-induced changes in the sensory properties of milk. *International Dairy Journal*, Volume 126, 105199.

CONTROLLING HEAT-RESISTANT SPORE-FORMING *Bacillus* TO PRODUCE SAFE MILK AND TO MINIMIZE CARBON FOOTPRINT

**Tran Huu Thanh Huy¹, Bui The Vinh¹, Huynh Le Dat¹,
Huynh Van Tien², Luong Thi Phuong Lien³, Le Thi Kim Loan⁴**

¹ *Me Kong University*

² *Can Tho University*

³ *Southern College for Engineering and Agriculture*

⁴ *Tien Giang University*

Summary

In the milk processing industry, the common application of heat methods for milk heat treatment, such as pasteurization and sterilization to kill target bacteria as *Bacillus* forming heat-resistant spores and biofilms, producing heat-stable extracellular protease and lipase enzymes in cow's raw milk that causes spoilage of milk products to obtain the quality and safety for processed dairy products. However, the applications of inappropriate heat treatment regimes results in higher thermal energy consumption and greenhouse gas emissions (Carbon Footprint). In Vietnam, applying heat to process 1,124.7 million liters of collected raw cow's milk, preliminary estimated cost loss is about 3.2 billion VND when processing temperature is 1 degree Celsius higher than required. Therefore, to eliminate heat-resistant spore-forming *Bacillus* from cow's raw milk completely by heat treatment, controlling contamination sources and identifying them to select the right heat treatment regime will help to produce safe dairy products, to save costs of used heat energy as well as minimizing of the carbon footprint in the milk production plant in future.

Keywords: *Bacillus, heat-resistant spore, carbon footprint, raw milk.*

Người phản biện: GS. TS. **Đống Thị Anh Đào**

Ngày nhận bài: 30/8/2023

Ngày thông qua phản biện: 26/11/2023

Ngày duyệt đăng: 28/12/2023