

# KHẢ NĂNG LÊN MEN CỦA VI KHUẨN *Limosilactobacillus fermentum* YU2301 ĐỐI VỚI MỘT SỐ LOẠI SỮA THỰC VẬT

Đinh Thị Thanh Vy, Lê Thị Loan, Võ Hoài Hiếu\*

Trường Đại học Yersin Đà Lạt

\*Email: vohoaihieu.96@gmail.com

Ngày nhận bài: 19/4/2023; Ngày chấp nhận đăng: 21/6/2023

## TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* YU2301 có khả năng lên men các loại sữa có nguồn gốc từ thực vật như sữa đậu nành, sữa đậu phộng, sữa đậu đỏ, sữa hạt sen, sữa dừa. Trong suốt quá trình lên men, pH của các loại sữa giảm dần và hàm lượng acid lactic tăng dần, đến 24 giờ độ pH của các loại sữa đều đạt dưới 4,5 và hàm lượng acid lactic đều đạt trên 0,3 g/100 mL. Ngoài ra, khi sử dụng vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 để lên men sữa thực vật, khả năng khử các gốc tự do DPPH tăng, đến 24 giờ, phần trăm khử gốc tự do đạt cao nhất với  $91,67\% \pm 2,08$  (sữa đậu phộng với 1% v/v chủng tham gia lên men) và  $94,44\% \pm 1,20$  (sữa dừa với 2% v/v chủng tham gia lên men). Hàm lượng phenolic tổng giảm đáng kể theo thời gian lên men. Mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 tăng theo thời gian lên men ở tất cả các loại sữa, đến 24 giờ mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 đều đạt trên  $10^8$  CFU/mL.

Từ khóa: *Limosilactobacillus fermentum*, lên men, sữa thực vật.

## 1. TỔNG QUAN

Từ nhiều thế kỷ qua, sữa luôn là sản phẩm được tiêu thụ với sản lượng lớn trên toàn thế giới. Đây là nguồn cung cấp canxi, chất béo, carbohydrate và protein cần thiết cho dinh dưỡng của con người [1]. Ngày nay, việc dị ứng sữa bò, không dung nạp lactose hay chế độ ăn uống không sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật ngày càng gia tăng đã buộc một số người tiêu dùng chuyển sang thực phẩm và đồ uống không chứa sữa để thay thế sữa bò [2].

Các chất được sử dụng để thay thế sữa có nguồn gốc từ động vật là một dạng chất lỏng được tạo ra từ quá trình phân giải nguyên liệu thực vật (ngũ cốc, giả ngũ cốc, hạt có dầu, quả hạch) thông qua quá trình phân giải từ nước và đồng nhất cho ra kích thước hạt từ 5–20  $\mu\text{m}$  mô phỏng sữa bò về hình dáng và độ đặc. Các loại nguyên liệu thay thế sữa có nguồn gốc từ thực vật này mang lại nhiều giá trị dinh dưỡng cũng như lợi ích cho sức khỏe. Hai chất isoflavones và phytosterol trong sữa đậu nành có tác dụng chống lại các bệnh ung thư, tim mạch, các bệnh về loãng xương, giảm cholesterol [3,4]; sữa đậu phộng có chứa các hợp chất phenolic giúp chống oxy hóa và các bệnh như bệnh tim mạch vành, đột quỵ và các bệnh ung thư khác [5,6]; bên trong sữa gạo có chứa phytosterol, đặc biệt là  $\beta$ -sitosterol và  $\gamma$ -oryzanol làm giảm cholesterol, tăng huyết áp, tác dụng chống tiểu đường, chống viêm, chống oxy hóa [7]; acid lauric và vitamin E trong sữa dừa thúc đẩy phát triển trí não, tăng cường hệ miễn dịch, duy trì độ đàn hồi của mạch máu, chống lão hóa và duy trì độ đàn hồi của làn da [8].

Mặc dù sữa có nguồn gốc thực vật đã có truyền thống từ lâu như các loại sữa đậu, sữa hạt,... tuy nhiên, việc nghiên cứu và phát triển các sản phẩm từ sữa thực vật sẽ thu hút được sự quan tâm nhiều hơn từ phía thị trường người tiêu dùng. Trong đó, sữa chua có nguồn gốc từ thực vật được xem là một trong những dòng sản phẩm mới phù hợp với sức khỏe của đại

đa số người tiêu dùng cũng như mang lại hiệu quả kinh tế cao cho các đơn vị sản xuất nhưng vẫn đảm bảo giá trị dinh dưỡng. Dòng sản phẩm này tương tự như sữa chua thông thường về đặc tính kết cấu và cảm quan cũng như khả năng chứa một lượng lớn các chủng lợi khuẩn có khả năng sinh acid lactic trong thời gian dài bảo quản.

Vi khuẩn lactic (LAB) là nhóm chịu trách nhiệm lên men các sản phẩm làm từ sữa và đã được sử dụng trong quá trình lên men thực phẩm từ những thế kỷ trước. Nhóm LAB gồm một số loài vi khuẩn như *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, v.v. Việc ứng dụng LAB trong lên men các loại sữa có nguồn gốc từ thực vật giúp giảm các hương vị không mong muốn do aldehyde, n-hexanol, n-pentanol và n-heptanol, xeton [9]. Quá trình lên men sữa bằng vi khuẩn lactic được quan tâm và nghiên cứu rộng rãi, tuy nhiên việc ứng dụng các chủng vi khuẩn này cho quá trình lên men sữa thực vật ít được chú ý [10]. Năm 2019, Brückner-Gühmann và cs. (2019) [11] đã kết hợp thành công hai chủng vi khuẩn *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và *Streptococcus thermophilus* trong lên men sữa yến mạch mang lại hương vị và cấu trúc như mong muốn. Đến năm 2020, các đặc tính chất lượng chính của sữa chua có nguồn gốc thực vật được xác định bởi nghiên cứu của Grasso và cs. (2020) [12] mang lại những thuận lợi trong việc phát triển các sản phẩm tương lai. Kể từ năm 2018 nhiều nghiên cứu tập trung nghiên cứu và phát triển các sản phẩm từ sữa chua thực vật có nguồn gốc từ hạt diêm mạch, đậu xanh, đậu nành, hạt phỉ, đậu phộng, đậu lăng, gạo, dừa, quả hạnh, kiều mạch, v.v [13].

Nghiên cứu này bước đầu tập trung đánh giá khả năng lên men một số loại sữa có nguồn gốc từ thực vật bằng chủng vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* YU2301 nhằm tạo tiền đề cho những nghiên cứu về sau.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* YU2301 có mã định danh trên ngân hàng gen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): OQ569364, được lưu trữ tại phòng Ứng dụng Vi sinh vật, Trung tâm Thí nghiệm - Thực hành, Trường Đại học Yersin Đà Lạt.

Đậu nành, đậu đỏ, đậu phộng, hạt sen, cơm dừa được mua tại các cửa hàng tạp hóa, chợ Đà Lạt.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chuẩn bị sữa thực vật

200g nguyên liệu mỗi loại sau khi rửa qua nước sạch được ngâm với dung dịch  $\text{NaHCO}_3$  0,5% trong 12 giờ, sau đó được rửa sạch với nước cất vô trùng. Nguyên liệu được trộn với 1000 mL nước và đồng nhất bằng máy làm sữa hạt Olivo CB20 ở chế độ làm sữa hạt trong 35 phút. 12% đường ăn tinh luyện được bổ sung vào sau khi vừa hoàn tất quá trình làm sữa hạt. Để loại bỏ vi sinh vật gây bệnh, 500 mL sữa thực vật mỗi loại trong bình thủy tinh 1 lít được thanh trùng ở 95 °C trong 15 phút bằng bể ổn nhiệt (Hãng Memmert, model: WNB14), cuối cùng được làm lạnh đến nhiệt độ phòng ngay lập tức theo mô tả của Li và cs. (2012) [14].

#### 2.2.2. Lên men sữa thực vật

Chủng vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 sau khi lấy ra khỏi tủ đông được hoạt hóa trên canh thang MRS trong 24 giờ ở 37 °C. Sau đó, 1% (v/v) dịch nuôi cấy được sử dụng để nhân sinh khối trên môi trường canh thang MRS lắc 150 rpm bằng máy lắc âm (Hãng Jinghong, model: THZ-312) ở 37 °C trong 12 giờ.

Để tiến hành lên men sữa thực vật, dịch nuôi cấy vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 được ly tâm với tốc độ 10000 rpm trong 10 phút sau đó được hoạt hóa lại với cùng thể tích ban đầu với dung dịch NaCl 0,85%. 1% và 2% chủng vi khuẩn sau đó được bổ sung vào sữa thực vật, ủ ở 37 °C. Cứ sau 12, 18 và 24 giờ, các mẫu sữa lên men được sử dụng để phân tích các chỉ tiêu pH, acid lactic, tổng polyphenol, khả năng khử gốc DPPH và mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301.

### 2.2.3. Định lượng acid lactic và pH

Giá trị pH được xác định bằng máy đo pH (Hãng Hana, model: Hi2002-02) đã được hiệu chuẩn với pH 4, 7 và 10. Hàm lượng acid lactic tại các thời điểm lên men được xác định dựa theo mô tả của Abraham và cs. (2014) [15]: Mười mL mẫu được chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 M sử dụng phenolphthalein làm chất chỉ thị. Quá trình chuẩn độ tiếp tục và đạt đến điểm cuối khi màu chuyển sang hồng. Kết quả được xử lý theo công thức:

$$\text{Acid Lactic (\%)} = \frac{V(\text{NaOH}) * k}{V(\text{mẫu})} * 100$$

Trong đó: k là hệ số của acid lactic; (NaOH): thể tích NaOH dùng để định lượng; V (mẫu): thể tích lượng mẫu đem đi định lượng.

Các phép đo pH và TA được lặp lại 3 lần và thực hiện ở 0, 12, 18 và 24 giờ.

### 2.2.4. Xác định hàm lượng phenolic tổng

Hàm lượng phenolic tổng trong sữa chua thực vật được xác định theo phương pháp của Singleton và cs. (1999) [16] có hiệu chuẩn. Thêm 0,50 mL dung dịch mẫu đã pha loãng vào 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và phản ứng trong 4 phút trong bóng tối ở nhiệt độ phòng. Sau đó, 2 mL bão hòa dung dịch natri cacbonat 7,5% được thêm vào và sau đó ủ trong bóng tối trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, độ hấp thụ được đánh giá ở bước sóng 765 nm. Cách tiến hành mẫu chuẩn và các mẫu thử là tương tự nhau, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình. Acid gallic được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng polyphenol trong sữa chua thực vật được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn acid gallic.

$$P = \frac{C * V * d}{m * 1000}$$

Trong đó: C: nồng độ acid gallic ( $\mu\text{g/mL}$ ); V: Thể tích sữa; d: Hệ số pha loãng sữa; m: Khối lượng hạt khô trong sữa; 1000: hệ số qui đổi từ  $\mu\text{g}$  sang mg.

### 2.2.5. Khả năng loại bỏ gốc oxy hóa

Khả năng kháng oxy hóa của sữa chua thực vật xác định nhờ phương pháp trung hòa gốc tự do 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) của Sharma và Bhat (2009) [17] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 40  $\mu\text{L}$  DPPH 100  $\mu\text{M}$  và 960  $\mu\text{L}$  sữa chua đã pha loãng. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó đo độ hấp thụ quang của DPPH bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 517 nm. Mỗi thí nghiệm tiến hành 3 lần để lấy giá trị trung bình. Phần trăm gốc tự do DPPH được tính theo công thức:

$$\text{SC DPPH} = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_n}\right) * 100$$

Trong đó: SC DPPH: Khả năng bắt gốc tự do DPPH (%);  $A_s$ : Độ hấp thụ quang của mẫu phân tích;  $A_b$ : Độ hấp thụ quang của mẫu trắng;  $A_n$ : Độ hấp thụ quang của mẫu đối chứng âm.

### 2.2.6. Định lượng mật độ vi khuẩn lactic

Mật độ vi khuẩn lactic được theo dõi trong 24 giờ, các mẫu được thu thập sau 0 giờ, 12 giờ, 18 giờ và 24 giờ. Một mililit mẫu được thu thập tại mỗi thời điểm được pha loãng với

9mL dung dịch đậm peptone (Peptone 1 g/L, NaCl 8,5 g/L). Sau khi pha loãng đến nồng độ thích hợp, 100  $\mu$ L huyền phù được trải lên môi trường thạch MRS bổ sung CaCO<sub>3</sub> sau đó ủ ở 37 °C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc có khả năng phân giải CaCO<sub>3</sub> được ghi nhận và tính toán dựa trên đơn vị hình thành khuẩn lạc Log CFU/mL.

### 2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel. Các thức thử nghiệm được lặp lại ba lần để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp thống kê ANOVA. Giá trị p < 0,05 được xem là sai khác có ý nghĩa.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Định lượng acid lactic và độ pH

Trong 24 giờ lên men, các giá trị pH và độ acid lactic có sự thay đổi theo thời gian ở hầu hết các loại sữa được thử nghiệm. Các giá trị pH được thể hiện trong bảng 1, cụ thể trong 12 giờ đầu, độ pH ở tất cả các loại sữa được ghi nhận giảm so với thời điểm chưa lên men, trong đó sữa hạt sen có giá trị pH thấp nhất, sữa đậu phộng có giá trị pH cao nhất. Giá trị pH tiếp tục giảm dần theo thời gian theo thời gian lên men, đến 24 giờ, độ pH được ghi nhận thấp nhất đối với sữa hạt sen; ngoài ra nồng độ chủng vi khuẩn được bổ sung vào ở 2% cho giá trị pH thấp hơn so với 1%. Kết quả thu được tại thời điểm 24 giờ cho thấy giá trị pH ở tất cả các nghiệm thức dao động từ 3,44-4,42, điều này hoàn toàn phù hợp với pH tối ưu của các loại sữa chua trên thị trường đạt từ 3,27-4,59 [18].

*Bảng 1.* Giá trị pH của các loại sữa sau khi lên men theo thời gian

	Sữa đậu nành 1%	Sữa đậu nành 2%	Sữa đậu đỏ 1%	Sữa đậu đỏ 2%	Sữa hạt sen 1%	Sữa hạt sen 2%	Sữa đậu phộng 1%	Sữa đậu phộng 2%	Sữa dừa 1%	Sữa dừa 2%
Đối chứng	6,93±0,06 <sup>bc</sup>		6,99±0,01 <sup>c</sup>		6,84±0,05 <sup>b</sup>		7,29±0,09 <sup>d</sup>		5,76±0,05 <sup>a</sup>	
12 giờ	4,88±0,00 <sup>e</sup>	4,61±0,01 <sup>d</sup>	4,48±0,02 <sup>c</sup>	4,19±0,02 <sup>b</sup>	4,65±0,05 <sup>d</sup>	3,79±0,04 <sup>a</sup>	4,90±0,09 <sup>e</sup>	5,58±0,03 <sup>d</sup>	4,47±0,08 <sup>c</sup>	4,23±0,06 <sup>b</sup>
18 giờ	4,73±0,06 <sup>b</sup>	4,37±0,01 <sup>f</sup>	4,28±0,01 <sup>d</sup>	4,06±0,02 <sup>c</sup>	4,00±0,02 <sup>b</sup>	3,65±0,05 <sup>a</sup>	4,50±0,02 <sup>e</sup>	4,31±0,03 <sup>de</sup>	4,35±0,05 <sup>c</sup>	3,75±0,05 <sup>c</sup>
24 giờ	4,42±0,02 <sup>j</sup>	4,24±0,01 <sup>h</sup>	4,15±0,01 <sup>f</sup>	3,96±0,01 <sup>e</sup>	3,62±0,03 <sup>c</sup>	3,44±0,04 <sup>a</sup>	4,31±0,03 <sup>f</sup>	4,13±0,02 <sup>g</sup>	4,19±0,05 <sup>d</sup>	3,55±0,05 <sup>b</sup>

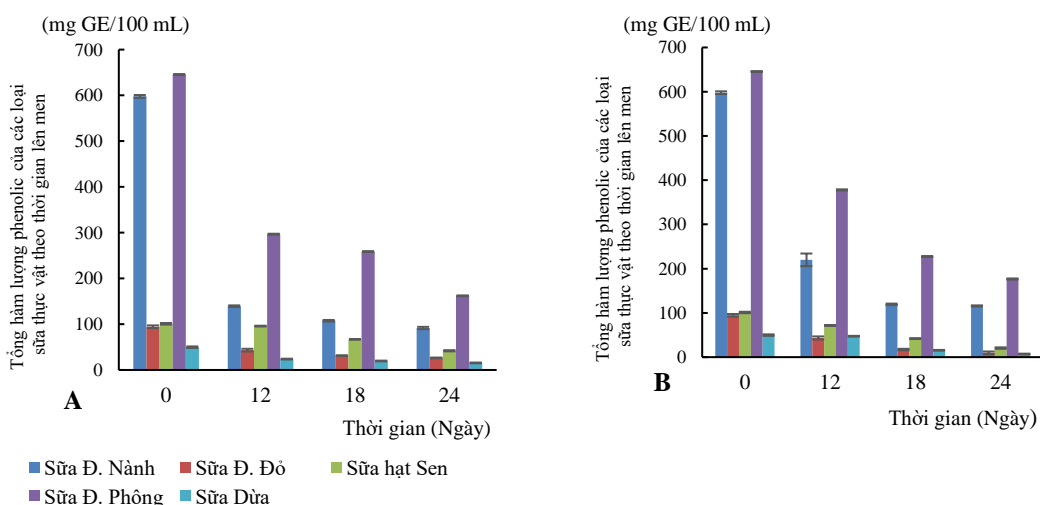
Tương tự, hàm lượng acid lactic tăng dần theo thời gian lên men (Bảng 2). Sau 24 giờ lên men, hầu hết hàm lượng acid lactic ở các loại sữa đạt từ 0,32-0,85 g/100 mL, trong đó sữa hạt sen có hàm lượng acid lactic cao nhất ở cả hai tỷ lệ chủng bổ sung vào. Điều này cho thấy, *L. fermentum* YU2301 sử dụng tốt nguồn đường sucrose được bổ sung để chuyển hóa thành acid hữu cơ. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Li và cs. (2012) [14] về sự gia tăng hàm lượng acid lactic và giảm pH. Acid lactic tăng lên trong quá trình lên men là nguyên nhân chính làm giảm giá trị pH. Điều này hoàn toàn phù hợp với giá trị pH được thu nhận ở bảng 1 và hàm lượng acid lactic ở bảng 2. Ngoài ra, tỷ lệ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 bổ sung vào sữa cũng thúc đẩy quá trình lên men, tỷ lệ chủng vi khuẩn được bổ sung vào sữa nhiều hơn cũng ảnh hưởng đến giá trị pH và hàm lượng acid lactic, điều này sẽ rút ngắn thời gian lên men của các loại sữa.

*Bảng 2.* Hàm lượng acid lactic tại các thời điểm lên men (g/100 mL)

	Sữa đậu nành 1%	Sữa đậu nành 2%	Sữa đậu đỏ 1%	Sữa đậu đỏ 2%	Sữa hạt sen 1%	Sữa hạt sen 2%	Sữa đậu phộng 1%	Sữa đậu phộng 2%	Sữa dừa 1%	Sữa dừa 2%
Đối chứng	0,06±0,00 <sup>e</sup>		0,03±0,00 <sup>c</sup>		0,04±0,00 <sup>d</sup>		0,02±0,00 <sup>b</sup>		0,01±0,00 <sup>a</sup>	
12 giờ	0,21±0,00 <sup>b</sup>	0,27±0,00 <sup>c</sup>	0,21±0,01 <sup>b</sup>	0,29±0,00 <sup>d</sup>	0,50±0,01 <sup>e</sup>	0,59±0,00 <sup>b</sup>	0,16±0,00 <sup>a</sup>	0,20±0,00 <sup>b</sup>	0,36±0,01 <sup>c</sup>	0,49±0,01 <sup>f</sup>
18 giờ	0,28±0,01 <sup>b</sup>	0,37±0,01 <sup>c</sup>	0,23±0,01 <sup>a</sup>	0,31±0,00 <sup>c</sup>	0,63±0,01 <sup>b</sup>	0,76±0,01 <sup>i</sup>	0,22±0,01 <sup>a</sup>	0,35±0,00 <sup>a</sup>	0,39±0,01 <sup>f</sup>	0,51±0,00 <sup>g</sup>
24 giờ	0,41±0,01 <sup>c</sup>	0,47±0,01 <sup>d</sup>	0,42±0,00 <sup>c</sup>	0,42±0,01 <sup>c</sup>	0,76±0,00 <sup>f</sup>	0,85±0,00 <sup>g</sup>	0,32±0,00 <sup>a</sup>	0,39±0,01 <sup>b</sup>	0,46±0,01 <sup>d</sup>	0,57±0,01 <sup>e</sup>

### 3.2. Hoạt tính phenolic tổng trong các loại sữa chua thực vật

Hàm lượng phenolic ở các loại sữa giảm liên tục trong suốt quá trình lên men được thể hiện qua Hình 1. Trước khi lên men, hàm lượng phenolic của các loại sữa đậu nành, sữa đậu đỏ, sữa hạt sen, sữa đậu phộng và sữa dừa đạt lần lượt là 597,82±3,02, 94,47±2,94, 100,09±1,68, 645,57±0,84 và 49,78±1,68 mg GE/100 g; tuy nhiên, đến 24 giờ, hàm lượng phenolic của các loại sữa giảm đáng kể. Trong đó sữa đậu nành và sữa đậu phộng sau lên men vẫn còn giữ được hàm lượng phenolic cao hơn các loại sữa còn lại. Cụ thể, các giá trị này đạt lần lượt là 91,68±2,51, 162,07±0,84 mg GE/100 g khi bổ sung 1% (v/v) *L. fermentum* YU2301; đối với 2% (v/v) *L. fermentum* YU2301 hàm lượng phenolic đạt 115,70±1,28, 176,59±1,28 mg GE/100 g. Kết quả này cho thấy sự tương quan giữa giá trị pH và hàm lượng phenolic, giá trị pH tăng sẽ làm thúc đẩy sự xuất hiện của các hợp chất chống oxy hóa như phenolic [19]. Nghiên cứu của Lodha và cs. (2021) [20] cũng cho thấy hàm lượng phenolic khi lên men sữa đậu nành bằng vi khuẩn lactic, điều này có thể chứng minh rằng vi khuẩn lactic có thể khử các hợp chất polyphenol trong sữa thực vật thông qua quá trình lên men giúp cải thiện khả năng tiêu hóa protein, carbohydrate cũng như tăng cường tính khả dụng sinh học của các khoáng chất trong sữa hạt [21]. Nguyên nhân dẫn đến sự giảm mạnh hàm lượng phenolic có thể do hoạt động của polyphenol oxidase có trong một số loại nguyên liệu thực vật hoặc hệ vi sinh vật và giá trị pH giảm trong quá trình lên men [19, 21].

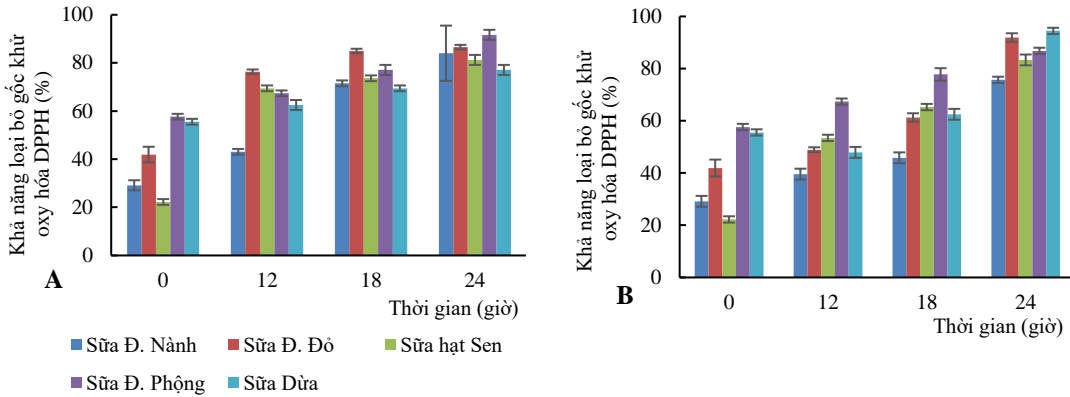


Hình 1. Tổng hàm lượng phenolic trong các loại sữa thực vật theo thời gian lên men với mật độ *L. fermentum* YU2301 ban đầu A. Tỷ lệ 1% (v/v), B. Tỷ lệ 2% (v/v)

### 3.3. Hoạt tính chống oxy hóa

Nhìn chung, khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH tăng dần theo thời gian lên men ở tất cả các loại sữa được thử nghiệm, hầu hết đều đạt trên 50% sau 18 giờ lên men. Sau 24 giờ lên men, phần trăm loại bỏ gốc tự do DPPH ở các loại sữa đều đạt trên 75%. Có sự khác về giá trị này khi thay đổi tỷ lệ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 tham gia vào quá trình lên men. Cụ thể, ở các loại sữa đậu đỏ, hạt sen và sữa dừa có tỷ lệ thuận giữa khả năng loại bỏ gốc DPPH và tỷ lệ chủng bổ sung vào. Tuy nhiên, khả năng loại bỏ gốc DPPH của sữa đậu nành và sữa đậu phộng sau 24 giờ lên men lại giảm khi tăng tỷ lệ chủng tham gia lên men từ 1% lên 2%. Khi các quá trình trao đổi vẫn tiếp tục xảy ra, các căng thẳng oxy hóa tăng lên dẫn đến các gốc tự do như DPPH cũng gia tăng, điều này có thể lý giải việc phân trăm khử gốc DPPH ở một số loại sữa có sự suy giảm khi bổ sung tỷ lệ chủng 2% (v/v). Kết quả này phù hợp với kết luận

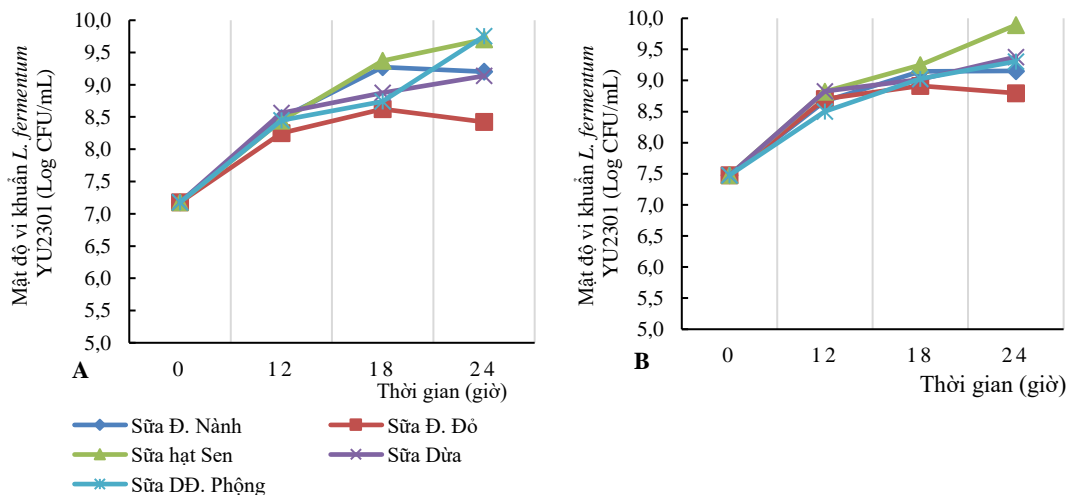
của Marazza và cs. (2012) [22] về việc sử dụng vi khuẩn Lactobacilli để lên men sữa đậu nành có khả năng loại bỏ các gốc DPPH tự do trên 50% so với sữa không lên men.



Hình 2. Khả năng loại bỏ gốc 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) của các loại sữa thực vật theo thời gian lên men với mật độ *L. fermentum* YU2301 ban đầu A. Tỷ lệ 1% (v/v), B. Tỷ lệ 2% (v/v)

### 3.4. Mật độ vi khuẩn lactic

Mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 có xu hướng tăng trong suốt quá trình lên men Hình 3, tuy nhiên đến 24 giờ, mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 bắt đầu giảm ở sữa đậu nành và sữa đậu đỏ trong khi vẫn tăng ở các loại sữa còn lại. Sự gia tăng mật độ tế bào vi khuẩn theo thời gian cho thấy sự tương đồng với kết quả định lượng acid lactic và độ pH. Với 1% (v/v) chủng tương đương với 7,18 Log CFU/mL chủng tại thời điểm 0 giờ, mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 đạt cao nhất 9,14 Log CFU/mL (sữa dừa), tiếp theo 9,70 Log CFU/mL (sữa hạt sen) và 9,75 Log CFU/mL (sữa đậu phộng) tại thời điểm 24 giờ; trong khi đó mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 đạt cao nhất ở 18 giờ đối với sữa đậu nành đạt 9,27 Log CFU/mL và sữa đậu đỏ đạt 8,62 Log CFU/mL. Kết quả trên cũng tương tự khi bổ sung 2% (v/v) chủng vi khuẩn tham gia vào quá trình lên men.



Hình 3. Mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 trong các loại sữa thực vật theo thời gian lên men (Log CFU/ml) với mật độ chủng vi khuẩn ban đầu A. Tỷ lệ 1% (v/v), B. Tỷ lệ 2% (v/v)

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khả năng phát triển của vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 phụ thuộc vào nguồn acid amin trong các loại sữa vì giá trị pH giảm nhanh và độ acid có thể chuẩn độ tăng nhanh được thể hiện ở Bảng 1 và Bảng 2, điều này cũng tương đồng với kết luận của Li và cs. (2012) [14] về khả năng sử dụng nguồn acid amin khi lên men sữa đậu nành của vi khuẩn *L. rhamnosus* GG và *B. animalis* Bb12. Mật độ vi khuẩn lactic trong các loại sữa sau khi lên men đều đạt trên  $10^8$  CFU/mL ở cả hai nồng độ bổ sung vào. Mật độ vi khuẩn ban đầu phải đủ lớn để đáp ứng lượng lợi khuẩn khả thi cần bổ sung vào cơ thể hằng ngày đạt từ  $10^6$  đến  $10^9$  CFU, do trong quá trình đi vào hệ tiêu hóa, các chủng lợi khuẩn phải còn sống sót khi đến đường ruột khi phải chống lại các điều kiện acid dạ dày và muối mật [23].

#### 4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *Limosilactobacillus fermentum* YU2301 có khả năng lên men một số loại sữa thực vật được làm từ đậu nành, hạt sen, đậu đỏ, đậu phộng, dừa. Sau 24 giờ lên men, độ pH ở tất cả các loại sữa khi được bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 với tỷ lệ 1% và 2% (v/v) đều đạt dưới 4,5, đạt thấp nhất với sữa hạt sen; tương tự, hàm lượng acid lactic tăng dần, tại 24 giờ tất cả các loại sữa đều đạt trên 0.3 g/100 mL, đạt cao nhất là sữa hạt sen. Hàm lượng phenolic tổng giảm dần và phần trăm khử gốc DPPH tăng dần theo thời gian lên men ở tất cả các loại sữa. Mật độ vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 tăng dần trong suốt quá trình lên men ở hầu hết các loại sữa, sau 24 giờ mật độ vi khuẩn đều đạt trên  $10^8$ CFU/ml. Từ các kết quả khảo sát trên cho thấy chủng vi khuẩn *L. fermentum* YU2301 có tiềm năng lên men các sản phẩm thay thế có nguồn gốc động vật. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn để đánh giá tiềm năng lên men ở các giai đoạn tiếp theo cũng như khai thác những đặc điểm có lợi của các loại sữa thực vật lên men.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dusabe A., Chacha M., Vianney J.-M., and Raymond J. - 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) (2022) 250-266. <https://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.1.20>
2. Kundu P., Dhankhar J., and Sharma A. - Development of non-dairy milk alternative using soymilk and almond milk. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* **6** (2018) 203-201. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.6.1.23>
3. Fukui K., Tachibana N., Wanezaki S., Tsuzaki S., Takamatsu K., Yamamoto T., Hashimoto Y., and Shimoda T. - Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* **50** (20) (2002) 5717–5721. <https://doi.org/10.1021/jf025642f>
4. Omoni A. O. and Aluko R. E. - Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutr Rev* **63** (8) (2005) 272-283. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2005.tb00141.x>
5. Wien M., Oda K., and Sabaté J. - A randomized controlled trial to evaluate the effect of incorporating peanuts into an American Diabetes Association meal plan on the nutrient profile of the total diet and cardiometabolic parameters of adults with type 2 diabetes. *Nutr J* **13** (2014) 2-9. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-10>
6. Settaluri V., Kandala V., Puppala N., and Sundaram J. - Peanuts and Their Nutritional Aspects - A Review. *Food and Nutrition Sciences* **3** (2012) 1644-1650. <http://doi.org/10.4236/fns.2012.312215>

7. Faccin G. L., Miotto L. A., Vieira L. D. N., Barreto P. L. M., and Amante E. R. - Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. *Rice Science* **16** (3) (2009) 226-234. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(08\)60083-9](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(08)60083-9)
8. Seow C. C. and Gwee C. N. - Coconut milk: chemistry and technology. *International Journal of Food Science & Technology* **32** (3) (1997) 189-201. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1997.00400.x>
9. Rackis J. J., Sessa D. J., and Honig D. H. - Flavor problems of vegetable food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **56** (3) (1979) 262-271. <https://doi.org/10.1007/BF02671470>
10. Ji D., Ma J., Xu M., and Agyei D. - Cell-envelope proteinases from lactic acid bacteria: Biochemical features and biotechnological applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **20** (1) (2021) 369-400. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12676>
11. Brückner-Gühmann M., Vasil'eva E., Culetu A., Duta D., Sozer N., and Drusch S. - Oat protein concentrate as alternative ingredient for non-dairy yoghurt-type product. *J Sci Food Agric* **99** (13) (2019) 5852-5857. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9858>
12. Grasso N., Alonso-Miravalles L., and O'Mahony J. A. - Composition, physicochemical and sensorial properties of commercial plant-based yogurts. *Foods* **9** (3) (2020) 1-11. <https://doi.org/10.3390/foods9030252>
13. Pua A., Tang V. C., Goh R. M., Sun J., Lassabliere B., and Liu S. Q. - Ingredients, processing, and fermentation: Addressing the organoleptic boundaries of plant-based dairy analogues. *Foods* **11** (6) (2022) 2-40. <https://doi.org/10.3390/foods11060875>
14. Li H., Yan L., Wang J., Zhang Q., Zhou Q., Sun T., Chen W. and Zhang H. - Fermentation characteristics of six probiotic strains in soymilk. *Annals of Microbiology* **62** (4) (2012) 1473-1483. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0401-8>
15. Abraham A., Giri S., Tripathi M., Singh R., Devi W., and Shukla V. - Optimization of fermentation conditions for the development of probiotic soymilk using *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 013 strain. *Int J Res Adv Eng Technol* **2** (3) (2014). <https://doi.org/10.1111/jfpp.12415>
16. Singleton V. L., Orthofer R., and Lamuela-Raventós R. M. - Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299** (1999) 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
17. Sharma O. P. and Bhat T. K. - DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* **113** (4) (2009) 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
18. Hwang H.-J. and Lee J.-H. - Quality characteristics of curd yogurt with *Rubus coreanum* Miquel juice. *Culinary science and hospitality research* **12** (2) (2006) 195-2005. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1640797>
19. Maciej S., Katarzyna C., Zbigniew S. - The mechanistic insights into the role of pH and solvent on antiradical and prooxidant properties of polyphenols - Nine compounds case study. *Food chemiscal* **407** (2023) 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134677>
20. Lodha D., Das S., and Hati S. - Antioxidant activity, total phenolic content and biotransformation of isoflavones during soy lactic-fermentations. *Journal of Food Processing and Preservation* **45** (6) (2021) 1-9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15583>



21. Hati S., Vij S., Singh B. P., Vandna K., and Surajit M. - Antioxidative activity and polyphenol content in fermented soy milk supplemented with WPC-70 by probiotic Lactobacilli. *International Food Research Journal* **20** (2013) 2125-2131.
22. Marazza J. A., Nazareno M. A., de Giori G. S., and Garro M. S. - Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Functional Foods* **4** (3) (2012) 594-601. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.03.005>
23. Lee Y.-K. and Salminen S. - The coming of age of probiotics - Trends in Food Science & Technology **6** (7) (1995) 241-245. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89085-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89085-8)

## ABSTRACT

### FERMENTABILITY OF *Limosilactobacillus fermentum* YU2301 FOR PLANT-BASED MILKS

Dinh Thi Thanh Vy, Le Thi Loan, Vo Hoai Hieu\*

*Yersin University*

\*Email: [vohoaihieu.96@gmail.com](mailto:vohoaihieu.96@gmail.com)

*Limosilactobacillus fermentum* YU2301 has the ability to ferment plant-based kinds of milk such as soy milk, peanut milk, red bean milk, lotus seed milk, and coconut milk. During the fermentation process, the pH of the kinds of milk gradually decreased and the lactic acid content gradually increased, at 24 hour the pH of the kinds of milk was below 4.5 and the lactic acid content was above 0.3 g/100mL. In addition, when using *L. fermentum* YU2301 to ferment plant milk, the ability to reduce DPPH free radicals increased, at 24 hours, the percentage of free radical scavenging was highest with 91.67%±2.08 (bean milk) peanuts with 1% v/v strains participating in fermentation) and 94.44%±1.20 (coconut milk with 2% v/v strains participating in fermentation). Total phenolic content decreased significantly with fermentation time. The density of *L. fermentum* YU2301 increased with fermentation time in all kinds of milk, up to 24 hours the concentration of *L. fermentum* YU2301 reached over 10<sup>8</sup> CFU/mL.

Keywords: *Limosilactobacillus fermentum*, fermentation, plant-based milks.