



**TRƯỜNG ĐẠI HỌC AN GIANG**  
**KHOA NÔNG NGHIỆP - TÀI NGUYÊN THIÊN NHIÊN**

---

**ĐẶNG THỊ CẨM TÚ**  
**MSSV: DTP010842**

**NGHIÊN CỨU CHẾ BIẾN SỮA KEFIR**

**LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP KỸ SƯ NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

**GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN**  
**ThS. Dương Thị Phượng Liên**  
**KS. Trần Xuân Hiền**

**Tháng 6 . 2005**

Ảnh 4 x 6

## **TIỂU SỬ CÁ NHÂN**

Họ và tên : ĐẶNG THỊ CẨM TÚ

Ngày tháng năm sinh : 08/11/1982

Nơi sinh : Châu Thành, Hậu Giang

Con Ông : ĐẶNG ANH TUẤN

và Bà : ĐƯỜNG THỊ THU BA

Địa chỉ : 040/10 QL 91A, Khu vực Bình Phước, Phường Phước Thới, Quận Ô Môn, Thành Phố Cần Thơ.

Vào Trường Đại học An Giang năm 2001 học lớp DH2TP1, khóa 2 thuộc Khoa Nông Nghiệp và Tài Nguyên Thiên Nhiên, đã tốt nghiệp kỹ sư ngành Công Nghệ Thực Phẩm năm 2005.

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC AN GIANG**  
**KHOA NÔNG NGHIỆP-TÀI NGUYÊN THIÊN NHIÊN**

Hội đồng chấm luận văn tốt nghiệp đã chấm thuận luận văn đính kèm với tên đề tài : **NGHIÊN CỨU CHẾ BIẾN SỮA KEFIR.**

Do sinh viên : **ĐẶNG THỊ CẨM TÚ.**

Thực hiện và bảo vệ trước Hội đồng ngày .....

Luận văn đã được Hội đồng đánh giá ở mức .....

Ý kiến của Hội đồng : .....

.....  
.....  
.....  
.....

Long xuyên, ngày . . . tháng .....năm 200....

**DUYỆT**

**Chủ Tịch Hội đồng**

**BAN CHỦ NHIỆM KHOA NN-TNTN**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC AN GIANG  
KHOA NÔNG NGHIỆP-TÀI NGUYÊN THIÊN NHIÊN**

**NGHIÊN CỨU CHẾ BIẾN SỮA KEFIR**

Do sinh viên : **ĐẶNG THỊ CẨM TÚ** thực hiện và đệ nạp  
Kính trình Hội đồng chấm luận văn tốt nghiệp xét duyệt.

Long xuyên, ngày.....tháng.....năm 200....

**GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN**

**Ths. Dương Thị Phượng Liên**

**Ks. Trần Xuân Hiễn**

## LỜI CẢM TẠ

*Để tích lũy được vốn kiến thức quý báu, để có thể hoàn thành tốt luận văn tốt nghiệp, đó là ơn sâu nghĩa nặng của tất cả thầy cô, người thân, bạn bè- những người đã chỉ bảo, gần gũi, giúp đỡ tôi trong 4 năm qua.*

*Xin chân thành cảm ơn cô **Dương Thị Phượng Liên** -Thạc sĩ Trường Đại Học Cần Thơ, Thầy **Trần Xuân Hiễn**-Bộ môn Công Nghệ Thực Phẩm, khoa NN-TNTN, Đại Học An Giang đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, cung cấp thông tin, kiến thức thật hữu ích cho tôi trong quá trình nghiên cứu.*

*Cảm ơn Ban Giám Hiệu, quý thầy cô bộ môn Công Nghệ Thực Phẩm, khoa NN-TNTN, Trường Đại Học An Giang, các giảng viên ĐHCT, giáo viên phản biện, các thầy cô phụ trách thư viện, phòng thí nghiệm, hóa chất, thiết bị... đã nhiệt tình giảng dạy, truyền đạt những kiến thức quý báu, cũng như đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài.*

*Con xin ghi nhớ công ơn ba mẹ, người đã sinh thành, dưỡng dục, dìu dắt tôi những bước đi đầu đời, tạo cho tôi hành trang vô giá để bước vào cuộc sống mới.*

*Lời cảm tạ sau cùng xin dành cho các bạn bè tôi, những người đã gần gũi, chia sẻ, giúp đỡ, và đồng hành với tôi trong suốt quãng đời Đại Học.*

*Long xuyên, ngày 25 tháng 5, năm 2005*

**Đặng Thị Cẩm Tú**

## TÓM LƯỢC

Sữa lên men Kefir là dạng thực phẩm mang giá trị dinh dưỡng cao, rất cần thiết cho con người và hiện đang được sản xuất phổ biến ở nhiều nước trên thế giới. Đây còn là sản phẩm có vai trò sinh học rất cao đối với cơ thể trong việc chống lão hóa và phòng ngừa một số bệnh mãn tính. Tuy nhiên, Kefir vẫn còn khá xa lạ với người tiêu dùng Việt Nam đặc biệt là khu vực ĐBSCL. Vì thế, để góp phần giới thiệu rộng rãi dạng thức uống này cũng như góp phần làm đa dạng, phong phú những dạng sản phẩm lên men từ sữa, đề tài tiến hành nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng và tính thương mại cho sản phẩm Kefir trên cơ sở chọn lựa các thông số tối ưu nhất qua các thí nghiệm :

- Khảo sát ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm. Thí nghiệm tiến hành phối chế với đường lactose ở 3 hàm lượng 0%, 5%, 10% và nước ép dâu với 3 tỉ lệ 0%, 10%, 20% so với dịch sữa, hàm lượng đường có sẵn trong sữa nguyên liệu là 4,6g/100ml, tỉ lệ men là 4%, lên men ở nhiệt độ phòng đến acid dừng 95<sup>o</sup>T, sau đó tiến hành phối chế thành phẩm với dịch siro và bảo quản ở 4-6<sup>o</sup>C

- Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ men giống đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm. Thí nghiệm khảo sát ở 4 tỉ lệ men: 2%, 4%, 6%, 8%.

- Khảo sát độ acid dừng thích hợp để kết thúc quá trình lên men. Thí nghiệm được khảo sát ở 4 mức: 85<sup>o</sup>T, 95<sup>o</sup>T, 105<sup>o</sup>T, 115<sup>o</sup>T.

- Khảo sát tỉ lệ phối chế thích hợp cho thành phẩm với siro ở nồng độ 20%, 25%, 30% với các tỉ lệ 20%, 30%, 40% theo dịch sữa.

- Khảo sát khả năng bảo quản sản phẩm.

Sau thời gian nghiên cứu, phân tích và tổng hợp số liệu chúng tôi rút ra các kết luận như sau:

- Tỷ lệ phối chế tốt nhất cho nguyên liệu là 5% đường lactose và 10% dịch dâu

- Tỷ lệ men giống thích hợp nhất là 6%

- Độ acid dừng thích hợp nhất là 105<sup>0</sup>T

- Tỷ lệ phối chế cho thành phẩm là 30% dịch siro nồng độ 25%

- Thời gian bảo quản tốt nhất là 15 ngày ở 4-6<sup>0</sup>C

## MỤC LỤC

Nội dung	Trang
CẢM TẠ.....	i
TÓM LƯỢC.....	ii
MỤC LỤC.....	iv
DANH SÁCH BẢNG.....	viii
DANH SÁCH HÌNH.....	ix
Chương 1 GIỚI THIỆU.....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục tiêu nghiên cứu.....	1
Chương 2 LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU.....	3
2.1. Giới thiệu về nguyên liệu.....	3
2.1.1. Tính chất lí hóa của sữa.....	3
2.1.1.1. Sữa là hệ phân tán cao.....	3
2.1.1.2. Độ chua của sữa.....	3
2.1.1.3. Tính oxi hóa của sữa.....	3
2.1.1.4. Khối lượng riêng.....	3
2.1.1.5. Áp suất thẩm thấu và nhiệt độ đông băng.....	4
2.1.1.6. Tính kháng khuẩn.....	4
2.1.2. Thành phần hóa học của sữa.....	4
2.1.2.1. Đường lactose.....	6
2.1.2.2. Chất béo.....	7
2.1.2.3. Protein.....	7
2.1.2.4. Khoáng.....	8
2.1.2.5. Vitamin.....	8
2.1.2.6. Hormone.....	8
2.1.2.7. Các hợp chất khác.....	8
2.1.3. Thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của dâu Tây.....	10
2.2. Cơ sở khoa học của quá trình lên men.....	10



2.2.1. Lên men lactic.....	10
2.2.2. Lên men ethanol.....	12
2.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng quá trình lên men.....	13
2.3. Giới thiệu về hạt Kefir.....	15
2.3.1. Nguồn gốc hạt Kefir.....	15
2.3.2. Thành phần hạt giống Kefir.....	16
2.3.2.1. Vi sinh vật trong hạt Kefir.....	16
2.3.2.2. Chu kỳ phát triển của giống Kefir.....	18
2.3.2.3. Kefiran.....	21
2.4. Một số loài vi khuẩn lactic quan trọng.....	22
2.5. Dinh dưỡng và lợi ích sức khỏe của Kefir.....	25
2.6. Phương pháp chế biến và bảo quản giống Kefir.....	25
2.7. Quy trình chế biến Kefir.....	27
2.7.1. Quy trình sản xuất men giống.....	27
2.7.2. Giải thích qui trình.....	27
2.7.3. Quy trình sản xuất Kefir.....	28
2.7.4. Giải thích qui trình.....	28
Chương 3 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	30
3.1. Phương tiện.....	30
3.1.1. Địa điểm nghiên cứu.....	30
3.1.2. Nguyên liệu.....	30
3.1.3. Dụng cụ và thiết bị.....	30
3.1.4. Hóa chất.....	30
3.2. Nội dung bố trí thí nghiệm.....	31
3.2.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.....	31
3.2.1.1. Mục đích .....	31
3.2.1.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.....	31
3.2.1.3. Chuẩn bị thí nghiệm.....	31

3.2.1.4. Tiến hành thí nghiệm.....	32
3.2.1.5. Chỉ tiêu xác định.....	32
3.2.2. Thí nghiệm 2 Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ men giống đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm.....	34
3.2.2.1. Mục đích .....	35
3.2.2.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.....	34
3.2.2.3. Chuẩn bị thí nghiệm.....	35
3.2.2.4. Tiến hành thí nghiệm.....	35
3.2.2.5. Chỉ tiêu xác định.....	35
3.2.3. Thí nghiệm 3 Khảo sát ảnh hưởng của độ acid dừng đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm.....	35
3.2.3.1. Mục đích .....	36
3.2.3.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.....	36
3.2.3.3. Chuẩn bị thí nghiệm.....	36
3.2.3.4. Tiến hành thí nghiệm.....	36
3.2.3.5. Chỉ tiêu xác định.....	37
3.2.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát tỉ lệ phối chế thích hợp cho thành phẩm.....	38
3.2.4.1. Mục đích .....	38
3.2.4.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.....	37
3.2.4.3. Chuẩn bị thí nghiệm.....	38
3.2.4.4. Tiến hành thí nghiệm.....	38
3.2.4.5. Chỉ tiêu xác định.....	38
3.2.5. Thí nghiệm 5 Khảo sát và tìm chế độ bảo quản thành phẩm.....	39
3.2.5.1. Mục đích.....	38
3.2.5.2. Tiến hành thí nghiệm.....	38
3.3. Phương pháp phân tích và xử lí số liệu.....	38
3.3.1. Phương pháp phân tích.....	40
Chương 4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	40

4.1. Ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.....	40
4.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ men giống đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm.....	45
4.3. Ảnh hưởng của độ acid dừng đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm.....	49
4.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ phối chế sau lên men đến hình thái và chất lượng sản phẩm.....	51
4.5. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến chất lượng sản phẩm .....	52
Chương 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	54
Phụ chương I.....	pc-1
Phụ chương II.....	pc-4

## DANH SÁCH BẢNG

Bảng số	Tựa bảng	Trang
1	Mối liên hệ giữa các đơn vị đo độ chua của sữa.....	3
2	Thành phần của một số loại sữa.....	4
3	Các thành phần chính của một lít sữa.....	4
4	Thành phần hoá học của dâu tây.....	10
5	Biến đổi các thành phần của sữa tạo thành Kefir.....	14
6	Các vi sinh vật có trong hạt Kefir.....	19
7	Giá trị nhiệt độ và pH tối ưu cho sự sinh trưởng của một số loài vi khuẩn lactic.....	24
8	Bảng điểm đánh giá cảm quan sản phẩm Kefir.....	33
9	Ảnh hưởng của hàm lượng đường lactose và nước ép dâu đến thời gian lên men, độ cồn và mật số vi sinh vật.....	40
10a	Kết quả đánh giá cảm quan mùi vị sản phẩm ( từng nhân tố).....	44
10b	Kết quả đánh giá cảm quan mùi vị sản phẩm ( tương tác 2 nhân tố).45	
11	Ảnh hưởng của tỷ lệ men đến độ cồn, nấm men, vi khuẩn và thời gian lên men.....	46
12	Kết quả cảm quan mùi vị sản phẩm.....	48
13	Kết quả cảm quan mùi vị và hình thái sản phẩm.....	51
14a	Kết quả cảm quan mùi, vị và hình thái sản phẩm theo thang điểm mô tả (từng nhân tố).....	51
14b	Kết quả cảm quan mùi, vị và hình thái sản phẩm theo thang điểm mô tả (tương tác 2 nhân tố).....	52
15	Bảng chỉ tiêu lý hoá, vi sinh của sản phẩm theo thời gian bảo quản..53	

## DANH SÁCH HÌNH

Hình số	Tựa hình	Trang
1	Sơ đồ tóm lược chuyển hoá các chất trong quá trình lên men sữa.....	12
2	Hạt Kefir sau khi được vớt ra khỏi sữa.....	16
3	Hình dạng, kích thước hạt Kefir nguyên vẹn sau khi đã cắt đôi.....	17
4	Ảnh chụp hạt giống Kefir dưới kính hiển vi điện tử gồm vi khuẩn nấm men và các chất gian bào.....	18
5	Hạt Kefir và bảo quản hạt Kefir.....	26
6	Nguyên liệu dùng cho chế biến sữa Kefir.....	39
7	Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa độ acid theo hàm lượng đường lactose và dịch dậu.....	41
	.....	42
8	Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa độ cồn theo hàm lượng đường lactose và dịch dậu.....	42
9	Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa mật số nấm men theo đường lactose và dịch dậu.....	43
10	Sự tương quan giữa mật số vi khuẩn theo hàm lượng lactose và dịch dậu.....	43
11	Sự tương quan giữa độ acid và độ cồn theo tỉ lệ men giống.....	47
12	Sự tương quan giữa độ acid và thời gian lên men theo tỉ lệ men giống.....	47
13	Sự tương quan giữa mật số nấm men và vi khuẩn theo tỉ lệ men giống.....	48
14	Sự tương quan giữa thời gian lên men và độ cồn theo độ acid dùng.....	51
15	Sản phẩm Kefir.....	54

## **Chương 1 GIỚI THIỆU**

### **1.1. Đặt vấn đề**

Ngày nay, sữa lên men chua là một trong những sản phẩm đang được ưa dùng và đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của con người. Ngoài việc cung cấp nguồn dinh dưỡng thiết yếu, nó còn được biết đến với tính chất kháng một số bệnh: ung thư, chống lão hoá và tăng cường tiêu hoá. Mang đầy đủ tính chất trên và đang có tiềm năng phát triển cao trên thế giới - Sữa Kefir (một sản phẩm sữa chua mới) cần được quan tâm nghiên cứu và phát triển. Khác với sữa chua thông thường, Kefir là sản phẩm vừa lên men lactic nhờ nhóm vi khuẩn lactic ưa ấm, vừa lên men rượu nhờ nấm men. Sản phẩm từ lâu đã được biết đến như một loại thuốc thiên nhiên với nhiều được tính được minh chứng qua quá trình sử dụng ở nhiều vùng trên thế giới, nó giúp tăng cường khả năng miễn dịch, giảm căng thẳng thần kinh, làm tan sạn mật, sạn thận, điều hoà huyết áp, làm ngưng sự tăng trưởng của tế bào ung thư và những lợi ích sức khoẻ khác mà cho đến nay vẫn còn được xem là những điều bí mật.

Song, sản phẩm này tuy đã có mặt từ rất lâu đời trên thế giới, nhưng vẫn còn rất mới trên thị trường tiêu thụ Việt Nam. Do đó, để góp phần giúp cho sản phẩm Kefir ngày càng phổ biến và quen thuộc với người tiêu dùng, việc nghiên cứu nâng cao chất lượng và làm đa dạng phong phú cho sản phẩm Kefir sẽ được giới thiệu ở luận văn này.

### **1.2. Mục tiêu nghiên cứu**

Sữa kefir sẽ được nghiên cứu chế biến ở phòng thí nghiệm với trọng tâm là giải quyết các vấn đề có liên quan đến chất lượng và thời gian bảo quản. Trên cơ sở đó đề tài nghiên cứu các vấn đề sau:

- Khảo sát ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.
- Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ men giống đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.
- Khảo sát ảnh hưởng của độ acid dừng đến chất lượng sản phẩm.

- Khảo sát tỉ lệ phối chế thích hợp cho thành phẩm.
- Khảo sát khả năng bảo quản thành phẩm.

## Chương 2 LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU

### 2.1. Giới thiệu về nguyên liệu

#### 2.1.1. Tính chất lí hoá của sữa

##### 2.1.1.1. Sữa là hệ phân tán cao

Các thành phần của sữa tuy có tính chất khác nhau nhưng khi hòa vào môi trường nước được thể đồng nhất và phân tán cao. Lactose và glucose tan trong nước ở dạng phân tử, còn muối của acid hữu cơ, vô cơ tồn tại ở dạng ion. Protein dạng keo, chất béo sữa dạng hạt phân tán cao.

##### 2.1.1.2. Độ chua của sữa

Có nhiều đơn vị để biểu diễn độ chua của sữa như độ Soxhlet Henkel ( $^{\circ}\text{SH}$ ), độ Thorner ( $^{\circ}\text{T}$ ), độ Dornic ( $^{\circ}\text{D}$ ). Thông thường độ chua của chuẩn độ được định nghĩa là số ml dung dịch NaOH 0.1N dùng để trung hòa acid của 100ml dịch sữa. Sữa thường có độ chua trung bình là  $16 \div 18^{\circ}\text{T}$  (độ Thorner).

**Bảng 1: Mối liên hệ giữa các đơn vị đo độ chua của sữa**

	$^{\circ}\text{SH}$	$^{\circ}\text{Th}$	$^{\circ}\text{D}$
$^{\circ}\text{SH}$	1	2,50	2,25
$^{\circ}\text{Th}$	0,40	1	0,90
$^{\circ}\text{D}$	4/9	10/9	1

(Lâm xuân Thanh, 2003)

##### 2.1.1.3. Tính oxi hoá khử của sữa

Do trong sữa chứa nhiều chất có khả năng khử hay oxi hóa như: acid ascorbic, tocopherol, riboflavin, systin, men.....làm cho sữa cũng có tính chất đó.

##### 2.1.1.4. Khối lượng riêng

Khối lượng riêng của sữa phụ thuộc hàm lượng chất béo cũng như các chất tan trong sữa. Trung bình sữa có khối lượng riêng  $d = 1,027 \div 1,032$ , số liệu này thay đổi tùy giống, loài, thời kỳ cho sữa. Khi pha thêm nước vào sữa sẽ làm thay đổi giá trị này.



### 2.1.1.5. Áp suất thẩm thấu và nhiệt độ đóng băng

Áp suất thẩm thấu ( $P_{tt}$ ) của sữa được tạo ra bởi những chất phân tán cao như đường lactose, muối. Bình thường  $P_{tt} = 6 \text{ atm}$  ở  $0^{\circ}\text{C}$ .

Nhiệt độ đóng băng của sữa là  $-0,55^{\circ}\text{C}$ . Căn cứ vào nhiệt độ đóng băng có thể biết được sữa có bị pha thêm nước vào hay không.

### 2.1.1.6. Tính kháng khuẩn

Sữa khi mới vắt xong, thường vi sinh vật không phát triển được mà có thể bị tiêu diệt vì trong sữa có chất kháng thể.

### 2.1.2. Thành phần hoá học của sữa

Nguyên liệu sử dụng chính trong sản xuất Kefir là sữa, thành phần cơ bản trong sữa các loài động vật bao gồm nhóm chủ yếu như bảng 2

**Bảng 2: Thành phần của một số loại sữa**

Loại sữa	Protein %	Casein %	Whey protein %	Chất béo %	Cacbohydrat %	Tro %
Sữa mẹ	1.2	0.5	0.7	3.8	7.0	0.2
Sữa ngựa	2.2	1.3	0.9	1.7	6.2	0.5
Sữa bò	3.5	2.8	0.7	3.7	4.8	0.7
Sữa trâu	4.0	3.5	0.5	7.5	4.8	0.7
Sữa dê	3.6	2.7	0.9	4.1	4.7	0.8
Sữa cừu	5.8	4.9	0.9	7.9	4.5	0.8

(Lê Thị Liên Thanh, 2003)

**Bảng 3: Các thành phần chính của một lít sữa**

Các thành phần	Mô tả	Trọng lượng	%
Nước	Pha lỏng	902	87,40
Glucid (40-60g/l)	Dạng tự do: lactose ( do galactose và glucose) ở trạng thái phân tử. Dạng kết hợp: galactose, galactozamin, acid sialic ở trạng thái keo, được liên kết với protein <1g/l.	49	4,75
Chất béo (25-45 g/l)	Ở dạng cầu béo: là những giọt chất béo có đường kính từ $1 \div 10 \mu\text{m}$ , được bao bằng một màng lipoprotein, ở dạng nhũ tương. Ở dạng các hợp chất hoà tan trong chất	39	3,78

	béo: các sắc tố ( $\beta$ caroten), sterol(cholesterol), các vitamin		
Hợp chất Nito (25-40 g/l)	Ở dạng mixen 28g: dạng huyền phù, là phức của phosphat canxi liên kết với một liên hợp của casein. Ở dạng hoà tan 4,7g: là những cao phân tử của albumin và immunoglobulin	33	3,20
	Nito phi protein 0,3g: ure axit uric creatin		
Chất khoáng (25-40g/l)	Ở trạng thái keo và hoà tan: Ở dạng phân tử và ion: axit citrit, K, Ca, P, Na, Cl, Mg Ở dạng các nguyên tố trung lượng (oligo-elemen): Zn, Al, Fe, Cu, I...	9	0,87
Chất khô tổng số (MST)	Sữa đã được làm bốc hơi nước	130	12,60
Các chất khác	Các chất xúc tác sinh học: các vitamin (A, D, E, K, B1, B2, PP, B6, B12, C...) và các enzym. Các khí hoà tan: CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> chiếm 4÷5% thể tích sữa	Vết	

(Lâm Xuân Thanh, 2003)

### 2.1.2.1. Đường lactose

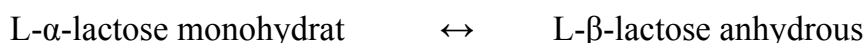
Lactose là một disaccharide do một phân tử glucose và một phân tử galactose liên kết với nhau tạo thành. Trong sữa đường lactose tồn tại dưới hai dạng:

- Dạng  $\alpha$ -lactose monohydrat  $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$  (phân tử  $\alpha$ -lactose ngậm một phân tử  $H_2O$ )

- Dạng  $\beta$ -lactose anhydrous  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (phân tử  $\beta$ -lactose khan). Tỷ lệ hàm lượng giữa  $\alpha$ -lactomonohydrate và  $\beta$ -lactose anhydrous trong sữa phụ thuộc vào giá trị pH và nhiệt độ của sữa.

Khi hoà tan đường  $\alpha$ -lactose monohydrat dạng tinh thể vào nước, góc quay cực của dung dịch sẽ là  $+89,4^\circ C$

Nếu giữ dung dịch này ở nhiệt độ phòng, sau 24 giờ góc quay cực sẽ giảm xuống giá trị  $+55^\circ$ . Đó là do một số phân tử  $\alpha$ -lactose monohydrat đã chuyển sang dạng  $\beta$ -lactose anhydrous. Khi đó dung dịch sẽ tồn tại cân bằng:



Việc giảm giá trị góc quay cực của dung dịch  $\alpha$  - lactose monohydrat sẽ diễn ra với tốc độ nhanh hơn nếu pH được kiềm hoá về giá trị 9,0 hoặc dung dịch được gia nhiệt ở  $75^\circ C$ .

Lactose là đường khử, độ ngọt của lactose thấp hơn nhiều so với các disaccharide và monosaccharide thường gặp. Nếu như độ ngọt của saccharose được đánh giá với chỉ số 100, của maltose là 32, glucose là 74 và fructose là 173 thì độ ngọt của lactose chỉ đạt 16. Lactose có thể bị thủy phân tạo ra 2 monosaccharide là glucose và galactose bởi enzym  $\beta$  -galactoside (lactase)

Các đường đơn giản như glucose, fructose, saccharose, có nhiều trong thực vật (hoa, trái cây các loại). Tuy nhiên chỉ có sữa động vật là nguồn chứa lactose duy nhất trong tự nhiên

Ngoài lactose, trong sữa còn có glucose (hàm lượng trung bình 70mg/l), galactose (20mg/l) và các hợp chất glucid chứa Nitơ như N-acetyl glucosamine, N-acetyl galactosamine, acid N-acetyl neuraminic... Tuy nhiên, hàm lượng của chúng rất thấp, chỉ ở dạng vết.

### 2.1.2.2. Chất béo

Là thành phần quan trọng, về dinh dưỡng chất béo có độ sinh năng lượng cao, chứa các vitamin trong chất béo (A, D, E). Với sản phẩm sữa lên men, chất béo ảnh hưởng tới mùi vị, trạng thái sản phẩm. Có 98÷99% chất béo là triglycerid, 1÷2% còn lại là các phospholipid, cholesterol, vitamin A, D, E, K.

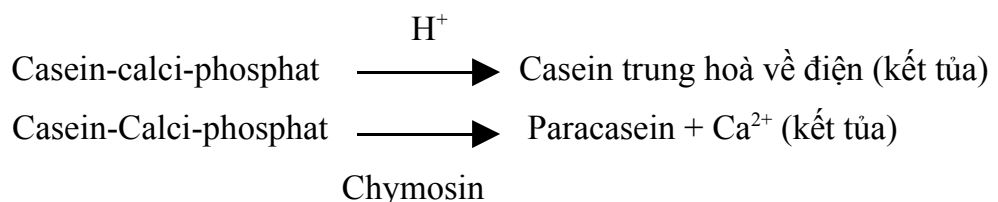
Trong sữa có 18 acid béo. Mỗi glyxerol có thể kết hợp với 3 acid béo cùng loại hoặc khác loại nên số glyxeride khác nhau là vô cùng lớn. Lớp váng sữa trên bề mặt có nhiều thể hình cầu kích thước khác nhau nổi tự do trong sữa, mỗi thể cầu được bao bọc bằng một màng mỏng. Thể cầu mỡ này có màng bao từ protein và các phosphatide (rất bền) có tác dụng bảo vệ giữ cho chúng không bị phá hủy bởi các enzym trong sữa (đường kính cầu mỡ 0,1÷20µm (trung bình 3÷4 µm), có 3000 đến 4000 triệu cầu mỡ/1ml sữa, là thành phần nhẹ nhất trong sữa (tỷ trọng 0,925g/cm<sup>3</sup>) và có xu hướng nổi lên bề mặt. Phần còn lại ngoài các cầu mỡ là sữa gầy.

Acid béo chiếm 98÷99% tổng chất béo, khác với mỡ động vật là chứa nhiều acid béo no khối lượng phân tử thấp.

### 2.1.2.3. Protein

Bao gồm casein từ 2÷4,5%, α-lactose albumin: 0,5%÷1% β-lactose globulin 0,1%, khoảng 0,1% là các protid khác.

Protein sữa là loại protid hoàn thiện chứa hầu hết các loại acid amin có trong tự nhiên và có tỉ lệ cân đối thích hợp cho sự hấp thu và đồng hoá của cơ thể người. Casein có tính chất keo, được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến sữa. Casein thường ở dạng phức chất casein-calcium-phosphat bền vững với hai lớp bảo vệ (lớp điện tích trái dấu và lớp nước liên kết, các phức chất liên kết lại với nhau tạo thành kết tủa (keo hoá), có thể keo hoá bằng acid lactic hoặc men chymozin theo phản ứng:



Sữa đã tách casein biến thành dạng trong, nước còn lại chứa các protein hoà tan như  $\alpha$ -lactose-globulin và globulin kháng thể được gọi là các protein nước sữa (whey). Các chất chứa nitơ phi protein bao gồm các acid amin tự do, creatin, acid uric, polipeptit, ure... Trong tất cả hợp chất trên thì acid amin là có ý nghĩa hơn cả.

#### 2.2.2.4. Khoáng

Hàm lượng chất khoáng trong sữa dao động từ 8÷10g/l các muối trong sữa ở dạng hoà tan hoặc dung dịch keo (kết hợp với casein)

Trong số các nguyên tố khoáng có trong sữa, chiếm hàm lượng cao nhất là calci, phospho và magie. Một phần chúng tham gia vào cấu trúc micelle, phần còn lại nằm dưới dạng muối hoà tan trong sữa. Các khoáng khác như K, Na, Cl đóng vai trò chất điện ly. Cùng với lactose chúng góp phần cân bằng áp lực thẩm thấu của sữa trong bầu vú động vật với áp lực máu.

Ngoài ra, sữa còn chứa các nguyên tố khác như Zn, Fe, I, Cu, Mo. Chúng rất cần thiết cho quá trình dinh dưỡng của con người. Một số nguyên tố độc hại như Pb, As... đôi khi cũng được tìm thấy ở dạng vết trong sữa bò.

#### 2.1.2.5. Vitamin

Vitamin sữa được chia làm hai nhóm: Vitamin hoà tan trong nước gồm B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, C... và vitamin hoà tan trong chất béo gồm A, D, E, K. Nhìn chung hàm lượng vitamin nhóm B trong sữa bò thường ổn định do chúng được tổng hợp chủ yếu bởi vi khuẩn trong ngăn thứ nhất dạ dày của nhóm động vật nhai lại và không phụ thuộc vào điều kiện ngoại cảnh. Tuy nhiên, hàm lượng vitamin tan trong chất béo bị ảnh hưởng sâu sắc bởi thành phần thức ăn và điều kiện thời tiết.

#### 2.1.2.6. Hormone

Hormone do các tuyến nội tiết tiết ra và giữ vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng của động vật. Trong sữa bò ta có thể tìm thấy nhiều loại hormone, chúng được chia thành 3 nhóm là proteohormone, hormone peptide và hormone steroid, trong số đó prolactin được nghiên cứu nhiều hơn cả.

Hàm lượng trung bình prolactine trong sữa bò là  $50\mu\text{g/l}$ , trong sữa non là  $23\text{mg/l}$ . Đa số bị mất hoạt tính khi thanh trùng ở nhiệt độ thấp ( $60\div 65^{\circ}\text{C}$ ).

#### 2.1.2.7. Các hợp chất khác

Trong sữa bò còn chứa các chất khí, chủ yếu là  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  và  $\text{N}_2$ . Tổng hàm lượng chúng chiếm từ  $5\div 6\%$  thể tích sữa. Các chất khí trong sữa thường tồn tại ở 3 dạng: dạng hoà tan, dạng liên kết hoá học với các chất khác và dạng phân tán. Khí ở dạng hoà tan hay phân tán thường gây ra một số khó khăn trong các qui trình chế biến sữa. Do đó sữa tươi thường được qua xử lý bài khí trước khi chế biến.

Thỉnh thoảng người ta còn phát hiện trong sữa có các hợp chất hoá học khác như:

- Chất kháng sinh: penicilline, chloramphenicol...
- Chất tẩy rửa: nước Javel, kiềm...
- Pesticide: heptachlore và các epoxyde, aldrine, dieldrin, chlordane.
- Kim loại nặng
- Nguyên tố phóng xạ, nitrat, độc tố vi sinh vật.

Những hợp chất này gây độc cho người sử dụng. Hàm lượng chúng trong sữa thường ở dạng vết và thường nhiễm vào sữa từ nguồn thức ăn, thiết bị, dụng cụ chứa và môi trường chuồng trại...

### 2.1.3. Thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của dâu Tây

**Bảng 4: Thành phần hóa học của dâu Tây**

Thành phần	Hàm lượng	Đơn vị
Nước	89,90	g
Protein	0,70	g
Béo	0,50	g
Cabohydrat	8,40	g
Ca	21,00	mg
P	21,00	mg
Fe	1,00	mg
Na	1,00	mg
Potassium	164,00	mg
Mg	12,00	mg
Vitamin A	60,00	UI
Vitamin B1	0,03	mg
Vitamin B2	0,07	mg
Vitamin C	59,00	mg
Niacin	0,60	mg
Năng lượng	37,00	Cal

(Nguyễn Minh Thủy, 2003)

## 2.2. Cơ sở khoa học của quá trình lên men

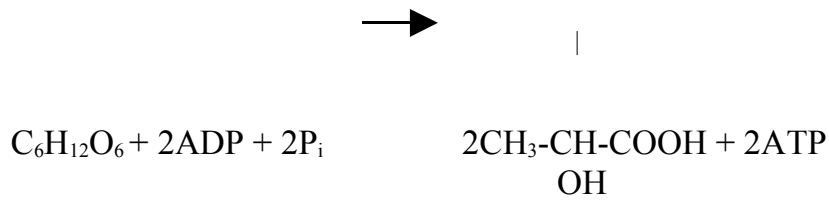
### 2.2.1. Lên men lactic

Trong công nghệ vi sinh vật, nhìn chung vi khuẩn lactic đồng hình luôn chiếm ưu thế. Tuy nhiên, trong công nghệ sản xuất các thực phẩm lên men truyền thống như phomai, Kefir, vi khuẩn lactic dị hình đôi khi vẫn được sử dụng nhằm mục đích đa dạng hoá chỉ tiêu về mùi vị và cấu trúc cho sản phẩm.

Quá trình lên men diễn ra trong tế bào chất của vi khuẩn. Đầu tiên đường lactose trong sữa được vi khuẩn lactic đưa vào tế bào nhờ cơ chế vận chuyển đặc trưng của màng tế bào chất (Cytoplasmic membrane). Tiếp theo lactose sẽ được phân thành 2 monosacharide rồi đi vào các chu trình chuyển hoá khác nhau.

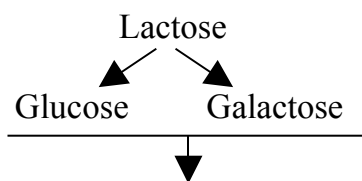
Đối với nhóm vi khuẩn lactic đồng hình như giống *Lactococcus*, các loài *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacilus bulgaricus*, *Lactobacilus helveticus*, *Lactobacilus lactic*.... chu trình đường phân là con đường chính chuyển hoá glucose thành acid lactic.

Phương trình tổng quát của lên men đồng hình:

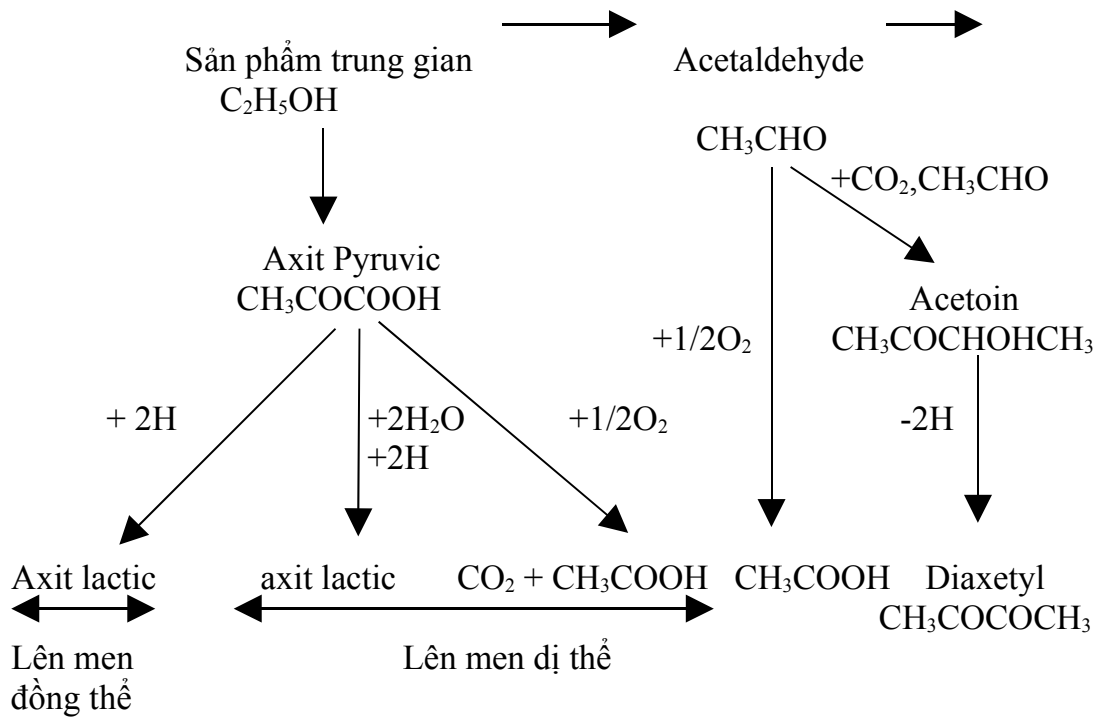


Lên men lactic là một quá trình trao đổi năng lượng. Các phân tử ATP được hình thành trong quá trình chuyển hóa cơ chất (lactose) sẽ được vi khuẩn giữ lại trong tế bào để phục vụ cho quá trình trao đổi chất và sinh trưởng của vi sinh vật. Ngược lại, các sản phẩm như acid lactic, ethanol, CO<sub>2</sub> được vi khuẩn thải vào môi trường lên men. Kết quả là hàm lượng acid lactic tích lũy trong môi trường lên men ngày càng tăng, làm giảm pH môi trường và kéo theo những biến đổi hóa lý khác.

Trong quá trình lên men lactic ngoài sản phẩm acid lactic (lên men đồng hình), acid acetic, ethanol, CO<sub>2</sub> (lên men dị hình) trong dịch lên men còn xuất hiện cả trăm hợp chất hóa học mới khác. Chúng là sản phẩm trung gian hoặc sản phẩm phụ của quá trình lên men. Hàm lượng của chúng trong dịch lên men thường rất thấp (vài ppm hoặc ít hơn). Một số hợp chất trong nhóm trên rất dễ bay hơi. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc góp phần hình thành nên mùi vị đặc trưng cho những sản phẩm lên men lactic. Đáng chú ý nhất là diacetyl và acetaldehyde, đây là những hợp chất quan trọng quyết định đến mùi vị đặc trưng cho sản phẩm lên men từ sữa.







**Hình 1: Sơ đồ tóm lược chuyển hoá các chất trong quá trình lên men sữa**

Tỷ lệ hàm lượng diacetyl và acetaldehyde ảnh hưởng đến giá trị cảm quan của yaourt và bơ. Tỷ lệ này phụ thuộc vào thành phần các vi sinh vật sử dụng trong tổ hợp giống và các thông số kỹ thuật của quá trình lên men như nhiệt độ, pH đầu, lượng giống cấy...

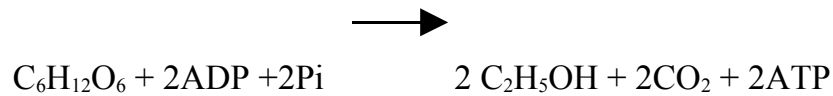
### 2.2.2. Lên men ethanol

Trong công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men từ sữa, quá trình lên men ethanol được thực hiện chủ yếu bởi các nấm men thuộc giống *Sacharomyces* và *Kluyveromyces*. Sau khi được vận chuyển vào trong tế bào chất, đường hexose được chuyển hóa theo chu trình đường phân để tạo thành acid pyruvic. Tiếp theo acid pyruvic sẽ được chuyển hoá thành acetaldehyde rồi thành ethanol

Dihydroxyacetone phosphat là một sản phẩm trung gian trong chu trình đường phân, hợp chất này có thể chuyển hoá thành glyxerol.

Trong môi trường pH acid, glycerol chỉ được tạo ra với hàm lượng nhỏ. Ngược lại, trong môi trường pH kiềm lượng glyxerol sinh ra sẽ tăng lên rất nhiều và glycerol sẽ trở thành một trong những sản phẩm chủ yếu của quá trình lên men.

Phương trình tổng quát của quá trình lên men trong môi trường pH acid



Sự chuyển hóa đường hexose thành ethanol và khí CO<sub>2</sub> diễn ra trong tế bào chất của nấm men. Đây là quá trình trao đổi năng lượng của nấm men trong điều kiện kỵ khí. Ethanol và CO<sub>2</sub> trong tế bào chất sẽ được nấm men thải vào môi trường lên men. Ngoài ra tế bào nấm men còn tổng hợp và thải vào dịch lên men hàng trăm sản phẩm phụ và sản phẩm lên men khác, những hợp chất này được tìm thấy với hàm lượng rất nhỏ, chúng được chia thành 4 nhóm: glyxerol cùng rượu bậc cao, aldehyde, acid hữu cơ và ester.

Trong quá trình lên men ethanol, nhiều acid hữu cơ được tạo thành (The Moll, 1990). Một số acid hữu cơ được sinh tổng hợp từ chu trình Crebs nếu như quá trình lên men không diễn ra trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt, các acid hữu cơ chiếm hàm lượng cao nhất trong dịch lên men là: acid citric, malic, acetic, lactic...

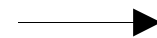
### 2.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng quá trình lên men

Các quá trình lên men trong sản xuất công nghiệp có thể tóm tắt như sau:

Môi trường trước khi lên men

Môi trường sau lên men

Cơ chất + giống vi sinh vật



Cơ chất sót + sinh khối vi sinh vật + sản phẩm trao đổi chất ngoại bào do vi sinh vật tổng hợp nên.

Trong công nghiệp sản xuất các sản phẩm lên men từ sữa như: yaourt, Kefir... . Các giai đoạn xử lý sản phẩm sau quá trình lên men thường đơn giản, sản phẩm cuối cùng bao gồm cả sinh khối vi sinh vật, các sản phẩm trao đổi chất ngoại bào do vi sinh vật tiết ra và cơ chất sót. Thành phần và hàm lượng của từng chất sẽ góp phần hình thành nên hương vị sản phẩm. Do đó, để sản xuất thực phẩm lên men với chất lượng mong muốn, cần phải:

- Chọn được giống vi sinh vật thích hợp.
- Xác định môi trường lên men với cơ chất đầy đủ theo tỷ lệ tối ưu.
- Xác định được các điều kiện lên men thích hợp như lượng giống cấy nhiệt độ và thời gian lên men. Ngoài ra còn phải quan tâm đến những vấn đề như cung cấp oxy và khuấy trộn.

**Bảng 5: Biến đổi các thành phần từ sữa tạo thành Kefir**

Thành phần	Chú thích
Chất béo	Phụ thuộc nguồn sữa ban đầu (bò, dê...) và lượng béo của sữa được dùng (nguyên béo, tách béo một phần hay không béo)
Lactose	Tiêu thụ một phần lactose, bởi vi khuẩn lactic và nấm men. Lactose trên 100 g sản phẩm sữa Kefir: 2÷2,5 g
Acid lactic	Hình thành bởi vi khuẩn lactic. Trên 100 g sản phẩm sữa Kefir có 0,6÷1 g
Protein	Chiếm 3÷3,4 g/100 sản phẩm sữa Kefir
Ethanol	Sản sinh bởi nấm men nếu dùng men: lượng còn là 0,01÷0,1/100 g sữa, nếu dùng hạt Kefir lượng còn là 0,02÷1,8 g/100 g sữa
Các acid hữu cơ khác	Axetic, fomic, propionic, Succinic, pyruvic, iso butyric, caproic, acid lauric... góp phần tạo hương cho Kefir hay được tiêu thụ bởi chính loài vi khuẩn trong suốt quá trình lên men.
CO <sub>2</sub>	Sinh ra nhờ nấm men và vi khuẩn lactic lên men dị thể sinh CO <sub>2</sub> tạo tính đặc trưng cho Kefir.
Hợp chất thơm	Acetaldehyde, diacetyl, acetone góp phần vào hương của sản phẩm
Vitamin	Tăng vitamin B (đối với sữa cừ), pyridoxine (từ sữa cừ, dê, ngựa), acid folic (trừ sữa ngựa), orotic, nicotinic, acid pantothenic: không đổi hay giảm khi cô đặc

(Nguyễn Tú Thanh, 2003)

## 2.3. Giới thiệu về hạt kefir

### 2.3.1. Nguồn gốc hạt Kefir

Cách đây hàng nghìn năm, Kefir được biết đến như một thứ nấm dùng chữa bệnh, nó xuất xứ từ cách nuôi riêng của các tu sĩ Ấn Độ. Đây là loại nấm vi khuẩn có thể làm biến đổi sữa nhờ một hệ vi sinh vật phức tạp gồm nhiều loài vi khuẩn và nấm men được chứng minh là rất có lợi cho sức khỏe. Dân miền núi Caucasus thuộc nước Xô Viết cũ - nguyên quán của Kefir - đã bào chế nó từ sữa của các sinh vật khác nhau và Kefir được lên men tự nhiên trong những túi da thú, theo các bộ tộc người ở đây họ xem Kefir như là quà tặng của đấng Allah, như nguồn tài sản của gia đình và của bộ tộc, họ tiêu thụ Kefir từ thuở ấu thơ và cứ như vậy duy trì từ thế hệ này đến thế hệ khác. Họ không hề biết đến bệnh ung thư, bệnh lao, bệnh dạ dày.. và họ thọ đến trung bình là 110 tuổi. Núi Caucasus là vùng duy nhất trên địa cầu mà người ta đạt sức khỏe hoàn toàn ở lứa tuổi này. Từ rất sớm các bác sĩ Nga đã rất tin tưởng rằng Kefir có lợi cho sức khỏe và có khả năng chữa bệnh.

Mãi đến những năm đầu của thế kỷ 20 hạt Kefir mới được sản xuất với số lượng nhỏ ở Moscow. Nguyên liệu để sản xuất Kefir có thể là sữa dê, sữa cừu hay sữa bò. Theo Oberman H và Libudiziz Z (1998) đầu tiên người ta lên men sữa thành Kefir trong các túi bằng da thú hoặc bồn bằng gỗ sồi. Đến cuối thế kỷ 19, Kefir trở thành sản phẩm quen thuộc của dân các nước vùng đông âu (Nga, Ucraina, Balan, Czech, Hungari...) và các nước vùng Scandinavia. Tuy nhiên để sản xuất sản phẩm Kefir cho mục đích thương mại mà vẫn giữ được chất lượng như sản phẩm truyền thống là một điều không dễ dàng vì theo truyền thống thì người ta không sử dụng những vật dụng bằng kim loại cho quá trình chế biến mà chỉ từ các dụng cụ bằng gỗ, đất sét hoặc da thú. Đến 1950, một phương pháp sản xuất Kefir mới đã được công nhận về chất lượng đó là phương pháp lên men có khuấy trộn.

Hiện nay có hai loại Kefir, một loại có vị ngọt được lên men với nước trái cây và đường, một loại được lên men từ sữa. Hệ vi sinh vật sử dụng trong sản phẩm Kefir bao gồm vi khuẩn lactic và nấm men. Chúng cùng phát triển cộng sinh trên môi trường sữa. Do đó sản phẩm Kefir có vị chua đặc trưng và thoảng nhẹ mùi nấm men.

Ở luận văn này sẽ nghiên cứu sự lên men kết hợp giữa hai loại nước ép trái cây và sữa, một loại sản phẩm khác với những loại sữa lên men truyền thống như yaourt với hương vị rất mới lạ, đặc trưng và có lợi cho sức khoẻ.

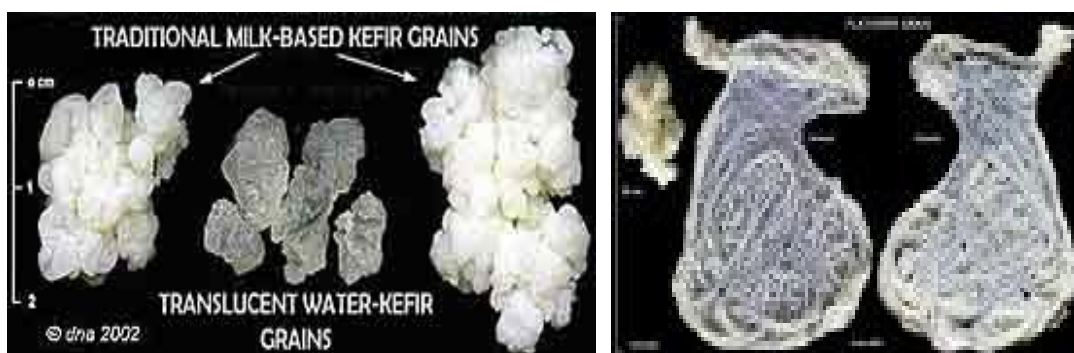


**Hình 2: Hạt Kefir sau khi được vớt ra khỏi sữa**  
([www.Kleibers.de/.../guido/4a\\_kefir\\_tibet.jpg](http://www.Kleibers.de/.../guido/4a_kefir_tibet.jpg))

### 2.3.2. Thành phần hạt giống Kefir

#### 2.3.2.1. Vi sinh vật trong hạt Kefir

Trong sản xuất Kefir, người ta sử dụng tổ hợp giống vi sinh vật dưới dạng hạt Kefir ( Kefir Grains). Các hạt Kefir có màu từ trắng đến vàng nhạt, hình dạng không ổn định và thường kết thành chùm với nhau tạo dạng tương tự hoa Chou-fleur với đường kính trung bình  $0,3 \div 2$  cm. Hạt Kefir là phức hệ vi sinh vật gắn với nhau bởi chất polisaccharide. Giống này bao gồm vi khuẩn lactic (*Lactobacilli*, *Lactococci*, *Leuconostoc*..) và nấm men. Đôi khi ta còn tìm thấy vi khuẩn *A.aceti* và *A.racens* cùng với các vi sinh vật khác tổ chức thành khối cầu vi sinh vật . Tuy vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn nhưng từ hàng nghìn năm qua sự tiêu thụ đã chứng minh được rằng hệ vi sinh vật trong Kefir là không gây bệnh mà còn có khả năng ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh như *Salmonella* hay *Singella*.



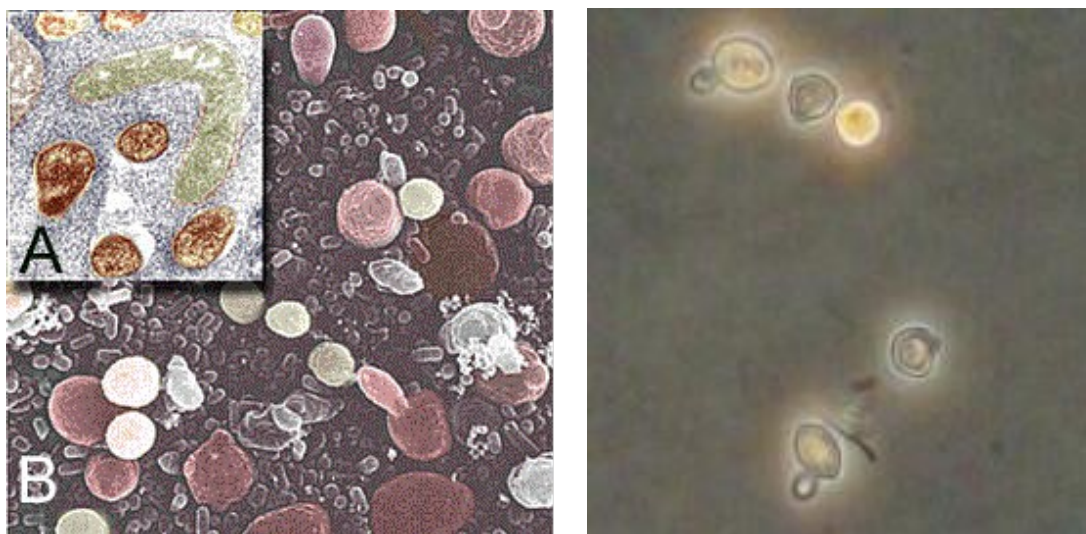
**Hình 3: Hình dạng, kích thước hạt Kefir nguyên vẹn và sau khi đã cắt đôi.**

(<http://user.chairot.net.au/~dna/thumb3-WKG.jpg>)

Polisaccharide chủ yếu là nước, vật chất hoà tan được biết là Kefiranofaciens và *L. kefir* sản sinh ra polisaccharide này. Chúng là một phần của hạt, nếu không có sự hiện diện của chúng thì hạt Kefir không thể hình thành. Ngoài tế bào vi sinh vật, hạt Kefir còn chứa protein (chiếm khoảng 30% tổng chất khô) và Carbohydrate (25÷50%). Như vậy từ một số thông tin đã đưa ra thành phần hợp thành của hạt giống Kefir là phức protein Polisaccharide béo. Thành phần hạt giống sấy khô đông lạnh với hàm ẩm 3,5% được tìm thấy bao gồm: béo 4,4%, tro: 12,1%, Muco-polisaccharide (Kefiran): 45,7%, protein tổng số 34,3% gồm có: protein không hoà tan 27%, protein hoà tan 1,6% và acid amin tự do là 5,6%.

Nhóm vi khuẩn *lactic lactobacilli* chiếm khoảng 65-80% tổng số vi sinh vật trong hạt Kefir. Chúng gồm những loài ưa ẩm và ưa nhiệt thực hiện quá trình lên men lactic theo cơ chế lên men đồng hình lẫn dị hình. Nhóm vi khuẩn lactic *Lactococci* chiếm 20% tổng số tế bào, *Bacilli* 69%, *Streptococci* 11-12%

Riêng nấm men chiếm 5÷10% tổng số vi sinh vật trong hạt gồm những loài lên men được lẫn không lên men được đường lactose. Các loài nấm men lên men được đường lactose thường được tìm thấy tại các vị trí gần bề mặt hạt Kefir. Ngược lại, các loài nấm men không lên men được đường lactose lại tìm thấy tại các vị trí sâu bên trong tâm hạt



**Hình 4: Ảnh chụp hạt giống Kefir dưới kính hiển vi điện tử gồm vi khuẩn, nấm men, và các chất gian bào**

*([Kefir.vilabo.oul.com](http://Kefir.vilabo.oul.com))*

#### *2.3.2.2. Chu kỳ phát triển của giống Kefir*

Kefir là những giống gốc tự nhiên, chúng được hình thành từ những màng bao bọc mỏng không theo một quy tắc nào cả bao gồm hỗn hợp protein, lipid, polisaccharide. Những màng bao bọc phát triển với hình dạng không nhất định, hình thành các thùy phức tạp và không đồng đều, các thùy này lại có xu hướng trở về nguyên bản tạo thành cấu trúc sinh học bao gồm nhiều thùy con bao quanh mình. Với dấu hiệu phát triển đặc biệt như thế chúng hình thành những hạt con, mỗi tiểu thùy được kết nối với nhau ở phần giữa, xòe ra trong khi nó được gắn với các điểm trung tâm của hạt giống mẹ.

**Bảng 6: Các vi sinh vật có trong hạt Kefir (Oberman H và cộng sự, 1998)**

Giống vi sinh vật	Loài
<i>Lactobacilli</i>	<b>Vi khuẩn</b>
	<i>Lb. brivis</i>
	<i>Lb. cellobiosus</i>
	<i>Lb. acidepphilus</i>
	<i>Lb. Kefir</i>
	<i>Lb. casei ssp. alactosus</i>
	<i>Lb. casei ssp. rhamnosus</i>
	<i>Lb. helveticus. ssplactis</i>
	<i>Lb. delbruevii.ssp.lactic</i>
	<i>Lb. paracasei.ssp.paracasei</i>
	<i>Lb. casei</i>
	<i>Lb. lactis</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. delbrueckii. ssp. hulgaricus</i>
	<i>Lb. fructivorans</i>
	<i>Lb. hilgardii</i>
	<i>Lb. kefiranofaciens</i>
	<i>Lb. kefirgarnum sp.nov</i>
<i>Lb. parakefir sp.nov</i>	
<i>Streptococci</i>	<i>S. thermophilus</i>
	<i>S. lactis</i>
	<i>S. filant</i>
	<i>S. durans</i>
<i>Lactococci</i>	<i>Lc. lactis.ssp.lactis</i>
	<i>Lc. lactis.ssp.lactis var diacetylactis</i>
	<i>Lc. lactis.ssp.cremoris</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. mesesteroides.ssp.dextranicum</i>
	<i>Leuc. mesenteroides.ssp.cremoris</i>
<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacters casei</i>



	<i>Acetobacters rasens</i>
<b>Nấm men</b>	
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis</i> <i>K. marxinnus. ssp. bulgaricus</i> <i>K.morxianus. ssp. marxianus</i>
<i>Sacchromyces</i>	<i>S. lactis</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. florentinus</i> <i>S. globosus</i> <i>S. unisporus</i> <i>S.carlsbergensis</i> <i>S. ssp. torulopsis holmii</i>
<i>Candida</i>	<i>C. kefir</i> <i>C. pseudotropicalis</i> <i>C. tenuis</i> <i>C. rancens</i>
<i>Torulaspora</i>	<i>T. delbrueckii</i>

(Lê Văn Việt Mẫn, 2004 và các nguồn trên internet)

Nhờ sự xuất hiện đó mà các hạt con tách ra có mẫu hình phát triển giống như hạt mẹ ban đầu. Một vài hạt Kefir cũng tách ra giống với cấu trúc vật lý của não người, tuyến tụy và các cơ quan bên trong. Sau một thời gian có thể do chấn thương hoặc những tác động bên ngoài, một phần thùy con gắn với hạt mẹ bị tách ra thành hạt tự do. Những hạt con này lại tiếp tục nhân giống thành hạt mẹ. Chu kỳ phát triển được lặp lại với chu trình gần giống nhau (tự nhân giống). Trong vài trường hợp đặc biệt, có những hạt không thể cho ra bất cứ hạt con nào trong một thời gian dài mà thay vào đó, chúng hình thành nên một khối lớn (khối hạt Kefir)

Bề mặt ngoài của hạt biến đổi từ dạng phẳng đến không đồng đều gồm nhiều thứ phức tạp, có những chỗ lồi lõm rải rác khắp bề mặt. Một vài hạt có thể có những vùng rộng phẳng, trong khi từ bề mặt tự có thể có những hạt có bề mặt không đồng đều. Nếu điều kiện thuận lợi, sau một thời gian, những hạt nhẵn này thường trở lại dạng nguyên thể, sau đó hình thành

các hạt bao quanh mình, nơi mà có thể nhân giống lên. Thường ở những vùng không phẳng, xù xì thường có sự hoạt động mạnh của nấm men, trong khi ở vùng phẳng vi khuẩn lại chiếm ưu thế. Nấm men hình thành những khóm nhỏ nhô ra trên bề mặt, *Streptococci* thì bện vào nhau với các vi khuẩn khác chứ không hình thành dạng cụm

Ở sâu bên trong hạt, *Lactobacilli* chiếm ưu thế và có rất ít tế bào nấm men, chúng được gói gọn trong dịch polisaccharide, các vi khuẩn hình que và nấm men hình thành các cụm riêng biệt bên ngoài và bên trong hạt. Ở đó *Lb. Kefiranoficients* được xem là nguyên nhân hình thành polisaccharide hòa tan Kefiran. Trong khi đó *L. bacitophilus* là nguyên nhân hình thành vỏ bọc bên ngoài polisaccharide mà có thể giúp hạt co giãn. Một số nghiên cứu cho rằng vi khuẩn có thể gây ra sự nhân giống hạt Kefir vì việc nhân giống của hạt không xảy ra khi vắng mặt *Lb. kefiranoficients* - là vi khuẩn sinh ra Kefiran ở trung tâm hạt.

#### 2.3.2.3. Kefiran

Cơ chế phức tạp về cấu trúc gian bào vi sinh vật trong hạt Kefir hiện nay chưa được giải thích rõ ràng. Người ta khám phá được gel hòa tan polisaccharide trong hạt kefir là điều duy nhất đủ cho tên gọi kefiran (KGF-C). Hạt kefir sấy khô bao gồm chất gian bào khoảng 45% là kefiran. Polisaccharide này gồm hai đường đơn glucose và galactose với tỉ lệ cân đối. Kefiran hình thành ở trung tâm hạt, với điều kiện kỵ khí thuận lợi cho việc tổng hợp kefiran trong sự hiện diện của ethanol. Một vài loài *Lactobacilli* khác cũng sinh ra polisaccharide như *Lb. brevis*, *Lb. sp.*

Các loài *Lactobacilli* khác nhau có thể sản sinh ra dạng gel polisaccharide gần giống nhau ở tốc độ khác nhau. Đây là một phần trong cơ chế phức tạp của hạt kefir. Có thể do những khuynh hướng khác nhau này mà *Lactobacilli* sản sinh các phần ở trung tâm hạt.

Một thử nghiệm trên chuột đã phát hiện tính kháng ung bướu của Kefiran. Trong thử nghiệm này kefiran được cung cấp từ đường miệng của chuột và kết quả cho thấy kích thước khối u đã giảm đi rõ.

#### 2.4. Một số loài vi khuẩn lactic quan trọng

*Streptococcus lactis*: vi khuẩn này phát triển tốt trong sữa và một số môi trường pha chế từ sữa, trong khi lại phát triển kém trong môi trường nước thịt pepton. Đây là loại vi khuẩn hiếu khí tùy tiện nên có thể phát triển sâu trong thạch và cho khuẩn lạc hình cây có nhánh. Đặc điểm sinh hoá quan trọng là lên men glucose, lactose, galactose, maltose, dextrin, không lên men saccharose. Vì vậy *Streptococcus lactis* đóng vai trò quan trọng trong việc chế biến sữa chua. Phát triển tốt ở nhiệt độ  $30\div 35^{\circ}\text{C}$ , ở nhiệt độ này vi khuẩn gây đông tụ sữa sau  $10\div 12$  giờ, độ acid giới hạn do *Streptococcus lactis* tạo nên thường dao động trong khoảng  $110\text{-}120^{\circ}\text{T}$ , mặc dù có những chủng yếu chỉ tạo khoảng  $90\text{-}100^{\circ}\text{T}$ . Sữa được lên men chua bởi *Streptococcus lactis* luôn luôn có hương vị đặc trưng của sản phẩm sữa chua. Ở nhiệt độ tối ưu *Streptococcus lactis* phát triển trong sữa có thể đạt đến số lượng tối đa là  $1,2\div 2$  tỷ tế bào/ml sau  $10\div 12$  giờ. Thời gian này tương ứng với thời gian lên men chua sữa đến  $60^{\circ}\text{T}$ . Độ acid sữa tăng lên rất nhanh trong vài giờ đầu, sau đó giảm dần và ngừng hẳn khi đạt đến gần  $120^{\circ}\text{T}$ . Đường biểu thị acid trong sữa lên men không có hướng đi xuống vì sau khi đạt cực đại độ chua được giữ nguyên theo thời gian mà không giảm đi

*Streptococcus cremoris*: loại liên cầu khuẩn này thường thấy trong sữa dưới dạng chuỗi dài hoặc hiện diện dưới dạng song cầu khuẩn, phát triển tốt ở  $20\div 25^{\circ}\text{C}$ . Các điều kiện nuôi cấy khác với giống *S.lactis*. Tuy nhiên, ảnh hưởng của chúng đối với sữa hơi khác, chúng thường làm đông sữa nhưng chúng cũng có thể làm cho sữa bị nhớt. Một số chủng loại này phát triển trong sữa cho mùi đặc biệt dễ chịu được ứng dụng trong chế biến bơ. Cũng như *S.lactis*, *S. cremoris* lên men lactose thành acid lactic nhưng không lên men saccharose, maltose, dextrin. *Streptococcus cremoris* làm cho sữa có độ chua thấp hơn ( $110\div 115^{\circ}\text{T}$ ) tạo nên sản phẩm có vị ngon thường được dùng trong sản xuất bơ chua.

*Streptococcus thermophilus* và *Streptococcus bovis* đây là hai vi khuẩn thuộc nhóm *Viridans Streptococci* chúng không phát triển ở  $10^{\circ}\text{C}$ , phát triển tốt ở  $40\div 45^{\circ}\text{C}$  khi lên men sữa tạo được khối đông, không phát

triển khi có sự hiện diện của 0,1% xanh methylen, 6,5%NaCl, pH=9,6, arginin, pepton, không tạo thành amoniac. *Streptococcus thermophilus* là vi sinh vật ưa nhiệt giống như tên chúng, nhiệt độ thích hợp khoảng 40÷45°C và bị tiêu diệt ở nhiệt độ 53°C. Khi làm môi trường nuôi cấy từ sữa thanh trùng và ủ ở 32°C số lượng lớn khuẩn lạc của *Streptococcus thermophilus* xuất hiện. *Streptococcus thermophilus* là một vi sinh vật quan trọng trong sản xuất yaourt, phomat, nó bị ngăn cản sự hoạt động bởi 0,01 mg penicillin hay 5 mg streptomycin/ml. *Streptococcus bovis* được tìm thấy trong sữa bò và có thể xâm nhập vào sữa từ nguồn này hay nguồn khác, nó sống sót trong sữa thanh trùng, có thể tách chúng từ sữa thanh trùng hay một số loại phomat

Các trực khuẩn lactic: trực khuẩn lactic phát triển rộng rãi trong thiên nhiên, chúng luôn luôn có mặt trong sữa và các sản phẩm sữa chịu được độ acid cao, phát triển ở phạm vi nhiệt độ rộng trong môi trường có hoặc không có không khí. Trực khuẩn lactic đóng vai trò rất quan trọng trong chế biến sữa chua, quá trình làm fomat.

Trực khuẩn lactic cũng chia thành nhóm điển hình và nhóm không điển hình tùy thuộc vào khả năng tạo thành sản phẩm phụ. Nhóm trực khuẩn lactic gồm các trực khuẩn ưa nhiệt, trực khuẩn xếp chuỗi cần nhiệt độ trung bình (ưa ấm), *Bacterium* thuộc nhóm trực khuẩn không điển hình.

Nhờ nhiều loại enzym thích hợp nên các vi khuẩn lactic điển hình có khả năng phân giải các đường đơn (glucose, galactose, levulose...) thành acid lactic. Các loại khác nhau có thể tích tụ lượng acid khác nhau: *Lactobacterium bulgaricum* tích tụ đến 3,5%, *Thermobacter*, *Ribirium cerea* là 2,2%, *Lactobacterium plantarum* là 1%.

Các trực khuẩn lactic ưa nhiệt phát triển tốt ở môi trường acid yếu (pH=6,5), tuy nhiên có loài phát triển ở pH=5,4 như *Lactobacillus bulgaricus*, cũng có loại phát triển tốt ở pH=3,8 trong khi các trực khuẩn xếp chuỗi không thể phát triển được, nhiệt độ tối ưu là 40÷45°C, đây là vi khuẩn tạo được độ acid rất cao 300÷350<sup>0</sup>T. *Lactobacterium helveticum* (trực khuẩn phomat) phát triển ở 22-51°C, làm cho sữa chua tới 200÷300<sup>0</sup>T, *Lactobacterium bulgarium* phát triển ở 22÷53°C tạo độ acid trong sữa

200÷300<sup>0</sup>T, độ giới hạn là 200÷250<sup>0</sup>T. *Lactobacterium lactic* phát triển ở 22÷50<sup>0</sup>C độ acid giới hạn là 110÷180<sup>0</sup>T

*Betabacterium* trên môi trường thạch tạo những khuẩn lạc giống như khuẩn lạc của trực khuẩn lactic ưu nhiệt. Khi phát triển trong sữa vi khuẩn này cho ít acid, nếu cho dịch tự phân của nấm men vào môi trường, vi khuẩn này phát triển mạnh hẳn lên, đường sữa bị lên men bởi vi khuẩn này không chỉ tạo thành acid lactic mà còn tạo nhiều acid dễ bay hơi. Trong sữa thường có hai loại chính là *Betabacterium causasium* và *Betabacterium breve*.

*Leuconostoc*: là nhóm gồm những vi khuẩn lên men lactic không điển hình. Chúng có dạng hình cầu nhưng trong môi trường acid chúng nhọn ở hai đầu và dài ra sinh ra lượng acid có hạn vì thế không làm đông sữa. Trái lại chúng hình thành từ đường, acetyl methyl carbonyl hoặc acetoin làm cho bơ thơm. Loại vi khuẩn điển hình của giống này là *Leuconostoc citrovorium* được ứng dụng trong sản xuất bơ.

**Bảng 7: Giá trị nhiệt độ và pH tối ưu cho sự sinh trưởng của một số loài vi khuẩn lactic**

Loài vi sinh vật	T <sub>opt</sub> (°C)	pH <sub>opt</sub>
<i>Lactococcus lactis</i>	29 ÷ 34	6,0 ÷ 6,5
<i>Lactococcus cremoris</i>	28 ÷ 32	6,0 ÷ 6,5
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	30 ÷ 34	6,0 ÷ 6,5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	40 ÷ 42	6,0 ÷ 6,5
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	43 ÷ 46	5,5 ÷ 6,0
<i>Lactobacillus helveticus</i>	43 ÷ 46	5,5 ÷ 6,0
<i>Lactobacillus casei</i>	30 ÷ 37	-
<i>Lactobacillus kefir</i>	30	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	37	5,5 ÷ 6,0
<i>Lauconotoc lactis</i>	20 ÷ 27	5,5 ÷ 6,0
<i>Lauconotoc cremoris</i>	25 ÷ 30	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	37 ÷ 41	-

(Lê Văn Việt Mãn, 2004)

## **2.5. Dinh dưỡng và những lợi ích về sức khỏe của Kefir**

Bên cạnh những vi khuẩn có lợi và nấm men, Kefir còn chứa nhiều khoáng chất và những acid amin cần thiết giúp chữa bệnh và duy trì các chức năng cho cơ thể. Các protein hoàn chỉnh trong Kefir được tiêu hoá hoàn toàn, vì thế cơ thể hấp thu một cách dễ dàng. Tryptophan là một trong những acid amin cần thiết rất phong phú trong Kefir, có tác dụng xoa dịu hệ thống thần kinh. Kefir rất giàu Ca và Mg, là những chất quan trọng cho một hệ thần kinh khoẻ mạnh, nếu dùng Kefir thường xuyên sẽ có tác dụng tốt cho hệ thần kinh.

Kefir cung cấp một lượng lớn phospho, đây là khoáng chất cần thiết thứ hai trong cơ thể con người, nó giúp sử dụng carbohydrat, chất béo, protein giúp tế bào phát triển tốt, duy trì và cân bằng năng lượng.

Kefir rất giàu vitamin B12, B1 và vitamin K. Đây là một nguồn Biotin tuyệt vời giúp cơ thể hấp thu những loại vitamin khác như acid folic, acid pantothenic và B12.

Nếu dùng Kefir một cách thường xuyên sẽ có nhiều lợi ích rất lớn. Một số thông tin cho rằng nhờ nó mà người ta đã trị được các bệnh rối loạn đường tiêu hóa, bệnh đau thắt dạ dày, viêm ruột mãn tính và những bệnh về gan, mật, thận, bàng quang. Kefir là một món ăn bổ dưỡng. Nó chứa nhiều chất cần thiết như: đường sữa, khoáng chất, vitamin, béo. Vị chua và men của Kefir giúp dễ dàng tiêu hóa những thức ăn khác. Hơn nữa, Kefir chứa một lượng khổng lồ nhũ khuẩn đối kháng với những vi trùng gây bệnh đã rõ ràng cấu tạo.

## **2.6. Phương pháp chế biến và bảo quản giống Kefir**

Hiện nay có rất nhiều thông tin khác nhau cho việc chăm sóc và bảo quản giống kefir. Cách đơn giản nhất là làm khô chúng bằng không khí rồi gói trong giấy và giữ nơi khô mát, những hạt này vẫn có thể hoạt động tốt sau một hay nhiều năm. Sau đó ngâm chúng vào nước, lọc sạch và thả vào một tách sữa để yên trong vài ngày, chúng sẽ hoạt động trở lại.

Hầu hết các phương pháp đều đề nghị nên rửa giống trước khi sử dụng, nhưng một số khác lại không cho phép, họ cho rằng hệ vi sinh vật có lợi xung quanh con giống sẽ bị xáo trộn hoặc bị tiêu diệt hoàn toàn trong

nước có chlorine hay flourine và đừng rửa giống ngoại trừ mục đích làm khô hay muốn ngừng lên men trong thời gian ngắn. Giống Kefir dẻo dai hơn mọi người nghĩ, có thể đặt chúng trong sữa tươi và trữ trong tủ lạnh ở 4°C khi bạn không muốn nó lên men. Tốt nhất nên thay sữa mỗi tuần để giữ giống và nuôi chúng luôn hoạt động.

Ngoài ra, có một cách trữ giống khác là đặt nó trong tủ đông một thời gian dài mà không có vấn đề gì đến việc tái kích hoạt giống.

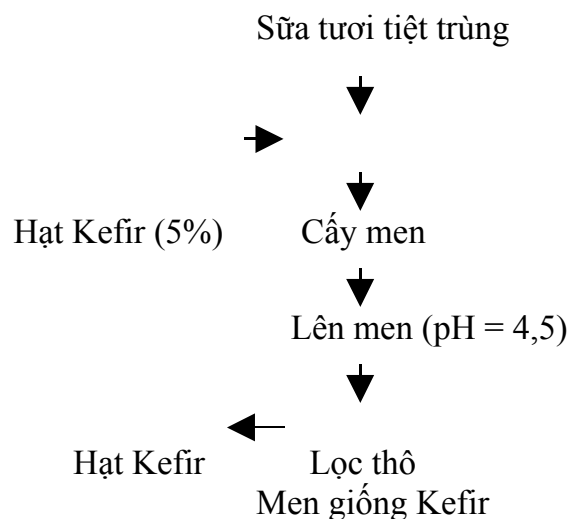
Kefir sẽ có chất lượng tốt trong khoảng 14 ngày nếu trữ ở 4°C. Theo phương pháp chế biến hiện nay người ta có thể thêm công đoạn ủ chín bằng cách sau khi cho lên men ở nhiệt độ phòng, làm lạnh xuống ở 14÷16°C khoảng 12 đến 14 giờ. Lúc này tốc độ trao đổi chất của vi khuẩn và nấm men bị chậm lại. Khi sản phẩm đã đạt đến độ chua yêu cầu, đưa vào bảo quản lạnh dưới 6°C và sử dụng 1÷2 tuần.



**Hình 5 Hạt Kefir và bảo quản hạt Kefir**

## 2.7. Quy trình chế biến

### 2.7.1. Quy trình sản xuất men giống Kefir



## 2.7.2. Giải thích qui trình sản xuất men giống

- Môi trường chuẩn bị giống: Sữa tươi, sữa gầy hoặc sữa hoàn nguyên. Hàm lượng chất khô trong môi trường khoảng 11÷12%. Sữa được thanh trùng ở 90÷95<sup>0</sup>C trong thời gian 30÷45 phút (thời gian thanh trùng kéo dài nhằm vô hoạt enzym và ức chế đến mức tối thiểu sự có mặt của vi sinh vật lạ trong môi trường để giúp cho giống phát triển tốt và không bị tạp nhiễm), sau đó đưa về 22÷24<sup>0</sup>C để chuẩn bị cấy giống. Ở đây sử dụng sữa tươi tiệt trùng của Vinamilk .

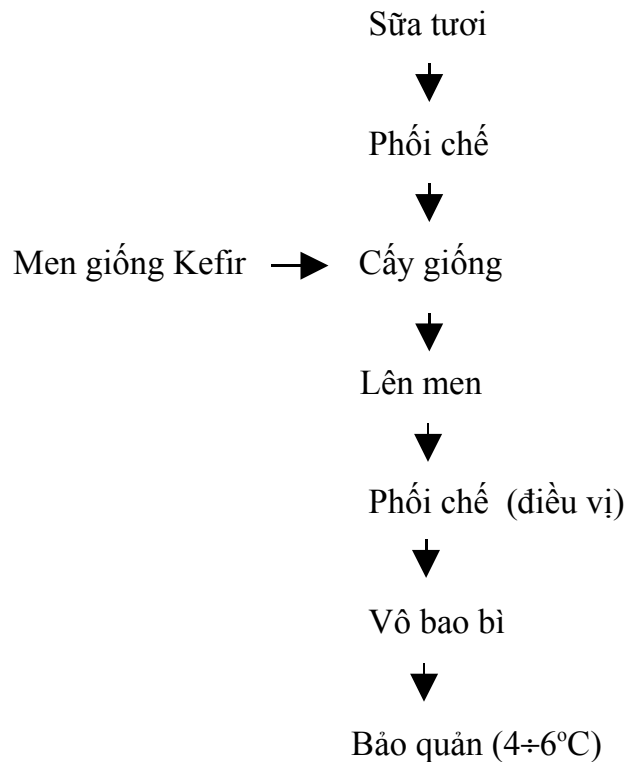
- Cấy giống : sử dụng hạt Kefir với lượng ban đầu 5% theo khối lượng, quá trình nhân giống cũng được thực hiện ở nhiệt độ phòng (23÷25<sup>0</sup>C) . Do hạt Kefir có kích thước lớn nên chúng thường bị chìm xuống đáy nên cần phải khuấy trộn môi trường trong thời gian 10÷15 phút sau mỗi 2÷5 giờ . Quá trình nhân giống kết thúc khi pH môi trường giảm xuống còn 4,5.

- Lọc: khi đạt pH yêu cầu, canh trường được lọc. Hạt kefir được xử lý bằng cách rửa trong nước vô khuẩn ở nhiệt độ thấp (6÷10<sup>0</sup>C) để loại bỏ tạp chất bám trên bề mặt hạt (có thể sử dụng sữa gầy vô trùng để rửa hạt, Hạt Kefir đã qua rửa sạch và bảo quản trong nước vô khuẩn hoặc dung dịch muối NaCl 0,9%. Khi cần nhân giống cho mẻ tiếp theo, sử dụng tiếp hạt Kefir trên để nhân giống

- Dịch thu được sau quá trình lọc thô chứa các vi khuẩn lactic và nấm men có thể sử dụng để cấy giống vào môi trường sữa nguyên liệu để sản xuất Kefir. Quá trình sản xuất giống cũng được thực hiện ở 25÷30<sup>0</sup>C thời gian nuôi trung bình là 20 giờ (cần kiểm tra giá trị pH của canh trường là 4,5 để xác định thời điểm kết thúc quá trình nuôi).



### 2.7.3. Quy trình chế biến Kefir



### 2.7.4. Giải thích quy trình sản xuất Kefir

- Nguyên liệu: Sữa có chất lượng cao, không chứa kháng sinh và đạt các mức chỉ tiêu về vi sinh. Hàm lượng chất béo có thể thay đổi tùy thị hiếu người tiêu dùng, sản phẩm Kefir thường có hàm lượng chất béo từ 2,5÷3,5%. Trong các thí nghiệm này, sử dụng nguyên liệu là sữa tươi tiệt trùng của Vinamilk.

- Phối chế: sữa nguyên liệu được bổ sung thêm đường lactose và dịch dâu nhằm tạo điều kiện tối ưu cho vi khuẩn lactic phát triển và tạo hương vị đa dạng cho sản phẩm

- Cấy giống: Giống Kefir được chuẩn bị theo quy trình sản xuất men giống (mục 2.7.1)

- Lên men: trong quá trình lên men Kefir, vi khuẩn lactic sẽ chuyển đường lactose thành acid lactic, một số loại nấm men sử dụng đường lactose sẽ chuyển hoá lactose thành ethanol và khí CO<sub>2</sub>. Trong dịch lên men chứa hàng trăm sản phẩm phụ từ hai quá trình lên men lactic và ethanol nói trên. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành nên hương vị của sản

phẩm, đáng chú ý nhất là các acid hữu cơ như acid propionic, acid formic, acid succinic, các hợp chất bay hơi thuộc nhóm aldehyde (aldehyde acetic, diacetyl) và rượu cao phân tử, nhiệt độ lên men  $25\div 30^{\circ}\text{C}$

- Điều vị: Sản phẩm sau lên men sẽ có độ nhớt tương đối cao nên cần bổ sung thêm nước và đường saccharose để sản phẩm đạt cấu trúc và hương vị mong muốn

- Vô bào bì: Thực hiện trong điều kiện vô trùng để hạn chế các vi sinh vật từ môi trường xung quanh nhiễm vào sản phẩm

- Bảo quản: sản phẩm hoàn thành được bảo quản ở  $4\div 6^{\circ}\text{C}$ . Trong quá trình bảo quản hệ vi sinh vật Kefir vẫn tiếp tục trao đổi chất với môi trường và làm biến đổi dần các chỉ tiêu hoá lý (độ chua, hàm lượng ethanol) và chỉ tiêu cảm quan (mùi vị...) của sản phẩm.

## **Chương 3 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **3.1. Phương tiện**

#### **3.1.1. Địa điểm nghiên cứu**

Quá trình tiến hành thí nghiệm, thu thập và xử lý số liệu tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công Nghệ Thực Phẩm, Khoa Nông Nghiệp-Tài Nguyên Thiên Nhiên, Trường Đại Học An Giang.

#### **3.1.2. Thời gian nghiên cứu**

Thời gian thực hiện thí nghiệm từ tháng 3/2005 đến tháng 5/2005.

#### **3.1.3. Nguyên liệu**

- Sữa tươi tiệt trùng của Vinamilk
- Giống Kefir
- Dâu Tây
- Đường Lactose
- Đường RE

#### **3.1.4. Dụng cụ và thiết bị**

- Tủ cấy, tủ ủ
- Cân phân tích, cân điện tử
- Thiết bị chưng cất
- Tủ lạnh
- Tủ sấy
- Một số dụng cụ thông thường ở phòng thí nghiệm

#### **3.1.5. Hóa chất**

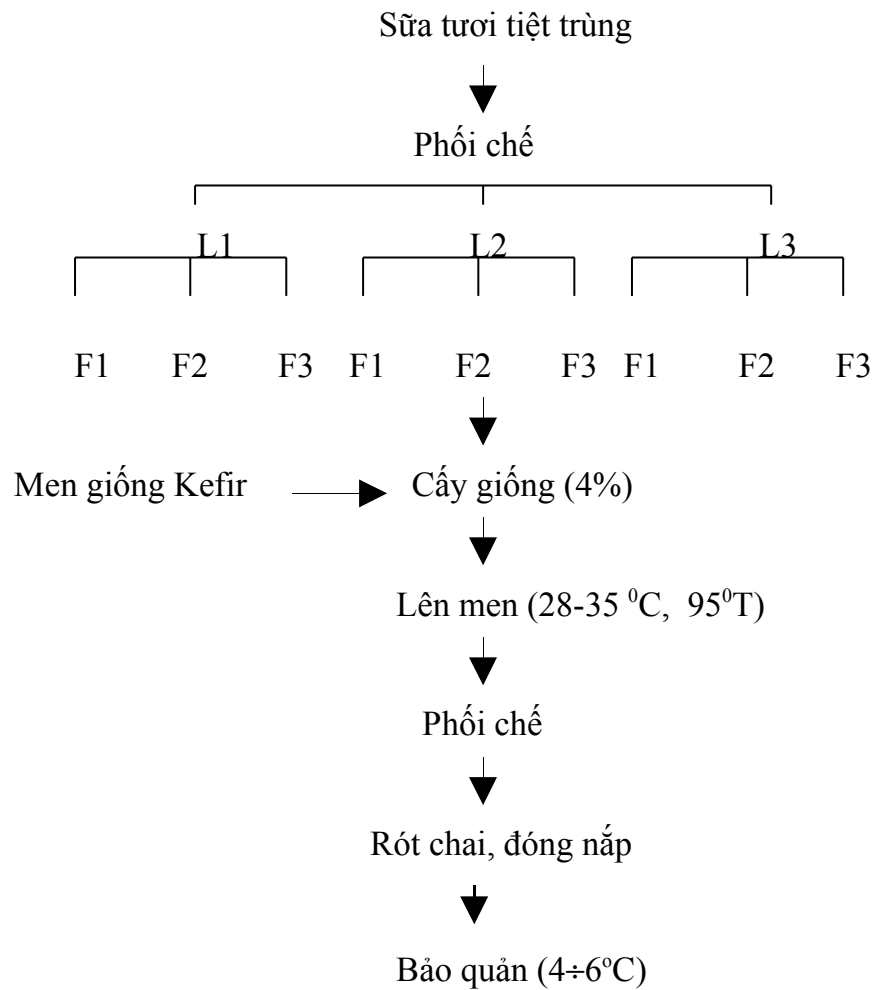
- Hóa chất chuẩn độ acid: NaOH 0,1N
- Hóa chất xác định lượng cồng: HNO<sub>3</sub> đậm đặc, KI 10%, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,1N
- Môi trường nuôi vi sinh vật: Fluid lactose Medium (vi khuẩn)  
Potato dextrose agar (nấm men)

### 3.2. Nội dung bố trí thí nghiệm

#### 3.2.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm

3.2.1.1. Mục đích: Tìm công thức phối chế nguyên liệu thích hợp để quá trình lên men đạt hiệu quả cao và sản phẩm có chất lượng tốt.

3.2.1.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm



Thí nghiệm tiến hành hoàn toàn ngẫu nhiên trên hai nhân tố L và F với hai lần lặp lại. L là tỉ lệ đường Lactose bổ sung; F là tỉ lệ dịch dâu bổ sung

L<sub>1</sub>: 0%

F<sub>1</sub>: 0%

L<sub>2</sub>: 5%

F<sub>2</sub>: 10%

L<sub>3</sub>: 10%

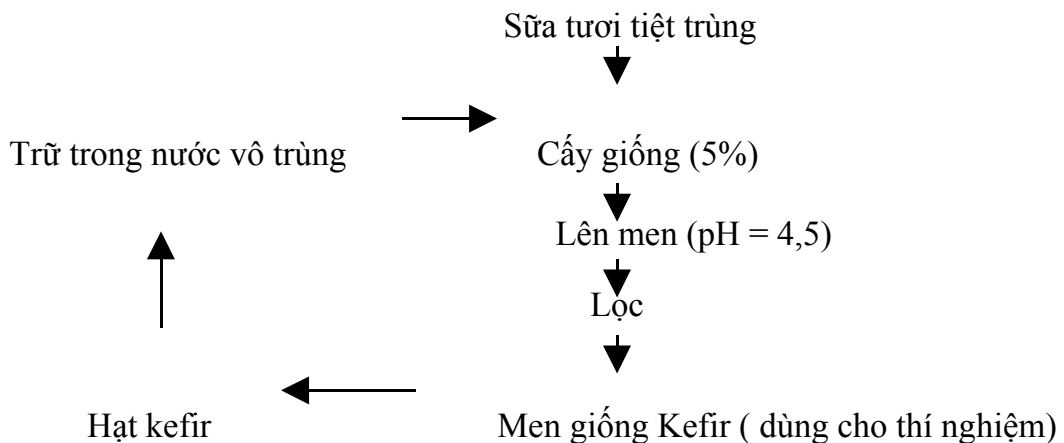
F<sub>3</sub>: 20%

### 3.2.1.3. Chuẩn bị thí nghiệm

Nguyên liệu thí nghiệm là sữa tươi tiệt trùng không đường của Vinamilk với các thành phần ổn định: lactose: 4,6g, béo 3,5g, đạm 3,3g/100 ml sữa

Dâu tây rửa sạch, ép lấy nước, chỉnh về độ khô và pH cố định (độ Brix =5%, pH=4.0) thanh trùng 80°C (5 phút)

Cân hàm lượng đường Lactose bổ sung theo tỉ lệ trên. Men giống Kefir được chuẩn bị theo quy trình:



Men giống được xác định tổng lượng vi khuẩn, nấm men bằng cách đếm số khuẩn lạc mọc trên môi trường dinh dưỡng thích hợp

### 3.2.1.4. Tiến hành thí nghiệm

Sữa tươi chia làm 9 mẫu ( mỗi mẫu 100ml), tiến hành phối chế đường lactose và dịch dâu với tỉ lệ trên. Cấy men giống tỉ lệ 4% (v/v) và lên men ở nhiệt độ phòng, độ acid dừng là 95<sup>o</sup>T. Sau đó tiến hành phối chế với dịch siro (nồng độ 25%) với tỉ lệ 30% . Sử dụng loại đường RE.

### 3.2.1.5. Các chỉ tiêu xác định

Độ acid theo thời gian

Độ cồn

Mật số vi khuẩn và nấm men

Đánh giá cảm quan theo theo thang điểm mô tả (bảng 8).

**Bảng 8: Bảng điểm đánh giá cảm quan sản phẩm Kefir**

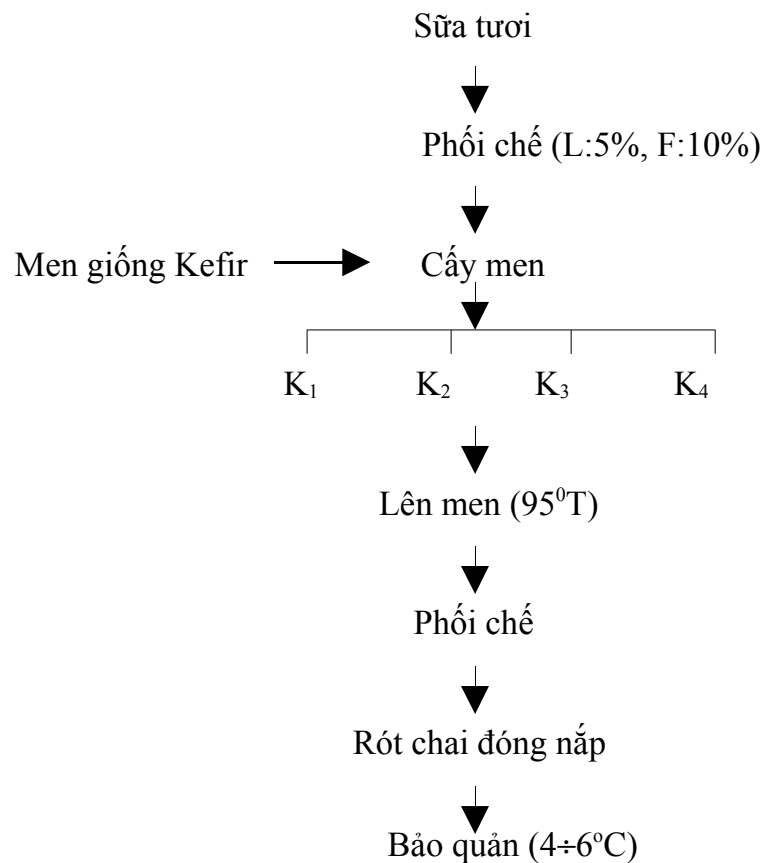
Điểm	Mô tả
<b>Mùi</b>	
5	Sản phẩm có mùi thơm đặc trưng của sữa chua, mùi thơm dịu của dâu Tây hòa hợp với mùi của rượu etylic, dễ chịu.
4	Sản phẩm có mùi thơm nhẹ của sữa chua, mùi thơm dịu của dâu Tây và thoảng mùi rượu etylic, nhưng ít đặc trưng hơn.
3	Mùi thơm của sữa chua và dâu Tây không thể hiện rõ, mùi rượu quá nhẹ hoặc quá nồng, kém hài hòa.
2	Sản phẩm có mùi kém, không còn mùi thơm tự nhiên của sữa chua, không có mùi dâu hoặc mùi dâu đã bị biến đổi, mùi acid acetic quá mạnh.
1	Sản phẩm có mùi lạ, không thể nhận biết được mùi của sữa và dâu
0	Sản phẩm có mùi của quả thối, mùi của sữa hư hỏng, khó ngửi
<b>Vị</b>	
5	Sản phẩm hài hòa giữa vị ngọt và vị chua dịu của acid lactic, vị nồng nhẹ của cồn và CO <sub>2</sub> khá hấp dẫn.
4	Sản phẩm có vị chua ngọt hài hòa nhưng độ cồn hơi cao hoặc hơi thấp, tương đối hấp dẫn.
3	Vị chua ngọt của sản phẩm kém hài hòa, hơi chua hoặc hơi ngọt, cồn quá nhiều hoặc quá ít, không hấp dẫn lắm.
2	Sản phẩm quá chua hoặc không chua, vị ngọt kém, không hòa hợp, không phát hiện cồn hoặc cồn quá mạnh, hơi đắng.
1	Sản phẩm có vị lạ, nhạt nhẽo.
0	Vị rất khó chấp nhận, đắng chát, biểu hiện của hư hỏng.
<b>Hình thái</b>	
5	Sản phẩm đồng nhất, không phân lớp, độ nhớt vừa phải
4	Sản phẩm tương đối đồng nhất, ít lợn cợn
3	Sản phẩm có dấu hiệu tách nước, hoặc độ nhớt hơi cao.

2	Sản phẩm bị phân lớp (lớp nước bên trên, dịch sữa bên dưới đồng nhất) hoặc độ nhớt quá cao.
1	Sản phẩm bị phân 2 lớp rõ rệt, dịch sữa bên dưới không đồng nhất, (có lợn cợn lớn)
0	Sản phẩm bị phân làm nhiều lớp

### 3.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ men giống đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm

3.2.2.1 Mục đích: Xác định tỉ lệ men giống thích hợp để quá trình lên men đạt hiệu quả cao và sản phẩm đạt chất lượng tốt

3.2.2.2 . Sơ đồ bố trí thí nghiệm



Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nhân tố K với hai lần lặp lại. K là tỉ lệ men giống Kefir (%)

K<sub>1</sub>: 2%

K<sub>2</sub>: 4%

K<sub>3</sub>: 6%

K<sub>4</sub>: 8%

### 3.2.2.3. Chuẩn bị thí nghiệm:

Quá trình chuẩn bị men giống, nước ép dâu, đường lactose giống thí nghiệm 1

### 2.2.2.4. Tiến hành thí nghiệm

Thí nghiệm tiến hành với thành phần nguyên liệu bổ sung gồm lactose 5%, nước ép dâu: 10%. Lên men đến acid dừng 95<sup>0</sup>T ở nhiệt độ phòng. Cấy men giống theo tỷ lệ khảo sát.

### 2.2.2.5. Chỉ tiêu xác định

Độ acid theo thời gian

Độ cồn

Vi khuẩn, nấm men

Đánh giá cảm quan theo bảng 8.

## 2.2.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của độ acid dừng đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm

3.2.3.1. Mục đích: Tìm độ acid dừng thích hợp cho thời gian lên men tốt và sản phẩm đạt chất lượng cao.

### 3.2.3.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

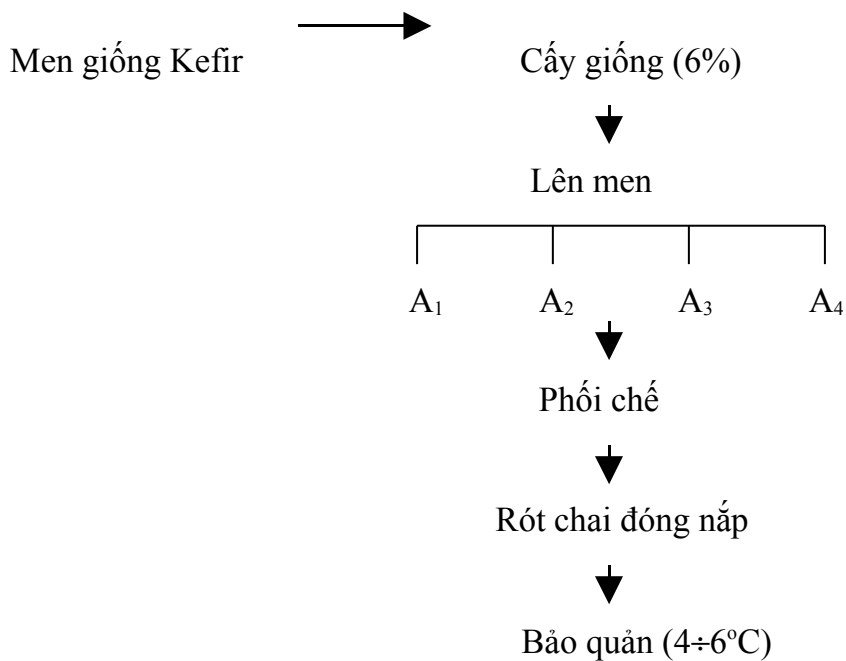
Sữa tươi



Phối chế (L:5%, F:10%)







Thí nghiệm bố trí hai lần lặp lại với nhân tố A là độ acid dừng của sản phẩm

A<sub>1</sub>: 85<sup>0</sup>T

A<sub>2</sub>: 95<sup>0</sup>T

A<sub>3</sub>: 105<sup>0</sup>T

A<sub>4</sub>: 115<sup>0</sup>T

### 3.2.3.3. Chuẩn bị thí nghiệm

các bước chuẩn bị như thí nghiệm 1

### 3.2.3.4. Tiến hành thí nghiệm

Sữa tươi chia làm 4 mẫu và phối chế với tỉ lệ lactose 5%, dịch dâu 10%. Sau đó cấy men giống Kefir với tỉ lệ 6% (v/v) và tiến hành lên men ở nhiệt độ phòng, theo dõi sự biến đổi độ acid theo thời gian và cho kết thúc lên men ở 4 độ acid dừng như trên, thành phẩm được phối chế và bảo quản lạnh ở 4÷6°C.

### 3.2.3.5. Chỉ tiêu đánh giá

Thời gian lên men

Độ cồn

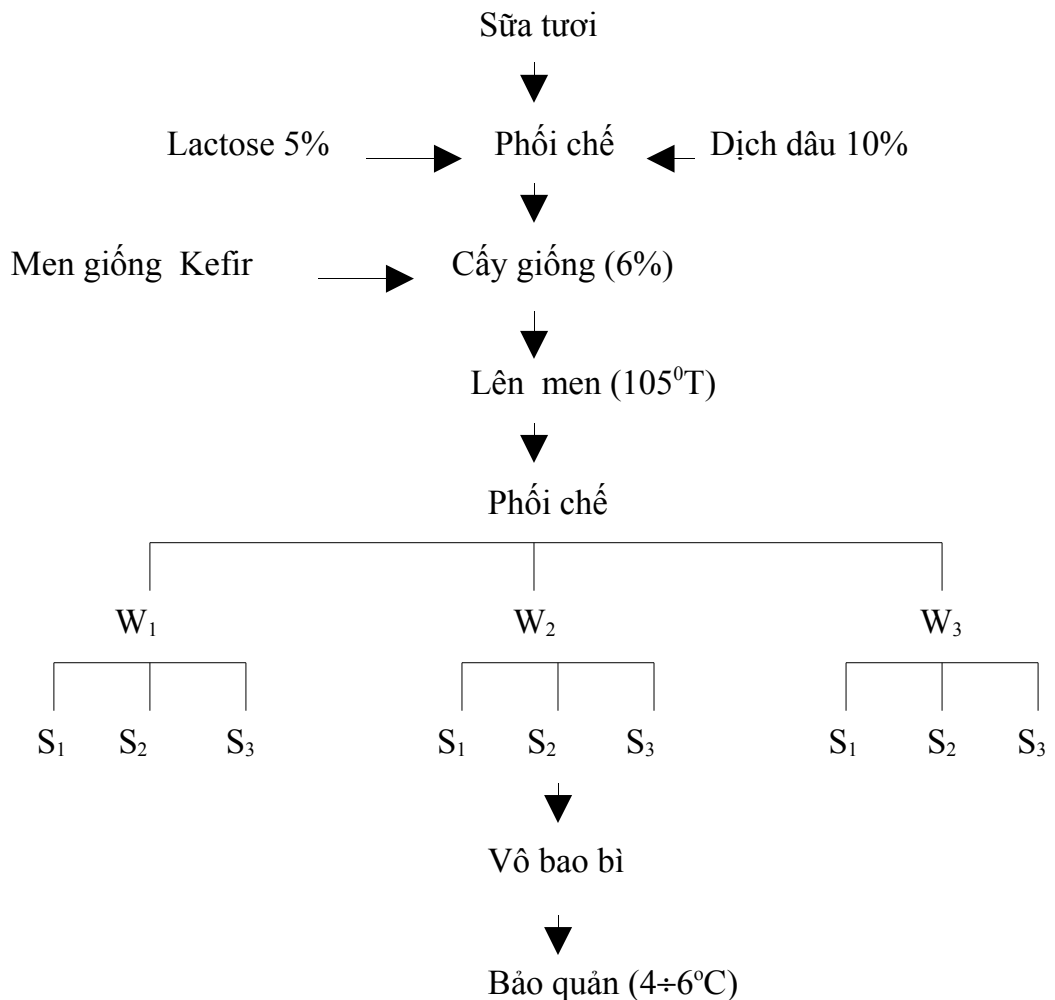
Mật số nấm men và vi khuẩn

Đánh giá cảm quan theo bảng 8.

### 3.2.4. Thí nghiệm 4: Khảo sát tỉ lệ phối chế thích hợp cho thành phẩm

3.2.4.1. Mục đích: Tìm công thức phối chế thích hợp để nâng cao tính thương mại và chất lượng sản phẩm.

3.2.4.2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm



Thí nghiệm bố trí 2 lần lặp lại trên 2 nhân tố W và S. Với W là tỉ lệ siro phối chế; S là nồng độ dịch Siro

W <sub>1</sub> : 20%	S <sub>1</sub> : 20%
W <sub>2</sub> : 30%	S <sub>2</sub> : 25%
W <sub>3</sub> : 40%	S <sub>3</sub> : 30%

3.2.4.3. Chuẩn bị thí nghiệm

Các bước chuẩn bị như thí nghiệm trên, chuẩn bị dịch siro với các nồng độ xác định bằng cách cho đường RE vào nước với các tỉ lệ 20%, 25%, 30%, đun nhẹ để hòa tan hết đường và thanh trùng dịch siro.

3.2.4.4. Tiến hành thí nghiệm

Sữa tươi chia làm 9 mẫu phối chế 5% đường lactose, 10% dịch quả, cây giống với tỉ lệ 6% và cho lên men đến độ acid dừng  $105^{\circ}\text{T}$ . Kết thúc lên men, sản phẩm được phối chế với dịch siro theo tỉ lệ khảo sát

#### 2.2.4.5. Chỉ tiêu xác định

Sản phẩm được đánh giá chất lượng bằng phương pháp cảm quan theo thang điểm mô tả (bảng 8)

### 3.2.5. Thí nghiệm 5: Khảo sát khả năng bảo quản thành phẩm

3.2.5.1. Mục đích: Theo dõi và chọn thời gian bảo quản thích hợp cho thành phẩm.

3.2.5.2. Tiến hành thí nghiệm:

Sản phẩm được bảo quản trong chai nhựa đóng nắp kín ở nhiệt độ  $4-6^{\circ}\text{C}$ , theo dõi sự thay đổi các chỉ tiêu độ acid, độ cồn và chất lượng sản phẩm theo thời gian để xác định thời gian bảo quản thích hợp.

### 3.3. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

3.3.1. Phương pháp phân tích

- Độ acid: Phương pháp xác định độ chua của sản phẩm (phụ chương 1)
- Độ cồn: Phương pháp xác định độ cồn ( phụ chương 1)
- Vi sinh vật: Phương pháp xác định hàm lượng vi sinh vật(phụ chương

1)

3.3.2. xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphic 3.0 và Minitab



**Hình 6 Nguyên liệu dùng cho chế biến sữa Kefir**

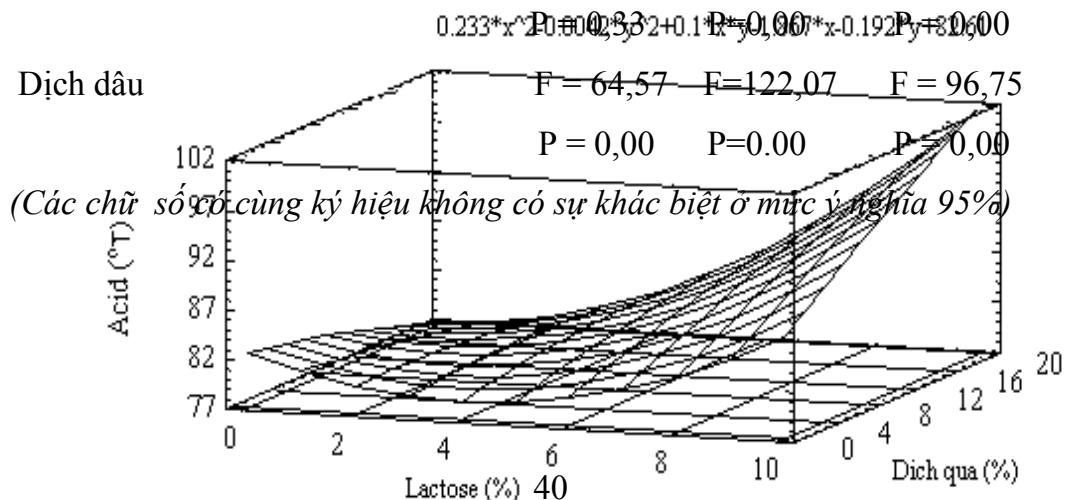
## Chương 4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1. Ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.

Để khảo sát ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến khả năng lên men và chất lượng sản phẩm, thí nghiệm tiến hành khảo sát hàm lượng đường lactose và dịch dâu bổ sung theo các tỉ lệ: Lactose 0%, 5%, 10%, Dịch dâu: 0%, 10%, 20%. Với tỉ lệ men giống cố định ở 4% (theo thể tích). Kết quả xác định vi sinh vật trong men giống gồm: vi khuẩn:  $3,18 \cdot 10^{14}$  (cfu)/ml, nấm men:  $9,60 \cdot 10^{11}$  (cfu)/ml. Hàm lượng lactose có sẵn trong nguyên liệu là 4,6g/100ml, dịch dâu có pH = 4,0, độ Brix = 5; acid dừng là 95<sup>o</sup>T. Kết quả thống kê độ cồn, vi khuẩn, nấm men và thời gian lên men được cho trong bảng 9

**Bảng 9: Ảnh hưởng của hàm lượng đường lactose và nước ép dâu đến thời gian lên men, độ cồn và mật số vi sinh vật**

Thành phần	Hàm lượng (%)	Thời gian (giờ)	Độ cồn (g/l)	Vi khuẩn (A.10 <sup>14</sup> cfu/ml)	Nấm men (A.10 <sup>14</sup> cfu/ml)
Lactose (L)	0	17,00	0,39 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	7,4 <sup>a</sup>
	5	16,50	0,45 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	8,5 <sup>b</sup>
	10	14,50	0,46 <sup>a</sup>	3,7 <sup>b</sup>	9,3 <sup>c</sup>
Dịch dâu (F)	0	17,00	0,21 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	7,8 <sup>a</sup>
	10	16,00	0,32 <sup>b</sup>	2,9 <sup>b</sup>	8,3 <sup>b</sup>
	20	15,50	0,77 <sup>c</sup>	3,1 <sup>b</sup>	9,1 <sup>c</sup>
Lactose			F = 1,20	F = 488,93	F = 211,00

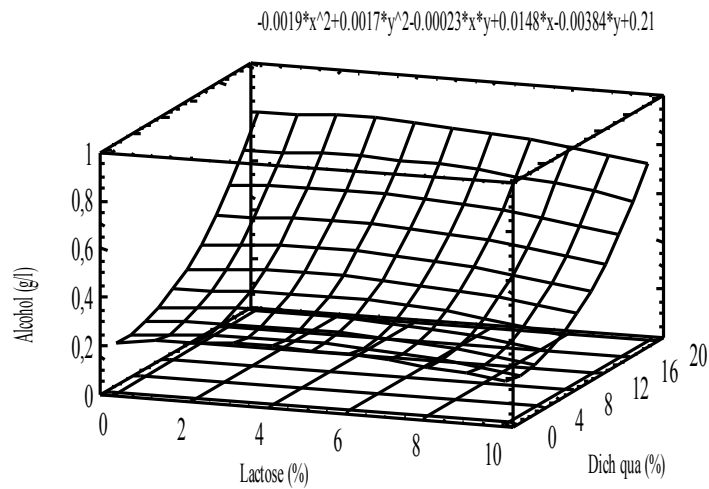


### **Hình 7: Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa độ acid theo hàm lượng đường lactose và dịch dâu**

Theo bảng 9 và hình 7 cho thấy, hàm lượng đường lactose và tỷ lệ dịch dâu ảnh hưởng đến độ acid của môi trường lên men, hàm lượng của các thành phần này càng tăng thì càng có nhiều cơ chất cho vi sinh vật sử dụng.

Khi bổ sung lactose, tức là bổ sung cơ chất chính cho nhóm vi khuẩn lactic hoạt động nên trong cùng thời gian lên men hàm lượng lactose cao, lượng acid sản sinh vào môi trường càng nhiều do vi khuẩn lactic hoạt động mạnh mẽ. Ngoài ra, khi dịch quả được bổ sung sẽ làm giảm pH môi trường (pH= 5,5÷6), tạo pH ban đầu tối ưu cho sự phát triển của nhóm vi khuẩn lactic, giúp vi khuẩn thích nghi và phát triển tốt hơn. Khi vi khuẩn bắt đầu phát triển tốt sẽ cung cấp đủ acid cho môi trường đến 110-120°T hoặc cao hơn .

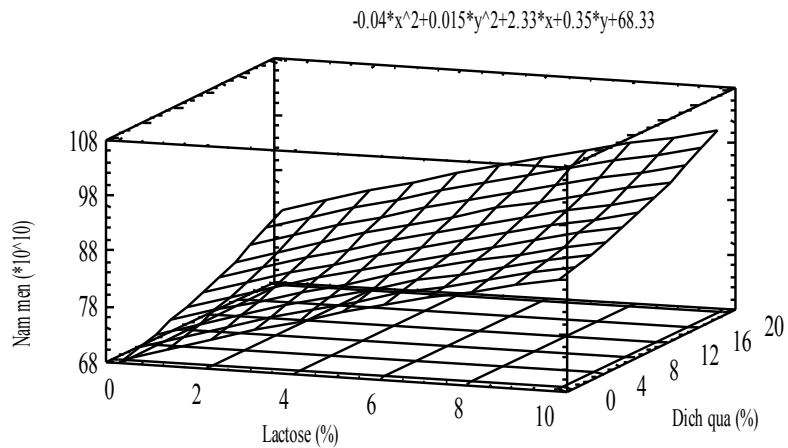
Khi hàm lượng lactose bổ sung thấp (<5%), tỷ lệ dịch quả càng nhiều, lượng acid sinh ra thấp hơn so với mẫu ít hoặc không bổ sung dịch quả trong cùng thời gian lên men, do nấm men được bổ sung nhiều cơ chất nên phát triển mạnh mẽ và có sự cạnh tranh với vi khuẩn, vi khuẩn không thích nghi tốt nên lượng acid sinh ra không cao, nhưng khi hàm lượng lactose bổ sung trên 5%, vi khuẩn chiếm ưu thế và lượng acid sinh nhiều hơn.



**Hình 8 Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa độ cồn theo hàm lượng đường lactose và dịch dâu**

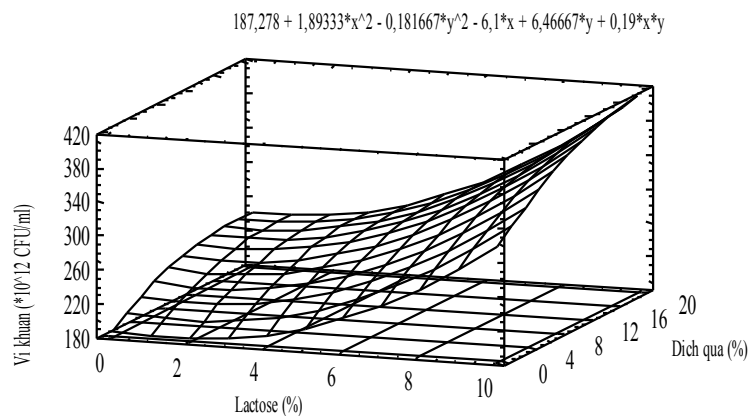
Qua hình 8 nhận thấy, tỷ lệ dịch dâu bổ sung có ảnh hưởng lớn đến độ cồn của sản phẩm, tuy nhiên hàm lượng lactose lại không ảnh hưởng nhiều, khi bổ sung đường lactose, lượng cồn sinh ra có thay đổi nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê. Trong khi đó, dịch dâu lại có tác động rõ nét, do trong men giống kefir có chứa tương đối một lượng lớn tế bào nấm men (chiếm 5-10% tổng số vi sinh vật trong hạt kefir), trong đó chỉ có một số ít sử dụng được đường lactose, còn cơ chất chính cho hầu hết tế bào nấm men là fructose, glucose. Do vậy, fructose trong dịch quả là nguyên nhân chính làm cho lượng cồn trong sản phẩm tăng vọt, đồng thời sinh  $\text{CO}_2$  và một số chất sinh hương tạo mùi cho sản phẩm.

Theo bảng 9 và hình 9, mật số nấm men bị ảnh hưởng nhiều bởi cả hai nhân tố đường lactose và dịch dâu, qua các nghiên cứu về hệ vi sinh vật, trong men kefir có chứa nhiều loài nấm men, trong đó có một số loại sử dụng được đường lactose, do đó đường lactose cũng là nguyên nhân ảnh hưởng đến sinh khối của nấm men.



**Hình 9 Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa mật số nấm men theo đường lactose và dịch dậu**

Như vậy, khi hàm lượng đường lactose và dịch dậu càng cao, càng có nhiều cơ chất cho nấm men sử dụng, hoạt động và phát triển, làm cho mật số nấm men tăng cao và sinh ra một lượng cồn tương đối và  $CO_2$  tạo cho sản phẩm có vị nồng và mùi thơm mạnh mẽ.



**Hình 10 Sự tương quan giữa mật số vi khuẩn theo hàm lượng lactose và dịch dậu**



Hình 10 cho thấy sự ảnh hưởng mạnh mẽ của dịch dâu và đường lactose đến mật số vi khuẩn. Trong men Kefir, nhóm vi khuẩn lactic chiếm ưu thế, chúng sử dụng cơ chất chính là đường lactose, glucose và galactose nên khi lượng lactose càng cao thì mật số vi khuẩn càng cao và tốc độ phát triển cũng nhanh hơn.

Với dịch dâu cũng vậy, khi fructose bị phân cắt thành các glucose sẽ cung cấp thêm cơ chất cho vi khuẩn hoạt động và phát triển, do vậy mật số của chúng cũng tăng nhanh khi hàm lượng dịch dâu tăng.

**Bảng 10a: Kết quả đánh giá cảm quan mùi vị sản phẩm (từng nhân tố)**

Thành phần	Hàm lượng (%)	Mùi	Vị
Lactose	0	3,40 <sup>b</sup>	3,36 <sup>b</sup>
	<b>5</b>	<b>4,03<sup>a</sup></b>	<b>4,03<sup>a</sup></b>
	10	3,70 <sup>ab</sup>	3,70 <sup>a</sup>
Dịch quả	0	3,33 <sup>b</sup>	3,83 <sup>a</sup>
	<b>10</b>	<b>4,03<sup>a</sup></b>	<b>3,70<sup>a</sup></b>
	20	3,76 <sup>a</sup>	3,57 <sup>a</sup>
Lactose		F = 6,81 P = 0,00	F = 10,42 P = 0,00
Dịch dâu		F = 8,47 P = 0,00	F = 1,67 P = 0,19

Theo kết quả bảng 10a, hàm lượng lactose bổ sung có ảnh hưởng đến vị của sản phẩm, mùi vị giữa mẫu có bổ sung lactose và không bổ sung lactose có sự khác biệt ý nghĩa, nhưng giữa mẫu bổ sung 5% và 10% lactose thì mùi vị lại không khác biệt, dựa vào số điểm trung bình và yếu tố kinh tế, mẫu bổ sung 5% lactose được xem là hiệu quả nhất.

Nồng độ dịch dâu bổ sung lại không ảnh hưởng nhiều đến vị, vị sản phẩm không có sự khác biệt ý nghĩa nhưng sự khác biệt về mùi giữa mẫu có và không có bổ sung dịch dâu lại rất rõ do dịch dâu có mùi thơm khá mạnh và lại là cơ chất chính cho nấm men sử dụng, phát triển và sinh hương cho sản phẩm. Tuy nhiên, giữa mẫu bổ sung 10% và 20% dịch dâu thì sự khác biệt về

mùi lại không có ý nghĩa thống kê nên chọn mẫu bổ sung 10% dịch dâu là tối ưu hơn

**Bảng 10b: Kết quả đánh giá cảm quan mùi vị sản phẩm  
(tương tác 2 nhân tố)**

Lactose	Dịch dâu	Mùi	Vị
0	0	3.20 <sup>ab</sup>	3.70 <sup>ab</sup>
0	10	3.60 <sup>ab</sup>	3.00 <sup>b</sup>
0	20	3.40 <sup>ab</sup>	3.40 <sup>ab</sup>
5	0	3.60 <sup>ab</sup>	4.00 <sup>a</sup>
<b>5</b>	<b>10</b>	<b>4.50<sup>a</sup></b>	<b>4.30<sup>a</sup></b>
5	20	4.00 <sup>ab</sup>	3.80 <sup>ab</sup>
10	0	3.20 <sup>b</sup>	3.80 <sup>ab</sup>
10	10	4.00 <sup>ab</sup>	3.80 <sup>ab</sup>
10	20	3.90 <sup>ab</sup>	3.50 <sup>ab</sup>
		F=0,67	F=2,55
		P=0,617	P=0,04

Như vậy, kết hợp kết quả đánh giá cảm quan từ bảng 10a và 10b, hàm lượng đường lactose 5% và dịch dâu 10% được chọn để bổ sung vào nguyên liệu.

#### **4.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ men giống đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm**

Để khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ men giống đến chất lượng sản phẩm, thí nghiệm được bố trí ở 4 tỉ lệ men: 2%, 4%, 6%, 8%. Sữa tươi nguyên liệu được bổ sung 5% đường lactose và 10% dịch quả và được cấy men giống với 4 tỉ lệ khảo sát. Acid dùng là 95<sup>0</sup>T. Các chỉ tiêu xác định được cho trong bảng 11

**Bảng 11: Ảnh hưởng của tỉ lệ men đến độ cồn, nấm men, vi khuẩn và thời gian lên men**

Tỉ lệ men giống (%)	Độ cồn (g/l)	Thời gian (giờ)	Nấm men ( $A.10^{11}$ cfu/ml)	Vi khuẩn ( $A.10^{14}$ cfu/ml)
2	0,05 <sup>c</sup>	20,00	5,2	2,1
4	0,20 <sup>b</sup>	17,50	6,6	2,8
<b>6</b>	<b>0,34<sup>a</sup></b>	<b>14,00</b>	<b>7,2</b>	<b>3,5</b>
8	0,66 <sup>a</sup>	13,00	8,1	4,2

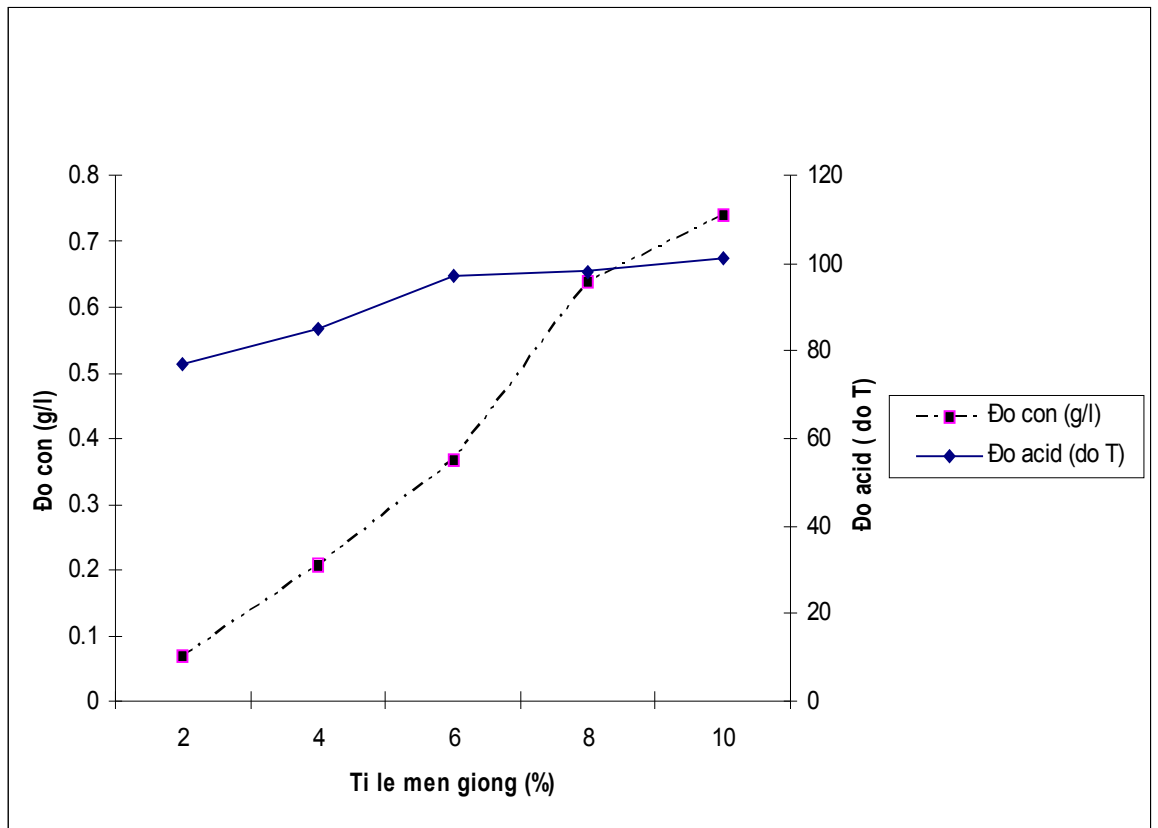
F = 337,54

P = 0,00

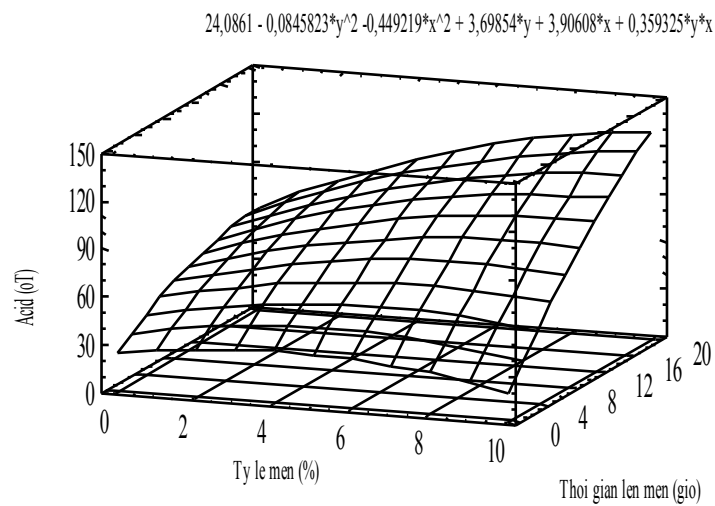
Theo hình 11 cho thấy, khi lượng men giống cấy vào càng nhiều, lượng acid và lượng cồn càng tăng. Tuy nhiên, khi tỉ lệ men cao (>6%) thì tốc độ tăng acid chậm hơn, do khi mật số vi sinh vật cao xảy ra hiện tượng cạnh tranh sinh học làm cho quá trình phát triển của vi sinh vật không được thuận lợi. Vì thế, tốc độ sinh acid bị chậm lại.

Tốc độ sinh cồn chậm hơn khi bổ sung tỉ lệ men trên 8% và khi lượng men cao thì mật số vi khuẩn cao, trong đó có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn acetic nên có sự chuyển hóa cồn thành acid acetic làm cho sản phẩm có vị chua gắt và mùi không hấp dẫn.

Đối với sản phẩm Kefir đòi hỏi lượng cồn không quá cao cũng không quá thấp, vị chua dịu và mùi hương mạnh mẽ, vì vậy tỉ lệ men giống nên chọn sao cho hòa hợp được các chỉ tiêu này.



**Hình 11: Sự tương quan giữa độ acid và độ còn theo tỉ lệ men giồng**



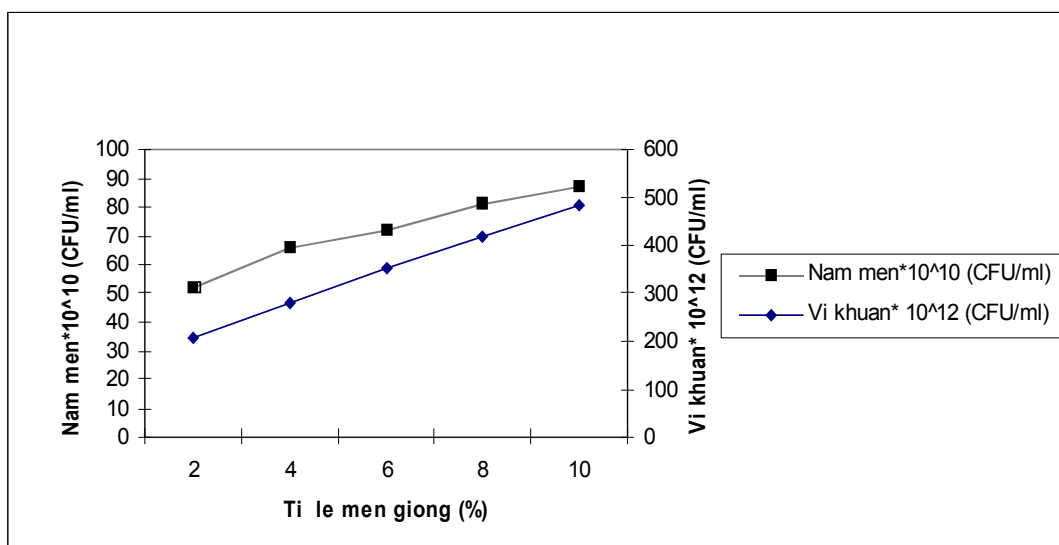
**Hình 12: Sự tương quan giữa độ acid và thời gian lên men theo tỉ lệ men giồng**

Hình 12 cho thấy, thời gian lên men và độ tăng acid phụ thuộc nhiều vào tỉ lệ men bổ sung. Khi lượng men quá thấp (<4%) thì thời gian để đạt độ acid yêu cầu khá dài, khi quá trình lên men dài dễ xảy ra hiện tượng tạp nhiễm, làm ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm và mất nhiều thời gian cho sản xuất. Khi tỉ lệ men cao (>8%) sẽ rút ngắn được thời gian lên men nhưng các vi khuẩn sinh hương lại không đủ thời gian để sinh mùi hấp dẫn cho sản phẩm, làm cho hương vị của Kefir kém đặc trưng hơn.

**Bảng 12: Kết quả cảm quan mùi vị sản phẩm**

Tỉ lệ men (%)	Vị	Mùi
2	3,40 <sup>a</sup>	2,75 <sup>b</sup>
4	3,60 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
<b>6</b>	<b>3,45<sup>a</sup></b>	<b>3,70<sup>a</sup></b>
8	3,35 <sup>a</sup>	3,05 <sup>b</sup>
	F = 4,87	F=0,48
	P=0,00	P=0,69

Từ kết quả thảo luận ở bảng 12, tỉ lệ men 6% là thích hợp nhất cho quá trình lên men, đảm bảo được chất lượng sản phẩm và tiết kiệm được thời gian.



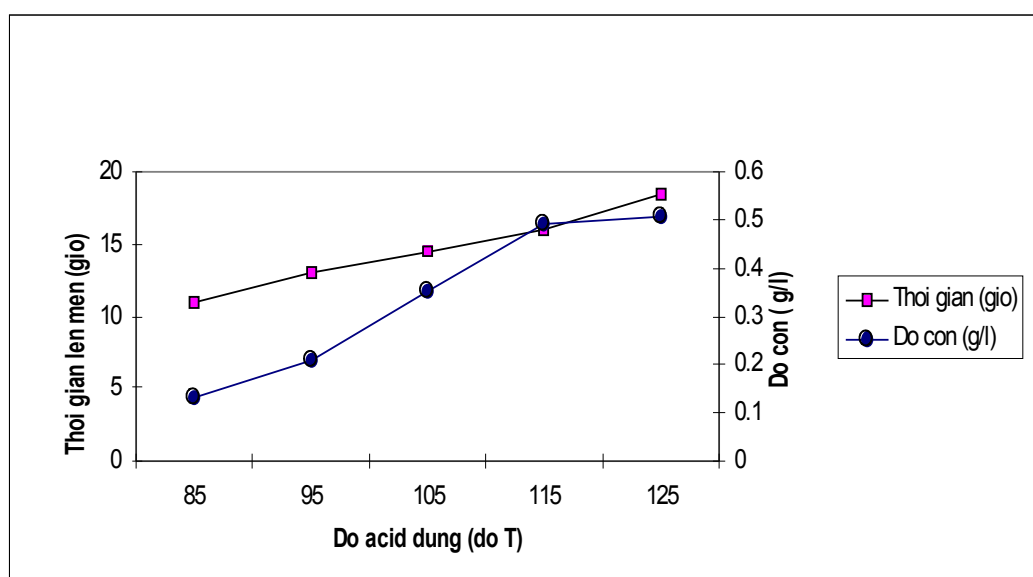
**Hình 13: Sự tương quan giữa mật số nấm men và vi khuẩn theo tỉ lệ men giống**

Hình 13 thể hiện mật số nấm men và vi khuẩn tăng một cách đều đặn theo mức độ tăng của tỉ lệ giống, nghĩa là khi đạt 95<sup>0</sup>T, lượng cơ chất trong môi trường vẫn còn cung cấp cho nấm men và vi khuẩn hoạt động nên chưa thấy có sự suy giảm mật số, do vậy cần có một chế độ bảo quản thích hợp sau khi kết thúc quá trình lên men để ức chế sự phát triển của chúng.

Qua các hình 11, 12, 13 cho thấy, tốc độ sản sinh các chất vào môi trường không đều đặn như mức độ tăng của mật số vi sinh vật. Vì lên men là một quá trình phức tạp, chỉ một thay đổi nhỏ trong điều kiện môi trường như pH, nhiệt độ, tỉ lệ men giống....thì quá trình sản sinh sản phẩm vào môi trường diễn ra theo nhiều chiều hướng khác nhau, có khi chúng sử dụng cơ chất chỉ để tăng sinh khối mà không sinh sản phẩm vào môi trường, nhất là khi lên men trong điều kiện hiếu khí.

#### 4.3. Ảnh hưởng của độ acid dừng đến thời gian lên men và chất lượng sản phẩm.

Để khảo sát ảnh hưởng của độ acid dừng, thí nghiệm được bố trí cho quá trình lên men kết thúc ở 4 độ acid dừng khác nhau: 85<sup>0</sup>T, 95<sup>0</sup>T, 105<sup>0</sup>T, 115<sup>0</sup>T. Sữa nguyên liệu được phối chế với 5% đường lactose và 10% dịch quả, tỉ lệ men giống sử dụng cố định ở 6% theo thể tích.



**Hình 14: Sự tương quan giữa thời gian lên men và độ còn theo độ acid dừng**

Hình 14 cho thấy, độ acid tăng một cách tương đối đều đặn theo thời gian, cách khoảng 2 giờ thì độ acid tăng thêm  $10^0T$ . Tuy nhiên, khi đạt đến độ acid cao ( $>110^0T$ ), tốc độ tăng acid chậm dần và thời gian kéo dài hơn. Do độ acid tăng cao làm cho pH môi trường xuống, ức chế trở lại sự hoạt động của vi khuẩn làm cho quá trình sinh acid chậm dần, nếu quá trình lên men vẫn tiếp tục thì đến một lúc nào đó acid của môi trường sẽ ức chế toàn bộ sự phát triển của vi sinh vật.

Hình 14 cũng thể hiện mức độ tăng của hàm lượng cồn theo độ acid dừng, ở độ acid dừng từ  $95-115^0T$ , tốc độ sinh cồn nhanh hơn do ở giới hạn acid này sẽ tạo pH môi trường thuận lợi cho sự phát triển của nấm men nên chúng sinh cồn rất nhanh. Nhưng khi đạt đến độ acid  $>115^0T$  thì quá trình sinh cồn bị giảm hẳn lại. Điều này có thể do mật số vi khuẩn tăng cao nên có hiện tượng cạnh tranh sinh học gây ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm men. Ngoài ra, có thể do lượng cơ chất trong môi trường giảm nên quá trình lên men sinh cồn chậm lại. Bên cạnh đó, có sự chuyển hóa của cồn thành acid acetic do sự hiện diện của nhóm vi khuẩn acetic, vì vậy quá trình lên men vẫn tiếp tục xảy ra đến độ acid cao, sinh nhiều acid acetic gây vị chua gắt cho sản phẩm. Đồng thời, khi mật số nấm men cao làm cho sản phẩm có vị hơi đắng của xác men.

Hơn nữa, khi độ acid cao, các mixen càng có khuynh hướng kết hợp các khối đông lại với nhau, dịch nước - whey - đường dễ bị tách ra, lực bền gel của sản phẩm giảm, rất dễ làm cho sản phẩm bị phân lớp. Tuy Kefir là sản phẩm có độ nhớt khá cao nhưng để đạt tính thương mại và tạo mùi vị thích hợp thì cần có thêm công đoạn phối chế với dịch siro sau khi quá trình lên men kết thúc. Do vậy, việc chọn lựa độ acid dừng thích hợp để vừa đảm bảo cho hình thái sản phẩm được ổn định trong quá trình bảo quản, vừa tạo cho sản phẩm có vị chua ngọt hài hòa là điều rất quan trọng.

Qua kết quả khảo sát và đánh giá cảm quan cho các chỉ tiêu, độ acid dừng  $105^0T$  được chọn để kết thúc quá trình lên men vì mùi và hình thái giữa các mẫu không có sự khác biệt nhưng vị của mẫu có độ acid  $105^0T$  lại có khác biệt rõ và được đánh giá tốt hơn.

**Bảng 13: Kết quả cảm quan mùi vị và hình thái sản phẩm**

<b>Độ acid dừng (°T)</b>	<b>Mùi</b>	<b>Vị</b>	<b>Hình thái</b>
85	3.10 <sup>a</sup>	3,00 <sup>b</sup>	3.80 <sup>a</sup>
95	3.30 <sup>a</sup>	3,00 <sup>b</sup>	3.30 <sup>a</sup>
<b>105</b>	<b>3.80<sup>a</sup></b>	<b>4,00<sup>a</sup></b>	<b>3.80<sup>a</sup></b>
115	3.10 <sup>a</sup>	3,30 <sup>ab</sup>	3.30 <sup>a</sup>
	F= 2,25 P=0,10	F=3,99 P= 0,01	F=2,63 P=0,65

#### 4.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ phối chế sau lên men đến hình thái và chất lượng sản phẩm

Để tiến hành khảo sát tỉ lệ phối chế, sau khi kết thúc quá trình lên men ở độ acid dừng 105<sup>0</sup>T, thí nghiệm tiến hành phối chế với dịch siro theo các nồng độ và tỉ lệ khác nhau. Nồng độ siro được khảo sát ở 3 mức 20%, 25%, 30% và tỉ lệ phối chế vào dịch sữa sau lên men là 20%, 30%, 40%. Kết quả chọn lựa dựa vào đánh giá cảm quan .

**Bảng 14a: Kết quả cảm quan mùi, vị và hình thái sản phẩm (Từng nhân tố)**

<b>Nhân tố</b>	<b>Hàm lượng</b>	<b>Mùi</b>	<b>Vị</b>	<b>Hình thái</b>
Nồng độ siro (S)	20	3,77 <sup>a</sup>	3,07 <sup>b</sup>	3,67 <sup>a</sup>
	<b>25</b>	<b>3,93<sup>a</sup></b>	<b>3,70<sup>a</sup></b>	<b>3,58<sup>a</sup></b>
	30	4,13 <sup>a</sup>	3,97 <sup>a</sup>	4,03 <sup>a</sup>
Tỉ lệ phối chế (W)	20	3,87 <sup>a</sup>	3,20 <sup>b</sup>	3,57 <sup>a</sup>
	<b>30</b>	<b>3,97<sup>a</sup></b>	<b>3,93<sup>a</sup></b>	<b>4,03<sup>ab</sup></b>
	40	4,00 <sup>a</sup>	3,40 <sup>b</sup>	3,67 <sup>b</sup>
S		F=2,35 P=0,10	F=12,60 P= 0,00	F=3,04 P=0,05
W		F= 2,35 P=0,10	F=7,03 P= 0,00	F=3,04 P= 0,05

Qua bảng 14, mùi giữa các mẫu không có sự khác biệt nhưng nồng độ dịch siro có ảnh hưởng đến vị của sản phẩm, vị giữa nồng độ siro 25% và



30% không có khác biệt, do vậy nên chọn nồng độ siro 25% để có kinh tế hơn. Ở nồng độ này sản phẩm vẫn đạt được sự hài hòa về vị chua ngọt. Với nồng độ siro như trên thì tỉ lệ phối vào sản phẩm là 30% sẽ thích hợp nhất, vì khi phối với tỉ lệ 20% độ nhớt sản phẩm còn khá cao, không phù hợp lắm cho sản phẩm dạng uống và ít được ưa chuộng hơn. Khi phối với tỉ lệ 40% có thể mang lại hiệu quả kinh tế nhưng sản phẩm lại loãng, dễ bị phân lớp, gây khó khăn cho quá trình bảo quản. Đồng thời, ở tỉ lệ phối chế 30% vị của sản phẩm cũng có khác biệt ý nghĩa

**Bảng 14b: Kết quả cảm quan mùi, vị và hình thái sản phẩm (Tương tác 2 nhân tố)**

<b>Nồng độ siro</b>	<b>Tỉ lệ phối chế</b>	<b>Mùi</b>	<b>Vị</b>	<b>Hình thái</b>
20	20	3,5 <sup>ab</sup>	2,5 <sup>b</sup>	3,7 <sup>a</sup>
20	30	3,7 <sup>a</sup>	2,9 <sup>b</sup>	3,4 <sup>ab</sup>
20	40	4,1 <sup>a</sup>	3,8 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>
25	20	3,8 <sup>a</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	3,1 <sup>b</sup>
<b>25</b>	<b>30</b>	<b>4,4<sup>a</sup></b>	<b>4,4<sup>a</sup></b>	<b>4,4<sup>a</sup></b>
25	40	4,2 <sup>a</sup>	4,2 <sup>a</sup>	3,2 <sup>b</sup>
30	20	3,8 <sup>a</sup>	3,6 <sup>ab</sup>	3,9 <sup>a</sup>
30	30	4,3 <sup>a</sup>	3,8 <sup>a</sup>	4,3 <sup>a</sup>
30	40	4,7 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>
		F=3,2	F=4,5	F=3,68
		P=0,01	P=0,00	P=0,00

#### **4.5. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến chất lượng sản phẩm**

Thành phẩm sau khi phối chế sẽ có độ acid là 75<sup>0</sup>T, độ cồn là 14,75g/l được đưa vào bảo quản ở 4÷6°C và tiến hành đo các chỉ tiêu chất lượng theo thời gian

**Bảng 15: Chỉ tiêu hóa lí, vi sinh của sản phẩm theo thời gian bảo quản**

Thời gian (ngày)	Độ acid (độ T)	Độ còn (g/l)*10 <sup>-2</sup>	<i>Salmonell</i> a(cfu/ml)	<i>E.coli</i> (cfu/ml)
0	75 <sup>a</sup>	14,75 <sup>a</sup>	0	0
5	75 <sup>a</sup>	14,75 <sup>a</sup>	0	0
10	76 <sup>a</sup>	14,85 <sup>a</sup>	0	0
15	77 <sup>ab</sup>	15,10 <sup>ab</sup>	0	0
20	80 <sup>b</sup>	15,40 <sup>b</sup>	0	0
	F= 17,80	F=22,36		
	P=0,00	P= 0,00		

Qua bảng 15 cho thấy, khi bảo quản sản phẩm ở 4÷6°C, thời gian để các chỉ tiêu chất lượng vẫn còn duy trì được là trước 15 ngày, tuy ở nhiệt độ lạnh nhưng vi sinh vật vẫn hoạt động nhưng với tốc độ chậm hơn nên các chỉ tiêu hóa lí của sản phẩm vẫn tiếp tục thay đổi. Mặc dù sau 20 ngày sản phẩm vẫn chưa có dấu hiệu hư hỏng nhưng độ acid, độ còn đã có sự thay đổi ý nghĩa. Vậy để đảm bảo được chất lượng nên giữ sản phẩm ở 4÷6°C và sử dụng trước 15 ngày. Qua kiểm tra vi sinh, sau 20 ngày trong sản phẩm không tồn tại vi sinh vật gây bệnh



**Hình 15: Sản phẩm Kefir**

## Chương 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 5.1. Kết luận

Qua quá trình tiến hành thí nghiệm, thu thập số liệu và tổng hợp các kết quả thu nhận được, có thể rút ra các kết luận như sau:

- Để quá trình lên men tốt và sản phẩm đạt chất lượng cao thì tỉ lệ bổ sung tối ưu nhất cho nguyên liệu là: đường lactose 5% và dịch quả 10%.

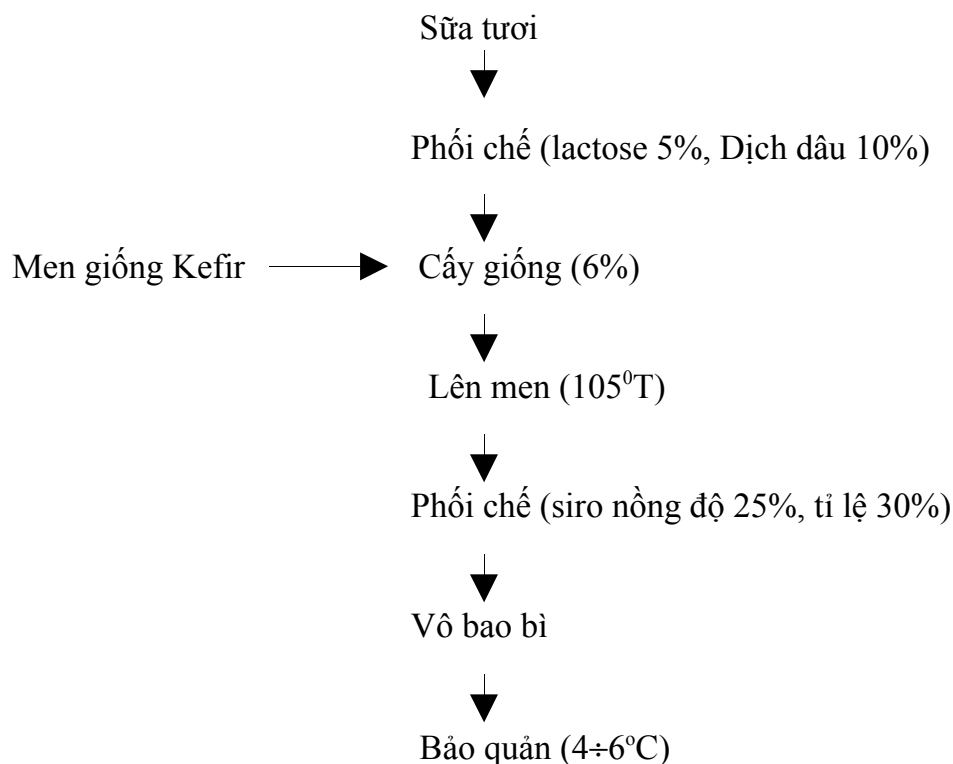
- Tỉ lệ men giống tốt nhất cho quá trình lên men là 6%.

- Độ acid dừng thích hợp nhất cho sản phẩm đạt mùi vị và hình thái tốt là 105<sup>0</sup>T.

- Tỉ lệ phối chế cho thành phẩm sau lên men được đánh giá cao ở nồng độ siro 25% với tỉ lệ phối vào dịch lên men là 30%.

- Thời gian bảo quản thích hợp nhất để sản phẩm vẫn giữ được chất lượng ổn định là 15 ngày ở 4÷6°C.

#### Quy trình kết luận:



## 5.2. Đề nghị

Kefir là sản phẩm tuy đã có từ rất lâu đời nhưng trên thị trường Việt Nam thì vẫn còn rất mới lạ. Hơn nữa do quá trình phát triển và hệ vi sinh vật trong Kefir còn rất phức tạp nên phương pháp chế biến Kefir trên qui mô công nghiệp còn nhiều khó khăn, tính thương mại không cao và chất lượng sản phẩm khó được thị trường chấp nhận. Điều này là một hạn chế lớn trong công nghiệp chế biến sữa vì Kefir ngoài việc sử dụng như một loại sữa chua thông thường, nó còn được quan tâm như một loại dược phẩm chữa bệnh và rất có lợi cho sức khỏe, Kefir chứa đầy đủ và quân bình các tố chất cần thiết cho cơ thể, nó thích hợp cho mọi lứa tuổi, đặc biệt là trẻ em, người bệnh và người già. Có rất nhiều thông tin về dược tính của Kefir mà đến nay người ta vẫn còn xem là điều bí mật

Do thời gian nghiên cứu ngắn, thiết bị và phương tiện thí nghiệm còn nhiều hạn chế nên nội dung thí nghiệm không thể khảo sát hết các yếu tố có liên quan đến chất lượng và tính thương mại cho sản phẩm Kefir. Vì vậy để góp phần nâng cao giá trị và đa dạng hóa cho sản phẩm, tạo điều kiện cho Kefir ngày càng quen thuộc và gắn gũi với người tiêu dùng Việt Nam, sản phẩm cần được nghiên cứu tiếp những vấn đề sau:

- Khảo sát thời gian và nhiệt độ ủ chín sản phẩm sau lên men để kefir có hương vị mạnh mẽ và hấp dẫn hơn.
- Khảo sát phối chế dịch quả với các loại quả khác, hoặc bổ sung cafe, cacao..... để đa dạng hóa sản phẩm.
- Nghiên cứu sự phát triển của hạt Kefir trên các môi trường mới như nước dừa, sữa đậu nành, sữa dừa, dịch quả nguyên chất.....
- Nghiên cứu biện pháp kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm
- Nghiên cứu phương pháp sản xuất Kefir trên qui mô công nghiệp hiện đại và khả năng phát triển sản phẩm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. ANNONYMOUS. 2005. About Kefi (<http://www.heliosnutrition.com>)
2. Bùi Thị Như Thuận, Nguyễn Phùng Tiến, Bùi Minh Đức. 1991. Kiểm Tra Chất Lượng và Thanh Tra Vệ Sinh An Toàn Thực Phẩm. Hà Nội: NXB Y Học.
3. Dom 's Kefir in-site (<http://user.chairot.com.au/~dna/Kefirpage.html>).
4. Dương Thị Phượng Liên. 1999. Kỹ thuật chế biến sữa và các sản phẩm sữa( bài giảng). Cần Thơ: ĐHCT
5. Early, R. 1992. The Technology of Dairy Products. Newyork: VCH Publishers, INC.
6. Huỳnh Đắc Hiếu. 1970. Food Chemistry. Modern Asia Editions.
7. Lê Ngọc Tú, Bùi Đức Hợi, Duẩn. 2001. Hoá học Thực Phẩm. Hà Nội: NXB Khoa Học Kỹ Thuật Hà Nội.
8. Lâm Xuân Thanh. 2003. Giáo trình công nghệ chế biến sữa và các sản phẩm từ sữa. Hà Nội: NXB Khoa Học Kỹ Thuật. .
9. Lê Văn Việt Mẫn. 2004. Công nghệ sản xuất các sản phẩm từ sữa. TPHCM: NXB Đại Học Quốc Gia TPHCM.
10. Lê Thị Liên Thanh, Lê Văn Hoàng. 2002. Công nghệ chế biến sữa và các sản phẩm sữa. Hà Nội: NXB Khoa Học Kỹ Thuật.
11. Lê Xuân Phương. 2001. Vi sinh vật công nghiệp. Hà Nội: NXB Xây Dựng
12. Nanak, S. 1997. Dairy Chemistry . Aman Publishing house
13. Nguyễn Minh Thủy. 2003. Công nghệ sau thu hoạch rau quả. Cần Thơ: Khoa Nông Nghiệp - Đại học Cần Thơ
14. Nguyễn Tú Thanh. 2003. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men Kefir - Luận văn tốt nghiệp. Cần Thơ: Khoa Nông Nghiệp - Đại học Cần Thơ
15. Phạm Văn Sô, Bùi Thị Như Thuận. 1991. Kiểm nghiệm lương thực thực phẩm. Hà Nội: Trường Đại Học Bách Khoa Hà Nội.

## PHỤ CHƯƠNG I

### 1.1 Phương pháp xác định độ còn của sản phẩm :

#### 1.1.1. Dụng cụ vật liệu và thuốc thử :

- Thuốc thử Nitrô Cromic :

Kali bicromat	4,9 g
Acid nitric đặc đặc vừa đủ	1000 ml

- Dung dịch Kali iodua 10%

Kali iodua	100 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml

Pha khi dùng : dung dịch Natri hyposunfit O. I N. (  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  )

#### 1.1.2 Tiến hành thử :

Lấy 100 ml mẫu đa loại  $\text{CO}_2$  cho vào máy cất lấy dịch cất cho đến khi gần cạn. Cho thêm nước cất vào dịch cất để vừa đủ 100ml.

Cho vào bình nón có nút kín :

- Dịch cất	5ml
- Nước cất	5ml
- Dung dịch nitro cromic	10ml

Đậy kín nút và để tiếp xúc 30 phút, cho thêm :

Dung dịch kali iodua	10ml
Nước cất	100ml

Lắc đều. Sau 2 phút, chuẩn độ iod được giải phóng ra thể tự do bằng dd natri hyposunfit O, I N. Phản ứng kết thúc màu chuyển từ màu vàng sang xanh lục của các muối crom III.

Trường hợp nếu khi cho dung dịch nitro cromic vào đã có ngay màu xanh lục là chưa có thừa dung dịch nitro cromic, cần phải cho thêm hoặc dùng lượng dịch thử ít hơn nữa.

Làm song song với 1 mẫu trắng với 10 ml dung dịch nitro cromic và 10 ml nước cất, theo đúng thao tác và thời gian như mẫu thử.

### 1.1.3. Tính kết quả :

1 ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1 N tương đương với 1.15 mg rượu etylic tính bằng mg trong 1 lít mẫu cần thử :

$$(N - n) * 1,15 * 1000 / 5$$

trong đó :

N : số ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0, 1 N dùng để định lượng mẫu trắng.

n : số ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0, 1 N dùng để định lượng mẫu thử.

Muốn chuyển sang độ rượu, nghĩa là số ml rượu etylic nguyên chất trong 100 ml mẫu, thì chia hàm lượng rượu etylic trong 100ml cho 0,79433 tỷ trọng của rượu etylic.

(Nguồn : **Kiểm tra Chất lượng và Thanh tra Vệ sinh An toàn Thực Phẩm** - Bùi Thị Như Thuận, Phùng Nguyễn Tiến và Bùi Minh Đức - NXB Y Học - 1991).

## 1.2 Xác định độ chua của sản phẩm :

Xác định độ chua của sữa bằng phương pháp định lượng độ chua.

### 1.2.1. Tiến hành thử :

- Cho vào một bình nón :

Sữa cần thử : 10ml.

Dung dịch Phenolphthalein 5 giọt.

Chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0.1N cho đến màu hồng nhạt bền vững.

### 1.2.2. Tính kết quả :

Độ chua của sữa, tính bằng độ T (độ Thorner) nghĩa là số ml NaOH 0.1N dùng để trung hòa các acid tự do trong 100ml sữa.

$$\text{Độ chua ( } ^\circ\text{T) = n * 100/10$$

Trong đó : n là số ml NaOH 0.1N dùng để chuẩn độ 10ml sữa.



### 1.3. Hàm lượng VSV :

#### 1.3.1. Hàm lượng vi khuẩn lên men trong sữa chua

- Nguyên tắc : đếm số khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch dinh dưỡng từ một lượng mẫu xác định trên cơ sở mỗi khuẩn lạc hình thành từ 1 tế bào duy nhất.

- Môi trường nuôi cấy : Fluid Lactose Medium.

- Tiến hành : sử dụng phương pháp đếm đĩa (Total Plate Count) ở các nồng độ khác nhau. Lấy 1ml mẫu pha loãng bằng pipet vô trùng cho vào giữa đĩa petri. Rót vào mỗi đĩa 15ml thạch dinh dưỡng. Lắc tròn xuôi và ngược chiều kim đồng hồ, mỗi chiều 5 lần. Đặt đĩa trên mặt phẳng nằm ngang cho đông tự nhiên. Ủ ấm ở 37°C trong thời gian 24 - 48 giờ.

- Đọc kết quả : đếm số khuẩn lạc trên các đĩa, tính giá trị trung bình của các nồng độ pha loãng và qui ra lượng VSV trong 1 ml mẫu.

#### 1.3.2. *Escherichia Coli*

- Môi trường nuôi cấy:

Môi trường tăng sinh: Fluid Lactose Medium

Môi trường phân lập: EMB (Eosine Methylene Blue Agar)

- Nguyên tắc và tiến hành:

Tăng sinh: cấy 1ml dung dịch mẫu vào ống nghiệm chứa 5ml môi trường tăng sinh. Dùng hai ống nghiệm cho mỗi mẫu

Phân lập: sau 24 giờ, dùng que cấy dịch mẫu từ ống có phản ứng dương tính (có sinh hơi, làm đục môi trường màu vàng) lên môi trường phân lập, ủ ở 37°C trong 24 giờ

Nhận dạng: trên môi trường EMB khuẩn lạc có màu đỏ tía, có ánh kim, tròn, bờ đều, đường kính 0,5mm.

#### 1.3.3 Đếm nấm mốc và nấm men tổng số

Môi trường nuôi cấy: Potato Agar Dextrin

Tiến hành: giống 3.1. ủ ở nhiệt độ phòng trong 3-5 ngày

Độc kết quả: đếm số khuẩn lạc mọc trên các đĩa, kết quả được tính là số khuẩn lạc (CFU) /1ml mẫu.

#### 1.3.4. *Salmonella*

Môi trường nuôi cấy: Môi trường tăng sinh: Selenite Broth

Môi trường phân lập: SS - Agar

Tiến hành: Cấy 1ml dung dịch mẫu vào đĩa chứa 15ml môi trường tăng sinh, dùng que cấy, cấy các khuẩn lạc trong môi trường tăng sinh lên môi trường phân lập, ủ ở 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ

Nhận dạng khuẩn lạc *Samonella*: khuẩn lạc trong suốt, không màu, có hay không có tâm đen.

## PHỤ CHƯƠNG II

### KẾT QUẢ THỐNG KÊ

#### Analysis of Variance for Do con, using Adjusted SS for Tests\_

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
L	2	0.01993	0.01993	0.00997	1.20	0.334
F	2	1.07626	1.07626	0.53813	64.57	0.000
Error	13	0.10834	0.10834	0.00833		
Total	17	1.20453				

#### Analysis of Variance for Vi khuẩn, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
L	2	74083	74083	37042	488.93	0.000
F	2	18496	18496	9248	122.07	0.000
Error	13	985	985	76		
Total	17	93564				

#### Analysis of Variance for nam men(, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
L	2	1125.33	1125.33	562.67	211.00	0.000
F	2	516.00	516.00	258.00	96.75	0.000
Error	13	34.67	34.67	2.67		
Total	17	1676.00				

#### Least Squares Means

	... Do con ...		.. Vi khuẩn ..		.. nam men( ..	
L	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean
0	0.450	0.03727	221.667	3.55342	74.333	0.66667
5	0.466	0.03727	248.000	3.55342	85.000	0.66667
10	0.389	0.03727	369.000	3.55342	93.667	0.66667
F						
0	0.207	0.03727	235.667	3.55342	78.333	0.66667
10	0.324	0.03727	291.667	3.55342	83.333	0.66667
20	0.774	0.03727	311.333	3.55342	91.333	0.66667

#### Analysis of Variance for diem mui, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
L	2	6.0222	6.0222	3.0111	6.81	0.002
F	2	7.4889	7.4889	3.7444	8.47	0.000
L*F	4	1.1778	1.1778	0.2944	0.67	0.617

Error	81	35.8000	35.8000	0.4420
Total	89	50.4889		

**Analysis of Variance for diem vi, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
L	2	6.6667	6.6667	3.3333	10.42	0.000
F	2	1.0667	1.0667	0.5333	1.67	0.195
L*F	4	3.2667	3.2667	0.8167	2.55	0.045
Error	81	25.9000	25.9000	0.3198		
Total	89	36.9000				

Least Squares Means

	.. diem mui ..		.. diem vi ...	
L	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean
0	3.400	0.1214	3.367	0.1032
5	4.033	0.1214	4.033	0.1032
10	3.700	0.1214	3.700	0.1032
F				
0	3.333	0.1214	3.833	0.1032
10	4.033	0.1214	3.700	0.1032
20	3.767	0.1214	3.567	0.1032
L*F				
0 0	3.200	0.2102	3.700	0.1788
0 10	3.600	0.2102	3.000	0.1788
0 20	3.400	0.2102	3.400	0.1788
5 0	3.600	0.2102	4.000	0.1788
5 10	4.500	0.2102	4.300	0.1788
5 20	4.000	0.2102	3.800	0.1788
10 0	3.200	0.2102	3.800	0.1788
10 10	4.000	0.2102	3.800	0.1788
10 20	3.900	0.2102	3.500	0.1788

**Analysis of Variance for do con , using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
ti le me	4	0.85687	0.85687	0.21422	377.54	0.000
Error	5	0.00284	0.00284	0.00057		
Total	9	0.85970				

**Analysis of Variance for vi khuan, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
ti le me	4	94516	94516	23629	**	
Error	5	0	0	0		
Total	9	94516				

\*\* Denominator of F-test is zero.  
 \*\* Unable to do multiple comparisons.

**Analysis of Variance for nam men(, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
ti le me	4	1482.40	1482.40	370.60	**	
Error	5	0.00	0.00	0.00		
Total	9	1482.40				

\*\* Denominator of F-test is zero.

Least Squares Means

ti le me	.. do con ( ..		.. vi khuan ..		.. nam men( ..	
	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean
2	0.058	0.016843	207.000	0.000000	52.000	0.000000
4	0.027	0.016843	280.000	0.000000	66.000	0.000000
6	0.345	0.016843	354.000	0.000000	72.000	0.000000
8	0.665	0.016843	417.000	0.000000	81.000	0.000000
10	0.725	0.016843	482.000	0.000000	87.000	0.000000

**General Linear Model: diem mui, diem vi, cau truc versus ti le men**

Factor	Type	Levels	Values
ti le me	fixed	4	2 4 6 8

**Analysis of Variance for diem mui, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
ti le me	3	11.7375	11.7375	3.9125	4.78	0.004
Error	76	62.2500	62.2500	0.8191		
Total	79	73.9875				

**Analysis of Variance for diem vi, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
ti le me	3	1.0375	1.0375	0.3458	0.48	0.698
Error	76	54.9500	54.9500	0.7230		
Total	79	55.9875				

**Analysis of Variance for cau truc, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
--------	----	--------	--------	--------	---	---

ti le me	3	6.9000	6.9000	2.3000	3.42	0.021
Error	76	51.1000	51.1000	0.6724		
Total	79	58.0000				

### Least Squares Means

	.. diem mui ..		.. diem vi ...		.. cau truc ..	
ti le me	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean
2	2.750	0.2024	3.400	0.1901	3.600	0.1834
4	2.900	0.2024	3.600	0.1901	3.000	0.1834
6	3.750	0.2024	3.600	0.1901	3.650	0.1834
8	3.050	0.2024	3.350	0.1901	3.750	0.1834

### General Linear Model: diem mui, diem vi, cau truc versus do acid

Factor	Type	Levels	Values
do acid	fixed	4	105 115 85 95

#### Analysis of Variance for diem mui, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
do acid	3	3.2750	3.2750	1.0917	2.25	0.100
Error	36	17.5000	17.5000	0.4861		
Total	39	20.7750				

#### Analysis of Variance for diem vi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
do acid	3	6.6750	6.6750	2.2250	3.99	0.015
Error	36	20.1000	20.1000	0.5583		
Total	39	26.7750				

#### Analysis of Variance for cau truc, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
do acid	3	2.5000	2.5000	0.8333	2.63	0.065
Error	36	11.4000	11.4000	0.3167		
Total	39	13.9000				

Least Squares Means

	.. diem mui ..		.. diem vi ...		.. cau truc ..	
do acid	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean
105	3.800	0.2205	4.000	0.2363	3.800	0.1780
115	3.100	0.2205	3.300	0.2363	3.300	0.1780
85	3.100	0.2205	3.000	0.2363	3.800	0.1780
95	3.300	0.2205	3.000	0.2363	3.300	0.1780

**General Linear Model: diem mui, diem vi, cau truc versus S, W**

Factor	Type	Levels	Values
S	fixed	3	20 25 30
W	fixed	3	20 30 40

**Analysis of Variance for diem mui, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
S	2	2.0222	2.0222	1.0111	2.35	0.102
W	2	0.2889	0.2889	0.1444	0.34	0.716
S*W	4	5.5111	5.5111	1.3778	3.20	0.017
Error	81	34.9000	34.9000	0.4309		
Total	89	42.7222				

R denotes an observation with a large standardized residual.

**Analysis of Variance for diem vi, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
S	2	12.8222	12.8222	6.4111	12.60	0.000
W	2	7.4889	7.4889	3.7444	7.36	0.001
S*W	4	8.4444	8.4444	2.1111	4.15	0.004

Error	81	41.2000	41.2000	0.5086
Total	89	69.9556		

R denotes an observation with a large standardized residual.

**Analysis of Variance for cau truc, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
S	2	3.6222	3.6222	1.8111	3.04	0.053
W	2	3.6222	3.6222	1.8111	3.04	0.053
S*W	4	9.1778	9.1778	2.2944	3.86	0.006
Error	81	48.2000	48.2000	0.5951		
Total	89	64.6222				

R denotes an observation with a large standardized residual.

Least Squares Means

	... diem mu ..		.. diem vi ...		.. cau truc ..	
S	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean
20	3.767	0.1198	3.067	0.1302	3.667	0.1408
25	3.933	0.1198	3.700	0.1302	3.567	0.1408
30	4.133	0.1198	3.967	0.1302	4.033	0.1408
W						
20	3.867	0.1198	3.200	0.1302	3.567	0.1408
30	3.967	0.1198	3.933	0.1302	4.033	0.1408
40	4.000	0.1198	3.400	0.1302	3.667	0.1408

**Analysis of Variance for acid, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
ngay	4	35.6000	35.6000	8.9000	17.80	0.004
Error	5	2.5000	2.5000	0.5000		
Total	9	38.1000				

**Analysis of Variance for con, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
ngay	4	0.0000626	0.0000626	0.0000157	22.36	0.002



Error	5	0.0000035	0.0000035	0.0000007
Total	9	0.0000661		

Least Squares Means

ngay	.... acid ....		.... con .....	
	Mean	SE Mean	Mean	SE Mean
0	75.0000	0.500000	0.1475	0.000592
5	75.0000	0.500000	0.1475	0.000592
10	76.0000	0.500000	0.1485	0.000592
15	77.5000	0.500000	0.1510	0.000592
20	80.0000	0.500000	0.1540	0.000592