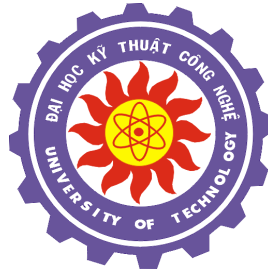


**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ TP.HCM
KHOA MÔI TRƯỜNG VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

**NÂNG CAO CHẤT LƯỢNG SỮA CHUA
BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI GÓI
VI KHUẨN LACTIC**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số ngành: 111

GVHD: TS. Nguyễn Thúy Hương

SVTH: Đỗ Quốc Cường

TP. Hồ Chí Minh, 7 / 2009

LỜI CẢM ƠN

Em xin chân thành cảm ơn cô Nguyễn Thúy Hương đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn và truyền đạt cho em nhiều kiến thức quý báu trong suốt quá trình làm Đồ án tốt nghiệp.

Em xin cảm ơn các thầy, cô phụ trách Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học, Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Tp. HCM đã hỗ trợ và tạo mọi điều kiện tốt nhất về phương tiện để em hoàn thành Đồ án này.

Em xin cảm ơn các thầy, cô thuộc Khoa Môi trường và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ Tp. HCM đã tận tình chỉ dạy và truyền đạt kiến thức cho em trong suốt thời gian em học tập tại trường.

Em xin cảm ơn các anh, chị lớp Cao học Công nghệ sinh học niên khóa 2006 và 2007, Trường Đại học Bách khoa Tp. HCM đã giúp đỡ em trong suốt thời gian làm Đồ án tốt nghiệp.

Tôi xin cảm ơn các bạn Nguyễn Mạnh Tùng, Trần Thu Trang, Nguyễn Thị Bé, Nguyễn Thị Quỳnh Ly và tất cả các bạn thuộc lớp Công nghệ sinh học niên khóa 2005, Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ Tp. HCM đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập tại trường và thời gian làm Đồ án tốt nghiệp.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn bố mẹ tôi và toàn thể đại gia đình của tôi đã động viên và giúp đỡ tôi trong những giai đoạn khó khăn nhất.

Tp. Hồ Chí Minh, tháng 6/2009

Đỗ Quốc Cường

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	2
1.1 Tổng quan về vi khuẩn lactic.....	3
1.1.1 Đặc điểm chung của vi khuẩn lactic.....	3
1.1.2 Hoạt động sinh hóa, trao đổi chất của vi khuẩn lactic và một số chủng vi khuẩn lactic điển hình.....	4
1.1.3 Vi khuẩn <i>Lactobacillus acidophilus</i>	7
1.2 Tổng quan về sữa và sữa chua.....	9
1.2.1 Thành phần dinh dưỡng, đặc điểm của sữa và sữa chua.....	9
1.2.2 Hệ vi sinh vật tồn tại trong sữa và sữa chua.....	17
1.2.3 Quy trình công nghệ sản xuất sữa chua.....	18
1.3 Tổng quan về vi gói.....	21
1.3.1 Khái niệm, đặc điểm, ưu và nhược điểm của vi gói.....	21
1.3.2 Các phương pháp vi gói hiện nay.....	24
1.3.2.1 Phương pháp nhỏ giọt.....	24
1.3.2.2 Phương pháp polymer hóa liên kết bề mặt.....	26
1.3.2.3 Phương pháp ngưng tụ polymer hóa.....	27
1.3.2.4 Phương pháp tách pha đồng tụ.....	27
1.3.3 Vật liệu vi gói, đặc điểm của vật liệu vi gói.....	30
1.3.3.1 Gelatin.....	30
1.3.3.2 Alginate.....	32
1.3.3.3 Các hợp chất vi gói khác.....	34
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM	39
2.1 Trang thiết bị, hóa chất, vật liệu.....	40
2.2 Nội dung thí nghiệm.....	40
2.2.1 Sơ đồ nội dung thí nghiệm.....	40
2.2.2 Bố trí thí nghiệm.....	40
2.2.2.1 Hoạt hóa, tăng sinh và giữ giống vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	40
2.2.2.2 Khảo sát sinh học giống vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	41
2.2.2.3 Thu sinh khối tế bào.....	42

2.2.2.4 Vi gói vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	43
2.2.2.5 Khảo sát chất lượng hạt vi gói.....	44
2.3 Các phương pháp liên quan.....	47
2.3.1 Các phương pháp vi sinh.....	47
2.3.1.1 Phương pháp pha chế môi trường dinh dưỡng MRS.....	47
2.3.1.2 Phương pháp nghiên cứu hình thái vi sinh vật.....	48
2.3.1.3 Phương pháp kiểm tra số lượng tế bào.....	49
2.3.2 Phương pháp hóa sinh – Phương pháp kiểm tra quá trình lên men lactic.....	50
2.3.3 Các phương pháp khác.....	51
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.....	53
3.1 Khảo sát đặc điểm sinh học của giống vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	54
3.1.1 Tăng sinh và giữ giống trên môi trường MRS.....	54
3.1.2 Quan sát vi thể, đại thể vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	54
3.1.3 Khảo sát khả năng lên men lactic của <i>L. acidophilus</i>	55
3.2 Khảo sát quy trình vi gói vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	56
3.2.1 Khảo sát nồng độ gelatin.....	56
3.2.2 Tạo chế phẩm vi gói và khảo sát kích thước hạt gel.....	57
3.3 Khảo sát chất lượng hạt vi gói.....	58
3.3.1 Khảo sát khả năng tồn tại của vi khuẩn lactic trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ.....	58
3.3.2 Khảo sát biến động pH, acid lactic trong quá trình lên men.....	60
3.3.3 Khảo sát đánh giá chất lượng cảm quan trong sản phẩm sữa lên men.....	60
Chương 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	63
4.1 Kết luận.....	64
4.2 Kiến nghị.....	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	66
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 – Một số chỉ tiêu vật lý của sữa bò.....	9
Bảng 1.2 – Sự thay đổi hàm lượng các chất trong sữa bò.....	10
Bảng 1.3 – Hàm lượng một số vitamin trong sữa bò.....	12
Bảng 1.4 – Thành phần một số nguyên tố vi lượng trong sữa bò.....	12
Bảng 1.5 – Thành phần dinh dưỡng của sữa chua.....	15
Bảng 1.6 – Một vài loại vitamin có mặt trong sữa chua.....	16
Bảng 3.1 – Bảng giá trị đo pH, V_{NaOH} và hàm lượng acid lactic (Σa).....	55
Bảng 3.2 – Một số tính chất của chế phẩm vi gói.....	57
Bảng 3.3 – Kết quả mật độ tế bào sống sót sau khi khảo sát trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ.....	58
Bảng 3.4 – % tế bào tồn tại so với mật độ ban đầu ở pH=2.....	58
Bảng 3.5 – So sánh khả năng lên men của hai hình thức tiếp giống là tế bào tự do và các chế phẩm vi gói.....	60
Bảng 3.6 – Bảng tổng hợp thứ tự so hàng.....	61
Bảng 3.7 – Bảng kết quả cảm quan theo phương pháp cặp đôi.....	61

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1 – <i>Lactobacillus acidophilus</i>	8
Hình 1.2 – Quy trình công nghệ sản xuất yaourt.....	19
Hình 1.3 – Các loại vi gói.....	21
Hình 1.4 – Sơ đồ nguyên tắc của phương pháp nhỏ giọt.....	24
Hình 1.5 – Sơ đồ mô tả phương pháp polymer hóa.....	26
Hình 1.6 – Sơ đồ mô tả quá trình ngưng tụ polymer hóa liên kết bề mặt.....	27
Hình 1.7 – Các giai đoạn của quá trình tách pha đông tụ đơn.....	28
Hình 1.8 – Sơ đồ quy trình điều chế vi gói bằng phương pháp tách pha đông tụ đơn.....	28
Hình 1.9 – Sơ đồ quy trình điều chế vi gói bằng phương pháp tách pha đông tụ phức.....	29
Hình 1.10 – Thành phần các acid amin trong gelatin.....	30
Hình 1.11 – Cấu trúc hóa học của gelatin.....	30
Hình 1.12 – Thành phần cấu trúc của alginate.....	33
Hình 2.1 – Sơ đồ nội dung thí nghiệm.....	41
Hình 3.1 – Môi trường tăng sinh và giữ giống <i>L. acidophilus</i>	54
Hình 3.2 – Hình chụp vi thể, đại thể tế bào vi khuẩn <i>L. acidophilus</i>	55
Hình 3.3 – Hình chụp chế phẩm vi gói.....	57

DANH MỤC ĐỒ THỊ

Đồ thị 1 – Biểu diễn giá trị pH của mẫu đối chứng và mẫu dịch lên men..... 56

Đồ thị 2 – Biểu diễn hàm lượng acid lactic sinh ra trong thời gian nuôi cấy.....56

Đồ thị 3 – Biểu diễn mật độ tế bào trong môi trường dạ dày nhân tạo
SGJ ở pH=2..... 59

MỞ ĐẦU

Từ rất lâu trong lịch sử loài người, chúng ta đã biết đến một nguồn thực phẩm rất giàu dinh dưỡng đó là sữa. Sữa là nguồn thực phẩm dành cho các loài động vật có vú còn non mới sinh chưa thể sử dụng các loại thực phẩm khác. Trong sữa có chứa nhiều chất dinh dưỡng như glucid, protein, lipid, khoáng, vitamin,... Những hợp chất này rất có lợi và cần thiết cho sức khỏe và sự tăng trưởng, phát triển của con người và các loài động vật. Là nguồn thực phẩm quan trọng, nên các sản phẩm từ sữa đã được đa dạng hóa như phô mai, bơ, sữa lên men yaourt, kefir là các sản phẩm truyền thống đã có từ rất lâu trước đây cho đến các sản phẩm hiện đại được sản xuất theo dây chuyền công nghiệp như sữa tươi thanh trùng, tiệt trùng, sữa nguyên kem, sữa bột, sữa gầy, sữa cô đặc,... Tất cả nhằm nâng cao chất dinh dưỡng và bảo quản sữa tốt hơn.

Trong đó sữa chua là một trong những thực phẩm được quan tâm hàng đầu, bởi nó được xem như là một dạng thực phẩm chức năng chứa các vi khuẩn probiotic có lợi cho sức khỏe con người. Tuy nhiên, sản phẩm sữa chua được sản xuất theo kiểu truyền thống, cộng với việc phân phối và bảo quản không tốt nên làm cho vi khuẩn probiotic không được bảo vệ, dẫn đến không phát huy được tác dụng tích cực khi đi vào môi trường cực đoan trong cơ thể con người như môi trường dạ dày, muối mật,... Đề tài “*Nâng cao chất lượng sữa chua bằng phương pháp vi gói vi khuẩn lactic*” đã mở ra một hướng nghiên cứu mới để bảo vệ vi khuẩn probiotic và nâng cao giá trị của sữa chua về chỉ tiêu vi sinh vật.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về vi khuẩn lactic.

1.1.1. Đặc điểm chung của vi khuẩn lactic.

Vi khuẩn lactic là những vi khuẩn lên men lactic thuộc họ *Lactobacterium*, là vi khuẩn Gram (+). Đây là những trực khuẩn hoặc cầu khuẩn, đa số không sinh bào tử, thường không chuyển động và kỵ khí tùy tiện, vi hiếu khí, chúng không chứa cytochrom và enzyme catalase, chúng có khả năng sinh tổng hợp enzyme peroxydase rất mạnh, phân giải H_2O_2 để phát triển. Đa số chúng lên men được mono và disaccharide, một số không lên men được saccharose, số khác không lên men được đường maltose. Các vi khuẩn lactic không có khả năng lên men tinh bột và các polysaccharide khác (chỉ có loài *L. delbruckii* là đồng hóa được tinh bột).

Vi khuẩn lactic thường có dạng hình cầu, hình oval và hình que, đường kính của dạng cầu khuẩn lactic từ 0,5-1,5 μm , các tế bào hình cầu xếp thành từng cặp hoặc chuỗi có chiều dài khác nhau. Kích thước tế bào trực khuẩn lactic từ 1-8 μm , trực khuẩn thường đứng riêng lẻ hoặc kết thành chuỗi.

Các loài vi khuẩn lactic có khả năng rất khác nhau tạo thành acid trong môi trường và sức chịu đựng acid cũng khác nhau. Đa số các trực khuẩn lactic đồng hình tạo thành acid cao hơn (khoảng 2-3,5%), liên cầu khuẩn (khoảng 1%). Các trực khuẩn này có thể phát triển được ở pH = 4-3,8 còn cầu khuẩn không thể phát triển được ở môi trường này. Hoạt lực lên men tốt nhất của trực khuẩn lactic ở vùng pH = 5,5-6.

Đa số vi khuẩn lactic (đặc biệt là trực khuẩn đồng hình) rất kén chọn thành phần dinh dưỡng, chúng chỉ phát triển khi trên môi trường có tương đối đầy đủ các yếu tố dinh dưỡng cần thiết như acid amin, peptide, protein, vitamin (B_1 , B_2 , B_6 , PP, các acid pantotenic và acid folic),...

Vi khuẩn lactic có hoạt tính protease, chúng phân hủy được protein của sữa tới peptide và acid amin. Hoạt tính này ở các loài có khác nhau, thường trực khuẩn là cao hơn. Chúng chịu được trạng thái khô hạn, bền vững với CO_2 và cồn ethylic, nhiều loài vẫn sống được trong môi trường có 10-15% cồn hoặc cao hơn, một số trực khuẩn bền với NaCl tới 7-10%. Các vi khuẩn lactic ưa ấm có nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 25-35 $^{\circ}C$, các loài ưa nhiệt có nhiệt độ tối ưu là 40-45 $^{\circ}C$, loài ưa lạnh có thể

phát triển được ở nhiệt độ tương đối thấp (khoảng 5⁰C hoặc thấp hơn). Khi gia nhiệt tới 60-80⁰C hầu hết chúng bị chết sau 10-30 phút.

Một số loại có khả năng tạo màng nhầy. Một số khác có khả năng đối kháng với thể hoại sinh và các vi sinh vật gây bệnh và làm thối rữa thực phẩm. Vi khuẩn lactic ngoài khả năng lên men lactic, chúng còn có khả năng sản sinh ra các chất kháng khuẩn gọi là bacteriocin và được ứng dụng nhiều trong y học cũng như trong bảo quản thực phẩm.

Vi khuẩn lactic phân bố rộng trong thiên nhiên, trong đất, trong nước, trong không khí, chủ yếu có mặt trên thực vật (đặc biệt có là ở trên cỏ), trong thực phẩm (rau, quả, sữa, thịt,...), một số chủng có mặt trong hệ thống đường ruột của cơ thể người và động vật. Trong cơ thể người và động vật, ngoài đường ruột chúng còn tồn tại trong khoang miệng. Các dạng cầu khuẩn đường ruột được gọi là *Enterococcus* hay *Streptococcus fecalis*.

Phân loại vi khuẩn lactic hiện nay chưa hoàn thiện và còn nhiều tranh cãi, chủ yếu phân loại dựa theo hình dáng tế bào. Thí dụ: cầu khuẩn xếp các giống *Streptococcus* và *Leuconostoc*, còn trực khuẩn xếp thành một giống *Lactobacillus* [1, 2, 3, 4, 7].

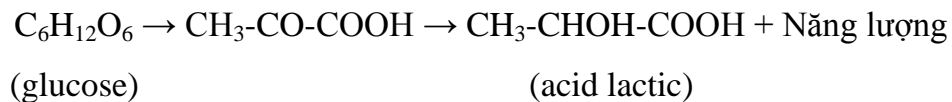
1.1.2. Hoạt động sinh hóa, trao đổi chất của vi khuẩn lactic và một số chủng vi khuẩn lactic điển hình.

1.1.2.1. Hoạt động sinh hóa, trao đổi chất của vi khuẩn lactic.

Hoạt động sinh hóa, trao đổi chất tiêu biểu nhất của vi khuẩn lactic chính là cơ chế của quá trình lên men lactic. Quá trình lên men lactic diễn ra trong tế bào vi khuẩn. Đầu tiên, đường sẽ được vi khuẩn lactic đưa vào bên trong tế bào nhờ cơ chế vận chuyển đặc trưng của màng tế bào. Nếu phân tử đường là đường đơn như glucose thì sẽ vào thẳng chu trình chuyển hóa, còn nếu phân tử đường là đường đôi hay các dạng đường khác thì sẽ bị thủy phân thành các monosaccharide sau đó mới vào chu trình chuyển hóa. Sau đó, phân tử đường này sẽ đi vào chu trình chuyển hóa khác nhau và cuối cùng cho sản phẩm là acid lactic, acid acetic, CO₂,...

Dựa vào sản phẩm tạo thành của quá trình lên men, mà người ta chia chúng ra hai nhóm là vi khuẩn lactic lên men đồng hình hay vi khuẩn lactic lên men dị hình.

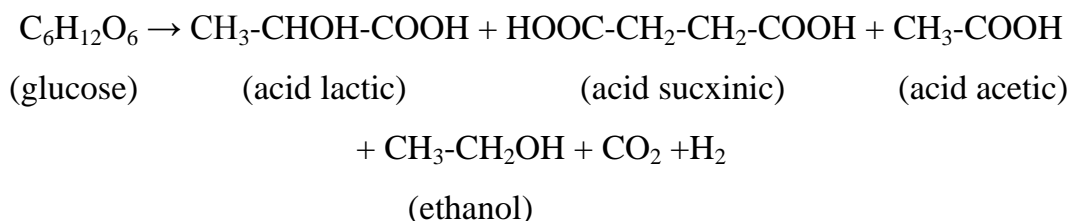
- Trường hợp lên men lactic đồng hình: Quá trình lên men tạo acid lactic theo chu trình Embden-Meyerhorf (con đường EMP). Trong tế bào vi khuẩn lên men lactic đồng hình có đủ enzyme carboxylase, do vậy pyruvate không bị phân giải sâu hơn, mà thay vào đó nó nhận hydro được tách ra và chuyển tới pyruvate để tạo thành acid lactic. Lượng acid lactic tạo thành chiếm hơn 90% sản phẩm, chỉ một phần nhỏ pyruvate còn lại bị khử cacbon chuyển thành acid acetic, ethanol, CO₂ và acetone,...



- Trường hợp lên men lactic dị hình: Xảy ra khi vi khuẩn lactic không có đủ các enzyme cơ bản của chu trình EMP là andolase và trizaphosphattizomerase. Do không theo con đường EMP nên chúng chuyển hóa theo con đường Pentose-Phosphate ở giai đoạn đầu, từ glucose-6-phosphate, 6-phosphoglucose và ribuloae-5-phosphate dưới tác dụng của enzyme epimerase chuyển thành xilulose-5-phosphate. Xilulose-5-phosphate sẽ đi theo hai con đường chuyển hóa khác nhau:

+ Xilulose-5-phosphate sẽ được chuyển hóa tiếp thành glyceraldehides-3-phosphate. Sau đó bị thủy phân tiếp theo con đường EMP để tạo thành acid lactic.

+ Xilulose-5-phosphate bị thủy phân tiếp theo một con đường khác để tạo acetyl phosphate. Sau đó, dưới tác dụng của acetatkinase sẽ tạo thành acetate hoặc bị khử tiếp thành acetaldehyde rồi thành ethanol, acid acetic, CO₂,...



+ Lượng sản phẩm phụ của quá trình lên men dị lactic như sau: acid lactic chiếm 40% (thấp hơn nhiều so với lên men lactic đồng hình), acid succinic chiếm 20%, ethanol chiếm 10%, acid acetic chiếm 10% và khoảng 20% còn lại là các loại khí [1, 2, 3, 4, 7].

1.1.2.2. Một số chủng vi khuẩn lactic điển hình.

a. Các vi khuẩn lactic lên men đồng hình.

Streptococcus lactis: Là cầu khuẩn hoặc trực khuẩn rất ngắn khi còn non, kết đôi hoặc thành chuỗi ngắn. Chúng là giống ưa ấm, phát triển tốt ở 30-35⁰C, làm đông

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

tụ sữa ở điều kiện này sau 10-12 giờ. Trong môi trường nó tích tụ được 0,8-1% acid lactic. Nhiệt độ tối thiểu cho phát triển là 10⁰C, tối đa là 45-45⁰C. Một số chủng tạo thành bacteriocin ở dạng nizin.

Streptococcus lactis: Là liên cầu khuẩn lactic được sử dụng rộng rãi trong chế biến các sản phẩm sữa như sữa chua, crem-bơ chua, phomat. Khi đông tụ sữa các cục vón chặt và nhẵn được tạo thành.

Streptococcus cremoris: Là tế bào hình cầu, kết thành chuỗi dài, ưa ấm và tạo ít acid trong môi trường. Nhiệt độ thích hợp cho phát triển là 25⁰C, tối thiểu là 10⁰C, tối đa là 36-38⁰C. Khi sử dụng được phối trộn với *Str. lactis*. Một số chủng thuộc giống *Diplococcus* sinh bacteriocin ở dạng diplococin.

Streptococcus thermophilus: Có dạng hình cầu, kết thành chuỗi dài, phát triển tốt ở nhiệt độ 40-45⁰C, tích tụ khoảng 1% acid. Dùng phối hợp với trực khuẩn lactic để chế biến sữa chua nói chung và các loại đặc biệt, sữa chua nấu chín và pho mát.

Lactobacillus bulgaricus: Là trực khuẩn tròn (đôi khi ở dạng hạt), thường kết thành chuỗi dài, không lên men được saccharose. Đây là giống ưa nhiệt, nhiệt độ tối ưu là 40-45⁰C, tối thiểu là 15-20⁰C. Nó tạo thành acid mạnh, tích tụ ở trong sữa tới 2,5-3,5% acid lactic. Dùng trong chế biến sữa chua phương nam, sữa ngựa.

Lactobacillus casei: Là trực khuẩn nhỏ, thường gặp ở dạng chuỗi dài hoặc ngắn, tích tụ tới 1,5% acid. Nhiệt độ tối ưu cho phát triển là 30-35⁰C. Trực khuẩn này dùng nhiều trong chế biến pho mát, nhờ nó có hoạt tính protease nên có thể phân hủy casein của sữa thành acid amin.

Lactobacillus acidophilus: Là trực khuẩn dài chịu nhiệt, nhiệt độ tối ưu cho phát triển là 37-40⁰C, tối thiểu là 20⁰C. Trong sữa nó tích tụ tới 2,2% acid. Trực khuẩn này được phân lập từ ruột trẻ em và bê non mới đẻ, dùng trong sản xuất sữa, acidophin có khả năng sinh bacteriocin có hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh đường ruột. Một số chủng có khả năng tạo thành màng nhầy.

Lactobacillus delbriieckii: Là trực khuẩn lactic chịu nhiệt, thấy nhiều ở các loại hạt ngũ cốc và bột. Có lẽ đây là giống vi khuẩn lactic duy nhất có thể đồng hóa được tinh bột. Nó không lên men và đồng hóa được lactose, vì vậy không dùng trong công nghiệp sữa. Nhiệt độ tối ưu là 45-50⁰C, tối thiểu là 20⁰C, tích tụ 2,5% acid. Được dùng nhiều trong sản xuất acid lactic từ tinh bột và sản xuất bánh mì.

Lactobacillus plantarum: Là trực khuẩn nhỏ, thường kết đôi hoặc chuỗi. Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng là 30⁰C, tích tụ 1,3% acid. Giống này chủ yếu trong muối chua rau dưa và ủ chua thức ăn dùng trong chăn nuôi [1, 2, 3, 4, 7].

b. Các vi khuẩn lactic lên men dị hình.

Lactobacillus brevis (*L. brassica fermentati*): Được tìm thấy chủ yếu trong muối chua bắp cải, rau củ,... Vì vậy, nó còn được gọi là trực khuẩn bắp cải. Trong lên men, ngoài acid lactic (khoảng 1,2%) nó còn tạo thành acid acetic, rượu ethylic (khoảng 2,4%) và CO₂, nó còn tạo hương làm cho sản phẩm có hương vị dễ chịu.

Lactobacillus lycopersici: Là trực khuẩn sinh hơi, đứng riêng lẻ hoặc kết thành chuỗi, gây hư hỏng thực phẩm như thối nhũn cuống cà chua, cũng như làm hư hỏng cà chua đóng hộp, nước cà chua đã qua thanh trùng chưa triệt để. Ngày nay, giống này được coi như là các biến chủng của *Lactobacillus brevis*.

Ngoài ra, còn có các liên cầu khuẩn tạo hương như *Str. citrovorus*, *S. diacetylactis*, *S. cremoris*,... nhiệt độ tối ưu cho các vi khuẩn sinh hương này phát triển là từ 25-30⁰C (riêng đối với *S. diacetylactis* phát triển tốt nhất ở nhiệt độ là 30⁰C). Chúng có kích thước tế bào nhỏ hơn so với các giống vi khuẩn lên men lactic khác, thường đứng riêng lẻ hoặc xếp thành đôi hay thành chuỗi dài ngắn khác nhau. Điểm đặc biệt ở vi khuẩn này là phần lớn chúng có các enzyme citritase, chính nhờ các enzyme này mà chúng mới có thể lên men được acid citric. Sản phẩm của quá trình lên men citric của các liên cầu khuẩn sinh hương là các acid bay hơi như acid acetic, acid propionic, các chất thơm như este, diacetyl,... làm cho hương vị của sản phẩm lên men được nâng cao và hoàn thiện [1, 2, 3, 4, 7].

1.1.3. Vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*.

1.1.3.1. Phân loại.

Loài *Lactobacillus acidophilus* thuộc giới vi khuẩn (bacteria), ngành *Fermicutes*, lớp *Bacilli*, bộ *Lactobacilliales*, họ *Lactobacillaceae*, giống *Lactobacillus*. Nó thường được sử dụng cùng với *Streptococcus salivarius* và *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* trong sản xuất yaourt kiểu acidophilus.

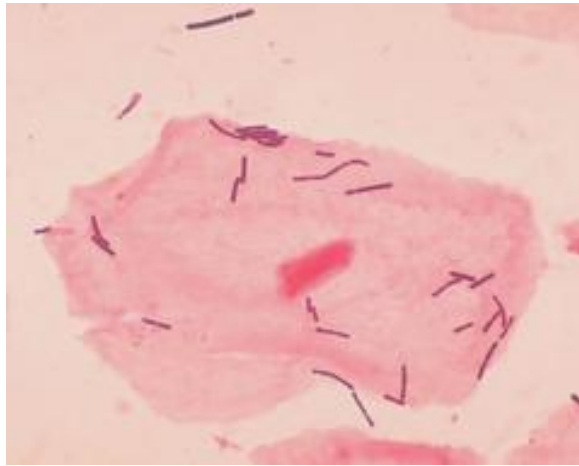
Vi khuẩn này được mô tả lần đầu tiên do công của một bác sĩ là Bruno Oppler và một nhà nghiên cứu dạ dày ruột là Ismar Isidor Boas. Tên gọi *Lactobacillus*

acidophilus bắt nguồn từ *lacto* có nghĩa là sữa, *bacillus* chỉ hình dáng giống cây gậy và *acidophilus* nghĩa là một “acid đằm thắm” (acid loving).

Lactobacillus acidophilus là vi khuẩn Gram (+), hình que, không sinh bào tử. Nó có khả năng lên men cả hiếu khí lẫn kỵ khí. Trong trường hợp lên men đồng hình, glucose được sử dụng để tạo acid lactic, hoặc tạo thành nhiều sản phẩm khác nhau như acid acetic, ethanol, CO₂,...trong trường hợp lên men dị hình [7, 16].

1.1.3.2. Hình thái.

Lactobacillus acidophilus là trực khuẩn, có kích thước rộng 0,6-0,9μm, dài 1,5-6μm, lên men đồng hình, nhiệt độ phát triển tối ưu là 37-42⁰C. Trong tự nhiên, chúng tồn tại riêng lẻ, đôi khi tạo thành chuỗi ngắn có khả năng chuyển động [7, 16].



Hình 1.1 - *Lactobacillus acidophilus* [33].

1.1.3.3. Đặc điểm sinh lý sinh hóa.

L. acidophilus có thể phát triển ở nhiệt độ cao như 45⁰C nhưng tối ưu là 35-40⁰C. Tính chịu acid của nó từ 0,3-1,9% chuẩn độ acid, với pH tối ưu từ 5,5-6. Chúng có những yêu cầu phát triển phức tạp như yêu cầu áp lực oxygen thấp, có thể lên men carbohydrate, protein và các phân tử bị phá vỡ từ các chất này, một số vitamin và khoáng như B-complex, acid nucleic, Mg, Mn, Fe cần cho sự phát triển.

Lactobacillus acidophilus phát triển ở pH thấp <3,5 và lên men trong điều kiện yếm khí. *Lactobacillus acidophilus* thiếu cytochrome, prophyrin, những enzyme hô hấp kết quả là nó không thể kinh qua sự oxy hóa phosphoryl hóa hoặc hô hấp. Vì vậy, nó sử dụng đường như một cơ chất cho sự lên men và sống được ở môi trường phong phú đường. Mỗi phân tử glucose trải qua sự lên men trong *Lactobacillus acidophilus* tạo ra năng lượng là 2ATPs. Ngoài glucose, *Lactobacillus acidophilus*

còn sử dụng aesculin, cellobiose, galactose, lactose, maltose, salicin, sucrose và trehalose cho sự lên men [7, 16, 33].

1.1.3.4. Đặc điểm sinh thái.

L. acidophilus được biết như một loài có vai trò probiotic. Sự bám dính và khả năng liên kết với nhau tạo thành một tập đoàn của vi khuẩn lactic là cơ chế hữu hiệu để hạn chế vi khuẩn có hại. Khi vi khuẩn lactic vào trong cơ thể, định cư ở đường ruột chúng cạnh tranh vị trí gắn kết trên thành ruột với vi sinh vật có hại, làm hạn chế số lượng tế bào vi sinh vật có hại trong đường ruột. Ngoài ra, *L. acidophilus* khả năng sinh tổng hợp một số chất có khả năng kháng khuẩn như acid lactic, hydrogen peroxide, diacetyl và bacteriocin làm hạn chế sự phát triển của vi khuẩn có hại. Ngoài ra, *L. acidophilus* còn có vai trò như một chất bổ trợ cho những người không chịu được lactose. Chúng tập hợp ở đường tiêu hóa, góp phần chuyển hóa và phân giải lactose trong quá trình tiêu hóa thức ăn ở dạ dày và ruột [32].

1.2. Tổng quan về sữa và sữa chua.

1.2.1. Thành phần dinh dưỡng, đặc điểm của sữa và sữa chua.

1.2.1.1. Một số tính chất vật lý, đặc điểm của sữa bò tươi.

Sữa là chất lỏng đục. Độ đục của nó là do các chất béo, protein và một số chất khoáng trong sữa tạo nên. Màu sắc của sữa phụ thuộc chủ yếu vào hàm lượng β -caroten có trong chất béo của sữa. Sữa bò thường có màu từ trắng ngà đến vàng nhạt, có mùi rất đặc trưng và vị ngọt nhẹ nhàng. Sữa có một số tính chất sau:

Bảng 1.1 – Một số chỉ tiêu vật lý của sữa bò

Đại lượng	Đơn vị đo	Giá trị
pH	-	6,5-6,7
Độ chua	⁰ D	15-18
Tỷ trọng	g/cm ²	1,028-1,036
Điểm đông đặc	⁰ C	-0,54÷-0,59
Thế oxy hóa - khử	V	0,10-0,20
Sức căng bề mặt ở 20 ⁰ C	Dynes/cm	50
Độ dẫn điện	1/ohm.cm	0,004-0,005
Nhiệt dung riêng	Cal/g. ⁰ c	0,933-0,954

[1].

1.2.1.2. Thành phần hóa học, dinh dưỡng của sữa bò tươi.

Sữa là một hỗn hợp với các thành phần chính bao gồm nước, lactose, protein, và các chất béo. Ngoài ra, sữa còn chứa một số hợp chất khác với hàm lượng nhỏ như các hợp chất chứa nitơ phi protein, vitamin, hormone, các chất màu và khí. Hàm lượng các chất trong sữa có thể dao động trong một khoảng rộng và phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chủng giống vật nuôi, tình trạng sức khỏe, điều kiện chăn nuôi, thành phần thức ăn chăn nuôi, chế độ ăn, thời tiết,...[1, 2, 4].

Bảng 1.2 – Sự thay đổi hàm lượng các chất trong sữa bò (% khối lượng)

Các thành phần chính	Khoảng biến thiên	Giá trị trung bình
Nước	85,5-89,5	87,5
Tổng các chất khô	10,5-14,5	13,0
Lactose	3,6-5,5	4,8
Protein	2,9-5,0	3,4
Chất béo	2,5-6,0	3,9
Khoáng	0,6-0,9	0,8

[1].

a. Đường lactose.

Trong sữa, đường lactose tồn tại dưới hai dạng: Dạng α -lactose monohydrate $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ và dạng β -lactose anhydrous $C_{12}H_{22}O_{11}$. Lactose là đường khử nên có độ ngọt thấp hơn nhiều các loại disaccharide và monosaccharide khác. Khác với các loại đường khác, đường lactose chỉ xuất hiện duy nhất trong sữa động vật. Ngoài lactose, trong sữa còn chứa glucose (hàm lượng trung bình 70mg/l), galactose (20mg/l) và các hợp chất glucid chứa nitơ như N-acetyl glucosamine, N-acetyl galactosesamine, acid N-acetyl neuraminic,...Tuy nhiên, hàm lượng của chúng rất thấp, chỉ ở dạng vết [1, 2, 4].

b. Các hợp chất có chứa nitơ.

Casein là thành phần protein chủ yếu trong sữa. Chúng tồn tại dưới dạng micelle. Mỗi micelle chứa khoảng 65% nước, phần còn lại là các loại casein và khoáng (gồm calci, magie, phosphate và citrate). Casein trong sữa có nguồn gốc từ những chủng, giống bò khác nhau có thể có cấu trúc bậc một khác nhau.

Các protein hòa tan trong sữa: β -lactoglobulin và α -lactalbumin là protein có dạng hình cầu, chúng có cấu trúc của nó gần giống với lysozyme, α -lactalbumin là một metalloprotein, trong mỗi phân tử của nó có chứa một nguyên tử calci nên α -lactalbumin là một protein có giá trị dinh dưỡng cao, thành phần các acid amin trong phân tử của nó rất cân đối. Peptone-proteose là những phân đoạn protein khác nhau, chúng là sản phẩm thủy phân từ β -casein bởi phasmin. Người ta còn tìm thấy trong sữa có ba loại immunoglobulin là IgG, IgA và IgM. Trong đó IgG là có hàm lượng cao nhất, đặc biệt trong sữa non, hàm lượng của IgG₁ có thể lên đến 80% tổng khối lượng các protein hoà tan trong sữa. IgM là một glyco-protein, cả IgG và IgM đều hoạt động như kháng thể theo cùng một cơ chế là liên kết với kháng nguyên và tạo ra mạng lưới không gian ba chiều không tan. Còn IgA, nó có chức năng chống nhiễm trùng đường ruột, rất có lợi cho cơ thể. Serum-albumin là protein phân tử lượng lớn có nguồn gốc từ máu và không đặc trưng cho sữa. Ngoài ra, trong sữa còn có các protein màng, hàm lượng của chúng rất thấp. Protein màng tạo nên một lớp màng mỏng bao quanh các hạt béo, góp phần làm ổn định hệ nhũ tương trong sữa.

Năm 1881, lần đầu tiên Arnold phát hiện sự có mặt của enzyme trong sữa bò. Enzyme đầu tiên đó là enzyme lactoperoxydase. Từ đó đến nay, rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đã tìm ra thêm hơn 60 loại enzyme khác nhau trong sữa. Phần lớn enzyme trong sữa làm hư hỏng sữa nhanh hơn. Tuy nhiên, một số enzyme trong sữa như lactoperoxydase, lysozyme có vai trò kháng khuẩn. Chúng tham gia vào việc ổn định chất lượng sữa tươi trong quá trình bảo quản trước khi chế biến. Một số loại enzyme chủ yếu trong sữa như: lactoperoxydase, catalase, lipase, phosphatase, lysozyme, protease [1, 2, 4].

c. Chất béo.

Chất béo trong sữa gồm hai nhóm chính là nhóm hợp chất với glycerol và nhóm hợp chất với sphingosine. Các chất béo trong sữa thường có dạng hình cầu, có đường kính từ 0,1-20 μ m. Trong 1ml sữa có khoảng 10-15 tỷ hạt cầu béo. Các hạt cầu béo có thành phần chủ yếu là glyceride, phospholipid và protein [1, 2, 4].

d. Vitamin và khoáng.

Các vitamin trong sữa được chia làm hai nhóm: vitamin hoà tan trong nước (B₁, B₆, B₁₂, C,...) và vitamin hoà tan trong chất béo (A, D, E, K). Các vitamin được

tổng hợp chủ yếu từ các VSV trong ngăn thứ nhất dạ dày của bò và không phụ thuộc vào điều kiện ngoại cảnh. Nhưng bị ảnh hưởng bởi thành phần thức ăn và điều kiện thời tiết,...[1, 2, 4].

Bảng 1.3 – Hàm lượng một số vitamin trong sữa bò

Vitamin	Hàm lượng	Vitamin	Hàm lượng (mg/l)	Vitamin	Hàm lượng (µg/l)
A	0,2-2,0 mg/l	B ₁	0,44	B ₁₂	4,3
D	0,375-0,5 µg/l	B ₂	1,75	C	20
E	0,75-1,0 mg/l	B ₃	0,94	Biotine	30
K	80 µg/l	B ₅	3,46	Acid folic	2,8
		B ₆	0,5		

[1].

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 các nguyên tố khoáng trong sữa, chiếm hàm lượng cao nhất là Ca, P, Mg, các khoáng khác như K, Na, Cl đóng vai trò như các chất điện ly. Ngoài ra, sữa còn chứa các nguyên tố khác như Zn, Fe, I, Cu,...chúng rất cần thiết cho quá trình dinh dưỡng của con người [1, 2, 4].

Bảng 1.4 – Thành phần một số nguyên tố vi lượng trong sữa bò (mg/l)

Nguyên tố	Sữa bò	Nguyên tố	Sữa bò
Zn	2-5	Mo	0,05-0,08
Si	1,5-7,0	F	0,1-0,2
Al	0,5-1,0	Se	0,01-0,05
Fe	0,2-0,5	Cr	0,01-0,02
Cu	0,02-0,15	Co	$0,5 \cdot 10^{-3}$ - $1,0 \cdot 10^{-3}$
I	0,015-0,050	Pb	0,04-0,08
Mn	0,03-0,05	As	0,03-0,05

[1].

e. Các hợp chất khác.

Trong sữa bò còn chứa các hormone, chúng được chia làm ba nhóm là proteohormone, hormone peptide và hormone steroid, trong số đó prolactine là được biết đến và nghiên cứu nhiều hơn cả, hàm lượng trung bình prolactine trong

sữa bò là 50µg/l, trong sữa non là 230µg/l [1, 2, 4]. Ngoài ra, trong sữa bò còn chứa các chất khí, chủ yếu là CO₂, O₂ và N₂. Tổng hàm lượng của chúng chiếm từ 5% đến 6% thể tích sữa. Chúng thường tồn tại ở các dạng hoà tan, dạng liên kết hoá học với chất khác và dạng phân tán. Thỉnh thoảng, người ta còn tìm thấy trong sữa bò một số hợp chất hoá học như: kháng sinh, chất tẩy rửa, kim loại nặng, nguyên tố phóng xạ,... các chất đó đều là các chất độc cho người sử dụng. Hàm lượng của chúng trong sữa thường ở dạng vết. Chúng nhiễm vào sữa do thức ăn, thiết bị vắt sữa, môi trường chuồng trại, nguồn nước,... Các chất này cần phải được loại bỏ ra khỏi sữa để đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm cho người sử dụng [1, 2, 4].

1.2.1.3. Một số tính chất vật lý, đặc điểm của sữa chua.

Sữa chua là sản phẩm chế biến từ sữa nhờ quá trình lên men bởi nhóm vi khuẩn lactic và một số nhóm vi khuẩn khác. Nó có một số đặc điểm sau:

- Trạng thái: Sữa chua là đồng nhất, mịn, sệt, không vón cục, không tách lớp.
- Mùi: Có mùi thơm đặc trưng của sản phẩm lên men nhờ sự có mặt của các hợp chất như acid lactic, acid acetic, diacetyl,... chúng có mùi thơm dịu và mùi của hương liệu bổ sung thêm vào mỗi loại sữa chua.
- Vị: Sữa chua có vị hơi chua của acid lactic, vị ngọt nhẹ của đường và vị béo của lipid trong sữa chua. Ngoài ra, còn có thêm vị đặc trưng của từng loại sữa chua.
- Màu sắc: Sữa chua thường có màu trắng ngà và màu đặc trưng của hương liệu bổ sung như màu hồng của sữa chua dâu, màu vàng của sữa chua trái cây,...

Hiện nay có rất nhiều loại sữa chua khác nhau như, dựa vào cấu trúc và mùi vị mà sữa chua có thể được phân loại như sau:

- *Sữa chua truyền thống (set type)*: Sản phẩm có cấu trúc gel mịn. Trong quy trình sản xuất, sữa nguyên liệu sau khi được xử lý, cấy giống rồi được rót vào bao bì. Quá trình lên men diễn ra trong bao bì làm xuất hiện các khối đông (coagulum) và tạo cấu trúc đặc trưng cho sản phẩm.

- *Sữa chua dạng khuấy (stirred type)*: Khối đông xuất hiện trong sản phẩm sau quá trình lên men bị phá hủy một phần do sự khuấy trộn cơ học. Trong quy trình sản xuất, sữa nguyên liệu được xử lý và cấy giống rồi lên men trong thiết bị chuyên dùng, tiếp theo là quá trình làm lạnh và rót sản phẩm vào bao bì. Sữa chua dạng khuấy sẽ không có cấu trúc gel mịn và đồng nhất như sữa chua truyền thống.

- *Sữa chua uống (drinking type) hay sữa chua lỏng*: Khối đông xuất hiện trong sản phẩm sau quá trình lên men bị phá hủy hoàn toàn. Sản phẩm có dạng lỏng. Điểm khác biệt là sau quá trình lên men, người ta sử dụng phương pháp khuấy trộn hoặc phương pháp đồng hóa để phá hủy cấu trúc gel của khối đông và làm giảm độ nhớt cho sản phẩm.

- *Sữa chua lạnh đông (frozen type)*: Sản phẩm có dạng tương tự như kem. Quá trình lên men sữa được thực hiện trong thiết bị chuyên dùng, tiếp theo hỗn hợp sau lên men sẽ được xử lý và lạnh đông để làm tăng độ cứng cho sản phẩm rồi bao gói.

- *Sữa chua cô đặc (concentrated yaourt)*: Quy trình sản xuất bao gồm các giai đoạn quan trọng như lên men sữa, cô đặc, làm lạnh và bao gói sản phẩm. Trong quá trình cô đặc, người ta sẽ tách bớt huyết thanh sữa ra khỏi sản phẩm.

Dựa vào hàm lượng chất béo trong sản phẩm, lượng chất béo trong sữa chua từ 0-10%. Theo WHO/FAO, sản phẩm sữa chua được chia làm ba nhóm chính:

- *Sữa chua gầy (skimmed yaourt)*: Hàm lượng chất béo không lớn hơn 0,5%.

- *Sữa chua bán gầy (partially skimmed yaourt)*: Hàm lượng chất béo nằm trong khoảng 0,5-3,0%.

- *Sữa chua béo (fat yaourt)*: Hàm lượng chất béo trong sản phẩm không thấp hơn 3% [1, 2, 4, 15].

1.2.1.4. Giá trị dinh dưỡng của sữa chua.

a. Carbohydrate.

Trong sữa chua tự nhiên có sự có mặt của một vài mono và disaccharide nhưng đường lactose lại có hàm lượng nhiều hơn hẳn. Thậm chí sau quá trình lên men, sản phẩm có thể chứa tới 4-5g lactose trong 100g sản phẩm. Bởi vì phần còn lại của quá trình lên men có thể chứa tới 14-16g TS (Total solid: tổng số chất khô) trong 100g sản phẩm nghĩa là có thể chứa tới 8g lactose. Vì vậy mà lượng lactose có trong sản phẩm cuối cùng có ít khác biệt so với sữa bình thường. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, khi so sánh với sữa, khả năng phân giải lactose của sữa chua phụ thuộc vào khả năng phân giải của β -galactosidase do những vi sinh vật có trong sữa chua tiết ra và những lactase do những vi sinh vật trong sữa chua tiết ra là để kích thích cho những lactase ngoại sinh hoạt động chuẩn bị cho khả năng phân giải lactose [15].

Bảng 1.5 – Thành phần dinh dưỡng của sữa chua (trong 100g)

Thành phần	Sữa chua ^a			
	Chất béo cao	Chất béo thấp	Chất béo thấp/hương trái cây	Kiểu Hy Lạp
Nước (g)	81.9	84.9	77.0	77.0
Năng lượng (kcal)	79	56	90	115
Protein (g)	5.7	5.1	4.1	6.4
Chất béo (g)	3.0	0.8	0.7	9.1
Carbohydrate (g)	7.8	7.5	17.9	-
Canxi (mg)	200	190	150	150
Phospho (mg)	170	160	120	130
Natri (mg)	80	83	64	-
Kali (mg)	280	250	210	-
Kẽm (mg)	0.7	0.6	0.5	0.5

[15].

^a Giá trị dinh dưỡng của sữa chua trái cây phụ thuộc vào loại trái cây và độ ổn định.

b. Protein.

Hàm lượng protein trong sữa chua cao hơn protein trong sữa bởi trong quá trình sản xuất sữa chua có sự bổ sung sữa gầy và sữa cô đặc để đồng hóa nguyên liệu sữa. Mỗi ngày sử dụng khoảng 200-250ml sữa chua có thể cung cấp tối thiểu khoảng 15g protein. Protein trong sữa chua dễ tiêu hóa, rất tốt cho sức khỏe con người [15].

c. Lipid.

Lượng chất béo có trong sữa chua tùy thuộc vào loại sản phẩm sữa chua được sản xuất. Mặc dù phần lớn sữa chua bán ở những nước công nghiệp được làm từ sữa gầy, thế nhưng sữa chua truyền thống cũng chứa khoảng 3-4g sữa béo trong 100g

sữa chua và sữa chua cô đặc hay sữa chua làm theo kiểu của Hy Lạp chứa khoảng 9-10g chất béo [15].

d. Vitamin và khoáng vi lượng.

Canxi có trong sữa chua là dạng canxi dễ hấp thu hơn bất kì dạng canxi được cung cấp bởi các nguồn khác. Ngoài ra sữa chua còn cung cấp một số nguyên tố vi lượng khác như Na, Mg, Zn, P đều ở dạng dễ hấp thu và sử dụng [15].

Bảng 1.6 – Một vài loại vitamin có mặt trong sữa chua (trong 100g)

Vitamin	Sữa chua		
	Chất béo cao	Chất béo thấp	Chất béo thấp/ hương trái cây
Retinol (μg)	28	8	10
Carotene (μg)	21	5	4
Thiamin (B_1) (μg)	60	50	50
Riboflavin (B_2) (μg)	270	250	210
Pyridoxine (B_6) (μg)	100	90	80
Cyanocobalamine (B_{12}) (μg)	0.2	0.2	0.2
Vitamin C (mg)	1	1	1
Vitamin D (μg)	0.04	0.01	0.01
Vitamin E (μg)	50	10	10
Acid Folic (μg)	18	17	16
Acid Nicotinic (μg)	200	100	100
Acid Pantothenic (μg)	500	450	330
Biotin (μg)	2.6	2.9	2.3
Choline (mg)	-	0.6	-

[15].

Sữa chua là sản phẩm lên men nhờ vi khuẩn lactic. Hoạt động của hệ VSV trong sữa và sữa chua làm cho giá trị dinh dưỡng của sữa không những không mất đi mà còn tăng thêm. Hoạt động của vi khuẩn lactic thủy phân protein, glucid, lipid trong sữa thành các chất đơn giản dễ tiêu hóa hơn như peptide và acid amin. Ngoài ra, do trong sữa chua có sự hiện diện của VSV có lợi là nhóm vi khuẩn lactic làm tăng sự ổn định của hệ VSV đường ruột, tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng từ thức ăn. Và đặc biệt, các vi khuẩn lactic còn sản sinh ra các loại acid hữu cơ như acid lactic, các enzyme tiêu hóa, các chất kháng khuẩn như lactococcidine giúp chống lại các tác nhân xâm nhập từ bên ngoài, bảo vệ hệ VSV đường ruột có lợi.

1.2.2. Hệ vi sinh vật tồn tại trong sữa và sữa chua.

1.2.2.1. Hệ vi sinh vật tồn tại trong sữa.

Trong sữa thường chứa các VSV như vi khuẩn và một số nhóm khác. Trong đó nhóm vi khuẩn lactic là phổ biến hơn cả, ít hơn là vi khuẩn butyric, propionic, vi khuẩn gây thối, trực khuẩn đường ruột,...

Vi khuẩn lactic: Vi khuẩn lactic có dạng hình cầu hoặc hình que, đứng riêng lẻ hoặc tạo thành chuỗi, Gram (+). Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 25-47⁰C.

Xét theo cách thức lên men, vi khuẩn lactic được chia thành hai nhóm là vi khuẩn lactic lên men đồng hình và vi khuẩn lactic lên men dị hình.

Xét theo hình thái cấu trúc thì vi khuẩn lactic được chia ra hai nhóm:

- Liên cầu khuẩn lactic (*Streptococcus lactic*): Tế bào hình tròn, oval, thường xếp thành đôi hoặc thành chuỗi. Nhiệt độ phát triển tối ưu là 30-35⁰C và được ứng dụng nhiều trong sản xuất sữa chua, bơ, phô mát.

- Trực khuẩn lactic (*Lactobacillus*): Chúng đứng riêng lẻ hoặc kết thành chuỗi và gồm ba nhóm nhỏ là trực khuẩn ưa nhiệt (nhiệt độ tối ưu là 40-45⁰C), nhóm trực khuẩn ưa ấm (nhiệt độ tối ưu là khoảng 30⁰C) và nhóm *Beta bacterium*.

Vi khuẩn Coliform: Tồn tại trong hệ tiêu hóa của động vật. Là vi khuẩn Gram (-), kỵ khí tùy tiện, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 30-44⁰C. Trong sữa, vi khuẩn Coliform chuyển hóa đường lactose thành acid lactic, acid hữu cơ khác, CO₂, H₂,... chúng giải phóng protein trong sữa tạo mùi khó chịu.

Vi khuẩn sinh acid butyric (giống *Clostridium*): Là vi khuẩn Gram (+), kỵ khí bắt buộc, có khả năng sinh bào tử. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 37⁰C. Tế bào có

dạng hình que, đôi khi có dạng hình thoi hoặc hình trứng. Vi khuẩn *Clostridium* chuyển hóa đường thành acid butyric, butanol, ethanol, acetone, CO₂, H₂,...

Vi khuẩn Propionic (giống *Propionibacterium*): Được tìm thấy trong dạ dày của các loài nhai lại như trâu bò. Chúng có hình cầu, xếp thành từng đôi hoặc chuỗi, Gram (+), kỵ khí không bắt buộc, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 30⁰C. Vi khuẩn này chuyển hóa đường thành acid propionic, acid acetic, CO₂,... làm hư hại sữa.

Vi khuẩn gây thối: Là các vi khuẩn có dạng hình cầu, hình gậy, hiếu khí lẫn kỵ khí, chúng có khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào trong môi trường sữa. Protease xúc tác thủy phân protein tới peptide và acid amin, acid amin tiếp tục bị thủy phân thành NH₃, H₂S,... làm cho sữa có mùi khó chịu. Vài giống vi khuẩn gây thối có khả năng tổng hợp lipase xúc tác phân giải chất béo trong sữa và tạo mùi ôi cho sữa. Ngoài ra, các vi khuẩn gây thối còn tạo ra khí CO₂, H₂, sinh tổng hợp acid hữu cơ làm giảm pH sữa và gây đông tụ protein. Một số khác có thể sinh tổng hợp protease xúc tác tương tự như renin làm đông tụ casein trong sữa [1, 2, 3, 4].

1.2.2.2. Hệ vi sinh vật tồn tại trong sữa chua.

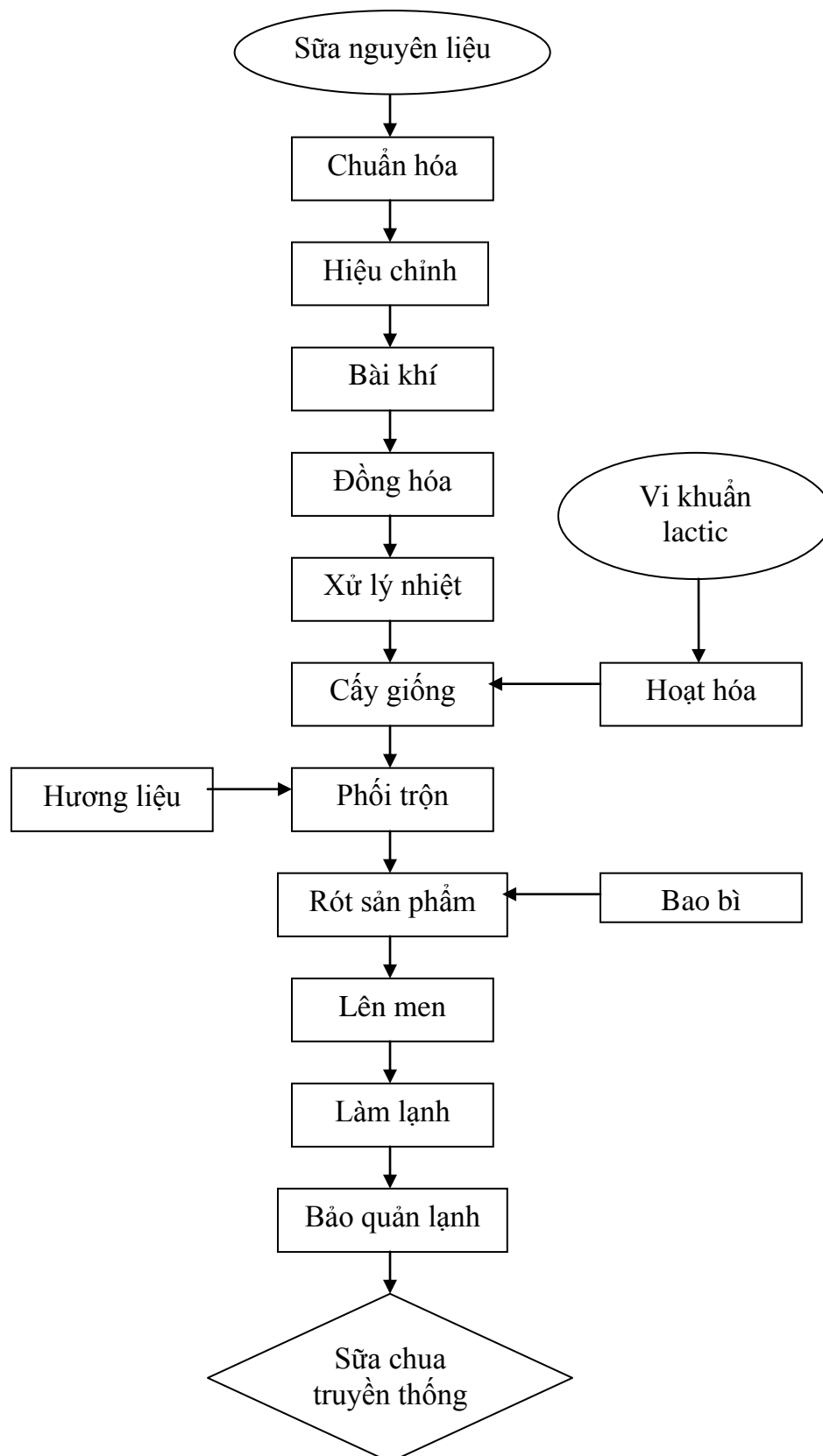
Trong sữa chua, hệ VSV bao gồm nhiều nhóm khác nhau nhưng trong đó phổ biến và tiêu biểu hơn hết là nhóm vi khuẩn lactic, ngoài ra còn có mặt một số nhóm vi khuẩn khác. Vi khuẩn lactic trong sữa chua có mặt tự nhiên trong sữa và quá trình lên men lactic. Chúng sử dụng cơ chất là đường lactose và các chất khác trong sữa để làm cơ chất phát triển, sản phẩm tạo thành là acid lactic, acid acetic,... các chất sinh hương,... Vi khuẩn lactic trong sữa chua thuộc các nhóm khác nhau như nhóm ưa ấm, nhóm ưa nhiệt [1, 2, 3, 4].

1.2.3. Quy trình công nghệ sản xuất sữa chua.

Sữa nguyên liệu: Có thể là nguồn sữa tươi, sữa bột, sữa cô đặc, sữa hoàn nguyên hoặc sữa tái chế. Sữa được dùng làm nguyên liệu phải đạt được các yêu cầu như: tổng số tế bào VSV trong sữa càng thấp càng tốt, không chứa thực khuẩn thể (Bacteriophage), không chứa kháng sinh, không chứa enzyme, không có dư lượng chất tẩy rửa, hàm lượng chất béo phù hợp, hàm lượng chất khô phù hợp (8,2%),...

Chuẩn hóa: Là công đoạn hiệu chỉnh hàm lượng chất béo cho sản phẩm sữa chua. Nếu sữa nguyên liệu có hàm lượng chất béo thấp ta sẽ bổ sung thêm cream

vào. Ngược lại, nếu sữa nguyên liệu có hàm lượng chất béo cao thì ta có thể bổ sung thêm sữa gầy hoặc ly tâm để loại bớt chất béo ra khỏi sữa.



Hình 1.2 – Quy trình công nghệ sản xuất yaourt [1].

Hiệu chỉnh hàm lượng chất khô: Nhằm điều chỉnh hàm lượng chất khô trong sữa về giá trị lý tưởng cho quá trình sản xuất sữa chua.

Bài khí: Là loại bỏ bớt chất khí trong sữa càng nhiều càng tốt. Khi đó, hiệu quả của các quá trình đồng hóa và thanh trùng sẽ tăng, các hợp chất bay hơi có mùi khó chịu trong sữa sẽ được tách bỏ và chất lượng sản phẩm sẽ tốt hơn.

Đồng hóa: Mục đích của quá trình đồng hóa là tránh hiện tượng tách pha của chất béo xảy ra trong quá trình lên men sữa và làm tăng độ đồng nhất cho sản phẩm. Quá trình đồng hóa sữa sẽ ảnh hưởng tốt đến cấu trúc micelle trong sữa và cải thiện cấu trúc gel của sữa chua thành phẩm. Thường đồng hóa ở áp suất 200-250 bar, nhiệt độ từ 65-70°C.

Xử lý nhiệt: Để tiêu diệt và ức chế đến mức tối đa hệ VSV và các enzyme có trong sữa. Hơn nữa, quá trình xử lý nhiệt sẽ làm biến đổi một phần các protein sữa. Nhờ đó, quá trình lên men sẽ tốt hơn, khối đông được hình thành với cấu trúc ổn định do β -lactoglobulin trong whey protein tương tác với κ -casein trong cấu trúc micelle, hạn chế thất thoát huyết thanh ra khỏi cấu trúc gel khi bảo quản sữa chua. Quá trình này thường được thực hiện ở nhiệt độ 90-95°C trong 3-5 phút.

Cấy giống vi khuẩn lactic: Trong sản xuất sữa chua ta thường dùng nhóm vi khuẩn lactic lên men đồng hình như *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus acidophilus*,.... Để rút ngắn thời gian lên men và tiết kiệm lượng chế phẩm vi khuẩn cần dùng, người ta thường hoạt hóa giống vi khuẩn lactic trước khi chuyển qua giai đoạn lên men.

Phối trộn: Ở giai đoạn này có thể phối trộn thêm những hương liệu khác nhau để sản xuất ra các loại yaourt có hương vị khác nhau.

Rót sản phẩm: Sau thời gian hoạt hóa, hỗn hợp sữa và giống vi khuẩn lactic được chiết rót vào các hũ sữa chua nhỏ và được chuyển qua phòng lên men.

Lên men: Nhiệt độ lên men tối ưu trong phòng lên men là từ 42-43°C. Thời gian lên men phụ thuộc vào chủng vi khuẩn lactic sử dụng, trạng thái sinh lý của giống và yêu cầu về độ chua của sản phẩm yaourt thành phẩm, thông thường thời gian lên men là từ 4-6 giờ.

Làm lạnh và bảo quản: Sau thời gian lên men, sản phẩm được làm lạnh để ổn định cấu trúc gel của sản phẩm và tránh hiện tượng tách huyết thanh sữa trong sản

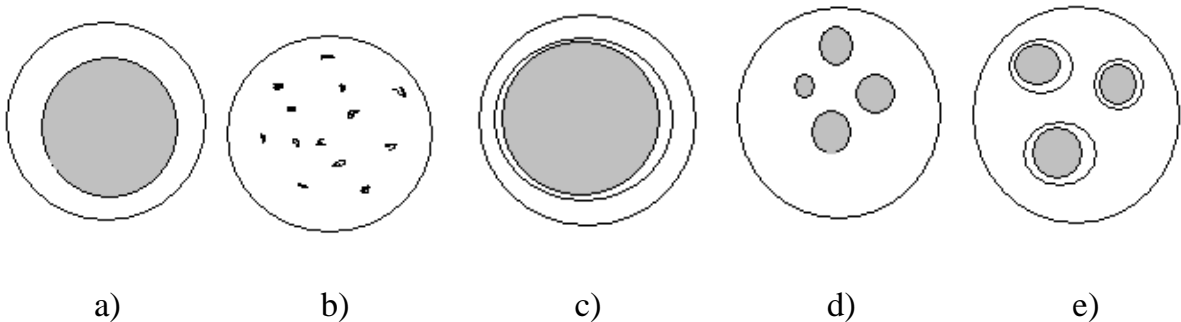
phẩm, đồng thời làm chậm tốc độ sinh tổng hợp acid lactic của vi khuẩn. Các bao bì chứa yaourt sẽ được đưa vào phòng làm lạnh để đưa về nhiệt độ 18-20⁰C trong vòng 30-40 phút. Cuối cùng, hạ nhiệt độ sản phẩm xuống 4⁰C và bảo quản trong kho lạnh ở nhiệt độ 2-4⁰C [1, 2, 4].

1.3. Tổng quan về vi gói.

1.3.1. Khái niệm, đặc điểm, ưu và nhược điểm của việc vi gói.

a. Khái niệm vi gói.

Vi gói là một trong những phương pháp cố định tế bào được sử dụng rộng rãi hiện nay. Vi gói là phương pháp sử dụng các chất tạo màng (gel) là các polymer có nguồn gốc tự nhiên như gelatin, alginate, chitosan, cellulose,... hoặc có nguồn gốc nhân tạo như polyamide, polystyrene, polyacrylate, polyacrylamide, polyester, polyvinyl pyrrolidone (PVP), polyethylene glycol (PEG),... để bẫy, nhốt và bao gói các tế bào, cơ thể vi sinh vật sống trong các nang nhỏ. Giúp tế bào cách ly với môi trường xung quanh, làm giảm sự tổn thương cũng như sự tổn thất số lượng tế bào, bằng cách này các tế bào sẽ được bảo vệ tốt hơn trong các môi trường cực đoan như acid cao, pH thấp, muối mật, sốc nhiệt,... và phóng thích tại những nơi ta mong muốn. Ngoài ra, vi gói còn giúp ổn định, tăng giá trị về mặt cảm quan cho sản phẩm.



Hình 1.3 – Các loại vi gói [5].

- a) Vi gói dạng lỏng; b) Vi gói dạng rắn; c) Vi gói nhiều lớp;
d) Vi gói đa nhân; e) Vi gói trong vi gói

Vi gói có nhiều loại: vi gói đơn nhân là phần nhân bên trong vi gói chỉ chứa một khối dung dịch hoặc chất rắn, vi gói đa nhân là bên trong vi gói có chứa nhiều nhân nhỏ (vi gói trong vi gói), vi gói nhiều lớp là vi gói được thiết kế với nhiều lớp bao khác nhau [5].

b. Đặc điểm vi gói.

Mỗi loại vật liệu vi gói và mỗi loại tế bào sống lại hoạt động ở các điều kiện khác nhau nên phải lựa chọn điều kiện để tạo thành vi gói như pH, nhiệt độ, thời gian,...

Vi gói không làm tổn hại đến các tế bào sống mà còn bảo vệ tế bào sống.

Vi gói cho phép cố định số lượng tế bào sống lớn hơn các phương pháp cố định tế bào khác.

Độ bền cơ học của lớp màng bao vi gói là một đặc điểm quan trọng. Nó phải có độ bền tương đối để có thể bảo vệ được các tế bào sống, tuy nhiên lớp màng vi gói này lại không được quá vững chắc vì như thế sẽ ảnh hưởng đến khả năng phóng thích tế bào khi cần thiết.

Kích thước hạt vi gói cũng là đặc điểm cần lưu ý. Giữa kích thước hạt vi gói, độ bền vững của hạt và khả năng phóng thích tế bào có mối quan hệ với nhau. Kích thước hạt vi gói càng lớn thì độ bền vững của hạt càng cao, khả năng bảo vệ tế bào sống càng cao, nhưng khả năng phóng thích tế bào càng khó. Kích thước hạt vi gói càng nhỏ thì độ bền càng thấp, khả năng bảo vệ tế bào sẽ thấp đi nhưng khả năng phóng thích tế bào sẽ dễ dàng hơn.

Ngoài ra còn có một số đặc điểm khác như sự mài mòn của các hạt vi gói do sự va chạm và ma sát vào nhau, khả năng kháng khuẩn của hạt vi gói,...[5].

c. Ưu điểm của vi gói.

Vi gói giúp bảo vệ tế bào sống, tạo ra mật độ vi sinh vật lớn, hạt vi gói như tấm áo choàng bảo vệ các tế bào sống chống chịu được điều kiện khắc nghiệt của môi trường cực đoan như acid, nhiệt độ,...

Tạo ra các gradient nồng độ cơ chất, nồng độ sản phẩm, nồng độ oxy hòa tan, pH môi trường lên men. Từ đó có thể tạo ra các môi trường khác nhau cho tế bào trong các lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng khác nhau.

Bảo vệ tế bào chống lại tác nhân bacteriophage, từ đó đảm bảo cho quá trình lên men không bị tạp nhiễm, hư hại.

Cho phép điều chỉnh tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật.

Cho phép sử dụng tế bào ở một pha riêng biệt đối với môi trường lên men, do đó khả năng dừng phản ứng nhanh.

Có thể sử dụng các kỹ thuật tập hợp vi sinh vật để thu được hoạt tính cao nhất.

Tạo điều kiện cho việc định vùng từng bộ phận trong tế bào đối với các chủng loại vi sinh vật khác nhau, các số lượng vi sinh vật khác nhau.

Tăng độ ổn định hoạt tính trao đổi chất của tế bào khi có sự thay đổi pH, nhiệt độ hay sự có mặt các chất ức chế trong môi trường lên men.

Vi gói có thể làm cho tế bào kéo dài khả năng tồn tại, từ đó giúp cho thời gian bảo quản chủng, giống tế bào vi sinh vật được lâu dài.

Trong các ngành sản xuất, đặc biệt là ngành sản xuất các sản phẩm liên quan đến probiotic, thì việc vi gói tế bào có ý nghĩa rất quan trọng. Nó giúp cho sản phẩm khi đến tay người tiêu dùng vẫn còn nguyên giá trị sử dụng.

Trong các ngành thực phẩm có các sản phẩm lên men như sản xuất bia, rượu,... thì kỹ thuật vi gói là một trong những lựa chọn để cố định tế bào vi sinh vật sử dụng trong công đoạn lên men, từ đó sử dụng vi sinh vật tiết kiệm, tối ưu và hiệu quả hơn [5, 17].

d. Nhược điểm của vi gói.

Tế bào vi sinh vật sản sinh ra nhiều enzyme trong quá trình trao đổi chất của nó, có những enzyme có thể cho xúc tác các phản ứng không mong muốn có thể làm tổn hại đến lớp vật liệu vi gói và cả chính tế bào. Để giải quyết vấn đề này phải chọn lựa giống vi sinh vật cho thích hợp (có thể biến đổi hoặc xử lý giống) để tế bào vi sinh vật không tạo ra các enzyme không mong muốn và tăng hoạt tính của các enzyme mong muốn.

Màng hay thành tế bào nguyên vẹn thường chống lại sự thẩm thấu của chất nền, sản phẩm và những phản ứng thích hợp trước hoặc sau khi cố định đòi hỏi phá hủy rào cản để thẩm thấu.

Có thể làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm nếu kích thước vi gói quá lớn.

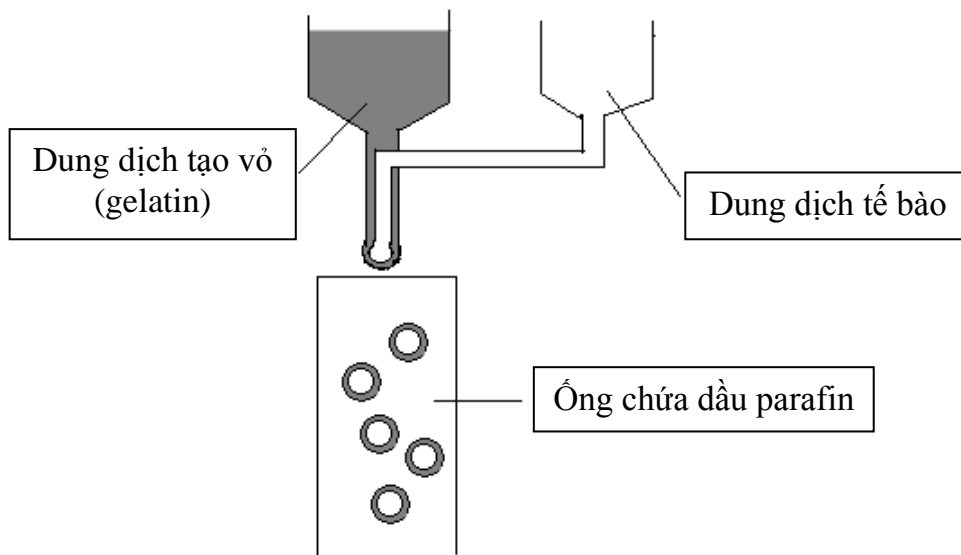
Đa số các vật liệu vi gói như gelatin, thạch, các loại tinh bột,...đều là các nguồn dinh dưỡng mà vi sinh vật có thể tiêu hóa được. Điều này khá nghiêm trọng vì như thế vi sinh vật được vi gói bên trong hoặc vi sinh vật tạp nhiễm từ bên ngoài có thể tiêu hóa lớp vi gói và làm cho lớp vi gói bị rách, thủng và như vậy hiệu quả vi gói sẽ giảm xuống đáng kể. Có bằng chứng cho thấy một số chủng vi khuẩn có khả

năng tiêu hóa, sử dụng chính vật liệu vi gói. Vì vậy mỗi chủng vi sinh vật ta phải nghiên cứu vật liệu vi gói phù hợp nhất cho đối tượng vi sinh vật đó [5].

1.3.2. Các phương pháp vi gói hiện nay.

1.3.2.1. Phương pháp nhỏ giọt.

Phương pháp nhỏ giọt ứng dụng nguyên lý căn bản là khi một chất lỏng được để rơi tự do thì sẽ tạo thành giọt hình cầu do sức căng bề mặt của chất lỏng. Phương pháp nhỏ giọt được thực hiện theo nguyên tắc tạo giọt đồng thời và lồng vào nhau của dung dịch tế bào và dung dịch tạo vỏ gói. Trong điều chế vi gói, sự nhỏ giọt không thể thực hiện bằng cách cho chảy tự nhiên nhờ vào trọng lực do các ống tạo giọt có đường kính rất nhỏ. Sự tạo giọt trong vi gói phải được thực hiện bằng cách ép các chất lỏng qua các ống đồng tâm, ở quy mô nhỏ có thể dùng bơm tiêm để ép chất lỏng qua bộ phận tạo giọt. Hệ thống còn có thể được gắn thêm một thiết bị siêu âm để ngắt giọt nên có thể điều chỉnh được kích thước của vi gói.



Hình 1.4 – Sơ đồ nguyên tắc của phương pháp nhỏ giọt [5].

Quy trình thực hiện vi gói bằng gelatin theo phương pháp nhỏ giọt gồm có 5 công đoạn sau:

- Điều chế dung dịch gelatin: Tính chất vật lý của dung dịch gelatin là yếu tố quan trọng quyết định chất lượng của vi gói được thực hiện theo phương pháp nhỏ giọt. Theo phương pháp này, cả hai loại gelatin A và B đều có thể sử dụng, gelatin nên có độ bền gel và dung dịch gelatin được điều chế ngay trước mỗi lô mẻ.

- Tạo giọt vi gói tế bào sống: Bộ phận quan trọng nhất của thiết bị gồm có 2 ống tạo giọt đồng tâm, ống trong nối với bình chứa dung dịch tế bào tự do, ống ngoài nối với bình chứa dung dịch tạo vỏ vi gói (gelatin). Gelatin được đun nóng và duy trì nhiệt độ 68-70⁰C để có thể chảy được qua ống với tốc độ ổn định. Dung dịch tế bào tự do duy trì ở nhiệt độ bình thường. Tốc độ chảy của 2 ống được điều chỉnh sao cho lượng gelatin vừa đủ để tạo một lớp vỏ bao bọc tế bào bên trong. Vi gói hình thành được dẫn đi vào một ống chứa parafin lạnh. Một bộ phận tạo xung được thiết kế tại đầu ra của 2 ống đồng tâm giúp ngắt giọt và tạo ra được vi gói có kích thước mong muốn. Sự đồng bộ về tốc độ bơm dung dịch tế bào và tốc độ tạo xung sẽ giúp vi gói đạt độ đồng đều về khối lượng. Các hạt vi gói sẽ di chuyển trong ống chứa dầu parafin lạnh nhờ một bơm được thiết kế ngay trên đường ống dẫn dầu parafin lạnh, gelatin tạo vỏ sẽ bắt đầu đông lại khi hạt vi gói bắt đầu di chuyển trong ống chứa dầu parafin lạnh. Sau khi hạt vi gói được tách ra khỏi dung dịch dầu parafin, dầu parafin sẽ được lọc, loại nước và được bơm lại vào trong hệ thống.

- Làm lạnh giọt vi gói: Các hạt vi gói sau khi ra khỏi máy được hứng vào trong các thùng chứa dầu parafin và được làm lạnh ở nhiệt độ 4⁰C trong thời gian ít nhất là 6-8 giờ để lớp gelatin đông lại hoàn toàn.

- Rửa sạch vi gói: Các hạt vi gói sau đó được lấy ra khỏi dầu parafin lạnh bằng cách ly tâm hoặc rây và được rửa lại bằng dung môi hữu cơ.

- Sấy khô vi gói: Hạt vi gói được cho vào buồng sấy. Quá trình sấy phải được kiểm tra chặt chẽ các thông số nhiệt độ, lưu lượng khí và hàm lượng ẩm của khí vào. Các hạt vi gói cần được sấy ở nhiệt độ thấp, thường thời gian sấy là khoảng 12 giờ.

Quy trình thực hiện vi gói bằng alginate theo phương pháp nhỏ giọt được thực hiện như sau:

- Điều chế dung dịch alginate, dung dịch CaCl₂ (chất hỗ trợ tạo gel).
- Bỏ sung tế bào tự do vào dung dịch alginate để tạo huyền phù tế bào.
- Cho tất cả lượng hỗn hợp alginate và tế bào tự do vào trong ống bơm tiêm và nhỏ giọt vào trong dung dịch hỗ trợ tạo gel. Khi giọt hỗn hợp alginate và tế bào tiếp xúc với dung dịch hỗ trợ tạo gel, ngay lập tức polymer alginate bao quanh tế bào và hình thành khung 3 chiều bởi liên kết với ion Ca²⁺. Nếu nồng độ alginate thấp (khoảng 0,6%) thì việc tạo gel của polymer alginate chỉ xảy ra nếu có mặt ion Ca²⁺

với nồng độ 0,3M. Nồng độ phổ biến thường được sử dụng để vi gói tế bào là alginate 1-2% và dung dịch hỗ trợ tạo gel (CaCl_2) là khoảng 0,05-1,5M.

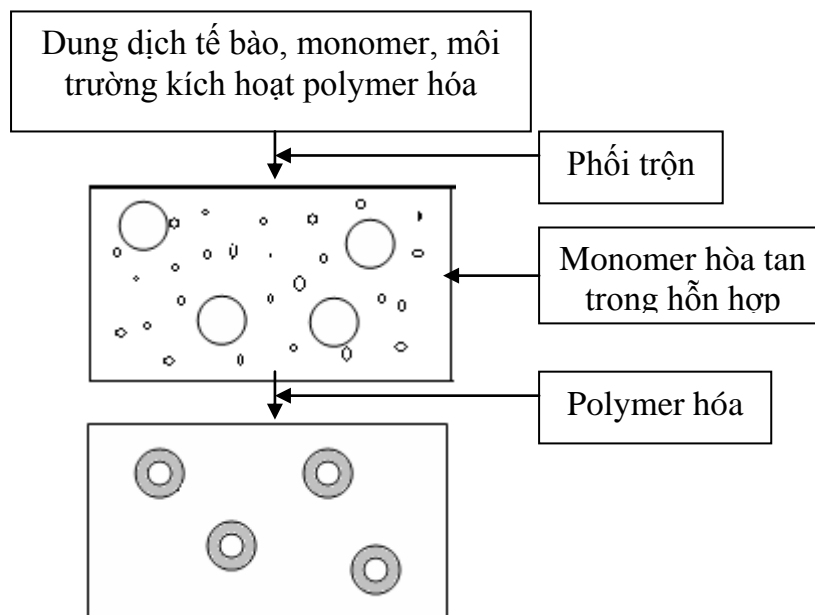
- Sau khi vi gói xong, hạt vi gói được sấy khô. Giai đoạn sấy này ít nhiều sẽ làm ảnh hưởng đến tế bào, có thể làm tổn thương tế bào. Các phương pháp sấy thường sử dụng là sấy thăng hoa, sấy phun và sấy tầng sôi.

Ưu điểm của phương pháp nhỏ giọt: thiết bị tương đối đơn giản, gọn gàng, dễ sử dụng, năng suất vi gói cao và bảo vệ tế bào tốt.

Nhược điểm của phương pháp nhỏ giọt: chỉ có thể tạo ra các hạt vi gói có hình dạng cầu, không tạo ra được các hạt vi gói có hình dạng thay đổi linh hoạt [5].

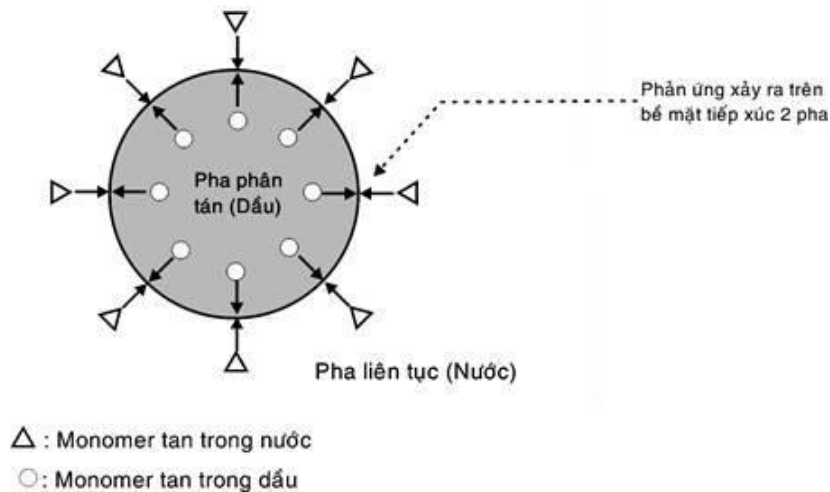
1.3.2.2. Phương pháp polymer hóa liên kết bề mặt.

Nguyên tắc: Tạo một phản ứng polymer hóa ngay bề mặt tiểu phân phân tán. Để thực hiện phản ứng polymer hóa, các monomer được hòa tan hoặc phân tán trong dung dịch chứa tế bào tự do. Các tế bào tự do dễ được bao bọc bởi màng polymer tại thời điểm polymer được hình thành, do đó phương pháp này còn được gọi là phương pháp polymer hóa in situ. Sau khi thực hiện phản ứng polymer hóa, các vi gói sẽ được tách ra khỏi môi trường lỏng bằng phương pháp ly tâm, lọc hoặc bằng cách cất loại dung môi. Kích thước hạt vi gói thực hiện bằng phương pháp polymer hóa thường nhỏ hơn các phương pháp vi gói khác, thường kích thước hạt vi gói nằm trong khoảng 3-2000 μm [5].



Hình 1.5 – Sơ đồ mô tả phương pháp polymer hóa [5].

1.3.2.3. Phương pháp ngưng tụ polymer hóa.



Hình 1.6 – Sơ đồ mô tả quá trình ngưng tụ polymer hóa liên kết bề mặt [5].

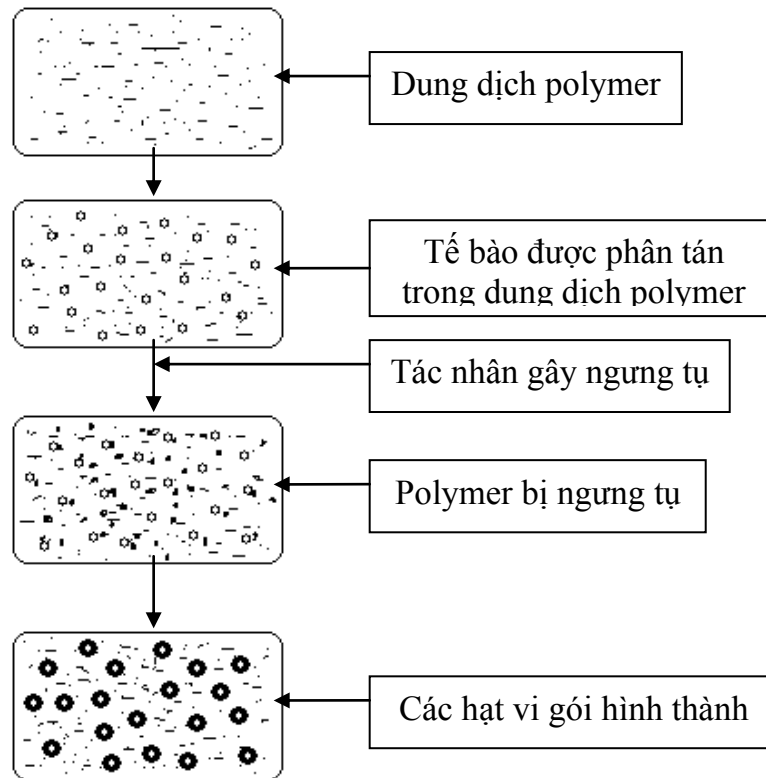
Phương pháp ngưng tụ polymer hóa liên kết bề mặt được ứng dụng rất nhiều để điều chế các vi gói. Nguyên tắc của phương pháp này tương tự phương pháp polymer hóa, nhưng sử dụng 2 loại polymer, một phản ứng ngưng tụ được thực hiện để tạo thành một polymer mới có liên kết chéo và có phân tử lượng lớn hơn bao quanh tiểu phân phân tán (các tế bào tự do) [5].

1.3.2.4. Phương pháp tách pha đông tụ.

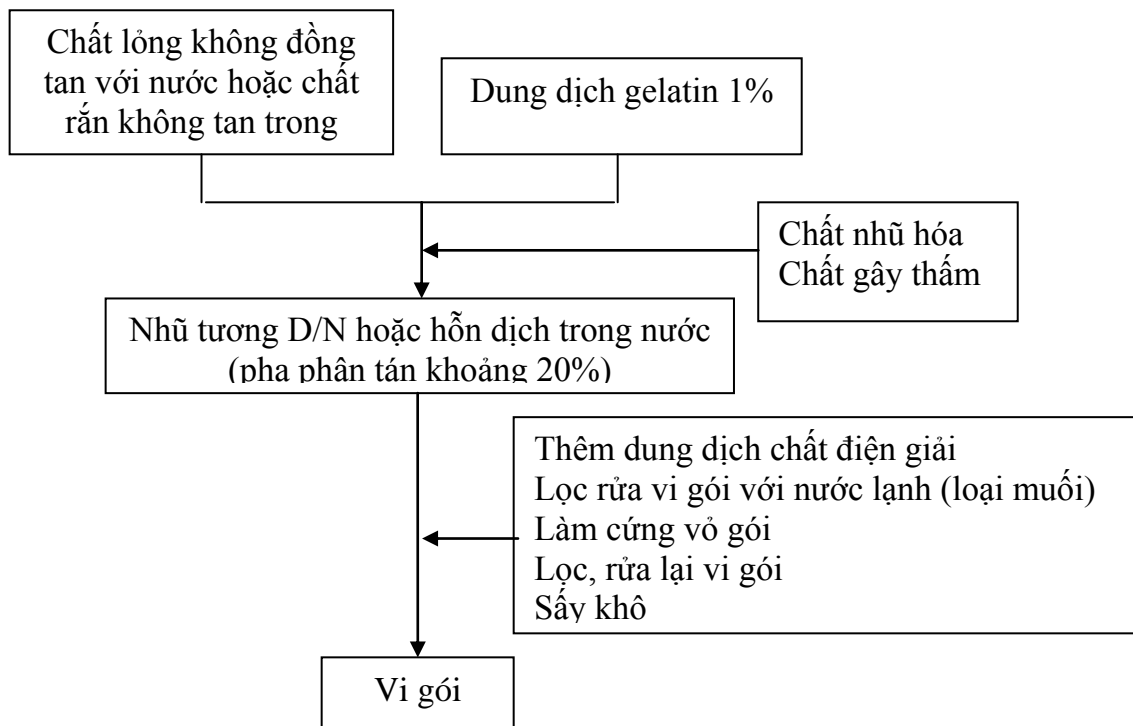
Phương pháp này thường được áp dụng đối với các dung dịch polymer thân nước, polymer được dùng phải có khả năng tạo thành màng phim. Nếu chỉ sử dụng một loại dung dịch keo thì gọi là phương pháp tách pha đông tụ đơn, nếu sử dụng nhiều loại dung dịch keo thì gọi là phương pháp tách pha đông tụ phức.

a. Phương pháp tách pha đông tụ đơn.

Nguyên tắc: loại nước của các keo thân nước, như vậy làm giảm độ tan của các chất keo, các chất keo sẽ tủa lại trên bề mặt tiểu phân phân tán (dung dịch tế bào tự do). Sự tách pha được thực hiện bằng cách thay đổi nhiệt độ, tạo sự hóa muối hoặc thêm một dung môi thứ hai vào để giảm độ tan của chất keo thân nước. Chất keo thân nước được sử dụng phổ biến nhất hiện nay chính là gelatin [5].



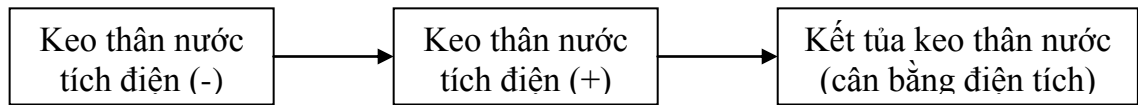
Hình 1.7 – Các giai đoạn của quá trình tách pha đông tụ đơn [5].



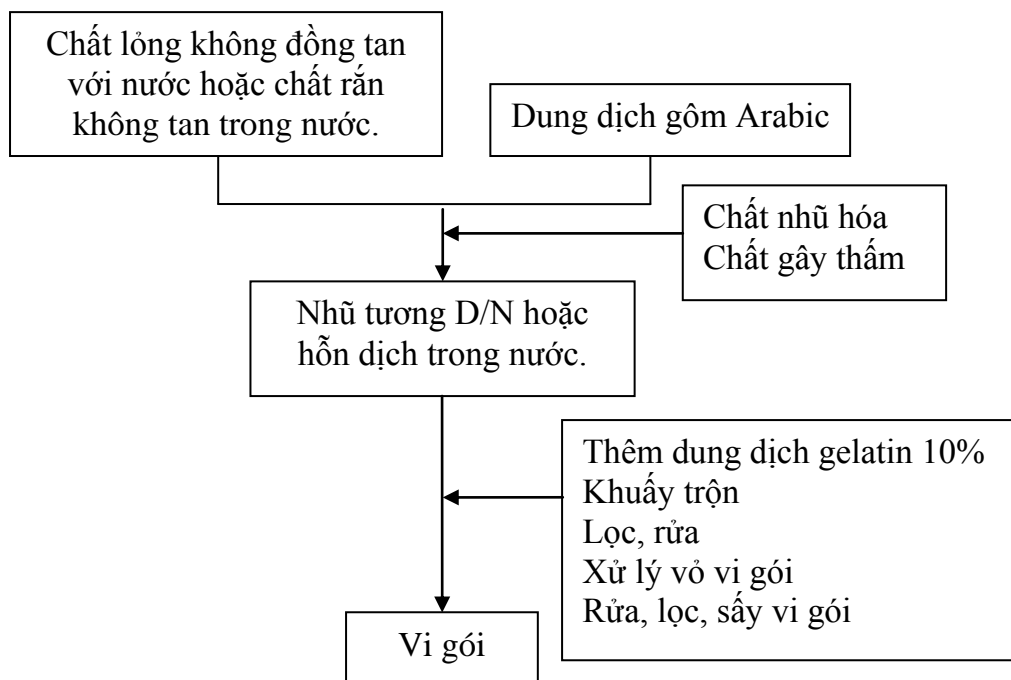
Hình 1.8 – Sơ đồ quy trình điều chế vi gói bằng phương pháp tách pha đông tụ đơn [5].

b. Phương pháp tách pha đông tụ phức.

Nguyên tắc: Sự đông tụ được thực hiện bằng cách kết tủa 2 chất thân nước tích điện trái dấu trên bề mặt tiểu phân phân tán (tế bào tự do).



Kích thước của vi gói phụ thuộc vào kích thước tiểu phân phân tán trong nhũ tương hoặc hỗn dịch, thường trong khoảng 5-5000 μ m. Tỷ lệ giữa lớp bao so với nhân có thể trong khoảng 3-30%. Phương pháp này có thể áp dụng dễ dàng ở quy mô sản xuất lớn với các thiết bị đơn giản như thùng phản ứng, hệ thống lọc loại dung môi, thiết bị kiểm tra pH và nhiệt độ,...[5].



Hình 1.9 – Sơ đồ quy trình điều chế vi gói bằng phương pháp tách pha đông tụ phức [5].

c. Phương pháp tách pha đông tụ trong dung môi hữu cơ.

Sự tách pha đông trong dung môi hữu cơ được thực hiện tương tự như tách pha đông tụ trong dung môi nước. Tuy nhiên, trong giai đoạn đầu phải điều chế nhũ tương N/D hoặc hỗn dịch tế bào trong dầu. Các polymer tạo vỏ nang phải là loại tan được trong dung môi hữu cơ. Sự tách pha đông được thực hiện bằng cách thêm dung môi hữu cơ hỗn hòa với tương ngoại nhưng không hòa tan được polymer tạo vỏ vi

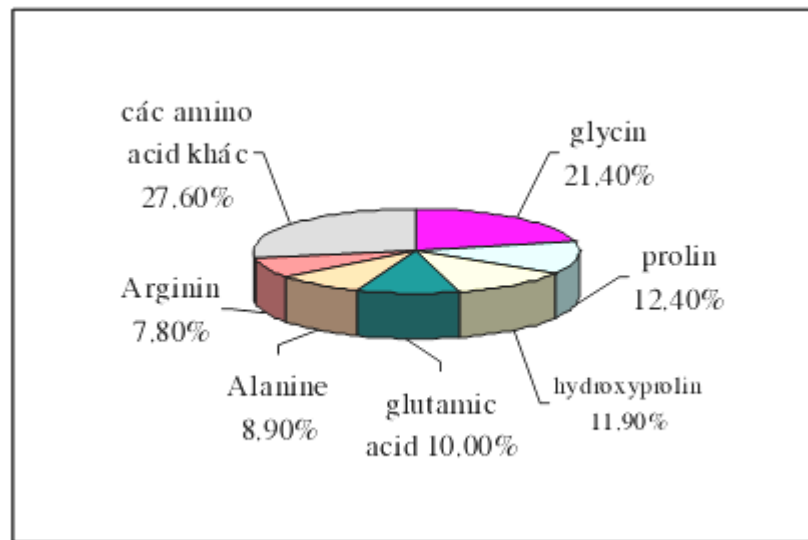
gói. Vỏ gói được hóa rắn bằng cách thêm dung môi phân cực vào hỗn hợp, hoặc tách loại vì gói trước sau đó rửa bằng dung môi phân cực [5].

Ngoài ra, còn có một số phương pháp vi gói khác như: phương pháp ly tâm, phương pháp phun sấy, phương pháp bao [5].

1.3.3. Vật liệu vi gói, đặc điểm của vật liệu vi gói.

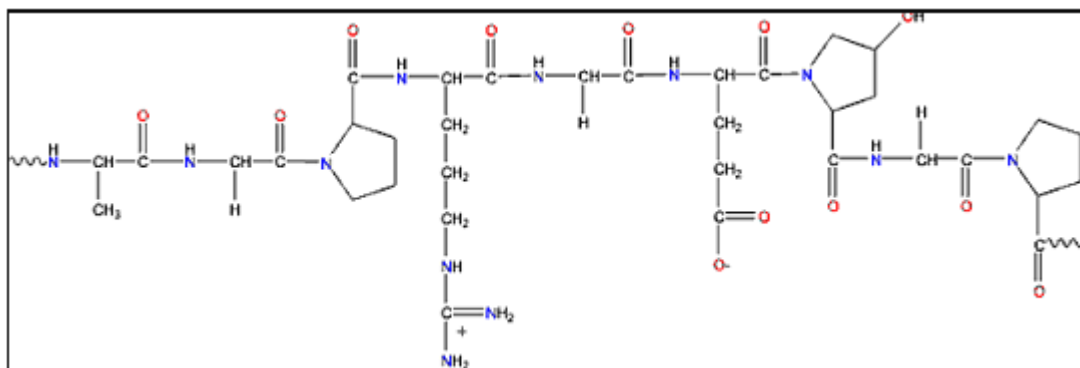
1.3.3.1. Gelatin.

a. Cấu tạo, nguồn gốc của gelatin.



Hình 1.10 – Thành phần các acid amin có trong gelatin [12, 30, 37].

Gelatin được thu nhận từ sự thủy phân giới hạn sợi collagen có nguồn gốc từ da, gân, xương của động vật như da cá, da và xương heo,... Collagen được biến tính ở nhiệt độ cao làm tháo cấu trúc xoắn ba tạo thành các chuỗi tách rời, được làm lạnh và hấp thu nước mạnh để tạo thành gelatin. Gelatin có chứa 18 loại acid amin (không có tryptophan và cystine), có hàm lượng glycine, proline và hydroxyproline cao.



Hình 1.11 – Cấu trúc hóa học của gelatin [12, 30, 37].

Có hai loại gelatin: gelatin loại A và gelatin loại B. Gelatin loại A được điều chế bằng cách thủy phân trong môi trường acid, có điểm đẳng điện trong khoảng 4,8-5,0. Quy trình thủy phân bằng acid mất khoảng 7-10 ngày, nguyên liệu sử dụng chủ yếu là da động vật. Gelatin loại B thu được bằng cách thủy phân xương động vật trong môi trường kiềm, có điểm đẳng điện trong khoảng 7-9. Quy trình thủy phân bằng kiềm lâu hơn quy trình thủy phân bằng acid khoảng 10 lần do có nhiều công đoạn hơn. Trên thực tế, hai loại gelatin này hoàn toàn có thể sử dụng riêng, nhưng thường được phối hợp với nhau để cho hiệu quả cao hơn. Khi phối hợp với nhau, gelatin thủy phân từ xương có chức năng tạo độ cứng, gelatin thủy phân từ da có chức năng tạo độ trong và độ dẻo dai cho vật liệu [12, 13, 30, 37].

b. Tính chất của gelatin.

Gelatin không tan trong nước lạnh nhưng dễ tan trong nước ấm. Khi thêm nước lạnh những hạt gelatin sẽ trương phồng tăng đến 5-10 lần trọng lượng. Khi tăng nhiệt độ lên trên 40⁰C những hạt gelatin này sẽ hòa tan để tạo thành dung dịch. Các yếu tố ảnh hưởng đến độ hòa tan của gelatin là nhiệt độ, nồng độ và kích thước hạt. Gelatin là nguyên liệu không độc, được sử dụng rộng rãi trong các ngành thực phẩm và trong y học của tất cả các nước. Gelatin có khả năng tạo màng phim bền chắc, ngay cả trong trường hợp màng phim rất mỏng đến khoảng 100 μ m. Dung dịch có nồng độ gelatin cao đến 40% vẫn có tính linh động ở nhiệt độ 50⁰C.

Độ bền gel của gelatin được biểu thị bằng độ Bloom, là một đại lượng dùng đo lường độ kết dính của các liên kết chéo có trong gelatin. Độ Bloom của gelatin thường phải đạt khoảng 100-200 Bloom gram.

Độ nhớt của gelatin được xác định trên dung dịch gelatin 6,67%, độ nhớt lý tưởng của gelatin phải đạt trong khoảng 25-45 milipoise ở 60⁰C. Tuy nhiên, nhiều nhà sản xuất quy định sử dụng gelatin có độ nhớt trong khoảng 38 ± 2 milipoise.

Gelatin thường chứa sắt với hàm lượng thay đổi tùy thuộc vào nguồn nước sử dụng trong quá trình sản xuất gelatin. Giới hạn sắt trong gelatin là không quá 15ppm.

Gelatin được biết đến như là một trong những môi trường nuôi cấy và giữ giống vi sinh vật nên nó là môi trường thuận lợi cho vi sinh vật phát triển nếu có hàm lượng ẩm cao. Theo quy định thì một gram gelatin phải không được chứa nhiều hơn 1000 vi sinh vật và tuyệt đối không được có *Samonella* hay *E. coli* [5].

c. Ưu và nhược điểm của chất gói là gelatin.

Ưu điểm: Rẻ tiền, thao tác đơn giản, dễ dàng, dễ dàng tạo gel bao quanh tế bào, không độc với vi khuẩn và cơ thể người, dễ dàng bị thủy giải trong môi trường dạ dày-ruột để phóng thích tế bào, vi gói gelatin có thể lơ lửng trong bể lên men giúp giảm chi phí khuấy trộn để phân phối đều tế bào ra khắp bể lên men,...

Nhược điểm: Gelatin dễ dàng đông đặc lại khi nhiệt độ xuống dưới 40⁰C nên phải luôn duy trì nhiệt độ này để gelatin ở dạng dung dịch, tuy nhiên nhiệt độ cao khi bổ sung tế bào để vi gói sẽ làm chết tế bào. Mất nhiều thời gian sau vi gói (gelatin sau khi vi gói phải để lạnh 6-8 giờ để gelatin đông lại hoàn toàn). Gelatin dễ tan chảy ở nhiệt độ 40⁰C cũng gây ảnh hưởng cho quá trình sấy khô vi gói,...[5].

d. Ứng dụng của gelatin.

Ứng dụng để làm màng bao trong các phương pháp cố định tế bào vi sinh vật. Hòa tan gelatin vào trong nước ở nhiệt độ thích hợp sau đó bổ sung tế bào sống vào trong môi trường lạnh để gelatin tạo thành hạt gel.

Gelatin được sử dụng trong y học như làm vỏ nang, tá dược, nguyên vật liệu trong sản xuất thuốc. Đặc biệt ứng dụng làm màng phủ vết thương nhờ có một số ưu điểm như: không có tính kháng nguyên, hoạt hóa đại thực bào, hiệu quả cầm máu cao, có thể được hấp thu hoàn toàn *in-vivo*.

Gelatin được dùng trong công tác giữ giống vi sinh vật. Pha chế môi trường nước thịt + gelatin + Inosit hoặc acid ascorbic. Sau đó cắt thành từng miếng nhỏ, sấy khô và bảo quản lạnh ở 5⁰C để sử dụng dần khi cần thiết.

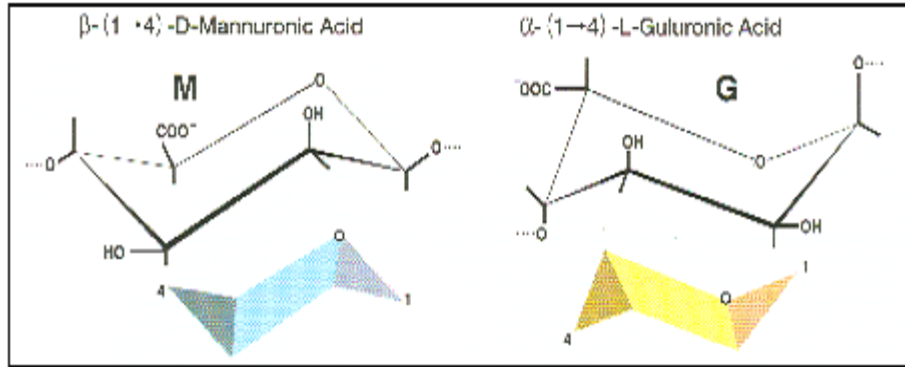
Ngoài ra, gelatin còn được dùng làm phim ảnh, chất kết dính trong sản xuất diêm, màng lọc ánh sáng, màng bao các sản phẩm thủy sản,...[5].

1.3.3.2. Alginate.

a. Cấu tạo, nguồn gốc của alginate.

Alginate là một polysaccharide mạch thẳng, không phân nhánh, phân tử lượng trung bình khoảng 200.000 Dalton, được chiết xuất từ tảo nâu. Thành phần chính của alginate là acid alginic cấu tạo bởi các đơn vị acid guluronic và acid mannuronic liên kết với nhau bởi dây nối α -(1→4)-L-guluronic (G) và β -(1→4)-D-mannuronic (M).

Alginate được sản xuất từ tảo nâu Phaeophyta, trong tảo các acid chủ yếu ở dạng muối hỗn hợp (Na, K, Mg, Ca) [12, 14, 38].



Hình 1.12 – Thành phần cấu trúc của alginate [12, 14, 38].

b. Tính chất của alginate.

Alginate có tính ưa nước, tương hợp sinh học cao và rẻ tiền. Alginate được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Alginate có hai tính chất quan trọng là độ nhớt dung dịch và khả năng tạo gel.

Độ nhớt của dung dịch alginate phụ thuộc vào nhiều yếu tố như:

- Xuất xứ của loại tảo sử dụng để chiết xuất, thông thường tảo ở vùng ôn đới có độ nhớt cao hơn tảo ở vùng nhiệt đới, trọng lượng phân tử của alginate càng cao thì độ nhớt dung dịch càng tăng.

- Nhiệt độ tăng 1⁰C thì độ nhớt tăng lên 25%, khi tăng nhiệt độ rồi lại hạ nhiệt độ thì độ nhớt của dung dịch alginate thấp hơn ban đầu.

- Quá trình bảo quản cũng ảnh hưởng đến độ nhớt của dung dịch alginate, khi ở dạng bột alginate vẫn tiếp tục bị thủy phân và sau một thời gian thì độ nhớt của nó giảm xuống đáng kể.

- Giá trị pH của dung dịch: ở pH 5,5, nhóm COO⁻ bị proton hóa thành –COOH làm cho lực đẩy tĩnh điện giữa các chuỗi giảm xuống, chúng trở nên gần nhau hơn và dễ dàng tạo liên kết hydro làm tăng độ nhớt. Ở các giá trị pH thấp hơn (pH 3-4) thì chúng sẽ hình thành gel. Nếu trong dung dịch alginate có mặt ion Ca²⁺ thì sẽ đông đặc ở pH khoảng 5. Khi pH >11, alginate bị khử polymer hóa làm giảm độ nhớt do các liên kết glucoside sẽ bị thủy phân trong môi trường kiềm.

Khả năng tạo gel của dung dịch alginate. Khi cho kết hợp với cation hóa trị II và III, thường là ion Ca²⁺ sẽ thấy xuất hiện các vùng nối giữa các mạch phân tử alginate và tạo gel theo mô hình “hộp trứng”. Các gel này được hình thành ở nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ <100⁰C và tan chảy khi đun nóng. Dung dịch alginate cũng tạo

gel khi bị acid hóa, nhưng loại gel này mềm hơn so với calcium gel. Theo mô hình “hộp trứng” của Grant (1973) thì trong quá trình hình thành gel cần có những cơ chế liên kết giữa hai hay nhiều chuỗi alginate. Chuỗi phân tử alginate cấu tạo từ các đơn vị glucuronic acid có hình dạng tương tự như một hộp đựng trứng với các nếp và khe hở mà ion Ca^{2+} có thể chui vào, định vị và liên kết, trong khi các ion Ca^{2+} giữ các phân tử alginate lại với nhau thành các chuỗi alginate. Cấu trúc giữa các mạch glucuronic acid tạo khoảng cách giữa các nhóm carboxyl và hydroxyl thích hợp với một lượng lớn các liên kết của calcium [19, 26, 39].

c. Ưu, nhược điểm của chất gói là alginate.

Ưu điểm: dễ dàng tạo gel bao quanh tế bào vi khuẩn, không độc với cơ thể, rẻ tiền, thực hiện dễ dàng, đơn giản, hình dạng hạt vi gói đẹp và tương đối đồng đều, quy trình vi gói có thể thực hiện ở nhiệt độ bình thường nên không làm tổn thương tế bào khi vi gói,...

Nhược điểm: mẫn cảm với môi trường acid, có thể tạo vết nứt rạn làm mất tính ổn định cơ học trong môi trường acid, hạt vi gói thường chìm xuống đáy thùng chứa làm giảm giá trị cảm quan của sản phẩm và tốn kém trong quá trình lên men (phải khuấy để phân phối đều tế bào vi gói trong bể lên men),... [19, 26, 39].

d. Ứng dụng của alginate.

Ứng dụng trong vi gói tế bào vi sinh vật sống. Muối natri của alginate (sodium alginate) tan trong nước, ta trộn thêm các tế bào vi sinh vật sống, sau đó nhỏ giọt vào dung dịch calcium chloride sẽ tạo thành hạt gel calcium alginate bao bọc tế bào sống bên trong.

Ứng dụng trong y sinh như làm phủ màng vết thương, giàn nuôi cấy tế bào, phẫu thuật,... Alginate được dùng trong hệ thống phân phối thuốc. Khi sử dụng, alginate sẽ bị phân cắt thành các gốc đường đơn giản hơn và có thể hấp thu hoàn toàn [19, 26, 39].

1.3.3.3. Các hợp chất vi gói khác.

a. κ -carrageenan và hỗn hợp của nó.

κ -carrageenan là hỗn hợp các polysaccharide trung tính tương tự agar-agar được chiết tách từ các loài tảo algae lớn ở biển, hòa tan trong nước hoặc trong dung dịch muối, có khoảng 4÷5% carrageenan, là polysaccharide có chứa galactose và

galactose sulfate. Ở nhiệt độ cao (60-90⁰C) mới phân hủy κ -carrageenan có nồng độ từ 2-5% (Klein và Vorlop, 1985). Gel hóa κ -carrageenan thực hiện việc thay đổi nhiệt độ. κ -carrageenan được ứng dụng trong cố định enzyme, cố định tế bào. Theo Chibata và các cộng sự, κ -carrageenan là nguyên liệu tốt để cố định tế bào vi sinh vật dùng trong công nghiệp sản xuất nhiều chất khác nhau. Nguyên tắc: bổ sung từ từ dung dịch tạo gel (potassium chloride, hoặc các cation khác như ammonium, calcium, alumium) vào trong dung dịch muối κ -carrageenan có chứa sẵn tế bào (hoặc enzyme) sẽ thu được chế phẩm bao gói tế bào. Hỗn hợp κ -carrageenan-locust bean tạo hiệu quả tốt cho sản phẩm lên men lactic (sữa chua) vì tính miễn cảm với acid hữu cơ thấp hơn. Hỗn hợp này được sử dụng rộng rãi cho vi gói probiotics trong những sản phẩm lên men. Tuy vậy, việc tạo gel của hỗn hợp κ -carrageenan-locust bean lại phụ thuộc ion Ca^{2+} , là ion ảnh hưởng xấu đến sức sống của *Bifidobacterium spp.* và cơ thể người. Đặc tính xuất hiện do tác động không mong muốn lên trạng thái cân bằng điện tích của chất lỏng trong cơ thể. Tỷ lệ hợp lý là 2:1 cho carrageenan-locust bean gum để tạo gel chắc chắn cho vi gói nhờ tương tác đặc biệt của các chuỗi galactomannan của locust với carrageenan [17, 18].

b. Chitosan.

Chitosan là một dẫn xuất của chitin, là một polysaccharide mạch thẳng tích điện âm bởi các nhóm amine có được nhờ sự khử acetyl của chitin, chiết tách từ vỏ các loài giáp xác, được cấu tạo từ các đơn vị D-glucosamine và 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosamine. Chitin là đơn vị cấu thành cấu trúc vỏ của động vật giáp xác như tôm nên nguồn tách chiết để sản xuất chitosan chủ yếu là từ vỏ, xác động vật giáp xác, phế phẩm của ngành chế biến sản xuất thủy sản. Chitosan có độ deacetyl cao (khoảng 90%) và trọng lượng phân tử gần 1.000.000 Dalton.

Màng chitosan tạo thành có tính kháng khuẩn, kháng nấm và hạn chế sự thất thoát. Chitosan hòa tan trong nước ở pH<6 và giống như alginate, tạo cấu trúc gel bằng cách gel hóa kích thích ion. Chitosan là polycation chứa các nhóm amine, nên liên kết với các anion và polyanion như polyphosphate, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ acid polyaldehydic. Ngoài ra chitosan còn được sử dụng làm vỏ bọc chất gói gelatin. Bởi vì không làm tăng khả năng sống của tế bào probiotic nên chitosan thường được sử dụng làm vỏ bọc [17].

c. Tinh bột.

Tinh bột được sử dụng làm vỏ bọc chất gói alginate. Loại tinh bột bắp có hàm lượng amylase cao (HACS) được áp dụng để tăng khả năng hình thành vỏ bọc. Tinh bột có một số tính chất như: tinh bột liên kết chặt chẽ với nước nên khi hấp thu nước sẽ trương phồng lên khoảng 10-50% tùy loại (cá biệt tinh bột khoai tây có thể tăng đến 200%), tinh bột càng khô thì hút nước và trương nở càng mạnh, độ tan không phụ thuộc vào pH, không cần sử dụng thêm chất để bảo quản.

Loại tinh bột bắp đã được làm khô lạnh (LCS) được sử dụng để làm vật liệu bọc chất gói, tuy nhiên nó bị phân hủy khi gặp enzyme ở tuyến tụy. Loại tinh bột có sức chịu (RS) không bị phân hủy bởi amylase tuyến tụy khi vào hệ tiêu hóa, tồn tại dưới dạng khó tiêu hóa. Sự phóng thích tế bào ở hệ tiêu hóa cũng tạo cho chúng chức năng prebiotic vì chúng có thể được sử dụng bởi vi khuẩn probiotic có trong ruột. Trộn HACS với RS theo tỉ lệ 4:1 phù hợp để phân phối vào hệ tiêu hóa. Những mẫu giàu RS thích hợp cho vi gói [5, 23, 25, 27].

d. Hỗn hợp xanthan-gelan.

Hỗn hợp xanthan-gelan gum được sử dụng để vi gói vi khuẩn probiotic. Tỉ lệ tối ưu là 1:0,75 cho xanthan:gellan (Sun và Griffiths, 2000). Ngược với alginate, hỗn hợp này có sức chống chịu trong điều kiện acid. Cũng có thể sử dụng thêm carrageenan chứa ion K^+ để ổn định cấu trúc (nhưng ion này lại có hại cho sức khỏe nếu nồng độ cao), gum có thể được ổn định nhờ ion Ca^{2+} . Mặc dù gelatin gum có cấu trúc hạt gel để vi gói nhưng nó không được sử dụng cho mục đích này vì nhiệt độ tạo gel cần phải cao (80-90⁰C trong 1 giờ) sẽ làm tổn thương tế bào [17].

e. Cellulose và các dẫn xuất của cellulose.

Cellulose acetate phthalate (CAP) là hợp chất này mang điện tích âm của phthalate. CAP hòa tan ở pH=6, không hòa tan ở pH=5. Do tính an toàn đối với sự tiêu hóa của người, CAP được sử dụng rộng rãi để vi gói dược phẩm. Cũng vậy, *Bifidobacterium pseudolangum* đông khô được vi gói bởi hợp chất này và bọc bằng sáp ong, có khả năng sống sót cao hơn khi vào hệ tiêu hóa [17, 28].

Cellulose vi tinh thể (Avicel) là cellulose thủy phân, sấy phun, dạng hạt, kích cỡ từ 20 μ m-180 μ m, có tính trơn khá tốt. Nó còn phối hợp với silic dioxide tạo hỗn hợp cellulose-silic dioxide vi tinh thể (CsiMC). Một số dẫn xuất của cellulose như

Natri carboxy methyl cellulose (NaCMC), Calci CMC, Methyl cellulose và Hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC). Trong đó HPMC thường sử dụng để làm vật liệu gói hơn cả. So với gelatin, vỏ nang HPMC có độ bền cao hơn và ít tương tác với nhân bên trong hơn. Một số tính chất của HPMC như: bền về mặt hóa học, bền với nhiệt, hàm lượng ẩm thấp, ít giòn khi bị sấy mất độ ẩm, vỏ vi gói tan nhanh, hàm lượng ẩm trong vi gói thấp (4-6%) so với gelatin (13-15%), tuy nhiên hiện nay vật liệu vi gói bằng dẫn xuất cellulose chưa được sử dụng nhiều do giá thành cao [5].

f. Các polymer tổng hợp.

Polyvinyl pyrrolidone (PVP) là polymer tổng hợp, có độ dính cao, tan trong nước, PVP dễ tan, có khả năng phóng thích nhanh chất mà nó vi gói. Các dẫn xuất PVP như crospovidone (cross-linked polyvinyl pyrrolidone) cũng được sử dụng trong thực hiện vi gói tế bào với tỷ lệ thường dùng là 1-5% trong công thức.

Polyethylene glycol (PEG), còn gọi tên khác là carbowax, polyglycol, macrogol,...PEG có thể ở cả ba dạng rắn, lỏng hoặc mềm. PEG là sản phẩm thu được khi trùng hợp các phân tử oxyethylen với sự có mặt của nước. PEG thể rắn không màu, không vị, có mùi nhẹ riêng, tan được trong nước, cồn, benzene và glycol, không tan với các ete, dầu hỏa và các hydrocarbon. Các dẫn xuất của PEG như polyethylene glycol dimetacrylate cũng có thể được sử dụng trong vi gói.

- Ưu điểm của PEG: Không gây ảnh hưởng đến sinh lý (không gây nhuận tràng). Các PEG rất bền vững nên có thể bảo quản dễ dàng, PEG không phải là môi trường thuận lợi cho nấm mốc phát triển nên có tính bảo vệ tốt hơn. Độ bền cơ học lớn nên rất thích hợp với khí hậu nhiệt đới như nước ta, có thể phối hợp thêm nhiều chất khác nhau để nâng cao hiệu quả khi sử dụng và thích hợp với nhiều phương pháp điều chế khác nhau.

- Nhược điểm của PEG: Có tính háo ẩm hút nước mạnh nên dễ gây kích ứng trực tràng hoặc kích thích nhu động ruột làm cho khả năng hấp thu không cao. Phóng thích chậm vì hòa tan chậm trong niêm dịch. Dễ bị giòn nếu trong quá trình bảo quản không đúng cách hoặc được làm lạnh quá nhanh. PEG còn chứa nhiều tạp chất như các vết kim loại, các peroxyd nên phải kiểm tra trước khi sử dụng.

Ngoài ra còn có rất nhiều các chất tổng hợp được sử dụng trong phương pháp vi gói như: polyamide, polystyrene, polyacrylate, polyacrylamide, polyester,...[5].

g. Các hợp chất khác.

Các hợp phần như whey protein được sử dụng làm chất gói, dầu đậu nành làm chất gói và được bọc bởi Arabic và gelatin gum, sáp ong để bọc các chất gói khác và CaCl_2 để tạo vỏ cho chất gói alginate được sử dụng để vi gói probiotic. Ngoài trừ vật liệu chính mà nó hình thành trực tiếp chất gói hoặc cấu trúc vỏ, thêm vào SDS, tween 80 (chất chuyển thể sữa) và chất chống đông (ví dụ glycerol) thường được thêm vào dung dịch để tiến hành vi gói [17, 39].

Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1. Trang thiết bị, hóa chất, vật liệu.

2.1.1. Trang thiết bị.

Tủ cấy, tủ ủ, tủ sấy, autolave, máy đo quang, máy ly tâm, đĩa Petri, ống nghiệm, erlen (250ml và 100ml), pipette (10ml, 5ml, 1ml), becher (1000ml, 500ml, 100ml), lame, que cấy, que trang, đèn cồn, ống tiêm (các kích cỡ khác nhau), cân,...

2.1.2. Hóa chất.

Cồn, đường glucose (500g), peptone (200g), agar (5-10 bịch), gelatin (500g), môi trường MRS (Án Độ sản xuất), sodium alginate, cao nấm men, giá, dung dịch NaOH (0,1N), thuốc thử phenolphthalein 1%, muối CaCl_2 , NaCl, thuốc nhuộm tím violet, iodine, fusine...

2.1.3. Vật liệu.

Giống vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* có nguồn gốc từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của Phòng thí nghiệm vi sinh vật, Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách Khoa Tp. HCM cung cấp.

2.2. Nội dung thí nghiệm.

2.2.1. Sơ đồ nội dung thí nghiệm.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm.

2.2.2.1. Hoạt hóa, tăng sinh và giữ giống vi khuẩn *L. acidophilus*.

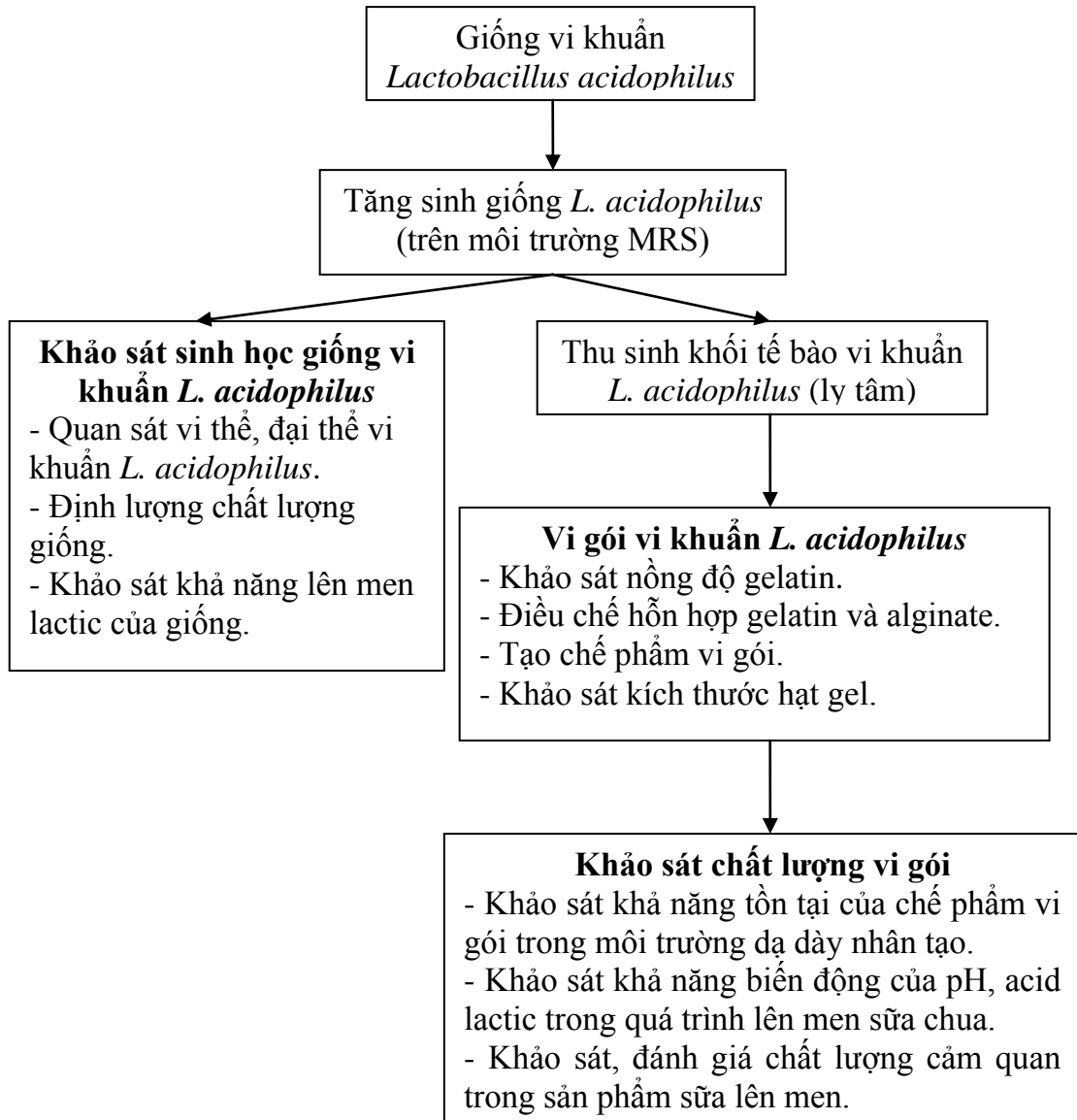
Pha chế môi trường MRS lỏng và môi trường MRS-agar.

Cấy giống vi khuẩn *L. acidophilus* vào các ống nghiệm chứa sẵn 10ml môi trường MRS lỏng để hoạt hóa giống. Đem ủ ở 37-42⁰C trong 1-2 ngày.

Hút 1ml giống từ các ống nghiệm giống đã hoạt hóa vào các ống nghiệm chứa sẵn 10ml môi trường MRS lỏng để tăng sinh, thu sinh khối tế bào. Đem ủ ở 37-42⁰C trong 1-2 ngày.

Hút 1ml giống vi khuẩn *L. acidophilus* từ ống nghiệm đã hoạt hóa cho vào ống nghiệm chứa sẵn 9ml nước muối sinh lý đã hấp khử trùng để tiến hành pha loãng mẫu ra các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-7} . Hút 0,1ml dung dịch ở các độ pha loãng phối vào đĩa petri chứa sẵn môi trường MRS-agar đã hấp khử trùng, tiến hành trải đĩa, đem ủ ở 37-42⁰C từ 1-2 ngày chờ khuẩn lạc mọc lên. Sau đó chọn những khuẩn lạc đặc trưng cấy ria trên môi trường MRS-agar trong ống thạch nghiệm, ủ ở 37-42⁰C từ 1-2 ngày, sau đó bảo quản ở nhiệt độ 4-5⁰C để làm nguyên liệu giữ giống. Ngoài ra

ta có thể sử dụng giống đã hoạt hóa trong ống nghiệm lỏng, dùng que cấy vòng lấy giọt canh trường tế bào để cấy ria trên môi trường MRS-agar trong ống thạch nghiêng, đem ủ ở 37-42⁰C trong 1-2 ngày, sau đó đem bảo quản ở 4-5⁰C để làm nguyên liệu giữ giống.



Hình 2.1 – Sơ đồ nội dung thí nghiệm

2.2.2.2. Khảo sát sinh học giống vi khuẩn *L. acidophilus*.

a. Quan sát vi thể, đại thể vi khuẩn *L. acidophilus*.

Quan sát vi thể vi khuẩn bằng phương pháp cấy trải. Hút 1ml giống vi khuẩn *L. acidophilus* từ ống nghiệm đã hoạt hóa cho vào ống nghiệm chứa sẵn 9ml nước muối sinh lý đã hấp khử trùng để tiến hành pha loãng mẫu ra các nồng độ từ 10⁻¹ đến 10⁻⁷. Hút 0,1ml dung dịch ở các độ pha loãng phối vào đĩa petri chứa sẵn môi trường

MRS-agar đã hấp khử trùng, tiến hành trải đĩa, đem ủ ở 37-42⁰C từ 1-2 ngày chờ khuẩn lạc mọc lên. Chúng tôi quan sát và mô tả vi thể (khuẩn lạc) của vi khuẩn *L. acidophilus*.

Quan sát đại thể vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram. Thực hiện tiêu bản giọt ép từ canh trường trong các môi trường MRS lỏng có giống vi khuẩn đã tăng sinh. Sau khi có tiêu bản giọt ép, chúng tôi thực hiện nhuộm Gram để quan sát đại thể vi khuẩn *L. acidophilus*.

b. Định lượng chất lượng giống bằng phương pháp cấy trải.

Hút 1ml dịch lên men và tiến hành pha loãng mẫu ra các nồng độ 10⁻¹ đến 10⁻⁷. Hút 0,1ml từ các độ pha loãng trên tiến hành cấy trải trên đĩa petri, đem ủ ở 37-42⁰C chờ khuẩn lạc mọc lên. Ghi nhận kết quả bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa Petri ở các nồng độ khác nhau. Áp dụng công thức để tính toán:

$$\text{Số tế bào / ml mẫu} = (n / v).D$$

Trong đó: n - Số khuẩn lạc trung bình đếm được trên tất cả các đĩa Petri ở cùng một độ pha loãng.

v - Thể tích dịch mẫu đem cấy (0,1ml).

D - hệ số pha loãng.

c. Khảo sát khả năng lên men lactic của giống.

Chuẩn bị môi trường MRS lỏng phối vào dụng cụ chứa, hấp khử trùng, cấy giống, đem ủ ở 37-42⁰C. Thu mẫu đối chứng và mẫu lên men để đo pH và hàm lượng acid lactic ban đầu (0 giờ). Sau đó cứ sau 24h, 48h, 72h, 96h chúng tôi thu mẫu đối chứng và mẫu lên men để đo pH và đo hàm lượng acid lactic sinh ra.

Định lượng acid lactic của 2 mẫu (mỗi mẫu 10ml) bằng dd NaOH 0,1N với chất chỉ thị màu phenolphtalein 1% (cho 2-3 giọt) và thêm 20ml nước cất trung tính. Ghi nhận kết quả thể tích của dd NaOH 0,1 N ở 2 mẫu.

$$\text{Áp dụng công thức: } \sum a \text{ (g/l)} = (V - V_0) \times 0,1 \times (90/10) = (V - V_0) \times 0,9$$

Trong đó V: ml dd NaOH trung hòa 10ml mẫu dịch lên men.

V₀: ml dd NaOH trung hòa 10ml mẫu đối chứng.

2.2.2.3. Thu sinh khối tế bào.

Chuẩn bị các ống falcon vô trùng, cân falcon. Hút giống vào falcon ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút, đổ bỏ dịch môi trường, sau đó rửa bằng nước muối

sinh lý và tiếp tục ly tâm, tiến hành rửa 2-3 lần nữa. Sau đó úp ngược ống ly tâm trên giấy lọc cho ráo. Dem cân falcon chứa sinh khối tế bào, suy ra khối lượng sinh khối thu được ở mỗi falcon. Thu phần sinh khối tế bào bám lại ở đáy ống ly tâm để sử dụng cho thí nghiệm vi gói tiếp theo.

2.2.2.4. Vi gói vi khuẩn *L. acidophilus*.

a. Khảo sát nồng độ gelatin.

Pha chế dung dịch gelatin ở nhiều nồng độ khác nhau để thử nghiệm khả năng vi gói của gelatin ở các nồng độ khác nhau như thế nào? Ở nồng độ nào là có thể vi gói được? Chúng tôi pha chế dung dịch gelatin ở các nồng độ sau:

5% - 7,5% - 10% - 12,5% - 15%

b. Điều chế hỗn hợp gelatin và alginate.

Do dung dịch gelatin là chất tạo gel dễ tan ở nhiệt độ thường (khoảng 35⁰C trở lên) nên phải tìm cách khắc phục nhược điểm này của vật liệu gelatin. Có 3 cách khắc phục:

Cách thứ nhất là tăng nồng độ gelatin lên. Cách này không hiệu quả (ngay cả khi tăng nồng độ gelatin lên đến 30%) mà còn gây khó khăn trong quá trình tạo vi gói do nồng độ gelatin tăng lên thì độ nhớt của dung dịch gelatin cũng tăng theo thường làm tắc đầu tiêm khi nhỏ giọt.

Cách thứ hai là phối hợp gelatin với agar 2%. Cách này cũng không hiệu quả vì vi gói vẫn tan khi ở nhiệt phòng, thêm nữa agar khó tan nên phải mất thời gian điều chế nhưng khi nhiệt độ giảm xuống thì agar lại rất mau đông nên thường làm tắc nghẽn ở đầu ống tiêm gây khó khăn trong quá trình tạo vi gói.

Cách thứ ba là phối hợp gelatin với alginate 2%. Cách này tỏ ra rất hiệu quả, gelatin đóng vai trò làm chất gói chính còn alginate đóng vai trò làm chất chịu nhiệt giúp cho vi gói chịu được nhiệt độ cao trên 40⁰C. Hỗn hợp gelatin – alginate tỏ ra rất hiệu quả, chúng có độ nhớt vừa phải nên dễ dàng thao tác mà không gây tắc nghẽn đầu tiêm như các cách khác.

Dựa vào kết quả thử nghiệm nồng độ gelatin ở trên, chúng tôi điều chế dung dịch alginate 2%, sau đó trộn hai dung dịch gelatin và alginate lại với nhau để tạo thành hỗn hợp chất gói.

c. Tạo chế phẩm vi gói.

Điều chế hỗn hợp gelatin – alginate.

Điều chế dung dịch CaCl_2 0,1M, để lạnh.

Điều chế dung dịch lactose 10%, để lạnh.

Sinh khối tế bào thu ở trên được bổ sung hỗn hợp gelatin – alginate theo tỉ lệ 1:4, sau đó vortex để sinh khối hòa lẫn hoàn toàn trong hỗn hợp. Chuyển tất cả vào ống tiêm nhỏ giọt vào trong dung dịch CaCl_2 0,1M (lạnh) sẽ thu được chế phẩm vi gói. Chế phẩm vi gói được lọc bằng giấy lọc vô trùng và bảo quản trong dung dịch lactose 10% ở 4 °C.

d. Khảo sát kích thước hạt vi gói.

Trong quá trình tạo vi gói, chúng tôi sử dụng các đầu kim tiêm có kích cỡ khác nhau để tạo ra các hạt vi gói có kích thước khác nhau. Sau khi có các chế phẩm vi gói, chúng tôi sử dụng vi trắc kế để đo đạc kích thước các chế phẩm vi gói.

2.2.2.5. Khảo sát chất lượng hạt vi gói.

a. Khảo sát khả năng tồn tại của vi khuẩn lactic trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ.

Sau khi tạo được chế phẩm vi gói ở các kích thước khác nhau, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng tồn tại của chế phẩm vi gói trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ.

Khảo sát mật độ tế bào và các dạng chế phẩm tại thời điểm ban đầu. Tiến hành cân 1g sinh khối tế bào tự do và 1g các chế phẩm vi gói (mỗi kích thước vi gói cân 1g). Sau đó tiến hành pha loãng mẫu từ 10^{-1} đến 10^{-7} và tiến hành cấy trải trên đĩa petri để xác định mật độ tế bào ban đầu của mẫu tế bào tự do và các mẫu vi gói kích thước khác nhau.

Khảo sát trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ ở pH=2. Chuẩn bị các môi trường dạ dày nhân tạo ở pH=2 đã được hấp thanh trùng ở 90°C trong 20 phút. Sau đó tiến hành cân 1g sinh khối tế bào tự do và 1g các chế phẩm vi gói ở các kích thước khác nhau, cho lần lượt tất cả vào trong môi trường SGJ pH=2. Sau đó sau 30 phút, 60 phút và 90 phút ta lấy mẫu ra tiến hành cấy trải đĩa để xác định mật độ tế bào còn tồn tại trong môi trường dạ dày nhân tạo là bao nhiêu.

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

b. Khảo sát biến động của hạt vi gói.

Chuẩn bị môi trường sữa cho quá trình lên men, hấp thanh trùng ở 90⁰C trong 30 phút, sau đó cấy giống vi khuẩn lactic dưới hai dạng là tế bào tự do và chế phẩm vi gói để hoạt hóa giống với tỷ lệ giống là 10%. Tiếp theo, phối hỗn hợp sữa và giống vào các hũ sạch để chuyển qua giai đoạn lên men. Các hũ sữa chua được ủ ở 44-45⁰C trong khoảng 4-6 giờ. Sau 6 giờ lấy mẫu mỗi chế phẩm vi gói và tế bào tự do ra 1 hũ để đo pH và lượng acid lactic sinh ra.

c. Đánh giá chất lượng cảm quan của sản phẩm.

Dùng phương pháp cho điểm và phương pháp cặp đôi để đánh giá cảm quan các sản phẩm sữa chua thu được. Để đảm bảo tính khách quan, các mẫu sữa chua được mã hóa (kí hiệu) một cách ngẫu nhiên như sau:

Sữa chua với hình thức tiếp giống là tế bào tự do	Sữa chua với hình thức tiếp giống là chế phẩm vi gói kích thước 1,2mm
Mẫu 2	Mẫu 1
Mẫu 3	Mẫu 5
Mẫu 4	Mẫu 6
Mẫu 8	Mẫu 7
Mẫu 10	Mẫu 9
Mẫu 14	Mẫu 12
Mẫu 15	Mẫu 13
Mẫu 18	Mẫu 20

Lập phiếu chuẩn bị thí nghiệm và phiếu trả lời. Sau đó mời 8 người thử cảm quan, mỗi người nhận được 2 mẫu sữa chua có kí hiệu trên hũ.

PHIẾU CHUẨN BỊ THÍ NGHIỆM

Sản phẩm: Sữa chua.

Tính chất: Trạng thái sản phẩm.

Màu sắc.

Mùi.

Vị.

Phép thử được lặp lại 8 lần.

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

Người thử	Mã số sản phẩm	Người thử	Mã số sản phẩm
1	Mẫu 1 và 8	5	Mẫu 5 và 10
2	Mẫu 2 và 9	6	Mẫu 12 và 15
3	Mẫu 3 và 6	7	Mẫu 13 và 14
4	Mẫu 4 và 7	8	Mẫu 18 và 20

PHIẾU TRẢ LỜI ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CẢM QUAN SẢN PHẨM

Phương pháp so hàng

Họ và tên người thử:.....Giới tính:.....

Nghề nghiệp:.....Tuổi:.....

Ngày thử:.....

Bạn nhận được 2 mẫu sữa chua. Bạn hãy ngửi, quan sát trạng thái, màu sắc và nếm thử vị của cả 2 sản phẩm. Và bạn hãy đánh giá các tính chất của 2 mẫu sản phẩm bằng cách cho điểm như gợi ý ở phần ghi chú:

Tính chất cảm quan			Nhận xét
Trạng thái sản phẩm (mịn, sệt, đồng nhất)			
Màu sắc			
Mùi			
Vị			

Ghi chú: Gợi ý cách cho điểm.

1: Rất ghét	2: Khá ghét	3: Ghét	4: Hơi ghét
5: Không ghét, không thích.			
6: Hơi thích	7: Thích	8: Khá thích	9: Rất thích

PHIẾU TRẢ LỜI ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CẢM QUAN SẢN PHẨM

Phương pháp so sánh cặp

Họ và tên người thử:.....Giới tính:.....

Nghề nghiệp:.....Tuổi:.....

Ngày thử:.....

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

Bạn nhận được một cặp mẫu sản phẩm. Bạn hãy đánh giá giữa 2 mẫu đó có gì khác nhau về các tính chất sau đây:

Tính chất cảm quan	
Trạng thái sản phẩm (mịn, sệt, đồng nhất)	
Màu sắc	
Mùi	
Vị	

Ghi chú: Nếu đặc tính mẫu này tốt hơn mẫu kia (kí hiệu >).

Nếu đặc tính mẫu này kém hơn mẫu kia (kí hiệu <).

Nếu đặc tính 2 mẫu tương đương nhau (kí hiệu =).

2.3. Các phương pháp liên quan.

2.3.1. Các phương pháp vi sinh.

2.3.1.1. Phương pháp pha môi trường dinh dưỡng MRS.

Chuẩn bị nguyên liệu pha môi trường: cung cấp đầy đủ các thành phần dinh dưỡng cho quá trình trao đổi chất của tế bào vi khuẩn lactic, duy trì được thế oxy hóa-khử, áp suất thẩm thấu và tạo được ổn định pH thích hợp của môi trường.

Làm trong môi trường: nếu môi trường nuôi cấy vi sinh vật có cặn thì cần lọc qua bông gòn, giấy lọc để làm trong môi trường.

Điều chỉnh pH của môi trường: các vi sinh vật khác nhau chỉ có thể sinh trưởng và phát triển trong các khoảng pH khác nhau và chỉ phát triển tối ưu ở một giá trị pH nhất định nào đó. Vì vậy pH của môi trường nuôi cấy vi sinh vật cần phải được điều chỉnh pH về giá trị thích hợp đối với vi sinh vật cần nuôi cấy. Trong đó các chất thường dùng để điều chỉnh pH của môi trường nuôi cấy vi sinh vật là các loại dung dịch HCl, NaOH,... Sử dụng máy đo pH để cho kết quả chính xác.

Phân phối môi trường vào các dụng cụ chứa (ống nghiệm, erlen lớn), làm nút bông và đem khử trùng môi trường bằng phương pháp nhiệt ướt trong autolave ở chế độ 121⁰C, 1atm trong vòng 30 phút.

Sau khi hấp khử trùng môi trường xong nếu sử dụng môi trường ngay để làm thạch nghiêng, thạch đứng hay đổ đĩa Petri thì ta tiến hành sau đó cấy giống vi sinh

vật lên môi trường và quan sát. Đối với môi trường chưa cần sử dụng ngay, ta bảo quản ở nơi thoáng mát, tránh ánh sáng, nhiệt độ thích hợp là từ $0-5^{\circ}\text{C}$ [6].

2.3.1.2. Phương pháp nghiên cứu hình thái vi sinh vật.

a. Quan sát hình thái vi thể tế bào bằng phương pháp trải đĩa.

Trên môi trường dinh dưỡng thích hợp cho đối tượng vi sinh vật mà ta quan tâm, sau khi cấy một thể tích giống vi sinh vật nhất định, số lượng tế bào vi sinh vật có trong thể tích giống đó sẽ phát triển và mọc lên các tập đoàn vi sinh vật gọi là các khuẩn lạc. Ta quan sát hình thái, cấu trúc và đặc điểm của khuẩn lạc đặc trưng để mô tả và nhận định đó có phải là vi sinh vật mà ta quan tâm hay không.

Phương pháp này được sử dụng để tiến hành quan sát hình thái vi thể tế bào vi sinh vật: chuẩn bị các đĩa Petri có chứa sẵn môi trường dinh dưỡng và chuẩn bị các ống nghiệm chứa sẵn 9ml nước cất (hoặc nước nuôi sinh lý) đã qua vô trùng để tiến hành pha loãng mẫu. Hút 1ml giống cho vào ống nghiệm 1 (ta có độ pha loãng 10^{-1}), hút 1ml từ ống nghiệm 1 cho vào ống nghiệm 2 (ta có độ pha loãng 10^{-2}), cứ như thế ta pha loãng ra các nồng độ 10^{-3} đến 10^{-7} . Hút 0,1ml từ các độ pha loãng khác nhau phối lên các đĩa Petri và dùng que trang trải đều lên toàn bộ bề mặt đĩa. Dem ủ ở nhiệt độ thích hợp trong 1-2 ngày để khuẩn lạc mọc lên [6].

b. Quan sát hình thái đại thể tế bào bằng phương pháp nhuộm Gram.

Nhuộm Gram không chỉ giúp phân biệt được vi khuẩn Gram (-) hay Gram (+) mà còn cho phép quan sát được hình thái, sự sắp xếp của tế bào và thông tin về lớp vỏ tế bào. Khi nhuộm theo phương pháp này, tế bào vi khuẩn Gram (+) có lớp vỏ tế bào dày cấu tạo bởi peptidoglycan sẽ hấp thu màu tím, còn tế bào vi khuẩn Gram (-) do có lớp vỏ tế bào mỏng hơn (có ít peptidoglycan hơn) nên sau khi ăn màu tím, bị rửa trôi và bắt màu hồng của thuốc nhuộm sau.

Cách tiến hành: tạo vết bôi vi khuẩn, làm khô, hơ nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn để cố định vết bôi. Sau đó vết bôi được nhuộm màu tím crsrtak violet, sau đó thêm thuốc nhuộm iodine để màu thuốc nhuộm gắn chặt vào tế bào vi khuẩn. Tiếp theo rửa vết bôi bằng cồn và nhuộm lại với safranin. Kết quả, ở tế bào vi khuẩn Gram (+) màu tím của violet được gắn chặt vào lớp vỏ tế bào nhờ iodine, không bị rửa trôi bởi cồn nên mang màu tím. Trái lại, ở tế bào vi khuẩn Gram (-), màu tím violet bị rửa trôi bởi cồn và tế bào bắt màu hồng của safranin [6].

2.3.1.3. Phương pháp kiểm tra số lượng tế bào.

a. Xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng phương pháp trải đĩa.

Ta có thể sử dụng phương pháp trải đĩa, đếm khuẩn lạc mọc trên đĩa để xác định gián tiếp số lượng tế bào vi sinh vật. Ta tiến hành pha loãng mẫu từ 10^{-1} đến 10^{-7} sau đó cấy lên đĩa Petri rồi đem ủ để khuẩn lạc mọc lên, tiến hành đếm số khuẩn lạc mọc trên các đĩa (lưu ý: chỉ đếm khuẩn lạc trên các đĩa với số khuẩn lạc nằm trong khoảng giá trị từ 15 đến 300 khuẩn lạc, thông thường khoảng giá trị này là từ 25 đến 250 khuẩn lạc) [6].

Áp dụng công thức sau để tính toán số lượng tế bào:

$$\text{Số tế bào / ml mẫu} = (n / v) \cdot D$$

Trong đó: n - Số khuẩn lạc trung bình đếm được trên tất cả các đĩa Petri ở cùng một độ pha loãng.

v - Thể tích dịch mẫu đem cấy (0,1ml).

D - hệ số pha loãng.

b. Định lượng vi sinh vật bằng phương pháp đo mật độ quang.

Theo phương pháp này, số lượng photon ánh sáng bị phân tán tỉ lệ thuận với lượng sinh khối tế bào có trong mẫu đem đo (trừ những mẫu có nồng độ đậm đặc) hay trong những điều kiện sinh trưởng nhất định thì tỉ lệ với nồng độ tế bào. Tuy nhiên lượng ánh sáng lọt vào bộ tách sóng quang ở mỗi máy đo mật độ quang bị quy định bởi hình dạng hình học của máy đó. Vì vậy, đường cong chuẩn xác định mối liên hệ giữa độ hấp thụ và nồng độ tế bào phải được thiết lập riêng cho từng máy đo. Điều này được thực hiện bằng cách đo độ hấp thụ của dịch huyền phù tế bào tại những nồng độ khác nhau và xác định nồng độ tế bào của mỗi dịch huyền phù bằng cách đếm số lượng yế bào trực tiếp dưới kính hiển vi hay cấy lên tạch đĩa rồi đếm số khuẩn lạc tạo thành.

Lưu ý: độ hấp thụ là số đo lượng sinh khối chứ không phải là số lượng tế bào. Kích thước tế bào thay đổi cho từng giai đoạn sinh trưởng, vì thế xây dựng đường cong chuẩn cho máy đo mật độ quang với các tế bào ở giai đoạn tăng trưởng là tốt nhất. Kích thước tế bào cũng thay đổi tùy thuộc vào môi trường nuôi cấy khác nhau. Kích thước tế bào càng nhỏ lại nếu môi trường nghèo chất dinh dưỡng, vì vậy đường

cong chuẩn phải được xây dựng theo từng môi trường nuôi cấy và từng chủng vi sinh vật riêng biệt.

Nếu mật độ tế bào quá cao, photon ánh sáng có thể bị các tế bào làm lệch hướng khỏi tụ quang và quay trở lại bởi các tế bào khác, làm mất độ chính xác của đo hấp thụ, đặc biệt khi giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 600nm lớn hơn 0,7. Vì vậy khi xác định mật độ tế bào bằng máy đo mật độ quang, dịch huyền phù cần phải được pha loãng đến những nồng độ thích hợp để có được độ hấp thụ chính xác. Lưu ý: giá trị đo được cần phải được nhân hệ số pha loãng [6].

c. Phương pháp kiểm tra khả năng tạo sinh khối của vi sinh vật.

Nguyên tắc: tách tế bào ra khỏi môi trường và xác định chúng. Xác định sinh khối vi sinh vật nhằm đánh giá khả năng phát triển của chúng trong một môi trường nào đó mà ta nghiên cứu hoặc giúp ta đánh giá được năng suất sinh học trong quá trình lên men.

Cách xác định sinh khối:

- Đếm số lượng tế bào trong 1 ml (theo phương pháp định lượng vi sinh vật).
- Ly tâm thu sinh khối tế bào, cân trọng lượng sinh khối đó. Ống ly tâm rửa sạch, khử trùng, sấy khô, cân. Dùng pipette hút môi trường nuôi cấy vi sinh vật cho vào ống ly tâm. Sau khi ly tâm, đổ hết dịch ta có sinh khối dạng paste. Cân ống ly tâm có sinh khối. Sinh khối thu được là hiệu số giữa hai lần cân trước và sau khi ly tâm.
- Ngoài ra ta có thể xác định sinh khối bằng cách xây dựng đường chuẩn mật độ tế bào vi sinh vật trong dung dịch ứng với mật độ quang trong máy đo quang ở bước sóng 600nm. Kết quả tra theo đường chuẩn [6].

2.3.2. Các phương pháp hóa sinh – Phương pháp kiểm tra quá trình lên men lactic.

Lên men lactic là quá trình chuyển hóa đường thành acid lactic và các sản phẩm khác. Tùy thuộc vào các sản phẩm tạo thành trong quá trình lên men lactic mà ta có lên men đồng hình hay dị hình.

Trong quá trình lên men đồng hình, sản phẩm chính là acid lactic, chiếm hơn 90%. Còn các sản phẩm phụ còn lại chiếm không quá 10%.

Trong quá trình lên men dị hình, acid lactic không phải là sản phẩm chủ yếu mà còn có rất nhiều các thành phần khác cũng được tạo thành với hàm lượng đáng kể.

Có thể định tính sự có mặt của acid lactic trong dịch lên men bằng nhiều phản ứng đặc trưng khác nhau:

- Cách đơn giản nhất là đo pH của dung dịch. Nuôi cấy vi khuẩn lactic trong môi trường MRS, nếu vi khuẩn này sinh acid lactic thì sẽ làm cho pH của môi trường giảm xuống. Khoảng chênh lệch thu được về pH chính là khả năng sinh acid lactic mạnh hay yếu của chủng vi khuẩn đó.

- Trong môi trường acid có mặt của KMnO_4 , acid lactic sẽ chuyển thành acetaldehyde và làm đen giấy lọc có tấm AgNO_3 trong ammoniac.

- Acid lactic khi phản ứng với nhân phenol có trong thuốc thử uphenmen làm cho màu thuốc thử chuyển từ xanh sang vàng.

- Dựa vào khả năng phân giải CaCO_3 của vi khuẩn lactic. Nuôi cấy vi khuẩn lactic trên môi trường thạch MRS có bổ sung CaCO_3 , nếu vi khuẩn sinh acid lactic thì nó sẽ phân giải được CaCO_3 ($2\text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Dựa trên sự biến đổi màu sắc trên đĩa thạch mà ta đánh giá khả năng sinh acid lactic của vi khuẩn đó.

Ngoài ra ta có thể định lượng acid lactic bằng dung dịch NaOH 0,1N với chất chỉ thị phenolphthalein 1%. Cho vào erlen dung tích 100ml: 10ml dung dịch lên men vi khuẩn + 20ml nước cất trung tính + 2-3 giọt phenolphthalein. Chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N cho đến khi thấy xuất hiện màu hồng nhạt bền vững. Thực hiện mẫu đối chứng là dịch chưa lên men. Hàm lượng acid tổng (Σa g/l) qui về acid lactic (xem như acid lactic là acid chủ yếu tích lũy trong dịch lên men) là:

$$\Sigma a = (V - V_0) \times 0,1 \times 90/10 = (V - V_0) \times 0,9$$

Trong đó: V là số ml dung dịch NaOH dùng trung hòa 10ml dịch lên men.

V_0 là số ml dung dịch NaOH dùng trung hòa 10ml dịch đối chứng [6].

2.3.3. Các phương pháp khác.

2.3.3.1 Phương pháp đo đường hạt vi gói.

Sử dụng vi trắc kế để đo đường kính hạt vi gói tạo thành, được tiến hành ở Phòng thí nghiệm Khoa học vật liệu, Trường Đại học Bách khoa TP. HCM.

2.3.3.2 Phương pháp đồng nhất mẫu.

Sử dụng máy đồng nhất mẫu để hòa tan mẫu.

2.3.3.3 Phương pháp đánh giá chất lượng cảm quan.

a. Phương pháp phép thử so hàng.

Tiến hành phép thử trên một loạt các mẫu, người thử được mời sắp xếp các mẫu này theo cường độ hay mức độ của một tính chất cảm quan nào đó. Phép thử so hàng chỉ mang lại cho ta thông tin về thứ tự so sánh cường độ giữa các mẫu mà không chỉ ra mức độ khác nhau giữa hai sản phẩm đứng cạnh nhau.

Trước tiên phải lập phiếu chuẩn bị thí nghiệm trên đó chỉ rõ trật tự trình bày mẫu cho từng người. Cần thiết thay đổi trật tự này giữa người thử với nhau cũng như giữa các lần lặp.

Người thử nhận được mẫu đã được mã hóa, mém thử và ghi lại kết quả vào phiếu trả lời [8].

b. Phương pháp phép thử so sánh cặp.

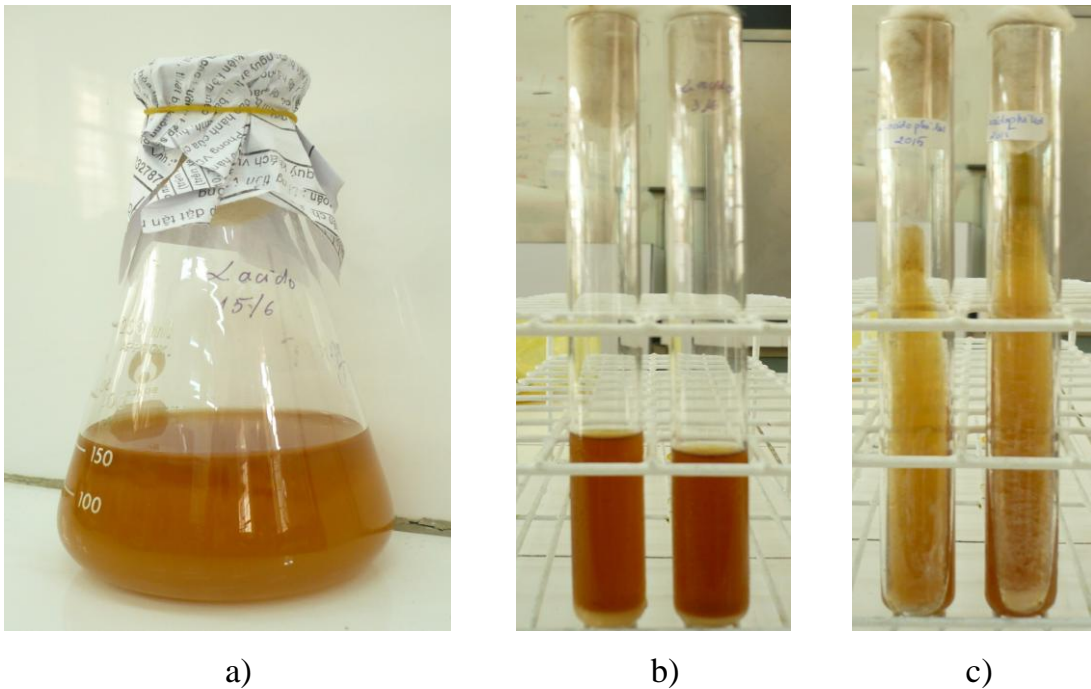
Phép thử gồm hai mẫu được chuẩn bị để so sánh với nhau. Người thử được mời trả lời có sự khác nhau hay không giữa hai mẫu được thử về một tính chất cảm quan nào đó. Phép thử này cho phép ta xác định chính xác có sự khác biệt nhau hay không về mặt cảm quan của các cặp mẫu [8].

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát đặc điểm sinh học của giống vi khuẩn *L. acidophilus*.

3.1.1. Tăng sinh và giữ giống trên môi trường MRS.

Quá trình tăng sinh và giữ giống được thực hiện trên môi trường MRS. Môi trường MRS được điều chế, hấp khử trùng ở chế độ 121 °C, trong 20 phút. Môi trường MRS lỏng được dùng để tăng sinh, hoạt hóa giống vi khuẩn lactic, còn môi trường MRS-agar được dùng để giữ giống vi khuẩn lactic trong tủ lạnh. Chất lượng giống vi khuẩn *L. acidophilus* của chúng tôi đạt được là $2,43.10^8$ tế bào/ml.



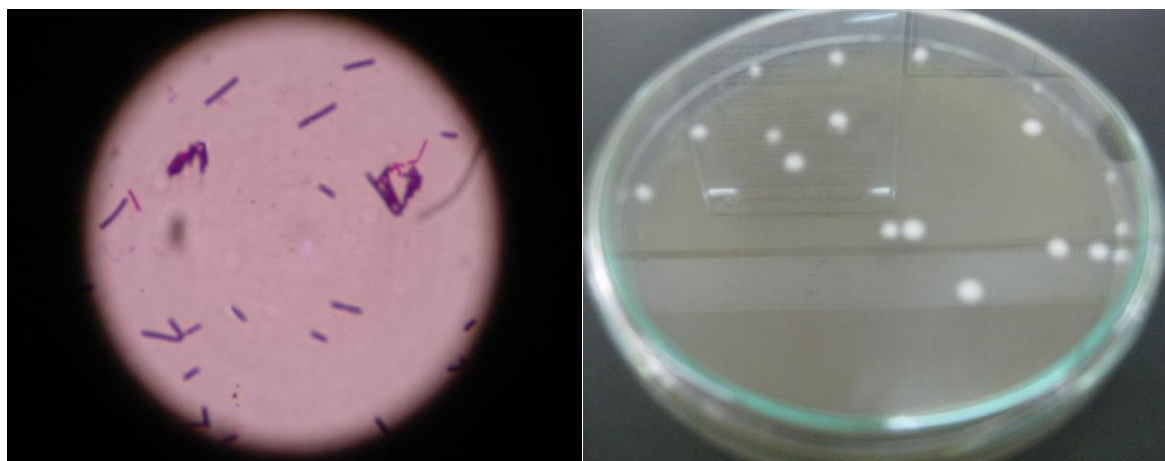
Hình 3.1 – Môi trường tăng sinh và giữ giống *L. acidophilus*

- a) Tăng sinh giống trong erlen; b) Tăng sinh giống trong ống nghiệm;
c) Giữ giống trong ống thạch nghiêng

3.1.2. Quan sát vi thể, đại thể vi khuẩn *L. acidophilus*.

Qua quá trình tăng sinh và nuôi cấy giống vi khuẩn *L. acidophilus*, chúng tôi thực hiện phương pháp nhuộm Gram để quan sát đại thể (tế bào) vi khuẩn *L. acidophilus* và thực hiện phương pháp cấy trải trên đĩa petri để quan sát vi thể (khuẩn lạc) tế bào vi khuẩn *L. acidophilus*.

Kết quả nhuộm Gram cho thấy tế bào vi khuẩn *L. acidophilus* là tế bào vi khuẩn Gram (+) nên bắt màu tím của thuốc nhuộm Crystal violet. Tế bào *L. acidophilus* có dạng hình que dài, kích thước chiều dài khoảng 5-10 μ m, thường đứng riêng lẻ một mình nhưng đôi khi cũng tập hợp lại với nhau.



a)

b)

Hình 3.2 – Hình chụp vi thể, đại thể tế bào vi khuẩn *L. acidophilus*

a) Hình chụp đại thể *L. acidophilus*; b) Hình chụp vi thể *L. acidophilus*

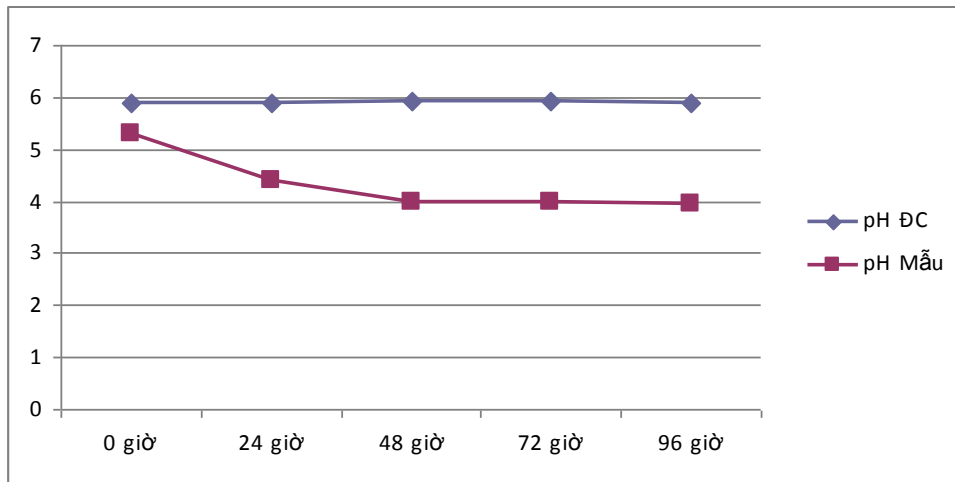
Kết quả cấy trái và ủ trên đĩa Petri ở 37-42⁰C sau 96 giờ chúng tôi nhận được là những khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục, bờ đều và có bề mặt lồi. Khuẩn lạc có kích thước đường kính khoảng từ 1-2mm (hình 3.2).

3.1.3. Khảo sát khả năng lên men lactic của *L. acidophilus*.

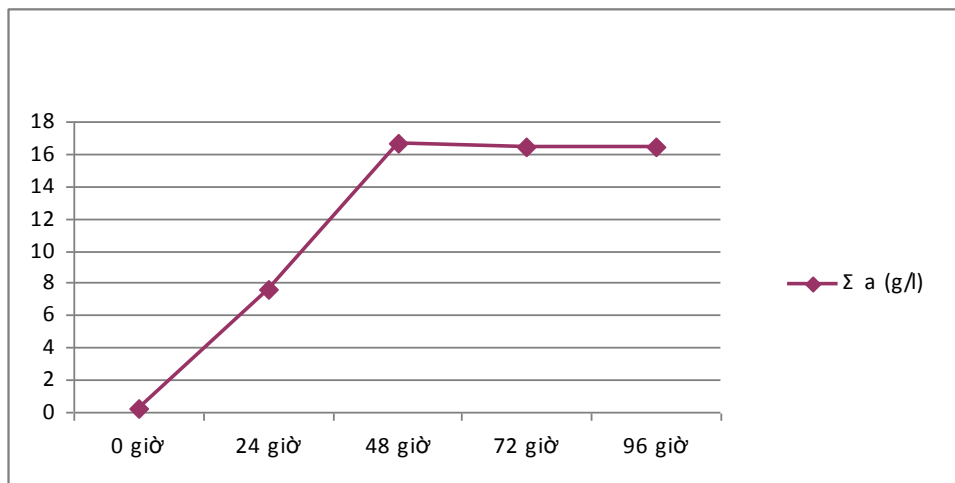
Kết quả đo pH của dịch lên men và dịch đối chứng, thể tích dung dịch NaOH chuẩn độ dịch lên men và đối chứng và lượng acid lactic ban đầu (0 giờ), 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ.

Bảng 3.1 – Bảng giá trị đo pH, V_{NaOH} và hàm lượng acid lactic (Σ a)

	pH _{ĐC}	pH _{Mẫu}	V _{NaOH} (ĐC)	V _{NaOH} (Mẫu)	Σ a (g/l)
0 giờ	5,90	5,30	6,05ml	6,25ml	0,18
24 giờ	5,90	4,41	6,63ml	15,03ml	7,56
48 giờ	5,92	3,98	6,2ml	24,66ml	16,614
72 giờ	5,93	3,98	5,6ml	23,9ml	16,47
96 giờ	5,90	3,94	5,36ml	23,66ml	16,47



Đồ thị 1 – Biểu diễn giá trị pH của mẫu đối chứng và mẫu dịch lên men



Đồ thị 2 – Biểu diễn hàm lượng acid lactic sinh ra trong thời gian nuôi cấy

Qua hai đồ thị biểu diễn ở trên chúng tôi nhận thấy vi khuẩn *L. acidophilus* trong quá trình tăng trưởng và phát triển của nó đã tạo ra một lượng acid lactic đáng kể. Chính lượng acid lactic này đã làm cho môi trường bị chua hóa, biểu thị bằng giá trị đo pH giữa mẫu đối chứng và mẫu lên men đã cho thấy rõ điều này. Mẫu đối chứng không có vi khuẩn lactic thì pH gần như không thay đổi gì trong suốt 96 giờ khảo sát, trong khi đó mẫu lên men có sự hiện diện của vi khuẩn lactic sinh ra một lượng acid lactic nên có giá trị pH thấp hơn.

3.2. Khảo sát quy trình vi gói vi khuẩn *L. acidophilus*.

3.2.1. Khảo sát nồng độ gelatin.

Kết quả khảo sát nhiều nồng độ gelatin đã cho kết quả là nồng độ gelatin từ 10% trở lên là có thể tạo được vi gói tế bào. Chúng tôi chọn nồng độ gelatin là 10% vì nếu chọn gelatin ở các nồng độ cao hơn vừa tốn hóa chất lại không làm tăng hiệu

quả vi gói, đồng thời còn gây khó khăn cho quá trình tạo vi gói do độ nhớt dung dịch gelatin tăng lên làm tắc nghẽn đầu tiêm. Dựa trên kết quả nồng độ gelatin này, chúng tôi điều chế dung dịch gelatin 10% và dung dịch alginate 2%, sau đó phối trộn lại để tạo thành hỗn hợp gelatin (10%) – alginate (2%).

3.2.2. Tạo chế phẩm vi gói và khảo sát kích thước hạt gel.

Sau khi đã chuẩn bị xong tất cả các yếu tố cần thiết, chúng tôi tiến hành tạo chế phẩm vi gói và nhận được kết quả như sau:

Bảng 3.2 – Một số tính chất của chế phẩm vi gói

STT	Một số tính chất	Nhận xét
1	Phương pháp vi gói	Phương pháp nhỏ giọt nhót tế bào trong vật liệu gelatin–alginate
2	Kích thước vi gói	$2,2 \pm 0,1\text{mm}$ $1,5 \pm 0,1\text{mm}$ $1,0 \pm 0,1\text{mm}$
3	Tính chất cơ lý	Hạt vi gói mềm
4	Hình dạng	Vi gói có dạng hạt
5	Mật độ tế bào	$4,5.10^8 - 5.10^8$ tế bào/ml



Hình 3.3 – Hình chụp chế phẩm vi gói

3.3. Khảo sát chất lượng hạt vi gói.**3.3.1. Khảo sát khả năng tồn tại của vi khuẩn lactic trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ.**

Dùng phương pháp cấy trải để xác định mật độ tế bào của mẫu tế bào tự do và mẫu các chế phẩm vi gói khảo sát qua các thời điểm khác nhau trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ pH=2. Kết quả chúng tôi nhận được như sau:

Bảng 3.3 – Kết quả mật độ tế bào sống sót sau khi khảo sát trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ

Thời gian theo dõi (phút)	Tế bào tự do (tế bào/ml)	Chế phẩm vi gói 2,2±0,1mm (tế bào/ml)	Chế phẩm vi gói 1,5±0,1mm (tế bào/ml)	Chế phẩm vi gói 1,0±0,1mm (tế bào/ml)
Ban đầu	5.10 ⁸	5.10 ⁸	5.10 ⁸	5.10 ⁸
30 phút	1,5.10 ⁸	4,5.10 ⁸	4.10 ⁸	3,7.10 ⁸
60 phút	0	3,5.10 ⁸	3,15.10 ⁸	2,9.10 ⁸
90 phút	0	2,6.10 ⁸	2,2.10 ⁸	1,85.10 ⁸

Dựa vào kết quả trên, chúng tôi tính toán % tế bào tồn tại so với mật độ ban đầu ở pH=2 như sau:

$$\%X_t = (X_t / X_0) \times 100$$

Trong đó: X₀: mật độ tế bào tại thời điểm t = 0.

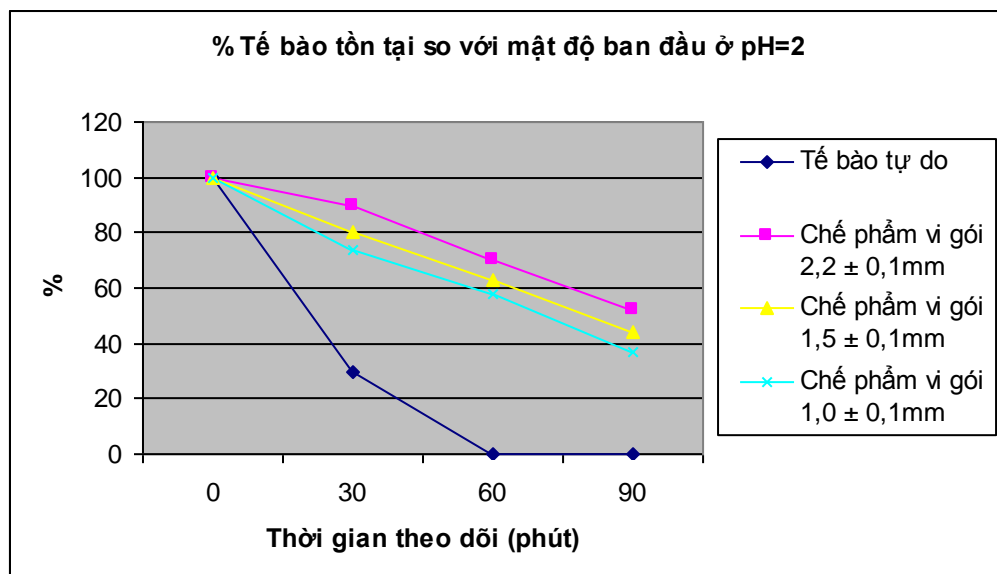
X_t: mật độ tế bào tại thời điểm t = 30 phút, 60 phút, 90 phút.

% X_t: phần trăm tế bào X_t so với X₀.

Bảng 3.4 – % tế bào tồn tại so với mật độ ban đầu ở pH=2

Thời gian theo dõi (phút)	Tế bào tự do (%)	Chế phẩm vi gói 2,2±0,1mm (%)	Chế phẩm vi gói 1,5±0,1mm (%)	Chế phẩm vi gói 1,0±0,1mm (%)
Ban đầu	100	100	100	100
30 phút	30	90	80	74
60 phút	0	70	63	58
90 phút	0	52	44	37

Qua hai bảng số liệu trên cho thấy mật độ tế bào tự do và các chế phẩm vi gói ban đầu là như nhau (100%). Sau thời gian 30 phút trong môi trường dạ dày nhân tạo, tế bào tự do sụt giảm đáng kể chỉ còn khoảng 30% so với ban đầu. Trong khi đó, mật độ tế bào vi khuẩn lactic trong các chế phẩm vi gói sụt giảm không nhiều như tế bào tự do, còn khoảng 74-90% so với ban đầu tùy kích thước vi gói. Sau 60 phút trong môi trường dạ dày nhân tạo, không còn thấy sự tồn tại của tế bào tự do, mật độ tế bào trong các chế phẩm vi gói còn khoảng trên 50%. Sau 90 phút trong môi trường dạ dày nhân tạo, mật độ tế bào trong các chế phẩm vi gói còn khoảng 37-52% tùy kích thước vi gói.



Đồ thị 3 – Biểu diễn mật độ tế bào trong môi trường dạ dày nhân tạo SGJ ở pH=2

Các khảo sát trong môi trường dạ dày nhân tạo cho thấy, nếu không được bảo vệ bằng vi gói thì tế bào vi khuẩn lactic sẽ bị tiêu diệt hoàn toàn trong khoảng thời gian là 60 phút, như vậy vi khuẩn lactic có trong sản phẩm sữa chua sẽ không phát huy được tác dụng tích cực của mình khi đi vào hệ thống tiêu hóa của chúng ta. Tế bào vi khuẩn lactic trong các chế phẩm vi gói do có lớp áo vi gói bên ngoài bảo vệ nên vẫn còn tồn tại được trong môi trường dạ dày nhân tạo sau 90 phút. Các chế phẩm vi gói có kích thước càng lớn thì khả năng bảo vệ vi khuẩn lactic càng tốt (sau 90 phút trong môi trường dạ dày nhân tạo, mật độ tế bào của chế phẩm vi gói kích thước 2,2±0,1mm là 52% so với 37% của chế phẩm vi gói kích thước 1,0±0,1mm).

3.3.2. Khảo sát biến động pH, acid lactic trong quá trình lên men.

Với chất lượng giống là $2,43.10^8$ tế bào/ml và tỷ lệ giống là 10%. Hai chỉ tiêu để so sánh khả năng lên men của hai hình thức tiếp giống bởi tế bào tự do và chế phẩm vi gói là pH và acid lactic. Sau 6 giờ lên men ở nhiệt độ 44-45⁰C, chúng tôi tiến hành lấy mẫu ra đo pH và xác định lượng acid lactic tạo thành, các hũ sữa chua được đem bảo quản lạnh ở 4-6⁰C.

Bảng 3.5 – So sánh khả năng lên men của hai hình thức tiếp giống là tế bào tự do và các chế phẩm vi gói

Giống	pH	V _{NaOH} (ml)	Acid lactic (g/l)
Tế bào tự do	4,18	6,7	4,446
Chế phẩm vi gói 2,2 ± 0,1mm	4,25	6,5	4,266
Chế phẩm vi gói 1,5 ± 0,1mm	4,23	6,55	4,311
Chế phẩm vi gói 1,0 ± 0,1mm	4,20	6,6	4,356

* Với mẫu nguyên liệu ban đầu có pH=6,7 và V_{NaOH}=1,76ml.

Dựa vào giá trị pH và hàm lượng acid lactic thu được, chúng tôi nhận thấy khả năng lên men giữa hình thức tiếp giống tế bào tự do và các chế phẩm vi gói là gần như tương đương nhau. Trong đó, chế phẩm vi gói kích thước 1,0 ± 0,1mm là gần với tế bào tự do nhất (bảng 3.5), còn các chế phẩm vi gói có kích thước lớn hơn có giá trị pH cao hơn và lượng acid lactic thấp hơn. Điều này chứng minh các chế phẩm vi gói có kích thước càng lớn thì khả năng lên men càng thấp (biểu thị qua giá trị pH cao hơn và lượng acid lactic thấp hơn) do lớp vỏ bọc vi gói bảo vệ bên ngoài đã làm hạn chế một số lượng tế bào vi khuẩn lactic ở bên trong vi gói tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng, từ đó làm hạn chế khả năng lên men của vi khuẩn lactic.

3.3.3. Khảo sát đánh giá chất lượng cảm quan trong sản phẩm sữa lên men.

Dựa trên giá trị pH và hàm lượng acid lactic sinh ra trong quá trình lên men sữa chua, chúng tôi chỉ tiến hành đánh giá cảm quan mẫu sữa chua được tiếp giống bằng tế bào tự do và chế phẩm vi gói 1,0 ± 0,1mm. Các chế phẩm vi gói có kích thước lớn hơn (2,2±0,1mm và 1,5±0,1mm) tuy bảo vệ vi khuẩn lactic tốt hơn nhưng do kích thước lớn nên dễ làm người thử cảm quan e ngại mà không giám thử sản phẩm, đồng thời khả năng lên men của các chế phẩm vi gói kích thước lớn không bằng chế phẩm vi gói có kích thước nhỏ. Sau khi lên men bằng các hình thức tiếp

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

giống khác nhau được các sản phẩm sữa chua, chúng tôi sử dụng hai phương pháp phân tích đánh giá cảm quan là phương pháp so hàng và phương pháp so sánh cặp. Kết quả thu được như sau:

Theo phương pháp so hàng:

Bảng 3.6 – Bảng tổng hợp kết quả thứ tự so hàng

Tính chất cảm quan	Mẫu tế bào tự do	Mẫu chế phẩm vi gói 1,0±0,1mm
Trạng thái sản phẩm (mịn, sệt, đồng nhất)	8	8,125
Màu sắc	8,25	8,25
Mùi	7,875	7,75
Vị	7,125	6,875
Tổng hợp	7,8125	7,75

Kết quả tính toán cho thấy mẫu sữa chua được tiếp giống bằng tế bào tự do và mẫu sữa chua được tiếp giống bằng chế phẩm vi gói kích thước 1,0±0,1mm có sự khác biệt nhau đôi chút nhưng sự khác biệt này là không lớn (7,8125 so với 7,75). Theo phương pháp này cho thấy mẫu sản phẩm sữa chua lên men bằng chế phẩm vi gói có kích thước 1,2mm là có thể chấp nhận được.

Theo phương pháp so sánh cặp:

Bảng 3.7 – Bảng kết quả cảm quan theo phương pháp cặp đôi

Tính chất cảm quan	Mẫu chế phẩm vi gói 1,0±0,1mm so với mẫu tế bào tự do
Trạng thái sản phẩm (mịn, sệt, đồng nhất)	<
Màu sắc	=
Mùi	<
Vị	<
Tổng hợp	<

Kết quả cho thấy về tổng thể chế phẩm vi gói 1,0±0,1mm có sự khác biệt so với mẫu tế bào tự do. Trong đó, các mặt như trạng thái sản phẩm, mùi, vị của mẫu

chế phẩm vi gói đánh giá thấp hơn mẫu tế bào tự do. Khía cạnh màu sắc giữa hai mẫu sản phẩm được đánh giá là tương đương nhau.

Qua hai phương pháp phân tích và đánh giá cảm quan, chúng tôi nhận xét mẫu sản phẩm sữa chua được tiếp giống bằng chế phẩm vi gói $1,0\pm 0,1\text{mm}$ là phù hợp với người tiêu dùng do không làm mất đi giá trị cảm quan về sản phẩm của người thử cảm quan. Khả năng lên men giữa hai hình thức tiếp giống là như nhau, khả năng lên men cũng gần bằng nhau, đồng thời vi gói có kích thước nhỏ ít ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan của sản phẩm.

Các chế phẩm vi gói đều có khả năng bảo vệ tế bào vi khuẩn lactic, trong đó chế phẩm có kích thước lớn ($2,2\pm 0,1\text{mm}$ và $1,5\pm 0,1\text{mm}$) thì khả năng bảo vệ tế bào tốt hơn chế phẩm có kích thước nhỏ hơn ($1,0\pm 0,1\text{mm}$). Tuy nhiên các vi gói có kích thước lớn sẽ dễ dàng làm cho người tiêu dùng e ngại mà không giám thử sản phẩm, ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng cảm quan, đồng thời kích thước vi gói lớn gây hạn chế khả năng tiếp xúc giữa tế bào vi khuẩn lactic với môi trường lên men từ đó làm giảm khả năng lên men lactic của chế phẩm vi gói lớn. Vi gói có kích thước $1,0\pm 0,1\text{mm}$ vừa có thể bảo vệ vi khuẩn lactic, vừa không làm thay đổi giá trị cảm quan của sản phẩm.

Chương 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận.

Sữa chua được xem là nhóm thực phẩm chức năng, nó chứa các vi khuẩn lactic có lợi, các vi khuẩn probiotic nên có vai trò quan trọng trong hệ thống tiêu hóa của con người. Nâng cao chất lượng sữa chua là vấn đề quan trọng được đặt lên hàng đầu để có thể phát huy tối đa những tác dụng tích cực của thực phẩm chức năng này. Có nhiều biện pháp khác nhau để cải thiện và nâng cao chất lượng sữa chua, trong đó biện pháp vi gói vi khuẩn lactic là một biện pháp được xem là hữu hiệu nhất.

Qua toàn bộ quá trình thực nghiệm, chúng tôi đã đạt được một số kết quả nhất định:

- Xác định được nồng độ gelatin tối ưu phục vụ cho vi gói vi khuẩn lactic là 10% và kết hợp tốt với nồng độ alginate 2%.

- Theo phương pháp nhỏ giọt, tạo ra các chế phẩm vi gói vi khuẩn lactic với các kích thước khác nhau $2,2 \pm 0,1\text{mm}$, $1,5 \pm 0,1\text{mm}$, $1,0 \pm 0,1\text{mm}$.

- Khảo sát trong môi trường dạ dày nhân tạo cho thấy khi vi gói khả năng bảo vệ vi khuẩn lactic tốt hơn so với tế bào tự do. Hạt vi gói có kích thước càng lớn thì khả năng bảo vệ tế bào càng tốt.

- Khảo sát khả năng lên men giữa hai hình thức tiếp giống khác nhau thông qua biến động quá trình lên men và phân tích đánh giá cảm quan cho thấy khả năng lên men là tương đương nhau giữa hai hình thức tiếp giống tế bào tự do và chế phẩm vi gói kích thước $1,0 \pm 0,1\text{mm}$.

Tóm lại, nâng cao chất lượng sữa chua, bảo vệ vi khuẩn lactic bằng phương pháp vi gói là hiệu quả nhất và cần thiết. Vi gói kích thước $1,0 \pm 0,1\text{mm}$ vừa có thể bảo vệ vi khuẩn lactic chống lại các điều kiện cực đoan trong sản phẩm và trong môi trường dạ dày nhân tạo, vừa không làm thay đổi giá trị cảm quan của sản phẩm.

4.2. Kiến nghị.

Sau quá trình thực nghiệm chúng tôi có một số kiến nghị:

- Do thời gian thực nghiệm có hạn nên chúng tôi chưa thể thực hiện đánh giá thời gian bảo quản chế phẩm vi gói cũng như kiểm nghiệm các chỉ tiêu hóa lý, vi sinh của sản phẩm sữa chua.

- Thực hiện vi gói theo phương pháp nhỏ giọt với các kích thước hạt vi gói nhỏ hơn để đánh giá khả năng bảo vệ tế bào và cảm quan của chế phẩm đó so với chế phẩm của chúng tôi như thế nào.

- Thực hiện vi gói theo các phương pháp khác đã nêu trong phần tổng quan tài liệu của luận văn để so sánh với phương pháp nhỏ giọt.

- Thực hiện phối trộn giữa gelatin với các chất tạo gel khác như: chitosan, agar, κ -carrageenan,... để so sánh với hỗn hợp phối trộn giữa gelatin và alginate, xem xét hỗn hợp nào bảo vệ vi khuẩn lactic tốt hơn.

- Thực hiện các loại vi gói khác nhau như vi gói nhiều lớp, vi gói trong vi gói,... để so sánh với loại vi gói của chúng tôi và tăng khả năng bảo vệ vi khuẩn lactic tốt hơn.

- Thực hiện vi gói với nhiều loại vi khuẩn probiotic khác nhau để bảo vệ vi khuẩn probiotic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo trong nước

1. Lê Văn Việt Mẫn (2004), *Công nghệ sản xuất các sản phẩm từ sữa và thức uống*, tập 1: *Công nghệ sản xuất các sản phẩm từ sữa*, NXB Đại học Quốc gia TP. HCM.
2. Lâm Xuân Thanh (2004), *Giáo trình công nghệ các sản phẩm từ sữa*, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
3. Lương Đức Phẩm (2000), *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*, NXB Nông nghiệp Hà Nội.
4. Lê Thị Liên Thanh, Lê Văn Hoàng (2002), *Công nghệ chế biến sữa và các sản phẩm sữa*, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
5. Lê Quan Nghiệm, Huỳnh Văn Hóa (2007), *Bào chế và sinh dược học*, tập 2, NXB Giáo dục.
6. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết (2006), *Thí nghiệm Công nghệ sinh học*, tập 2: *Thí nghiệm vi sinh vật học*, NXB Đại học Quốc gia TP. HCM.
7. Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự (1980), *vi sinh vật học*, tập 2, NXB Đại học và trung học chuyên nghiệp.
8. Hà Duyên Tư (2006), *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*, NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, 146.
9. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7030:2002 (sữa chua – Quy định kỹ thuật).
10. Nguyễn Lưu Hiền Trang, Nguyễn Thúy Hương, *Nghiên cứu nâng cao chất lượng sữa chua đậu nành bằng phương pháp vi gói vi khuẩn lactic*, Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Bách khoa TP. HCM.
11. Lê Hà Văn Thư (2008), *Nghiên cứu qui trình tạo đồ uống lên men từ gạo lứt*, Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Bách khoa TP. HCM.
12. Trần Lê Bảo Hà (2004), *Thiết kế đánh giá màng màng gelatin-alginate trong điều trị tổn thương bỏng*, Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Khoa học tự nhiên TP. HCM.
13. Võ Huy Dân (2002), *Công nghệ vật liệu trong y sinh học*, trang 350-358.
14. Trần Hùng (2004), *Bài giảng dược liệu học*, trang 38-39, 86-87, 144-145.

Tài liệu tham khảo nước ngoài

15. A.Y.Tamime and R.K.Robinson (2000), *Yoghurt science and technologe*, Second edition, Woodhead publishing limited.
16. Ana M.P Gomes và F. Xavier Malcata (1999), *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical and therapeutical properties relevant for use as probiotics*, Tạp chí Trends in food Science & Technology số 10, trang 139-152.
17. Amir Mortazavian-Seyed Hadi Razavi-Mohammad Reza Ehsani-Sara Sohrabvandi (2007), *Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms*, Iranian journal of biotechnology, 5(1), 1-17.
18. Audet P, Paquin C, Lacroix C (1988), *Immobilized growing lactic acid bacteria with κ -carrageenan-locust bean gum gel*, Appl Microbiol Biotechnol, 11-18.
19. Arnauld JP, Laroix C, Choplin L (1992), *Effect of agitation rate on cell release raye and metabolism during continues fermentation with entrapped growing Lactobacillus casei subsp. casei*. Biotech Tech, 261-265.
20. Fabian E, Elmadfa I (2006), *Influence of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on the plasma lipid profile in young healthy women*, Ann Nutr Merab.
21. Gunther CW, Lyle RM, Legowski PA, James JM, McCabe LD, McCabe GP, Peacock M, Teegarden D (2005), *Fat oxidation and its relation to serum parathyroid hormone in young women enrolled in a 1-y dairy calcium intervention*, Am J Clin Nutr.
22. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML (2001), *Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with probiotic Bifidobacterium lactis HN019*, Am J Clin Nutr.
23. Hojo K, Ohshima T, Yashima A, Gomi K, Maeda N (2001), *Effects of Yoghurt on the Human Oral Microbiota and Halitosis*.
24. Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, et al (1992), *Ingestion of yogurt containing Lactobacillus acidophilus as prophylaxis for candidal vaginitis*, Am Intern Med.
25. Haralampu SG (2000), *Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS₃*, Carbohydrate Polymers, 285-292.

26. Jankowski T, Zielinska M (1997), *Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules*, Biotechnol Technol, 31-34.
27. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H (2003), *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt*, Int Dairy J., 3-13.
28. Malm CJ, Emerson J, Hiatt GD (1951), *Cellulose acetate phthalate as enteric coating material*, J American Pharm Assoc Sci. 10, 520-522.
29. Ruixiang Zhao và cộng sự (2007), *Analysis of functional properties of Lactobacillus acidophilus*, Tạp chí World ..J. Microbial Biotechnol số 23, trang 195-200.
30. Sung Woo Kim (2004), *The study of chitosan/gelatin based films crosslinked by proanthocyanidins as biomaterial*, UMI number: 1421773.
31. Tetsuya Masuda và cộng sự (2005), *Intracellular enzyme activities and autolytic properties of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei*, Tạp chí Food science technology Res. Số 11(3), trang 328-331.

Truy cập từ website

32. Tự điển Microbe wiki, microbe.kenyon.edu
33. Tự điển Wikipedia, www.wikipedia.org
34. [www. Whfood.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=124](http://www.Whfood.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=124)
35. hanoifishing.com/forum/showthread.php?t=10780
36. <http://www.dairyconsultant.co.uk/pages/yoguhrt.htm>
37. <http://www.gmap-gelatin.com/>
38. <http://www.kimica.ip/eng-Manufacturing-P6.htm>
39. fmcbiopolymer.com/ingredients/alginate%20PGA/gelation/tabid/2412/default.aspx

PHỤ LỤC

I. Bổ sung tổng quan tài liệu.

I.1. Những nghiên cứu mới về *Lactobacillus acidophilus*.

Nhóm tác giả Ruixiang Zhao đã phân tích thuộc tính chức năng của *L. acidophilus*. Theo họ, môi trường sữa gầy (skimmilk), sự lên men của *L. acidophilus* là lên men đồng hình, lượng acid lactic tạo thành từ hai chủng *L. acidophilus* khảo sát là 12,73 g/l và 13,33 g/l chiếm 90% tổng số các acid hữu cơ tạo thành. Điều này mở ra những xu hướng thử nghiệm có thể gia tăng sự tận dụng lactose và làm giảm đi nồng độ lactose trong sữa. Điều này có thể là một trong những nguyên nhân tại sao *L. acidophilus* làm tăng sức chịu lactose cho những người cá biệt. Họ có thể sử dụng những chế phẩm probiotic [29].

β -galactosidase có thể cải thiện việc sử dụng lactose cho những người không chịu được lactose (lactose-intolerant persons). Lactose được thu nhận bằng một chất đặc biệt thấm vào trong tế bào vi khuẩn và nó phân chia bởi β -galactosidase thành glucose và D-galactose. Trong môi trường MRS, β -galactosidase hoạt động tốt nhất vào thời điểm 36 giờ và sau đó bắt đầu sụt giảm. Điều này một lần nữa chứng minh tại sao *L. acidophilus* làm tăng sức chịu lactose cho một số cá thể đặc biệt [29].

Việc sản xuất một số acid amin tự do trong quá trình lên men sữa gầy gia tăng rất lớn so với không lên men trên môi trường sữa gầy, đặc biệt là glutamic acid, praline, asparagines. Valin, leucin, tyrosin và arginine. Trong nghiên cứu của Ruixiang Zhao, *L. acidophilus* có khả năng thủy phân protein của sữa thành acid amin tự do. Vì giá trị protein sữa được đánh giá bởi nồng độ acid amin tự do nên sự lên men bởi *L. acidophilus* đã cải thiện chất lượng và giá trị của protein sữa [29].

L. acidophilus có khả năng giảm cholesterol trong môi trường MRS có bổ sung cholesterol với những mức độ khác nhau. Sau 24 giờ nuôi cấy, các mức cholesterol giảm dưới tới hạn 5,69 mmol⁻¹ là mức kết luận chẩn đoán bệnh cao cholesterol. Tuy nhiên, khả năng này chỉ trên in vitro, những chứng minh xa hơn trên máu người và động vật cần tiếp tục thử nghiệm [29].

Thử nghiệm chứng minh *L. acidophilus* có khả năng chống lại *B. anthracis* và *E. coli*. Nó có khả năng hoạt động như một tác nhân kháng vi khuẩn gây bệnh Gram (+) và Gram (-). Cơ chế tác động kháng khuẩn khá phức tạp và cần nghiên cứu thêm

nữa. Có thể là do một số acid hữu cơ, bacteriocin, chất tương tự bacteriocin, H₂O₂ có cả *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* chống lại vi khuẩn gây bệnh đường ruột [29].

Các enzyme nội bào như proteolytic và lipolytic tồn tại trong probiotic ảnh hưởng đến mùi của sản phẩm. Trong trường hợp protease, protease ngoại bào thoát ra khỏi tế bào vi khuẩn vào giai đoạn sớm của sự lên men là yếu tố quyết định để vi khuẩn phát triển tốt trong sữa, protease nội bào liên quan đến mùi của sản phẩm trong suốt thời gian bảo quản. Lipolytic có vai trò đặc biệt quan trọng trong sự hình thành hương vị của sản phẩm. Hoạt tính của enzyme này thường thấp và không đáng kể ở *Lactobacillus*. Nhưng hầu hết chủng *L. acidophilus* đều có hoạt tính enzyme lipase cao hơn *L. casei* (ngược lại với trường hợp protease). Thuộc tính tự phân của *L. acidophilus* được nhiều nhà nghiên cứu xác nhận. Nhiều khả năng có thể tìm thấy enzyme tự phân ở các mức pH khác nhau và tùy thuộc vào điều kiện của dung dịch hòa tan phân tán. Các thuộc tính của các enzyme đã nâng cao giá trị khi lựa chọn giữa *L. acidophilus* với *L. casei* và các chủng vi khuẩn lactic khác cho mục đích probiotic vì có mối liên quan mật thiết giữa enzyme tự phân và khả năng phát triển của vi khuẩn vì các enzyme này phóng thích trong suốt thời gian bảo quản tác động đến chất lượng sản phẩm [31].

Sự gắn bám protein trung gian được chứng minh có vai trò quan trọng hiệu quả probiotic của *L. acidophilus*. Có những nghiên cứu chỉ ra rằng cơ chế chính xác của sự gắn bám là từ chuỗi đến chuỗi. Cơ chế thực hiện liên quan đến sự gắn protein và carbohydrate trung gian. Mặc dù cả hai cơ chế đều được chứng minh thành công trong in vitro như đã thành công trong in vivo, bởi vì đường dạ dày-ruột là một môi trường hay thay đổi, không giống như môi trường in vitro. Những nghiên cứu xa hơn với việc sinh thiết mô ruột là cần thiết để xác nhận sự bám và lưu lại của *L. acidophilus* trong đường ruột. Tuy nhiên, những nghiên cứu này là rất ít. Trong in vitro, tổ chức North Carolina Food Microbiology (NCFM) đã trình bày rõ ràng về sự đáp ứng của một protein trung gian. NCFM đã chứng minh rằng sự gắn bám không phải là một lớp polysaccharide. Những cơ chế xa hơn là cần thiết để xác nhận cơ chế trong in vitro [32].

Khả năng chống vi trùng bám sinh: khi *L. acidophilus* cùng được nuôi cấy với các vi sinh vật khác, nó biểu hiện sự ức chế đối với các vi sinh vật cạnh

tranh. *L. acidophilus* sản xuất một số loại chất kháng khuẩn bao gồm acid hữu cơ, hydrogen peroxide, diacetyl và bacteriocin. Độ hoạt động của các hợp chất này đã quá rõ ràng trong phòng thí nghiệm nhưng vai trò của nó trong in vivo thì chưa được nghiên cứu nhiều. Đó là một lĩnh vực nghiên cứu thiết thực. Trong phòng thí nghiệm, NCFM đã xác định hoạt động tương phản chống lại những tác nhân gây bệnh foodborne (bẩm sinh) như *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* và *E. coli* gây bệnh đường ruột [32].

I.2. Ứng dụng của vi khuẩn lactic.

Vi khuẩn lactic ngày càng được sử dụng nhiều trong công nghệ thực phẩm, trong y học, công nghiệp và nông nghiệp. Những hướng ứng dụng cơ bản gồm:

Ứng dụng trong công nghệ thực phẩm.

Sản xuất các sản phẩm lên men từ sữa. Trong sản xuất các loại sản phẩm lên men từ sữa đều có sử dụng các chủng vi khuẩn lactic để làm tác nhân lên men, trong quá trình phát triển các vi khuẩn lactic tạo ra acid lactic làm cho casein kết tủa và tạo hương vị đặc trưng cho sản phẩm.

Sản xuất các loại thực phẩm lên men chua như dưa chua, hoa quả chua. Trong quá trình lên men chua rau quả, các vi khuẩn lactic và vi khuẩn acetic sinh trưởng phát triển và sản sinh ra acid lactic, acid acetic và các loại acid hữu cơ khác. Các acid hữu cơ này làm giảm pH của dịch, chống lại hiện tượng gây thối rữa rau quả, đồng thời làm tăng hương vị, thời gian bảo quản và thời gian sử dụng sản phẩm được lâu hơn.

Trong sản xuất nước tương có sử dụng vi khuẩn lactic để tạo pH thích hợp cho sản phẩm và tăng hương vị cho sản phẩm. Tương tự, trong sản xuất đậu phụ (đậu hũ) có công đoạn kết tủa protein đậu. Theo phương pháp truyền thống thường dùng nước chua (có chứa vi khuẩn lactic) để tạo kết tủa (nhờ pH giảm đến điểm đẳng điện của protein đậu nành). Ngoài ra, người ta còn dùng vi khuẩn lactic để ủ chua cỏ, làm tăng giá trị dinh dưỡng và khả năng bảo quản cỏ cho gia súc [3, 6].

Ứng dụng trong y học.

Ứng dụng vi khuẩn lactic để chữa bệnh đường ruột, sản xuất vật liệu sinh học, sản xuất các loại sữa bột và bột giàu chất dinh dưỡng cho trẻ em và người cao tuổi.

Ứng dụng acid lactic trong phẫu thuật chỉnh hình, trong nha khoa, sản xuất các loại hóa mỹ phẩm có tính tẩy rửa, sát trùng nhẹ giành cho trẻ em và phụ nữ [3, 6].

Ứng dụng khác.

Sản xuất chất dẻo cho tương lai, chất dẻo mới này gọi là poly acid lactic là sản phẩm được tạo từ phản ứng trùng hợp acid lactic. Đặc tính ưu việt nhất của loại vật liệu mới này là có khả năng phân hủy cao hơn vật liệu cũ và sản phẩm phân hủy không gây ô nhiễm môi trường.

Acid lactic được ứng dụng làm dung môi trong công nghiệp sản xuất sơn, vecni, dệt nhuộm, thuốc da. Trong công nghiệp chế biến rượu, acid lactic được dùng dưới dạng muối canxi.

Ứng dụng trong hóa mỹ phẩm, chống lại vi sinh vật trên bề mặt da, làm ẩm và làm sáng da [3, 6].

I.3. Lợi ích từ sữa và sữa chua.

Lợi ích từ sữa.

Sữa bò tươi là nguồn thực phẩm đã có từ lâu đời nên có rất nhiều nghiên cứu về nó trong lịch sử và kết quả là có hàng loạt các sản phẩm có xuất xứ từ sữa đã ra đời như sữa chua lên men, sữa chua kefir, phô mai, bơ,...

Ngoài những sản phẩm truyền thống đó, ngày nay với sự phát triển của khoa học kỹ thuật đã có hàng loạt các sản phẩm mới, hiện đại hơn có nguồn gốc từ sữa như sữa tươi thanh trùng, tiệt trùng, sữa cô đặc, sữa bột, các loại đồ uống, các loại bánh kẹo,... Đặc biệt đáng chú ý trong đó là sản phẩm sữa bột. Sữa bột là nguồn dinh dưỡng không thể thiếu cho trẻ em, người già và người bệnh nên những nghiên cứu về sữa bột được đặc biệt quan tâm và chú ý. Từ sữa bò tươi người ta sản xuất ra các loại sữa bột và bổ sung thêm vào đó nhiều chất dinh dưỡng như các loại vitamine A, B₁, B₆, B₁₂, K, Biotin; Các loại khoáng chất như Fe, Canxi; Các chất có lợi cho trí não và thể chất cho trẻ em như DHA, ARA, MCT, FOS, Omega 3, Omega 6, Taurine, Oligosaccharide, Tryptophan, Lactoferrin, Ganglioside, Mucin, lactadherin, β -Caroten, Galactosylactose, Lactulose, GOS, α -Lactalbumin, Choline; Các chất bổ sung và phục hồi sức khỏe như Folate, TPAN, MUFA, PUFA, FOS (Fructo-Oligosaccharide),... Mỗi loại sữa bột lại phù hợp cho từng đối tượng khác nhau, tùy vào nhu cầu của người sử dụng mà chọn lựa loại sữa phù hợp với nhu cầu bản thân.

Ngoài ra sữa cũng là một trong những phương pháp làm đẹp hiệu quả. Trong sữa có chứa nhiều chất dinh dưỡng có lợi cho cơ thể, đặc biệt là da. Sử dụng sữa để rửa mặt thường xuyên có tác dụng làm trẻ hóa da, giữ ẩm cho da và làm da tươi sáng.

Lợi ích từ sữa chua.

Ngày nay, sữa lên men nói chung và sữa chua nói riêng đã được sử dụng phần lớn ở các nước trên thế giới. Có được sự phát triển như vậy là vì sữa chua là nguồn cung cấp chất dinh dưỡng tuyệt hảo cho con người, một lợi ích sức khỏe tiềm tàng. Các sản phẩm sữa lên men đều có độ tiêu hóa cao bởi lẽ các chất đều đã được chuyển hóa thành những dạng mà cơ thể dễ hấp thụ, đặc biệt đối với người già và trẻ em. Không chỉ vậy, khoa học hiện đại đã chứng minh sữa chua có những tác dụng rất tích cực đến sức khỏe con người.

Đa số các sản phẩm sữa lên men là thực phẩm “ăn kiêng” và có tác dụng chữa bệnh. Sử dụng các sản phẩm sữa lên men có tác dụng kích thích sự tiết dịch vị, kích thích sự trao đổi chất, hệ vi khuẩn lactic (trong các sản phẩm này) có tác dụng không chế sự phát triển của vi khuẩn gây thối rữa ở ruột. Ngoài các thành phần dinh dưỡng như protein, lipid, glucid; các sản phẩm lên men còn chứa nhiều vitamin, các chất kháng thể rất có ý nghĩa trong điều trị một số bệnh.

Sữa chua có một giá trị dinh dưỡng đáng kể: Trong 100g sữa chua chứa khoảng 100Kcal (bằng khoảng 1/2 chén cơm hay 2 trái chuối xanh), cung cấp 260kJ năng lượng, có chất đường (15,4g), chất đạm (3,1g), chất béo (3g), calci và một số loại vitamin. Một số loại sữa chua còn thêm DHA (chất béo không no chuỗi dài) có tác dụng giúp sáng mắt và tăng chỉ số phát triển trí tuệ...

Mặt khác, trong sữa chua có chất kháng sinh gọi là lactocidine, có khả năng chống lại các virus, đề kháng với các bệnh do virus gây ra. Đã có những nghiên cứu cho thấy việc ăn sữa chua 3 lần/tuần thì hệ miễn dịch được tăng cường. Dùng sữa chua như một phần trong bữa ăn hàng ngày giúp bạn làm sạch và ngăn ngừa các bệnh ở hệ tiêu hóa. Nguồn canxi trong sữa chua cũng giúp cải thiện hệ tiêu hóa, giúp hạn chế nhưng tác động của acid chua (hiện tượng ợ chua) trong hệ tiêu hóa. Ngoài ra việc sử dụng sữa chua còn rất tốt cho răng miệng, nó làm giảm lượng vi khuẩn và

hàm lượng hydro sulfur gây mùi trong miệng, thậm chí giảm các mảng bám răng và các bệnh về lợi nhất là khi sử dụng loại sữa chua ít đường.

Sữa chua và các sản phẩm lên men sữa khác có một số vi khuẩn tạo nên enzyme proteaza, tác dụng thủy phân protein thành các acid amin tự do dễ hấp thụ nên ngoài giá trị dinh dưỡng, sữa chua còn được xem như một loại mỹ phẩm chăm sóc da hiệu quả. Acid lactic trong sữa chua với tác dụng ngăn ngừa sự xâm nhập và kiểm chế hoạt động của các loại vi khuẩn có hại, tạo nên một màng chắn an toàn bảo vệ cho da. Các vi khuẩn lên men chua còn có thể tiết ra chất kháng sinh tự nhiên, kích thích quá trình làm lành các thương tổn của da như sẹo, các vết rỗ, tái tạo da mới....Đặc biệt gần đây, tháng 11 năm 2006 khi ông Peter Lee và cộng sự tại Đại học Stranford, bang California (Mỹ) công bố kết quả sữa chua giúp phụ nữ có khả năng ngăn chặn sự truyền nhiễm HIV [15].

Chữa hôi miệng: Trong một nghiên cứu mới đây của các nhà khoa học Nhật Bản đã khẳng định rằng: sữa chua không đường nguyên chất có thể làm giảm chất hydrogen sulphide là nguyên nhân chính gây hôi miệng xuống mức đáng ngạc nhiên [34].

Giảm béo: Sữa chua giàu Canxi còn là phương thuốc chữa béo phì hiệu quả. Theo Zemet, Canxi có nguồn gốc từ sữa có ảnh hưởng lên hoạt động của các tế bào mô mỡ, giúp chúng chuyển hóa thành năng lượng và đốt cháy hoàn toàn thay vì tích tụ trong cơ thể. Chính vì vậy, phụ nữ thường xuyên sử dụng sữa chua làm phương thuốc giảm cân tự nhiên. Trong sữa chua có nhiều Canxi làm chất xúc tác giúp cơ thể đốt cháy mỡ rất nhanh [20, 21].

Tăng cường hệ miễn dịch: Ăn sữa chua có thể giúp ngăn ngừa bệnh viêm mũi dị ứng và viêm đường hô hấp trên do virus như cảm lạnh hoặc cảm cúm [13, 14].

Bệnh đường ruột: Những người mắc các bệnh dạ dày-ruột, như viêm ruột, đau dạ dày do nhiễm khuẩn *Helicobacter pylori*,...có thể giảm bớt triệu chứng nhờ sữa chua. Theo các nhà khoa học đến từ Trung tâm nghiên cứu Dinh dưỡng, Đại học Tufts (Mỹ), chính vi khuẩn lactic có mặt trong sữa chua đã gia tăng số lượng vi khuẩn tích cực trong đường ruột và giúp khử hoạt tính của một số hóa chất gây hại. Nguồn Canxi trong sữa chua cũng giúp cải thiện hệ tiêu hóa, giúp hạn chế những tác động của acid chua (hiện tượng ợ chua) trong hệ tiêu hóa [20, 21, 23, 35].

Chữa bệnh nấm Candida: Vi khuẩn *L. acidophilus* có trong sữa chua có thể không chế bệnh nấm Candida sinh dục [24].

Giảm cholesterol: Tác dụng bình ổn lượng cholesterol trong máu, cải thiện sự cân bằng giữa cholesterol HDL có lợi và cholesterol LDL có hại, một số vi khuẩn trong sữa chua còn có khả năng phân hủy acid mật. Vi khuẩn *Lactobacilli* trong sữa chua có thể làm giảm nguy cơ tử vong ở nam giới bị ung thư ruột kết và ung thư trực tràng, ở người bị bệnh không dung nạp lactose trong sữa vẫn có thể ăn được sữa chua và hấp thu tốt [20, 21, 36].

Trị tiêu chảy, táo bón: Sữa chua còn giúp giảm nguy cơ và thời gian bị tiêu chảy liên quan đến thuốc kháng sinh [20, 21, 23, 35].

Tăng khả năng tiêu hóa: Trong sữa chua có nhiều loại vitamin như vitamin B giúp duy trì cảm giác ngon miệng và sự phát triển của cơ thể [20, 21, 23, 35].

Tăng tuổi thọ và chắc xương: Sữa chua còn có tác dụng tăng tuổi thọ, vi khuẩn có trong sữa chua giúp ngăn ngừa và chữa trị chứng viêm khớp, hàm lượng Canxi cao trong sữa chua cũng có tác dụng tích cực đến sự phát triển và ổn định của xương [24, 34].

I.4. Các phương pháp vi gói khác.

a. Phương pháp ly tâm.

Phương pháp ly tâm được cải tiến trên cơ sở nguyên tắc của hệ thống nhỏ giọt. Trong trường hợp này, lực ly tâm được ứng dụng thay cho lực ép từ hệ thống bơm dung dịch tạo nhân và dung dịch tạo vỏ gói. Thiết bị có rất nhiều lỗ nên có thể chế tạo rất nhiều vi gói ứng với một vòng quay của thiết bị, nên cho năng suất rất cao. Kích thước vi gói có thể được kiểm soát bởi các thông số như kích thước lỗ, tốc độ quay của thiết bị, tốc độ nạp chất lỏng tạo nhân và tạo vỏ. Vi gói thực hiện theo phương pháp ly tâm có kích thước trong khoảng 100-200 μ m [5].

b. Phương pháp phun sấy.

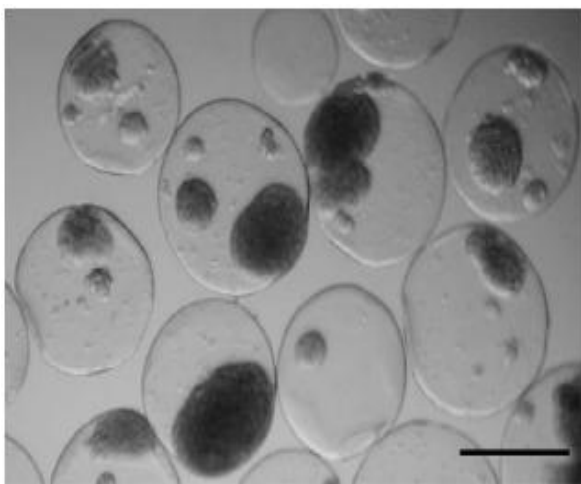
Thiết bị phun sấy có thể ứng dụng điều chế vi gói. Tế bào tự do phải được phân tán trong dung dịch polymer thành dạng dung dịch. Khi phun sấy, dung môi trong pha lỏng sẽ bay hơi và polymer sẽ kết tụ trên bề mặt tiểu phân phân tán (tế bào tự do). Phương pháp này có thể được ứng dụng dễ dàng trên quy mô sản xuất lớn. Nhược điểm chính của phương pháp này là có thể tạo ra một hỗn hợp trộn lẫn

giữa vi gói có tế bào bên trong và các vi gói có ít (hoặc không có) tế bào bên trong [5].

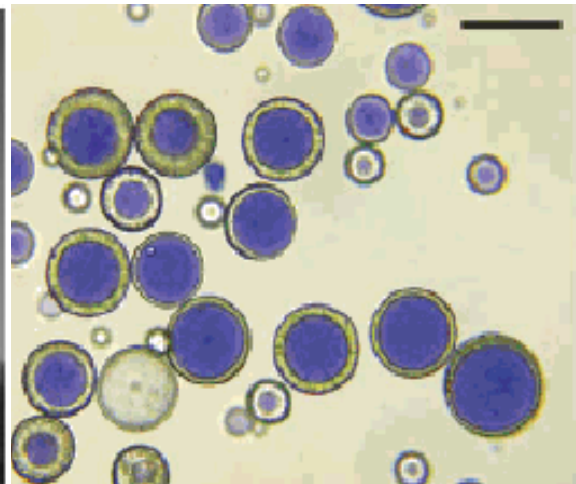
c. Phương pháp bao.

Phương pháp vi gói này phải thực hiện thao tác phần tế bào tự do trước bằng các phương pháp thích hợp như phương pháp tạo hạt trực tiếp,...Sau đó mới bao gói hạt lại bằng phương pháp nổi bao đường kính điện hoặc thiết bị bao tầng sôi. Trong đó thiết bị bao tầng sôi kiểu phun từ dưới lên được đánh giá là thiết bị hữu hiệu nhất khi điều chế vi gói theo phương pháp này [5].

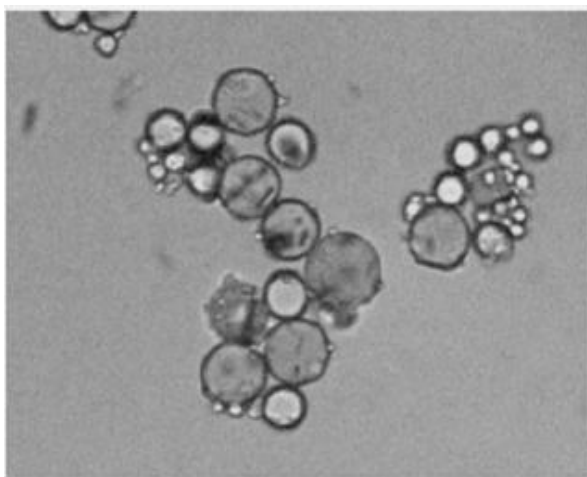
I.5. Một số hình ảnh vi gói.



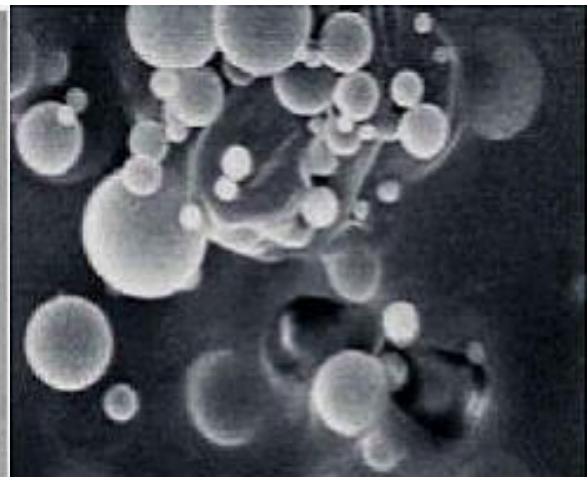
a)



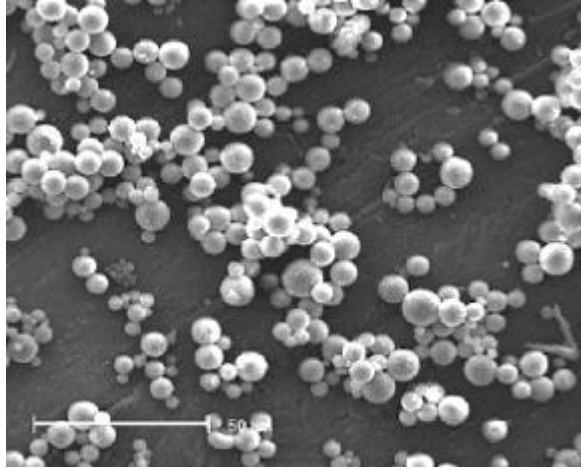
b)



c)



d)



e)

Hình 1 – Một số ảnh chụp vi gói [5]

- a) Hình chụp vi gói đa nhân dưới kính hiển vi điện tử,
- b) Hình chụp vi gói được điều chế bằng phương pháp tạo giọt kết hợp với siêu âm,
- c) Hình chụp vi gói có nhân dạng lỏng,
- d) Hình chụp vi gói chitosan bằng phương pháp phun sấy,
- e) Hình chụp vi gói ketoprofen (có nhân dạng rắn)

II. Bổ sung kết quả và bàn luận.

II.1. Kết quả đánh giá cảm quan.

Bảng 1 – Bảng đánh giá cảm quan mẫu tế bào tự do.

STT	Trạng thái sản phẩm	Màu sắc	Mùi	Vị
1	8	7	8	7
2	9	9	7	7
3	8	9	8	6
4	7	8	9	8
5	7	8	7	6
6	9	9	8	8
7	7	8	8	7
8	9	8	8	8
Tổng cộng	8	8,25	7,875	7,125

Bảng 2 – Bảng đánh giá cảm quan chế phẩm vi gói $1,0 \pm 0,1\text{mm}$.

STT	Trạng thái sản phẩm	Màu sắc	Mùi	Vị
1	9	8	8	7
2	8	7	7	7
3	9	9	8	7
4	7	8	7	7
5	8	8	9	7
6	8	9	8	6
7	9	9	7	7
8	7	8	8	7
Tổng cộng	8,125	8,25	7,75	6,875

Bảng 3 – Bảng đánh giá cảm quan so sánh giữa mẫu chế phẩm vi gói $1,0 \pm 0,1\text{mm}$ với mẫu tế bào tự do.

Mẫu chế phẩm so với mẫu tế bào tự do				
STT	Trạng thái sản phẩm	Màu sắc	Mùi	Vị
1	=	<	>	<
2	<	>	<	<
3	=	=	=	<
4	<	=	<	=
5	<	=	<	<
6	=	=	=	>
7	<	=	=	<
8	>	>	<	<
Tổng cộng	<	=	<	<