

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH LỢI KHUẨN VÀ KHẢ NĂNG LÊN MEN SỮA ĐẬU ĐỎ CỦA *Lactobacillus pentosus* DCM 52.10

Nguyễn Thị Lâm Đoàn^{1*}

¹ Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Email: nlldoan@hus.edu.vn

TÓM TẮT

Lactobacillus pentosus là một loài đã được ứng dụng trong sản phẩm thực phẩm probiotic. Mục đích của nghiên cứu là đánh giá tiềm năng lợi khuẩn và khả năng lên men sữa đậu đỏ của chủng *L. pentosus* DCM 52.10. Bằng phương pháp nuôi cấy xác định mật độ vi khuẩn; phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đã xác định *L. pentosus* DCM 52.10 có một số đặc tính lợi khuẩn tốt như chịu được pH của dạ dày; muối mật; kháng vi khuẩn gây bệnh *E. coli* ATCC 25922 và *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. Điều kiện sinh trưởng, phát triển thích hợp của chủng là 37°C, pH 6,5 và thời gian nuôi cấy là 32 giờ. *L. pentosus* DCM 52.10 có khả năng lên men sữa đậu đỏ trong suốt quá trình lên men pH của sữa giảm dần và hàm lượng axit tăng dần, đến 24 giờ độ pH của sữa đạt dưới 4,3 và hàm lượng axit đạt trên 0,6% ở cả hai tỷ lệ tiếp giống 1 và 2% (v/v). Mật độ vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 tăng theo thời gian lên men, đến 24 giờ mật độ vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 đạt trên 10⁸ CFU/mL.

Từ khóa: *Lactobacillus pentosus*, lợi khuẩn, lên men, đậu đỏ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sữa luôn là sản phẩm được tiêu thụ với sản lượng lớn trên toàn thế giới và là nguồn cung cấp canxi, chất béo, carbohydrate, protein cần thiết cho dinh dưỡng của con người [1]. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, việc dị ứng với protein trong sữa bò, không dung nạp lactose, dư lượng kháng sinh, các hormone estrogen và progesterone trong sữa động vật hay chế độ ăn uống không sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật ngày càng gia tăng [2]. Chính vì vậy, sữa có nguồn gốc thực vật thu hút được sự quan tâm nhiều hơn từ người tiêu dùng vì chúng mang lại nhiều giá trị dinh dưỡng cũng như lợi ích cho sức khỏe [3]. Đồ uống lên men từ thực vật, trong đó hạt đậu đỏ là một trong những nguyên liệu tiềm năng bởi từ xa xưa đã là một món ăn truyền thống phổ biến, giàu dinh dưỡng. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh được giá trị dinh dưỡng của hạt đậu đỏ như: Giàu chất xơ, giàu protein và có chứa các amino axit thiết yếu cho cơ thể [4, 5]. Trong các loại đậu đỏ thì hạt đậu có màu tối nói chung, đậu

đỏ nói riêng có nhiều lợi ích tốt cho tim và hệ tim mạch. Tiêu thụ đậu đỏ giúp cải thiện chức năng các mạch máu, kiểm soát huyết áp, giúp dự phòng bệnh xơ vữa động mạch [4].

Vi khuẩn lactic đặc biệt là giống *Lactobacillus* là nhóm chính chịu trách nhiệm lên men các sản phẩm từ sữa và được sử dụng trong quá trình lên men thực phẩm từ nhiều thế kỷ trước. Chúng được sử dụng để lên men các sản phẩm từ hạt đậu đỏ [6, 7]. Trong quá trình lên men, vi khuẩn lactic thủy phân các chất dinh dưỡng và các hợp chất hóa học khác trong hạt đậu đỏ tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học mang lại lợi ích sức khỏe hơn [8, 9]. Trong những năm gần đây, đã có một số nghiên cứu tạo sản phẩm đồ uống lên men từ đậu nành bởi các chủng *Lactobacillus* [10], hay tạo sữa chua đậu nành có bổ sung bí đỏ [11]. Tuy nhiên, những nghiên cứu tạo đồ uống lên men từ đậu đỏ vẫn còn hạn chế. *Lactobacillus pentosus* là một loài thuộc chi *Lactobacillus* của vi khuẩn lactic thường được sử dụng làm giống khởi đầu cho quá trình lên men [12, 13]. Ngày càng có nhiều chủng *L. pentosus*

được sử dụng rộng rãi như probiotic trong các sản phẩm thực phẩm do tác dụng tăng cường sức khỏe của chúng [14, 15]. Chính vì vậy, nghiên cứu này bước đầu đánh giá hoạt tính lợi khuẩn và khả năng lên men sữa đậu đỏ của chủng *L. pentosus* DCM 52.10 nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu phát triển sản phẩm đậu đỏ lên men làm đa dạng hóa sản phẩm đồ uống.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống vi sinh vật bao gồm: Chủng DCM 52.10 phân lập từ cà muối và phân loại là loài *L. pentosus* bằng phân tích trình tự gen *pheS* [16]. *L. pentosus* DCM 52.10 được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường de Man, Rogosa Sharpe (MRS) và bảo quản ở -80°C trong môi trường nuôi cấy cộng với glycerol (20%, v/v) để sử dụng cho các nghiên cứu. Vi khuẩn kiểm định: *S. typhimurium* ATCC 13311 và *E. coli* ATCC 25922 được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hạt đậu đỏ dùng trong nghiên cứu này là đậu đỏ giống Rado 660 được mua tại Siêu thị Winmart. Đường kính trắng mua tại Siêu thị Winmart.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đặc tính lợi khuẩn của vi khuẩn L. pentosus DCM 52.10

Khả năng chịu muối mật: Thí nghiệm tiến hành dựa trên nghiên cứu của Jacobsen và cs (1999) [17]. Chủng *L. pentosus* DCM 52.10 được nuôi cấy trong môi trường MRS có bổ sung muối mật với nồng độ 0,3% (w/v). Sau các khoảng thời gian nuôi cấy 0, 1, 2, 3, 4, 5 giờ ở 37°C, tiến hành cấy trải lên đĩa petri chứa môi trường MRS agar để xác định mật độ vi khuẩn.

Khả năng chịu axit: Theo Zhou và cs (2009) [18], 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 axit dạ dày. Thí nghiệm tiến hành dựa trên phương pháp của Jacobsen và cs (1999) [17]. *L. pentosus* DCM 52.10 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, 5 giờ ở 37°C, tiến hành cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường

MRS agar để xác định mật độ vi khuẩn.

Hoạt tính kháng khuẩn: Sử dụng phương pháp đục lỗ thạch để xác định hoạt tính kháng khuẩn của *L. pentosus* DCM 52.10, vi sinh vật chỉ thị là *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 [19].

2.2.2. Xác định điều kiện nuôi cấy chủng L. pentosus DCM 52.10

Dựa vào kết quả nghiên cứu của Amelia và cs (2005) [20], khoảng nhiệt độ, pH và thời gian nuôi cấy được thiết lập để khảo sát. Khảo sát khoảng nhiệt độ nuôi cấy của chủng ở 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55°C trong môi trường MRS với pH = 6,5, sau thời gian nuôi cấy 24 giờ đo giá trị OD_{620nm}. Sau khi chọn được nhiệt độ nuôi cấy thích hợp ở trên, chủng được nuôi cấy trong môi trường MRS tại các giá trị pH là 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8 ở nhiệt độ đã xác định ở trên, sau 24 giờ đo giá trị OD_{620nm} để xác định pH tối thích. Tiếp theo, khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp các giá trị nhiệt độ và pH tối thích ở trên được sử dụng để nuôi cấy chủng *L. pentosus* DCM 52.10 theo các thời gian khác nhau 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 giờ, tiến hành đo OD_{620nm} tại các mốc thời gian này để tìm thời gian thích hợp cho nuôi cấy.

2.2.3. Đồ uống lên men từ đậu đỏ

- Chuẩn bị dịch sữa đậu đỏ

Đậu đỏ mua về rửa, vo sạch, rồi đem đi ngâm với nước từ 7 - 8 giờ cho đậu nở mềm. Sau đó, rửa sạch lại với nước rồi chần đậu ở 75°C trong 5 phút. Nghiền đậu theo tỷ lệ đậu: nước là 1: 7. Lọc dịch đậu thu lấy phần dịch sữa. Phối trộn bổ sung thêm đường kính trắng vào sữa đậu đỏ để dịch sữa đạt 180°Brix [11]. Dịch sữa đồng hóa, thanh trùng ở 90°C trong 10 phút. Sữa sau khi thanh trùng cần được làm nguội về nhiệt độ lên men 37 - 38°C để chuẩn bị cho quá trình cấy giống vi khuẩn.

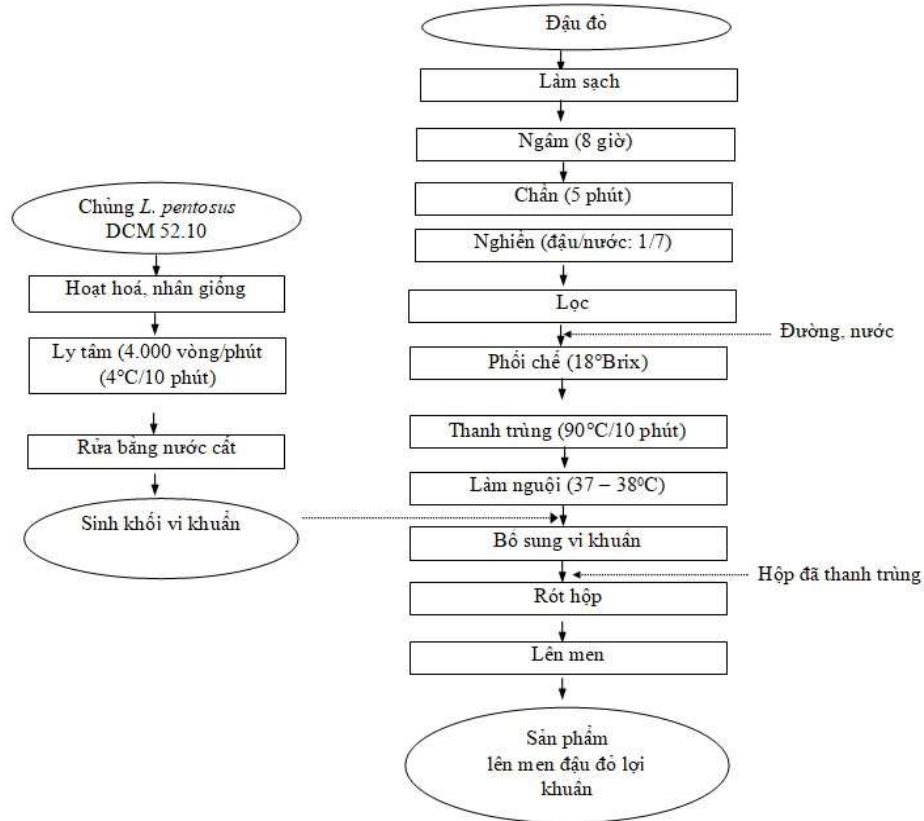
- Lên men sữa đậu đỏ

Vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 được hoạt hóa và nhân giống trong các bình tam giác 100 và 200 ml chứa môi trường MRS với điều kiện nuôi cấy thích hợp là kết quả của thí nghiệm ở mục 2.2.2. Dịch nuôi cấy vi khuẩn này được ly tâm với tốc độ 4.000 vòng/phút (4°C/10 phút). Sau ly tâm

thu sinh khối thì rửa lại bằng nước cất 2 - 3 lần, tiến hành bổ sung vào dịch sữa đậu đỏ được nồng độ tế bào *L. pentosus* DCM 52.10 ban đầu 2×10^{10} CFU/mL. 1% và 2% chủng vi khuẩn đó được bổ sung vào sữa đậu đỏ lên men ở nhiệt độ 37 – 38°C, cứ sau 0, 6, 12, 18, 24 giờ mẫu sữa lên men

được sử dụng để phân tích các chỉ tiêu: pH, hàm lượng axit và mật độ vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 [21, 22].

Quy trình sản xuất đồ uống lên men bổ sung chủng lợi khuẩn được thực hiện theo hình 1.



Hình 1. Quy trình chế biến đồ uống lên men đậu đỏ bổ sung *L. pentosus* DCM 52.10 [11]

2.2.4. Phương pháp phân tích

Xác định pH của dịch sữa đậu đỏ tại các thời điểm lên men bằng máy đo pH (Hach, Mỹ) theo TCVN 10035:2013 [23].

Xác định hàm lượng axit tổng (%): Chuẩn độ dung dịch NaOH 0,1N theo TCVN 4589:1988 [24].

Xác định mật độ tế bào vi khuẩn probiotic: Đếm mật độ vi khuẩn trên môi trường MRS agar theo TCVN 7906:2008 [25].

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai một nhân tố (oneway ANOVA) và so sánh cặp đôi các giá trị trung bình theo tiêu chuẩn Turkey bằng phần mềm Minitab 16.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm lợi khuẩn của chủng *L. pentosus* DCM 52.10

3.1.1. Khảo sát khả năng chịu muối mật và axit của *L. pentosus* DCM 52.10

Sự hiện diện của muối mật trong đường tiêu hóa là trở ngại chính đối với bất kỳ chủng lợi khuẩn, vì muối mật gây ra tính thấm của màng tế bào có thể dẫn đến sự rò rỉ các chất qua màng và gây chết tế bào [26]. Do đó, việc lựa chọn chủng vi sinh vật lợi khuẩn cũng phụ thuộc vào khả năng sống sót của chúng khi có muối mật. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các chủng lợi khuẩn cho người cần phải có khả năng kháng lại muối mật ở nồng độ 0,3% và trong thời gian 4 giờ để

chúng có thể duy trì các hoạt động trao đổi chất ổn định trong ruột non của vật chủ [27, 28]. Bảng 1 cho thấy, tại thời điểm 0 giờ, mật độ *L. pentosus* DCM 52.10 đạt 9,72 log CFU/mL và giảm dần theo thời gian. Thời gian nuôi cấy từ 4 - 5 giờ mật độ *L.*

pentosus DCM 52.10 giảm từ 8,98 log CFU/mL xuống 8,92 log CFU/mL, trong khoảng thời gian này, mật độ tế bào giảm ít do chúng đã thích nghi được với môi trường chứa muối mật ở nồng độ 0,3%.

Bảng 1. Mật độ *L. pentosus* DCM 52.10 theo thời gian tại nồng độ muối mật 0,3%

Nồng độ muối mật	Mật độ <i>L. pentosus</i> DCM 52.10 (log CFU/mL)					
	0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ
0,3%	9,72 ± 0,01 ^c	9,56 ± 0,01 ^d	9,43 ± 0,03 ^c	9,22 ± 0,06 ^b	8,98 ± 0,10 ^a	8,92 ± 0,05 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái ở mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa (α = 0,05).

Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Mahasneh và cs (2015) [29], theo đó *Lactobacillus* có thể chịu được nồng độ muối mật trong khoảng 0,3 - 2%; Divya và cs (2012) [30], chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* B6 có khả năng chịu được muối mật ở nồng độ 0,3% và khi tăng nồng độ muối mật lên 0,5% và 0,8% thì có sự suy giảm về mật độ tế bào. Theo Pfeller và cs (2007) [31], một số gen của vi khuẩn có thể được kích hoạt bởi việc bổ sung muối mật gây ra quá trình sinh tổng hợp màng tế bào vi khuẩn, thành tế bào và các protein bề mặt khác để thích nghi với điều kiện khắc nghiệt của muối mật.

Khả năng chịu pH có tính axit cũng là một trong những thông số lựa chọn quan trọng đối với các chủng lợi khuẩn [26]. Do đó, chủng lợi khuẩn sử dụng đưa vào cơ thể người qua đường tiêu hóa phải vượt qua được môi trường axit trong dạ dày

pH 2,0 trong thời gian 3 giờ là giới hạn quyết định sàng lọc của các chủng [32, 33]. Do đó, chủng *L. pentosus* DCM 52.10 được khảo sát khả năng chịu axit, kết quả được trình bày trong bảng 2. Tại thời điểm 0 giờ, mật độ *L. pentosus* DCM 52.10 đạt 9,81 log CFU/mL sau đó giảm dần theo thời gian khảo sát, đến 5 giờ nuôi cấy, mật độ *L. pentosus* DCM 52.10 đạt 8,63 log CFU/ mL. Sau 5 giờ, chủng *L. pentosus* DCM 52.10 vẫn có khả năng chịu được pH 2,0, đạt tỷ lệ sống sót trên 50%. Kết quả này tương đồng với kết quả trong nghiên cứu của Ramos và cs (2013) [32], theo đó *Lactobacillus* sp. có khả năng sống sót ở pH 2,0. Nghiên cứu của Aartia và cs (2018) [26] cho thấy, các chủng khác nhau trong cùng một loài thuộc chi *Lactobacillus* cũng có khả năng chịu độ pH có tính axit khác nhau.

Bảng 2. Mật độ *L. pentosus* DCM 52.10 theo thời gian tại pH 2,0

pH	Mật độ <i>L.pentosus</i> DCM 52.10 (log CFU/mL)					
	0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ	4 giờ	5 giờ
2,0	9,81 ± 0,02 ^e	9,72 ± 0,01 ^d	9,70 ± 0,02 ^d	9,68 ± 0,02 ^c	9,62 ± 0,01 ^b	8,63 ± 0,02 ^a

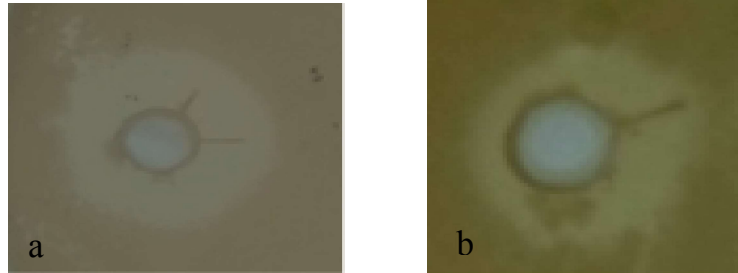
Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái ở mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa (α = 0,05).

3.1.2. Khảo sát đặc tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh của *L. pentosus* DCM 52.10

Hai chủng vi khuẩn gây bệnh *S. typhimurium* ATCC 13311 và *E. coli* ATCC 25922 đã được sử dụng để khảo sát đặc tính kháng khuẩn của *L. pentosus* DCM 52.10. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn lactic được tính bằng đường kính vòng vô khuẩn quanh khuẩn lạc. Tính kháng

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) [34]. Đường kính vòng kháng khuẩn của chủng *L. pentosus* DCM 52.10 được trình bày trong bảng 3 và hình 2.

Kết quả cho thấy, đường kính vòng kháng khuẩn của *L. pentosus* DCM 52.10 đối với *S. typhimurium* ATCC 13311 là 14,52 mm > 10 mm và đối với *E. coli* ATCC 25922 là 12,56 mm > 10 mm, điều này cho thấy, *L. pentosus* DCM 52.10 có khả năng kháng mạnh vi khuẩn gây bệnh, cho hoạt tính lợi khuẩn tốt. Hoạt động đối kháng với vi khuẩn gây bệnh của vi khuẩn lactic là do trong quá trình trao đổi chất đã tạo ra axit hữu cơ như: Axit lactic, axit acetic, peptide kháng khuẩn, H₂O₂... [35].



Hình 2. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của các chủng *L. pentosus* DCM 52.10
(a) *S. typhimurium* ATCC 13311, (b) *E. coli* ATCC 25922

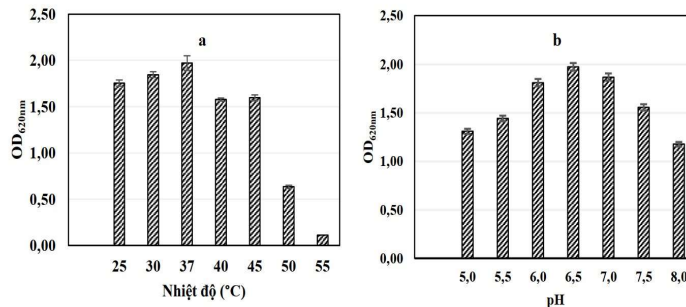
Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Kai và cs (2020) [13], theo đó chủng *L. pentosus* ZFM94 có khả năng kháng *E. coli* và *Staphylococcus citreus* LC5. Nghiên cứu của Motahari và cs (2017) [36] cho thấy, chủng *L. pentosus* 22C phân lập từ sữa chua truyền thống tạo ra peptide có khối lượng từ 5 - 10 kDa, đặt tên là pentocin 22C. Peptid pentocin 22C có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh cả gram dương và gram âm, trong đó đường kính vòng kháng khuẩn *E. coli* 11 mm có thể được sử dụng làm chất bảo quản sinh học.

Bảng 3. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của *L. pentosus* DCM 52.10

Chủng vi khuẩn kiểm định	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	14,52 ± 0,02
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,56 ± 0,03

3.2. Xác định điều kiện nuôi cấy phù hợp của chủng *L. pentosus* DCM 52.10

Xác định điều kiện nuôi cấy phù hợp của chủng *L. pentosus* DCM 52.10 để thu sinh khối vi khuẩn cao nhất, giúp giảm chi phí trong sản xuất. Kết quả ở hình 3a cho thấy, khi tăng nhiệt độ nuôi cấy từ 25 - 37°C sau 24 giờ thì sinh khối của vi khuẩn tăng dần thể hiện qua giá trị OD_{620nm} tăng từ 1,755 lên 1,972 và giảm 40°C, đặc biệt ở 55°C giá trị OD_{620nm} chỉ đạt còn 0,111.

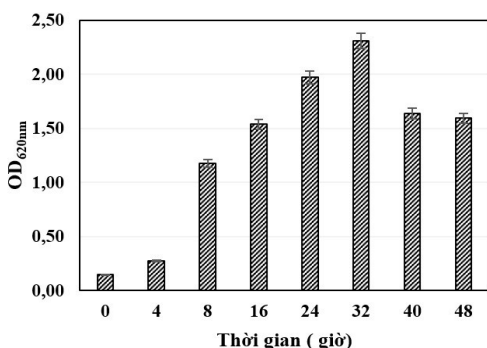


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ (a), pH (b) đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng *L. pentosus* DCM 52.10

Ảnh hưởng pH ban đầu của môi trường nuôi cấy, kết quả chỉ ra pH 6,5 cho khả năng nuôi cấy tăng sinh chủng tốt nhất, khi tăng pH của môi trường lên 7,0; 7,5; 8,0 thì khả năng sinh trưởng

của chủng đều giảm (Hình 3b). Ngoài ra, nghiên cứu cũng xác định thời gian phù hợp để thu được sinh khối vi khuẩn cao nhất. Kết quả ở hình 4 cho thấy, thời gian nuôi cấy chủng *L. pentosus* DCM

52.10 bắt đầu tăng sinh mạnh từ 8 - 32 giờ nuôi cấy. Ở 32 giờ nuôi cấy, giá trị OD_{620nm} cao nhất đạt 2,314, ở 40 và 48 giờ nuôi cấy, khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng bắt đầu giảm giá trị, OD_{620nm} lần lượt là 1,637 và 1,595 (Hình 4). Như vậy, điều kiện thích hợp cho nuôi cấy tăng sinh chủng *L. pentosus* DCM 52.10 nhiệt độ 37°C, pH 6,5 và thời gian nuôi cấy là 32 giờ. So sánh với kết quả nghiên cứu của Ashokkumar và cs (2018) [37], xác định chủng *L. pentosus* K1-23 có khả năng sinh β-glucan có điều kiện tăng sinh thích hợp là ở nhiệt độ 37,84°C, pH 5,25 và thời gian nuôi cấy là 6,08 ngày thì chủng *L. pentosus* DCM 52.10 có nhiệt độ nuôi cấy tăng sinh thấp hơn, pH cao hơn và thời gian nuôi cấy ngắn hơn. Khi so sánh với chủng *L. pentosus* B96 phân lập từ dịch lên men quả oliu trong nghiên cứu của Amelia và cs (2005) [20] có điều kiện nuôi cấy tăng sinh thích hợp là 30°C, pH 7 thì chủng *L. pentosus* DCM 52.10 có nhiệt độ nuôi cấy cao hơn và pH nuôi cấy thấp hơn. Như vậy, mặc dù cùng một loài nhưng mỗi chủng *L. pentosus* từ các nguồn khác nhau có những điều kiện nuôi cấy tăng sinh khác nhau phù hợp.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng *L. pentosus* DCM 52.10

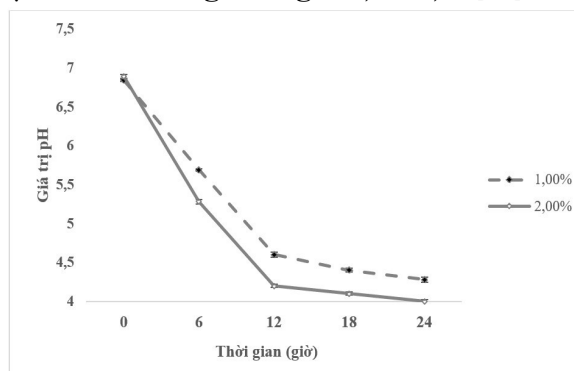
Sau khi xác định được một số điều kiện nuôi cấy tăng sinh phù hợp và khảo sát các đặc tính lợi khuẩn cho kết quả tốt, chủng *L. pentosus* DCM 52.10 sẽ được nhân giống theo điều kiện đã xác định và sử dụng cho lên men sữa đậu đỏ.

3.3. Độ pH và hàm lượng axit trong quá trình lên men dịch sữa đậu đỏ

Sữa đậu đỏ lên men bởi chủng *L. pentosus* DCM 52.10 trong 24 giờ giá trị pH và hàm lượng

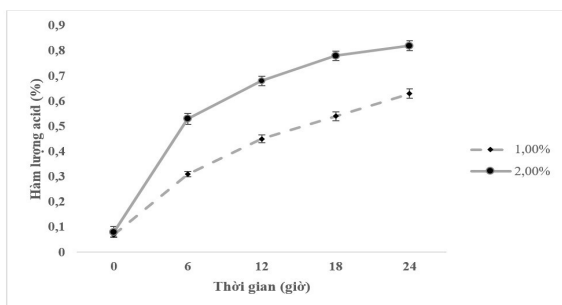
axit thay đổi theo thời gian, cụ thể pH giảm và hàm lượng axit tăng.

Tỷ lệ tiếp giống khác nhau có sự tạo axit khác nhau, ở tỷ lệ tiếp giống 2% *L. pentosus* DCM 52.10 phát triển dồi dào hình thành axit nhiều hơn dẫn đến pH thấp và hàm lượng axit cao hơn so với tỷ lệ tiếp giống 1% (Hình 5, 6). Lên men trong 12 giờ đầu pH giảm mạnh ở cả 2 tỉ lệ tiếp giống, cụ thể: 1% (pH = 5,69 ở 6 giờ và pH = 4,6 ở 12 giờ) và 2% (pH = 5,28 ở 6 giờ và pH = 4,2 ở 12 giờ). Như vậy, *L. pentosus* DCM 52.10 phát triển mạnh trong giai đoạn này dẫn đến làm giảm mạnh pH. Sau 12 giờ, giá trị pH giảm ít hơn. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Hà Ny và cs (2015) [38], khi nghiên cứu sản xuất sữa chua đậu nành đã cho rằng, từ 4 - 16 giờ pH giảm mạnh, sau 16 giờ giá trị pH giảm không đáng kể. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cho thấy, sữa lên men có chất lượng tốt thường có pH là 4,2 - 4,6 [39, 40]. Tại thời điểm 24 giờ lên men, giá trị pH dao động từ 4,0 - 4,28 và cũng phù hợp với pH tối ưu của các loại sữa chua thông thường từ 3,27 - 4,59 [41].



Hình 5. Giá trị pH của sữa đậu đỏ theo thời gian lên men

Hình 5 và 6 cho thấy, mối liên hệ giữa độ pH và phần trăm axit trong sữa đậu đỏ lên men. Độ pH của sữa đậu đỏ lên men càng thấp thì phần trăm axit trong sữa đậu đỏ lên men càng cao. Nhìn chung, pH giảm và độ axit tăng qua các thời điểm lên men. Hàm lượng axit của sữa đậu đỏ lên men bởi chủng *L. pentosus* DCM 52.10 tại 6 và 12 giờ với nồng độ tế bào ban đầu 2×10^{10} CFU/mL ở tỉ lệ tiếp giống 2% có hàm lượng axit lần lượt là 0,57% và 0,68%, cao hơn ở tỉ lệ tiếp giống 1% có độ axit 0,31% và 0,45%.



Hình 6. Hàm lượng axit của sữa đậu đỏ theo thời gian lên men

Sau 24 giờ lên men, hàm lượng axit đạt 0,63% ở tỉ lệ tiếp giống 1%, 0,82% ở tỉ lệ tiếp giống 2% (Hình 6). Axit được sinh ra tạo hương vị cho sản phẩm đồ uống lên men. Phần lớn các vi khuẩn lactic có khả năng tạo thành từ 0,5 - 1,5% axit, một số loài có thể tạo tới 3% [42]. Như vậy, *L. pentosus* DCM 52.10 có khả năng lên men sữa đậu đỏ trong suốt 24 giờ lên men, pH của sữa giảm dần và hàm lượng axit tăng dần.

3.4. Mật độ vi khuẩn lợi khuẩn trong quá trình lên men

Bảng 4. Mật độ vi khuẩn chủng *L. pentosus* DCM 52.10 theo thời gian lên men

Tỷ lệ tiếp giống tại thời điểm	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	
1%	0 giờ	$2,2 \times 10^7$
	6 giờ	$5,2 \times 10^7$
	12 giờ	$2,1 \times 10^8$
	18 giờ	$3,6 \times 10^8$
	24 giờ	$4,1 \times 10^8$
2%	0 giờ	$3,9 \times 10^7$
	6 giờ	$1,7 \times 10^8$
	12 giờ	$4,6 \times 10^8$
	18 giờ	$5,3 \times 10^8$
	24 giờ	$6,0 \times 10^8$

Trong quá trình lên men, mật độ vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 có xu hướng tăng theo thời gian lên men. Số lượng tế bào vi khuẩn tăng mạnh trong 12 giờ đầu lên men dịch sữa đậu đỏ, có mật độ tế bào ở tỉ lệ tiếp giống 1% là $2,1 \times 10^8$ CFU/mL và ở tỉ lệ 2% là $4,6 \times 10^8$ CFU/mL (Bảng 4). Mật độ tế bào vi khuẩn tăng nhẹ từ 12 - 24 giờ, sau 24 giờ lên men mật độ tế bào đạt $4,1 \times 10^8$ CFU/mL (ở tỉ lệ tiếp giống 1%) và $6,0 \times 10^8$ CFU/mL (ở tỉ lệ tiếp

giống 2%). Sự gia tăng mật độ tế bào vi khuẩn theo thời gian cho thấy, sự tương đồng với kết quả định lượng axit lactic và độ pH ở trên. Như vậy, mật độ vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 trong sữa đậu đỏ sau 24 giờ lên men đều đạt trên 10^8 CFU/mL ở cả hai nồng độ 1 và 2% (v/v). Kết quả thí nghiệm cho thấy, khả năng phát triển của *L. pentosus* DCM 52.10 trong sữa đậu đỏ.

Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Li và cs (2012) [43], về mật độ vi khuẩn lactic trong các loại sữa sau khi lên men đều đạt trên 10^8 CFU/mL và cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Đinh Thị Thanh Vy và cs (2024) [21], mật độ *Lactobacillus fermentum* YU2301 tăng theo thời gian lên men, ở sữa đậu đỏ 24 giờ mật độ *L. fermentum* YU2301 đều đạt trên 10^8 CFU/mL. Theo TCVN 7030:2016 [44] và một số nghiên cứu đã chỉ ra, để mang lại lợi ích cho sức khỏe, mật độ lợi khuẩn trong sản phẩm tối thiểu là $10^6 - 10^7$ CFU/mL [45, 46]. Mật độ vi khuẩn ban đầu phải đủ lớn để đáp ứng lượng lợi khuẩn, do trong quá trình đi vào hệ tiêu hóa, các chủng lợi khuẩn phải sống sót khi đến đường ruột chống lại các điều kiện axit dạ dày và muối mật [47].

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 có đặc tính lợi khuẩn tốt, như chịu được pH của dạ dày, muối mật và kháng vi khuẩn gây bệnh *E. coli*, *S. typhimurium*. Chủng này có điều kiện tăng sinh thích hợp ở 37°C, pH 6,5 và thời gian nuôi cấy là 32 giờ. *L. pentosus* DCM 52.10 có khả năng lên men sữa đậu đỏ. Sau 24 giờ lên men, độ pH sữa đậu đỏ khi bổ sung vi khuẩn này ở tỷ lệ 1% và 2% (v/v) đều đạt dưới 4,3, hàm lượng axit tăng dần tại 24 giờ trên 0,6%. Mật độ vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 tăng dần trong suốt quá trình lên men, sau 24 giờ mật độ vi khuẩn đều đạt trên 10^8 CFU/mL. Từ các kết quả trên cho thấy, chủng vi khuẩn *L. pentosus* DCM 52.10 có tiềm năng lợi khuẩn và lên men các sản phẩm sữa từ hạt đậu thay thế nguồn sữa động động vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dusabe A., Chacha M., Vianney J. M., Raymond J. (2022). Development of plant-based yoghurt rich in bioavailable essential nutrients and bioactive compounds from ingredients available in

East Africa. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 10(1): 250 - 266.

2. Kundu P., Dhankhar J., Sharma A. (2028). Development of non-dairy milk alternative using soymilk and almond milk. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 6: 203 - 201.

3. Aydar E. F., Tutuncu S., Ozcelik B. (2020). Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies and health effects. *Journal of Functional Foods*, 7: 103975.

4. Trương Hồng Sơn, Lưu Liên Hương, Lê Minh Khánh, Hoàng Hà Linh (2022). Đậu đỗ và sức khỏe dưới góc nhìn của quy luật ngũ hành và dinh dưỡng hiện đại. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 515(2): 300 - 304.

5. Giuseppa D. B., Clara N, Giuseppe D. B., Luca R, Vincenzo L. T., Angela G. P., Giacomo D. (2016). Mineral composition of some varieties of beans from Mediterranean and Tropical areas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(3): 239 - 248.

6. Limón R. I., Peñas E., Torino M. I., Martínez V. C., Dueñas M., Frias, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, 172: 343 - 352.

7. Savijoki K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4): 394 - 406.

8. Tomovska J., Presilski S., Gjorgievski N., Tomovska, N., Qureshi, M. & P Bozinovska, N. (2013). Development of a spectrophotometric method for monitoring angiotensin-converting enzymes in dairy products. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(1): 14 - 18.

9. Gjorgievski N., Tomovska, J., Dimitrovska, G., Makarijoski, B., Shariati, M. A. (2014). Determination of the antioxidant activity in yogurt. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 8: 88 - 92.

10. Nguyễn Thị Lâm Đoàn, Đào Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Tiến Thành, Nguyễn Hoàng Anh (2022). Sử dụng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* trong lên men sữa đậu nành. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20(12): 1608 - 1618.

11. Trần Thị Định, Nguyễn Thị Thúy Nga, Vũ Thị Huyền, Nguyễn Thị Hoàng Lan, Bùi Thúy Ngọc, Vũ Thị Kim Oanh, Đinh Thị Hiền (2023). Ảnh hưởng của nguyên liệu đến chất lượng sữa chua đậu tương bổ sung bí đỏ và mít đông cam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 21(6): 900 - 908.

12. Ying L., Xiao-xiao X., Salam A I., Shahzor G K., Hong Y., Yan - feng W., Wen H (2016). Characterization of *Lactobacillus pentosus* as a starter culture for the fermentation of edible oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.). *LWT - Food Science and Technology*, 68, 21 - 26.

13. Kai Y., Ping L., Qing G. (2020). Complete genome sequence analysis of a strain *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its probiotic characteristics. *Genomics*, 12: 3142 - 3149.

14. Izumo T., Izumi F., Nakagawa I., Kitagawa Y., Shibata H., Kiso Y. (2011). Influence of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 ingestion on the mucosal immunity of healthy and *Salmonella typhimurium*-infected mice. *Biosci Microflora*, 30: 27 - 35.

15. Montoro B P., Nabil B., Leyre L L., Sonia C G., Antonio G., Hikmate A. (2016). Fermented alorea table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Front. Microbiol*, 7: 1 - 13.

16. Nguyen Thi Lam Doan, Van H K., Cnockaert M, De B. E., Maarten A., Le T. B., Vandamme P. (2013). A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 163: 19 - 27.

17. Jacobsen C. N., Nielsen V. R and Hayford A. E. (1999). 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): 4949 - 4956.

18. Zhou T., Li B., Peng C., Ji P. B., Chen G., Ren Y. L. (2009). Assessment of the sequential simulated gastrointestinal tolerance of lactic acid bacteria from kefir grains by response surface

- methodology. *Journal of Food Science*, 74(6): M328 - M334.
19. Herrerros M. A., Sandoval H., Gonzalez L., Castro J. M., Fresno J. M. and Tornadijo M. E., (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol*, 22: 455 - 459.
20. Amelia D., Dulce B., Cidalia P., Francisco N. and Antonio G. F. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22: 521 - 528.
21. Đinh Thị Thanh Vy, Lê Thị Loan, Võ Hoài Hiếu (2024). Khả năng lên men của vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* YU2301 đối với một số loại sữa thực vật. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Công thương thành phố Hồ Chí Minh*, 24(1): 53 - 61.
22. Jetsaraporn N., Uthaiwan S., Varongsiri K. (2019). Single and mixed lactic acid bacteria culture fermentation in red bean milk for development of a functional beverage. *Malaysian Applied Biology*, 48(4): 139 - 145.
23. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 10035: 2013. Thực phẩm đã qua xử lý nhiệt đựng trong bao bì kín - Xác định pH.
24. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 4589:1988. Đồ hộp - Phương pháp xác định hàm lượng axit tổng số và axit bay hơi.
25. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 7906:2008. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - phương pháp định lượng vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.
26. Aartia C., Ameer K., Rakesh V., Mariadhas V. A., Paul A., Naif A. A., Soundharrajan I., Ki C. C. (2018). *In vitro* investigation on probiotic, anti - Candida and antibiofilm properties of *Lactobacillus pentosus* strain LAP1. *Archives of Oral Biology*, 89: 99 - 106.
27. Gilliland S. E., Nelson C. R., Maxwell C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2): 377 - 381.
28. Nguyễn Thị Lâm Đoàn (2018). Khảo sát và định tên vi khuẩn *Lactobacillus* sp. có đặc tính probiotic từ một số thực phẩm lên men truyền thống. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 10(95): 90 - 97.
29. Mahasneh A M., Sarah H., Sari A. M. (2015). Probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from local traditional fermented products. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(2): 81 - 87.
30. Divya, J. B., Varsha, K. K. & Nampoothir, K. M. (2012). Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 167: 1314 - 1324.
31. Pfeller, E. A., Azcarate-Peril, M. A., Klaenhammer, T. R. (2007). Characterization of novel bile inducible-operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*, 189: 4624 - 4634.
32. Ramos C, L., Thorsen L., Schwan R F., Jespersen L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36: 22 - 29.
33. Mishra V. and Prasad D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 109 - 115.
34. Stavros K., Ioanna M., Chrysanthi N., Athanasios A., Eugenia B., Argyro B., Stavros P., Theodoros V. (2016). 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): 19 - 26.
35. Daniel D. (2004). Chapter meat fermentation: Principles and applications. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker, Inc. 410 - 426.
36. Motahari P., Saeed M., Mehran K. (2017). Safety evaluation and antimicrobial properties of *Lactobacillus pentosus* 22C isolated from traditional yogurt. *Food Measure*, 11: 972 - 978.
37. Ashokkumar S., Myoungjin K., Hyeong C. J., Keun K. (2018). Strain selection and optimization of mixed culture conditions for

Lactobacillus pentosus K1-23 with antibacterial activity and *Aureobasidium pullulans* NRRL 58012 producing immune-enhancing β -Glucan. *J. Microbiol. Biotechnol*, 28(5): 697 - 706.

38. Trần Thị Hà Ny, Nguyễn Quang Đạt, Nguyễn Thị Lan Anh, Trương Văn Thiên, Phạm Thị Hương (2015). Nghiên cứu quá trình sản xuất sữa chua đậu nành bằng hệ vi sinh vật trong kefir. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 11(96): 105 - 109.

39. Nguyễn Đức Doan, Đỗ Thị Hà (2020). Ảnh hưởng của các phương pháp xử lý nhiệt kết hợp với lên men đến hàm lượng axit gamma - aminobutyric, axit phytic và tính chất lý - hóa của sữa chua đậu nành nảy mầm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(5): 367 - 377.

40. Thien Trung Le (2012). Purification, analysis and applications of bioactive milk fat globule membrane material. PhD thesis, Ghent University, Belgium. ISBN-number: 9789059894976.

41. Hwang H. J., Lee J. H. (2006). Quality characteristics of curd yogurt with *Rubus*

coreanum Miquel juice. *Culinary Science and hospitality research*, 12(2): 195 - 205.

42. Lâm Xuân Thanh (2003). *Giáo trình công nghệ chế biến sữa và các sản phẩm chế biến sữa*. Nxb Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.

43. Li H., Yan L., Wang J., Zhang Q., Zhou Q., Sun T., Chen W., Zhang H. (2012). Fermentation characteristics of six probiotic strains in soymilk. *Annals of Microbiology*, 62(4): 1473 - 1483.

44. Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 7030:2016. Sữa lên men.

45. Shah N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894 - 907.

46. Ding W. K., Shah N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15(2): 219 - 232.

47. Lee Y. K., Salminen S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7): 241 - 245.

EVALUATION OF PROBIOTIC CHARACTERISTICS AND RED BEAN MILK FERMENTATION ABILITY OF *Lactobacillus pentosus* DMC 52.10

Nguyen Thi Lam Doan¹

¹*Faculty of Environmental Sciences, University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

Summary

Lactobacillus pentosus has been used to produce probiotic food products. The study aimed to evaluate the probiotic potential and red bean milk fermentation ability of *L. pentosus* DCM 52.10. Using the culture method, the bacterial density was determined and the agar diffusion method revealed that *L. pentosus* DCM 52.10 had good probiotic characteristics, such as tolerance to gastric pH, bile salts and antagonism against the pathogenic bacteria *E. coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. This strain had suitable growth conditions at 37°C, pH 6.5 and a cultivation time of 32 hours. *L. pentosus* DCM 52.10 can ferment red bean milk. During the fermentation process, the pH of the milk decreased gradually and the lactic acid content increased steadily. After 24 hours, the red bean milk pH reached below 4.3 and the lactic acid content exceeded 0.6% at both inoculation ratios of 1% and 2% (v/v). The density of *L. pentosus* DCM 52.10 increased during fermentation, reaching over 10⁸ CFU/mL after 24 hours.

Keywords: *Lactobacillus pentosus*, probiotic, fermentation, red bean.

Ngày nhận bài: 9/8/2024

Ngày chuyển phản biện: 28/8/2024

Ngày thông qua phản biện: 19/9/2024

Ngày duyệt đăng: 15/11/2024