

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SẤY THĂNG HOA SẢN PHẨM SỮA CHUA BỔ SUNG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO LÊN MEN BỞI *Lactobacillus* spp.

Võ Sông Hương¹, Trương Phước Thiên Hoàng², Võ Trần Quốc Thắng²,
Lê Hồ Thanh Thảo¹, Lê Phước Thọ^{3*}

¹Khoa Khoa học Sinh học, Trường đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Công ty TNHH Bio Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. và nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) được bổ sung vào quá trình lên men sữa chua nhằm gia tăng giá trị và lợi ích của sữa chua. Công nghệ sấy thăng hoa cũng được áp dụng để tạo ra các trạng thái mới cho sữa chua, nhằm mang lại trải nghiệm mới lạ cho người tiêu dùng. Khảo sát khả năng sinh acid lactic của 7 chủng *Lactobacillus* spp. (kí hiệu từ SH1 đến SH7) cho thấy các chủng SH1, SH6, và SH7 có khả năng sinh acid lactic cao với hàm lượng lần lượt là 2,04 mg/mL, 1,98 mg/mL và 1,81 mg/mL. Các chủng này được xác định là *Lactobacillus plantarum* thông qua định danh sinh học phân tử. Các chủng SH1, SH6, SH7 được ủ tăng sinh trong môi trường MRS broth, sau 24 giờ đạt mật số cao lần lượt là $5,27 \times 10^9$; $6,7 \times 10^9$; $8,8 \times 10^{10}$ CFU/mL. Sau đó, lên men 3 chủng *Lactobacillus* spp. (tỷ lệ 0,5% và 1%) với sữa chua thương mại và bổ sung đông trùng hạ thảo (0,1% - 0,5%). Kết quả cho chủng SH1 tạo sữa chua mịn, kết khối dạng gel ở tỷ lệ bổ sung 0,5% sau 12 giờ lên men. Đánh giá cảm quan sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo 0,3% được ưa thích nhất đạt 4,2 điểm (mùi hương, vị, cấu trúc và màu sắc). Khảo sát đặc tính sinh học của sữa chua cho khả năng kháng oxy hóa đạt chỉ số IC₅₀ là 16,43 mg/mL và không có khả năng ức chế chủng *Escherichia coli* và *Salmonella* spp.. Sữa chua được làm đông ở -30°C, sấy thăng hoa ở 40°C trong môi trường chân không áp suất dưới 500 mTorr, sau đó sấy khan ở 45°C cho mật số vi khuẩn *Lactobacillus* spp. là $1,3 \times 10^7$ CFU/g, với hàm lượng adenosine là 23,9 mg/kg và cordycepin 29,0 mg/kg. Sữa chua sấy thăng hoa đạt các chỉ tiêu an toàn về vi sinh nằm trong mức cho phép theo TCVN 7030:2016 và phù hợp với thị hiếu người tiêu dùng, mức ưa thích đạt 4,1/5,0 điểm.

Từ khóa: Đông trùng hạ thảo, *Lactobacillus* spp., kháng oxy hóa, sấy thăng hoa, sữa chua.

MỞ ĐẦU

Sữa chua được biết đến không chỉ là món ăn ngon miệng mà còn mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe, cung cấp nguồn canxi dồi dào giúp duy trì sức khỏe của xương và răng. Đồng thời, sữa chua chứa hàng triệu lợi khuẩn giúp tăng cường hệ miễn dịch đường ruột, hỗ trợ hệ tiêu hóa và hỗ trợ giảm các nguy cơ mắc nhiều bệnh bao gồm cả béo phì (Ashraf *et al.*, 2022). Người tiêu dùng ngày càng nhận thức về giá trị và đẩy mạnh tiêu thụ sản phẩm bổ dưỡng này. Theo Statista thống kê năm 2023, doanh thu thị trường sữa chua toàn cầu đang trên đà tăng trưởng và dự kiến đạt 181,3 tỷ USD vào năm 2024. Nhu cầu gia tăng đã đặt ra nhiều cuộc cạnh tranh giữa các nhà sản xuất về hương vị, kết cấu, công dụng và chất lượng sản phẩm.

Mặt khác, công nghệ sấy thăng hoa là công nghệ tiên tiến được ứng dụng rộng rãi trong ngành thực phẩm những năm gần đây. Quá trình sấy thăng hoa bao gồm 3 bước: làm đông lạnh, sấy sơ cấp và sấy thứ cấp. Đầu tiên nguyên liệu được đông lạnh khi đông băng hoàn toàn, sau đó giảm áp suất môi trường xuống mức phù hợp và bắt đầu nâng nhiệt (-30°C đến 35 - 40°C). Giữ nguyên áp suất - nhiệt độ (35 - 40°C) sẽ tạo ra chênh lệch áp suất rất lớn trong lòng vật liệu sấy và qua đó hình thành dòng ẩm chuyển động từ trong lòng vật liệu sấy ra ngoài bề mặt (Nguyễn Tấn Dũng, 2016). Sấy thăng hoa giúp bảo quản các thành phần không bền với nhiệt (protein, hương vị và màu sắc), vẫn giữ được hình dạng và kích thước ban đầu. Trong khi sấy nhiệt thông thường sử dụng nhiệt độ cao làm thay đổi cấu trúc bên ngoài, đồng thời biến tính các thành phần dinh dưỡng quan trọng như enzyme. Đối với sữa chua sấy thăng hoa, không chỉ lưu giữ được các thành phần dinh dưỡng quan trọng và vi khuẩn có lợi, mà còn nâng cao vị giác. Ngoài ra, sản phẩm có thời gian bảo quản dài và người tiêu dùng không phải lo lắng về nhiệt độ bảo quản. Sữa chua thường được lên men bởi các chủng *Lactobacillus bulgaricus* và *Lactobacillus casei*, gần đây các chủng tiềm năng khác như *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* đang được nghiên cứu, ứng dụng rộng rãi hơn trong sản xuất thực phẩm (Gholamhosseinpour *et al.*, 2024). Xu hướng thị trường ngày càng chú trọng độ an toàn và ưa chuộng các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên đã thúc đẩy việc bổ sung các thành phần như đông trùng hạ thảo vào sữa chua.

Đông trùng hạ thảo được coi là dược liệu quý trong quan niệm của người châu Á, thường được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền phương Đông. Nấm đông trùng hạ thảo được đánh giá cao về giá trị dược liệu vì chứa các hợp chất như cordycepin, adenosine, có hoạt tính kháng oxy hóa, chống lão hóa, tính kháng viêm và khả năng kháng ung thư (Yu *et al.*, 2016). Hơn nữa, nhiều hợp chất sinh học có giá trị cao như cordycepin, ergosterol, myriocin, polysaccharides và vitamin tổng hợp đã được tách chiết và ứng dụng rộng rãi.

Nhằm mục đích mang lại trải nghiệm cho người tiêu dùng về sản phẩm sữa chua dạng sậy, tăng giá trị sản phẩm sữa. Đồng thời, nhận thấy lợi ích đông trùng hạ thảo mang lại và tiềm năng ứng dụng các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. trong chế biến thực phẩm. Từ những thực tiễn trên, đề tài “Ứng dụng công nghệ sấy thăng hoa sản phẩm sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo lên men bởi vi khuẩn *Lactobacillus* spp.” được tiến hành nghiên cứu. Sản phẩm sữa chua sấy thăng hoa bổ sung đông trùng hạ thảo sẽ có giá trị dinh dưỡng hơn các loại sữa chua khác chế biến từ sữa bò, tạo ra hương vị đặc trưng riêng và góp phần duy trì sức hút của sản phẩm sữa chua trên thị trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các chủng vi sinh vật: *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, nấm men (*Candida albicans*), nấm mốc (*Aspergillus oryzae*) được lưu trữ trong ống stock glycerol 20% tại Phòng Vi sinh Ứng dụng - Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) được cung cấp bởi công ty TNHH Bio Nông Lâm.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát khả năng sinh acid lactic của vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Phương pháp định tính khả năng phân giải $CaCO_3$ trên đĩa thạch (Nguyễn Ngọc Thạch *et al.*, 2015): các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. thuần được nuôi cấy tăng sinh trong 50 mL môi trường MRS ở 37°C trong 24 giờ. Hút 40 μ l dịch khuẩn nhỏ vào giếng đã tạo sẵn trên đĩa môi trường MRS agar (có bổ sung 1% $CaCO_3$, mỗi đĩa 3 giếng và ủ ở 37°C trong 48 giờ). Đo đường kính vòng phân giải $CaCO_3$ trên đĩa thạch. Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức: $Df = ((D_1 + D_2 + D_3) - 3d)/3$. Trong đó: D là đường kính vòng $CaCO_3$ bị phân giải trên đĩa; d là đường kính lỗ giếng và Df: đường kính vòng phân giải (cm).

Định lượng khả năng sinh acid lactic bằng phương pháp chuẩn độ Therner (Phạm Thị Kim Thảo *et al.*, 2018). Sau khi tăng sinh, ly tâm thu 10 mL dịch nổi bổ sung 20 mL nước cất vô trùng và 1 - 2 giọt phenolphthalein (nồng độ 1% trong cồn 96°). Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì dừng lại. Công thức tính độ acid: $^{\circ}T = V_{NaOH} \text{ tiêu tốn} \times 10$, % acid lactic = $^{\circ}T \times 0,009$. Trong đó: $^{\circ}T$ là độ Therner ($1^{\circ}T$ tương ứng với 9 mg acid lactic); 10: số mL dịch nuôi cấy dùng chuẩn độ.

Đánh giá đặc tính sinh học của sữa chua bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus* spp. và đông trùng hạ thảo

Ủ tăng sinh vi khuẩn *Lactobacillus* spp.: Tăng sinh *Lactobacillus* spp. trong môi trường MRS lỏng ở 37°C. Theo dõi mật số *Lactobacillus* spp. sau các thời gian ủ tăng sinh 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015).

Phương pháp chuẩn bị sữa chua cái: sữa tươi vinamilk (50%), sữa đặc (25%), nước (25%), gelatin 0,3% (w/v). Thanh trùng hỗn hợp dịch sữa ở 85°C trong 15 phút và làm nguội đến nhiệt độ 43°C (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015). Giống vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được tăng sinh, ly tâm dịch tăng sinh khuẩn 6000 vòng/phút trong 5 phút. Thêm nước cất từ 2 - 3 lần để loại bỏ hoàn toàn môi trường MRS, sinh khối thu được sẽ hoà với nước cất. Lên men cái lần 1: hút cho 1 mL dịch khuẩn vào 200 mL hỗn hợp dịch sữa. Lên men ở 37°C trong thời gian cho mật độ tốt nhất ở đến khi đạt lượng acid lactic đạt pH 4,6 (Nagaoka, 2019). Lên men cái lần 2: lấy 0,5% sữa chua cái lần 1 bổ sung vào 200 mL hỗn hợp dịch sữa. Lên men ở 37°C trong thời gian thí nghiệm ở lên men cái lần 1, sau đó bảo quản ở tủ mát 4°C.

Khảo sát cảm quan người tiêu dùng đối với hàm lượng đông trùng hạ thảo bổ sung vào sữa chua (Hà Duyên Tư, 2010): men cái lần 2 sẽ được phối trộn (tỷ lệ phối trộn 0,5% và 1%) cùng hỗn hợp dịch sữa và sữa chua cái thương mại (10%). Đông trùng hạ thảo được xay nhuyễn, hấp cách thuỷ và bổ sung theo tỷ lệ 0,1%; 0,3%; 0,5% vào sữa chua lên men. Đánh giá cảm quan sản phẩm dựa trên thang Hedonic 9 điểm, bao gồm màu sắc, vị, mùi hương và trạng thái.

Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh đường ruột của sữa chua: sữa chua được chọn sau đánh giá cảm quan sẽ pha trong nước cất vô trùng ở nồng độ 0,5 g/mL. Ngâm đĩa giấy whatman (6mm) trong dung dịch mẫu đã pha và kháng sinh. Hơ nóng đồ kẹp gấp rồi để nguội, gấp các đĩa giấy đặt lên môi trường thạch LB đã cấy trang chủng vi khuẩn bệnh *E. coli*, *Salmonella* spp.. Sau đó ủ 37°C trong 24 giờ, thực hiện thí nghiệm lặp lại 3 lần. Đọc kết quả và xác định đường kính kháng khuẩn. Đường kính vòng vô trùng $D < 1$ mm không kháng, đường kính vòng vô trùng $1 \text{ mm} \leq D < 5$ mm kháng yếu, đường kính vòng vô trùng $6 \text{ mm} \leq D < 10$ mm kháng trung bình, đường kính vòng vô trùng $D \geq 10$ kháng mạnh.

Khảo sát khả năng chống oxy hóa: phương pháp thử nghiệm gốc tự do DPPH (1,1 – Diphenyl – 2 picrylhydrazyl) (Júnior *et al.*, 2023). Sữa chua hoà tan vào ethanol đến nồng độ 100 mg/mL, ly tâm thu dịch. Bổ sung 1 mL dung dịch DPPH (0,1 mM, pha trong ethanol 99,5%) vào ống nghiệm chứa 4 mL dung dịch sữa chua ở các nồng độ 5 mg/mL, 10 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL và 25 mg/mL. Ủ trong vòng 30 phút ở điều kiện không có ánh sáng, tiến hành đo mật độ quang OD ở bước sóng 517 nm. Tính phần trăm bắt gốc tự do được tính theo công thức:

$$SA_{DPPH} (\%) = ((1 - Abs \text{ mẫu}) / Abs \text{ đối chứng}) \times 100$$

Trong đó: $SA_{DPPH} (\%)$ là tỷ lệ bắt gốc tự do (Scavenging Activity) của mẫu nghiên cứu; Abs mẫu là mật độ quang của mẫu khảo sát; Abs đối chứng là mật độ quang của dung dịch DPPH.

Ứng dụng công nghệ sấy thăng hoa tạo viên sữa chua

Mẫu sữa chua bổ sung đồng trùng hạ thảo sẽ được cho vào khuôn tạo viên vuông, viên trái tim và viên hình sao. Sau đó sẽ được đưa vào buồng máy sấy thăng hoa được cấp đông ở - 30°C trong 90 phút để đông băng sữa chua hoàn toàn. Máy sấy thăng hoa tạo môi trường chân không trong buồng sấy bằng cách giảm áp suất về dưới 500 mTorr trong 45 phút. Tiến hành sấy thăng hoa ở nhiệt độ 40°C. Thí nghiệm được thiết kế khảo sát nhiệt độ sấy khan 40°C, 43°C, 45°C, 50°C để thu nhận sản phẩm sữa chua ở trạng thái rắn. Chỉ tiêu theo dõi là mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. và xác định tỷ lệ nước trong sữa chua ban đầu biểu thị bằng (%) theo khối lượng.

Các chỉ tiêu vi sinh vật trong sữa chua: theo quy định Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7030:2016 về Sữa lên men (năm 2016).

Bảng 1. Giới hạn vi sinh vật trong sản phẩm

Chỉ tiêu	Giới hạn	
	Sữa lên men	Sữa chua, sữa chua dùng chủng thay thế, sữa acidophilus
<i>E. coli</i>	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử
<i>Salmonella</i> spp.	Không phát hiện trong 25 mL hoặc 25 g mẫu thử	Không phát hiện trong 25 mL hoặc 25 g mẫu thử
<i>Coliforms</i>	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử
<i>S. aureus</i>	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử
Nấm men, nấm mốc	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử	Không phát hiện trong 1 mL hoặc 1 g mẫu thử

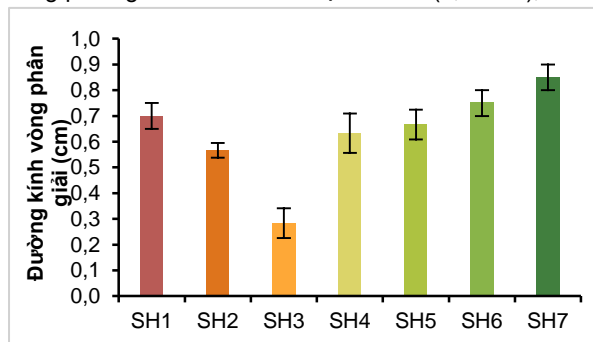
Xác định hàm lượng hoạt chất trong sữa chua: sữa chua bổ sung đồng trùng hạ thảo sẽ được phân tích 2 hoạt chất cordycepin và adenosine bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Mẫu sẽ được gửi cho công ty cổ phần công nghệ Vietlabs phân tích theo phương pháp thử VLAB-CH-TP-687:2022.

Khảo sát thị hiếu người tiêu dùng (Hà Duyên Tư, 2010): sản phẩm được đánh giá cảm quan dựa trên thang Hedonic 9 điểm: đánh giá về cấu trúc (giòn, xốp) màu sắc, vị ngọt hoặc vị chua, mùi hương, hình dạng (hình khối vuông). Đồng thời, khảo sát thị hiếu 60 người tiêu dùng ưa thích sản phẩm của 3 nhóm độ tuổi (10 - 16; 17 - 25; 26 trở lên).

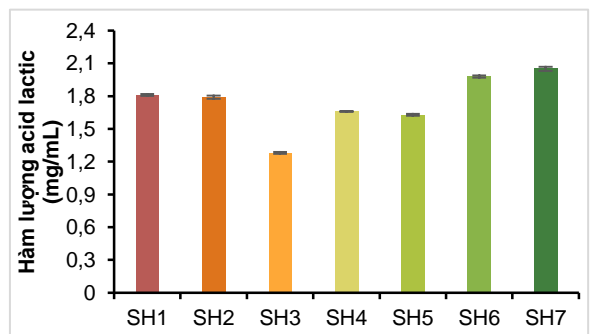
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát khả năng sinh acid lactic của vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Sau 48 giờ ủ, tất cả các chủng đều có khả năng sinh acid và phân giải CaCO₃ trên đĩa thạch. Kết quả chủng có vòng phân giải lớn nhất lần lượt là SH7 (0,85 cm), SH6 (0,75 cm), SH1 (0,7 cm).



Hình 1. Khả năng sinh acid lactic các chủng



Hình 2. Hàm lượng sinh acid lactic các chủng

Trên cơ sở kết quả định tính khả năng sinh acid lactic, tiến hành định lượng acid lactic cho kết quả các chủng SH7, SH6, SH1 có hàm lượng acid lactic sinh ra cao nhất lần lượt là 2,04 mg/mL, 1,98 mg/mL và 1,81 mg/mL. Kết quả ghi nhận ở cùng 48 giờ tăng sinh tương đồng với nghiên cứu của Phạm Thị Kim Thảo và đồng tác giả (2018) (Phạm Thị Kim Thảo *et al.*, 2018). Trong quá trình sinh trưởng, *Lactobacillus* spp. chuyển hóa đường thành acid lactic thông qua con đường Embden - Meyerhof - Parnas (EMP). Ngoài ra, *Lactobacillus* còn sản xuất acid lactic theo con đường pentose - phosphate oxy hóa (PPO) (lên men dị hình). Như vậy, các chủng SH1, SH6, SH7 có tiềm năng ứng dụng cao trong lên men.

Đánh giá đặc tính sinh học của sữa chua bổ sung *Lactobacillus* spp. và đông trùng hạ thảo

Ủ tăng sinh vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Sau 24 giờ tăng sinh ở nhiệt độ 37°C các chủng SH1, SH6, SH7 đạt mật số cao nhất lần lượt là $5,27 \times 10^9$ CFU/mL; $6,7 \times 10^9$ CFU/mL; $8,8 \times 10^{10}$ CFU/mL (bảng 2). Kết quả mật độ tế bào vi khuẩn tăng sinh ở 24 giờ cao hơn so với các thời điểm 16 giờ, 48 giờ, 72 giờ. Nghiên cứu của Đoàn Anh Dũng và đồng tác giả (2015) cũng cho thấy tăng sinh *L. plantarum* đạt mật số cao nhất ở 24 giờ (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015). Như vậy, ủ tăng sinh 24 giờ ở 37°C là phù hợp để thu sinh khối vi khuẩn lên men sữa.

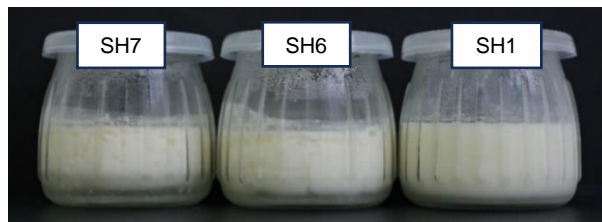
Bảng 2. Mật độ tế bào các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. chọn lọc

Ký hiệu chủng	Mật độ khuẩn (Log10 CFU/mL)			
	16 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
SH1	9,09 ^b ± 0,00	9,72 ^a ± 0,06	8,18 ^c ± 0,03	7,22 ^d ± 0,01
SH6	9,29 ^b ± 0,02	9,83 ^a ± 0,02	7,76 ^c ± 0,05	7,17 ^d ± 0,01
SH7	9,91 ^b ± 0,01	10,94 ^a ± 0,02	8,61 ^c ± 0,05	6,92 ^d ± 0,02

Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% ($\alpha = 0,05$).

Lên men sữa chua cái

Khi bổ sung khuẩn *Lactobacillus* spp. tỷ lệ 0,5% và 1% lên men cùng sữa chua cái thương mại cho kết quả sữa chua bổ sung chủng SH1 sau 12 giờ lên men có khả năng tạo thành khối đặc, mịn, không tách nước. Tuy nhiên, ở tỷ lệ 1% chủng SH1 sữa chua bị tách nước nhẹ do sự gia tăng mật số của SH1 nhanh hơn sữa chua cái thương mại. Hàm lượng acid lactic trong sữa chua đạt pH 4,6 thì sữa đông tụ tạo khối (Nagaoka, 2019) nhưng *L. plantarum* (SH1) chuyển hóa acid lactic theo con đường pentose - phosphate nên acid lactic sinh ra chỉ đạt 50%, kèm theo ethanol sinh ra ảnh hưởng đến mùi hương và tách nước. Bên cạnh đó, *L. bulgaricus* làm chủ quá trình lên men khi sữa chua đạt pH 4,2 - 4,4; sản sinh acid lactic theo con đường EMP (acid lactic chiếm 90% sản phẩm sinh ra), giảm pH xuống 4,5 - 4,6 và sữa đông tụ. Theo nghiên cứu của Đoàn Anh Dũng và đồng tác giả (2015) với tỷ lệ 6% chủng *L. plantarum* kết hợp cùng men khô thương mại cho độ cứng sản phẩm tốt, nhưng bổ sung 8% thì độ cứng giảm (Đoàn Anh Dũng *et al.*, 2015). Vì vậy, tỷ lệ bổ sung chủng vi khuẩn SH1 (*L. plantarum*) ở 0,5% là phù hợp để tạo sản phẩm sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo.

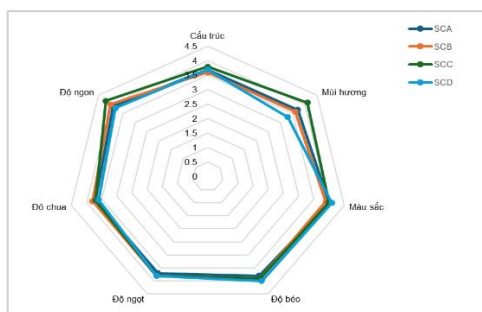


Hình 3. Lên men cái với tỷ lệ khuẩn *Lactobacillus* spp. 0,5%

Khảo sát cảm quan người tiêu dùng đối với hàm lượng đông trùng hạ thảo bổ sung vào sữa chua

Sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo theo các tỷ lệ có màu vàng nhạt ở tỷ lệ 0,5%, cấu trúc dạng gel sệt, mịn và mùi hương dễ chịu. Mức độ ưa thích sản phẩm được khảo sát với sự tham gia 60 người tiêu dùng đánh giá 7 thuộc tính, sữa chua bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo (SCC) được người tiêu dùng ưa thích ở tất cả các thuộc tính (độ ngon đạt 4,2 điểm),

kế đến là sữa chua bổ sung 0,1% đông trùng hạ thảo, xếp sau cùng là sữa chua bổ sung 0,5% đông trùng hạ thảo (Hình 4).



Hình 4. Cảm quan người tiêu dùng về sữa chua

Bảng 3. Mức độ ưa thích sản phẩm theo giới tính

Sản phẩm	Nam	Nữ
SCA*	3,9 ± 0,81	3,9 ± 0,76
SCB*	4,0 ± 0,72	3,9 ± 0,74
SCC*	4,3 ± 0,69	4,1 ± 0,66
SCD*	4,0 ± 0,64	3,8 ± 0,7

* SCA sữa chua không bổ sung đồng trùng hạ thảo.

* SCB sữa chua bổ sung 0,1% đồng trùng hạ thảo.

* SCC sữa chua bổ sung 0,3% đồng trùng hạ thảo.

* SCD sữa chua bổ sung 0,5% đồng trùng hạ thảo.

Xét ở giới tính, sự khác biệt mức ưa thích sản phẩm không khác biệt đối với 4 sản phẩm sữa chua (nam chiếm 37% tổng số người tiêu dùng). Dựa vào bảng 3 và hình 4, cho thấy tất cả người tiêu dùng đều ưa chuộng mẫu sữa chua bổ sung đồng trùng hạ thảo 0,3% và không khác biệt độ ưa thích về giới tính.

Khả năng kháng vi sinh vật gây bệnh đường ruột của sữa chua

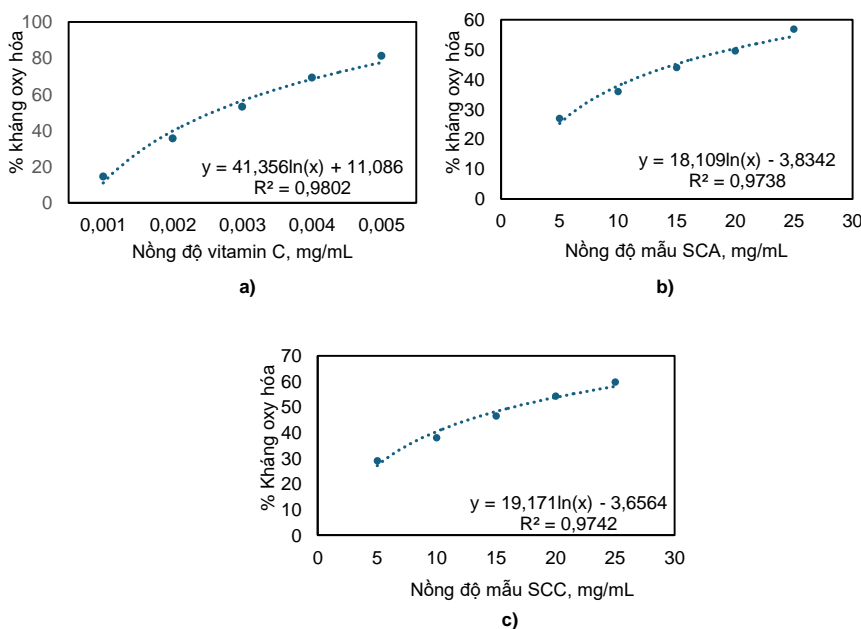
Khảo sát khả năng kháng khuẩn của sữa chua bổ sung 0,3% đồng trùng hạ thảo thực hiện trên 2 chủng vi khuẩn là *E. coli* và *Salmonella* spp. cho kết quả hoạt tính kháng khuẩn của sữa chua không hiệu quả đối với việc ức chế 2 chủng vi sinh vật đã thử nghiệm (bảng 4). Gholamhosseinpour và đồng tác giả (2024) khi thực hiện thêm *E. coli* ở mật độ $1,2 \times 10^4$ - $1,6 \times 10^6$ CFU/mL vào sữa và ủ cùng *L. plantarum*. Sau 8 giờ lên men (40°C) mật số vi khuẩn *E. coli* giảm đáng kể. Sữa chua không chỉ chứa hàm lượng acid lactic cao, mà còn chứa một số chất chuyển hóa khác (bacteriocin, diacetyl) cũng tham gia kháng khuẩn (Gholamhosseinpour et al., 2024). Do đó cần thực hiện thí nghiệm để khảo sát thêm về khả năng này khi bổ sung thêm đồng trùng hạ thảo và chủng *L. plantarum*.

Bảng 4. Vòng kháng vi sinh vật của sữa chua đồng trùng hạ thảo

VSV	Đường kính trung bình (mm)	Kết luận
<i>E. coli</i>	6,00 ± 0,00	Không kháng
<i>Salmonella</i> spp.	6,00 ± 0,00	Không kháng

Khảo sát khả năng chống oxy hóa

Khả năng kháng oxy hóa bằng xác định bằng giá trị IC₅₀, kết quả cho giá trị IC₅₀ của sữa chua là 19,55 mg/mL chứng tỏ sữa chua có khả năng chống oxy hóa (hình 5). Khả năng chống oxy của sữa chua có được nhờ quá trình thủy phân các thành phần sữa của vi khuẩn *Lactobacillus* spp..



Hình 5. Đồ thị biểu diễn % kháng oxy hóa của vitamin C và mẫu sữa chua

(a) Vitamin C, (b) Sữa chua (SCA), (c) Sữa chua bổ sung 0,3% đồng trùng hạ thảo (SCC).

Khi bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo, sữa chua có giá trị IC₅₀ giảm xuống còn 16,43 mg/mL. Đồng thời, giá trị IC₅₀ của vitamin C là 2,56 µg/mL, đây là một chất oxy hóa mạnh, vì vậy giá trị IC₅₀ càng thấp thì khả năng kháng oxy hóa càng mạnh. Ở nghiên cứu của Lê Thị Lan Thảo (2023), khi bổ sung 9% bột đông trùng hạ thảo vào viên hoàn kết hợp với nghệ vàng đã thể hiện khả năng chống oxy hóa cao nhất có giá trị IC₅₀ bằng 6,1 mg/mL (Lê Thị Lan Thảo, 2023). Kết quả trên chỉ ra đông trùng hạ thảo đã bổ sung thêm một số hoạt chất chống oxy hóa như cordycepin và polysaccharide cho sữa chua, từ đó ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm và giúp nâng cao giá trị kinh tế của sản phẩm sữa chua.

Ứng dụng công nghệ sấy thăng hoa tạo viên sữa chua

Mật độ vi khuẩn sau sấy thăng hoa

Khối lượng sữa chua trước khi sấy thăng hoa là 620 g và sau khi sấy thu lại được 316 g. Như vậy, hàm lượng nước trong sữa chua ban đầu chiếm 49% tổng khối lượng. Sau khi lên men sữa chua, mật số vi sinh đạt 1,1 x 10⁸ CFU/mL. Tiến hành khảo sát sấy thăng hoa ở nhiệt độ sấy khan 40°C, 43°C, 45°C, 50°C để thu nhận sản phẩm sữa chua ở dạng viên.

Bảng 5. Mật số vi khuẩn sau sấy thăng hoa

Nhiệt độ sấy	Mật độ vi khuẩn (Log10 CFU/g)
40°C	7,25 ^a ± 0,55
43°C	7,23 ^a ± 0,55
45°C	7,12 ^a ± 0,55
50°C	5,53 ^b ± 0,03

Bảng 6. Các chỉ tiêu vi sinh vật trong sữa chua sấy

Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả
<i>E. coli</i>	CFU/g	Không phát hiện
<i>Salmonella</i> spp.	CFU/25g	Không phát hiện
<i>Coliforms</i>	CFU/g	Không phát hiện
<i>S.aureus</i>	CFU/g	Không phát hiện
Nấm men, nấm mốc	CFU/g	Không phát hiện

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% (α = 0,05).

Mật độ vi khuẩn của sữa chua sau khi sấy không chênh lệch nhiều đối với nhiệt độ 40°C, 43°C, 45°C (1,7 x 10⁷ CFU/g, 1,6 x 10⁷ CFU/g, 1,3 x 10⁷ CFU/g) và đáp ứng tiêu chí mật độ khuẩn có lợi ít nhất đạt 10⁷ (Castellone et al., 2021). Vậy nhiệt độ sấy khan ở 45°C là phù hợp nhất khi vẫn giữ mật độ vi sinh đạt 10⁷ và thời gian sấy ngắn hơn so với ở nhiệt độ 40 - 43°C. Dựa kết quả bảng 6 cho thấy các vi sinh vật gây bệnh và hư hỏng cho sản phẩm đều không hiện diện trong sữa chua sấy, điều này đảm bảo an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng.

Hàm lượng hoạt chất trong sữa chua

Đông trùng hạ thảo ban đầu chứa 3190 mg/kg adenosine và 5507 mg/kg cordycepin, khi bổ sung 0,3% vào sữa chua thì hàm lượng adenosine xấp xỉ 10 mg/kg và 17 mg/kg cordycepin. Sau sấy thăng hoa khối lượng sản phẩm còn lại 51%, nên sữa chua sấy theo lý thuyết sẽ khoảng 20 mg/kg adenosine và 33 mg/kg cordycepin. Thực tế, kết quả phân tích hàm lượng cordycepin và adenosine trong sữa chua sấy lần lượt là 29,0 mg/kg và 23,9 mg/kg. Như vậy, hiệu suất của quá trình phân tích thì hàm lượng adenosine là 115% và cordycepin là 88%. Kết quả cho thấy, không có sự hao hụt đáng kể hai hoạt chất trên trong quá trình lên men và sấy thăng hoa sữa chua. Do vậy, việc bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo vào sữa chua sấy đã giúp tăng thành phần hoạt chất tốt cho người sử dụng, tăng giá trị dinh dưỡng cho sản phẩm.

Khảo sát thị hiếu người tiêu dùng:

Khảo sát thị hiếu được thực hiện tại Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM với sự tham gia của 60 người tiêu dùng. Mức độ ưa thích của người tiêu dùng đối với 2 mẫu sữa chua có sự khác biệt (Bảng 7). Sản phẩm sữa chua sấy bổ sung 0,3% đông trùng hạ thảo được chấp nhận nhiều nhất với mức ưa thích đạt 4,08 điểm (tương ứng với mức thích sản phẩm).

Bảng 7. Thị hiếu người tiêu dùng với sữa chua sấy

Sản phẩm	Thuộc tính				
	Cấu trúc	Hình dạng	Mùi hương	Vị	Mức ưa thích
Sản phẩm bổ sung ĐTHT	4,10 ^a ± 0,78	3,70 ^a ± 0,7	4,02 ^a ± 0,85	4,50 ^a ± 0,68	4,08 ^a ± 0,44
Sản phẩm thương mại	3,87 ^a ± 0,7	3,47 ^b ± 0,57	3,35 ^b ± 0,6	3,83 ^b ± 0,74	3,63 ^b ± 0,43

Trong cùng một cột, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% (α = 0,05). ĐTHT: Đông trùng hạ thảo.

Bảng 8. Mức ưa thích sữa chua sấy theo độ tuổi

Sản phẩm	10 - 16 tuổi	17 - 25 tuổi	26 tuổi trở lên
Sản phẩm bổ sung ĐTHT	4,16 ^a ± 0,46	4,08 ^a ± 0,47	4,00 ^a ± 0,39
Sản phẩm thương mại	3,65 ^a ± 0,34	3,63 ^a ± 0,54	3,61 ^a ± 0,39

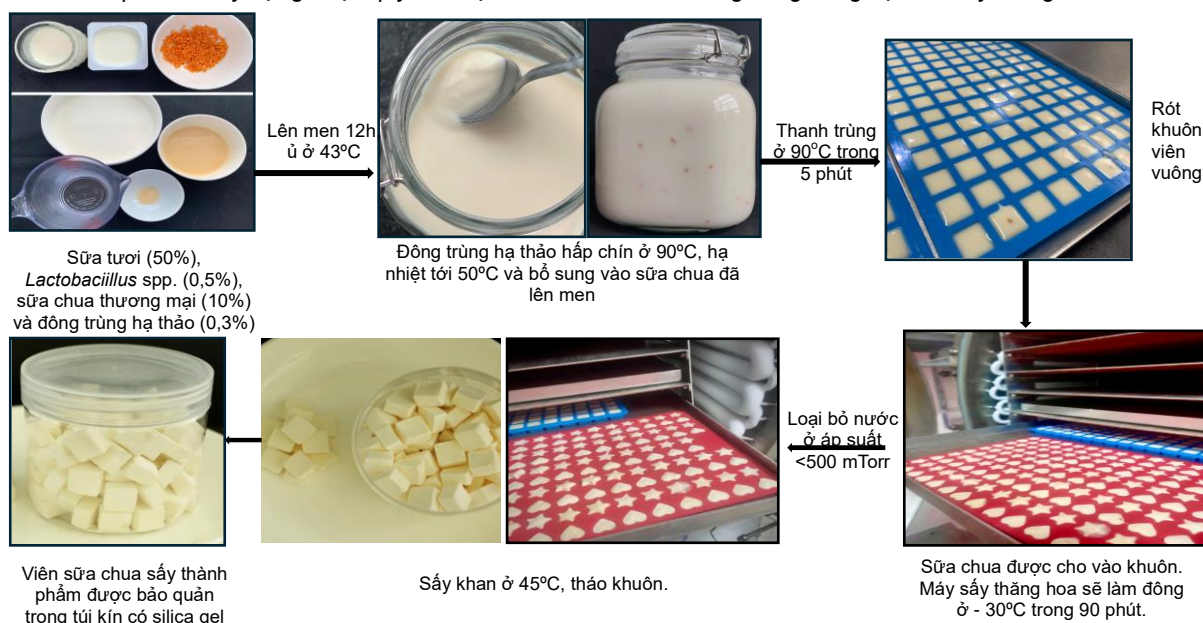
Bảng 9. Mức ưa thích sữa chua sấy theo giới tính

Sản phẩm	Nam	Nữ
Sản phẩm bổ sung ĐTHT	4,03 ± 0,37	4,10 ± 0,47
Sản phẩm thương mại	3,76 ± 0,39	3,55 ± 0,43

Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức khảo sát ở độ tin cậy 95% ($\alpha = 0,05$).

Đối với khía cạnh độ tuổi, mức ưa thích sản phẩm sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo không chênh lệch nhiều, tuy nhiên ở độ tuổi 10 - 16 tuổi vẫn ưa chuộng sản phẩm nhất (4,16 điểm). Kết quả mức ưa thích sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo theo giới tính không có sự khác biệt nhiều, về sản phẩm thương mại thì nam ưa thích hơn so với nữ (nam chiếm 36,7%). Vậy sản phẩm sữa chua sấy bổ sung đông trùng hạ thảo phù hợp thị hiếu với đa số người tiêu dùng, cả nam và nữ đều ưa thích sản phẩm bao gồm các độ tuổi khác nhau.

Từ các kết quả trên xây dựng được quy trình tạo viên sữa chua bổ sung đông trùng hạ thảo sấy thăng hoa như sau:



Hình 6. Quy trình tạo viên sữa chua sấy thăng hoa bổ sung đông trùng hạ thảo

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên cho thấy sữa chua được bổ sung đông trùng hạ thảo (0,3%) và chủng *L. plantarum* cho chất lượng sản phẩm tốt, ổn định, tạo khối sữa chua dẻo mịn, chất lượng cảm quan cao (4,2 điểm) với điều kiện thời gian ủ tăng sinh khuẩn thích hợp lên men sữa ở 24 giờ ($5,27 \times 10^7$ CFU/mL); bổ sung giống *L. plantarum* tỷ lệ 0,5% với sữa chua cái thương mại là 10%. Sản phẩm sữa chua sấy thăng hoa nguyên vẹn, không bị vỡ, mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. đạt $1,3 \times 10^7$ CFU/g ở nhiệt độ sấy khan 45°C. Bên cạnh đó, sữa chua sấy chứa hàm lượng cordycepin và adenosine lần lượt là 29,0 mg/kg và 23,9 mg/kg; cũng như tăng khả năng chống oxy hóa (IC₅₀ đạt 16,43 mg/mL). Như vậy, sữa chua sấy bổ sung đông trùng hạ thảo phù hợp thị hiếu người tiêu dùng, làm phong phú thêm sản phẩm sữa chua hiện có và nâng cao giá trị dinh dưỡng của sữa chua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashraf SA, Elkhailifa AEO, Ahmad MF, Patel M, Adnan M, Sulieman AME (2022). Probiotic Fermented Foods and Health Promotion. *African Fermented Food Products - New Trends*, Springer, 59 - 88.
- Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B (2021). Eating fermented: Health benefits of LAB-fermented foods. *Foods*, 10: 26 - 39.
- Đoàn Anh Dũng, Nguyễn Công Hà, Lý Nguyên Bình, Lê Nguyễn Đoàn Duy (2015). Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn probiotic *Lactobacillus plantarum* trong chế biến sữa chua. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 36: 14-20.

- Gholamhosseinpour A, Hashemi SMB, Safari F, Kerboua K (2024). Impact of ultrasonicated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactiplantibacillus plantarum* AF1 on the safety and bioactive properties of stirred yoghurt during storage. *Ultrasonics sonochemistry*, 102: 106 - 726.
- Hà Duyên Tư (2010). *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Júnior MES, Araújo MVRL, Martins ACS, Lima MS, Silva FLHD, Converti A, Maciel MIS (2023). Microencapsulation by spray-drying and freeze-drying of extract of phenolic compounds obtained from ciriguela peel. *Scientific Reports*, 13(1): 15222.
- Lê Thị Lan Thảo (2023). Nghiên cứu công thức tạo viên hoàn kết hợp nghệ vàng (*Curcuma longa*) và đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*). Khóa luận tốt nghiệp. *Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*.
- Nagaoka S (2019). Yogurt Production. Kanauchi M, Eds. *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols*, 45 - 54.
- Nguyễn Ngọc Thạch, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Thị Việt Trinh, Huỳnh Thị Thu Ba, Bùi Hoàng Đăng Long, Ngô Thị Phương Dung (2015). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic ứng dụng trong lên men sữa chua bổ sung tảo Spirulina. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, (40): 8-14.
- Nguyễn Tấn Dũng (2016). Quá trình và thiết bị công nghệ hóa học và thực phẩm: Kỹ thuật và công nghệ sấy thăng hoa. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- Phạm Thị Kim Thảo, Nguyễn Thị Anh Tú, Lê Lý Thùy Trâm, 2018. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic ứng dụng ủ chua bã đậu nành làm thức ăn chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 1: 81 - 122
- Shahbandeh M (2023). Global yogurt industry market revenue forecast 2018 - 2028. *Statista*, 870893.
- TCVN 7030:2016 (2016). Sữa lên men. Bộ Khoa học và Công nghệ.
- Yu LJ, Feng CP, Li X, Chang MC, Meng JL, Xu LJ (2016). Immunomodulatory and antioxidative activity of *Cordyceps militaris* polysaccharides in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 594 - 598.

APPLICATION OF FREEZE-DRYING TECHNOLOGY PRODUCTS DRIED YOGURT SUPPLEMENTED WITH *Cordyceps militaris* FERMENTED BY *Lactobacillus* spp.

Vo Song Huong¹, Truong Phuoc Thien Hoang², Vo Tran Quoc Thang²,
Le Ho Thanh Thao¹, Le Phuoc Tho^{3*}

¹Department of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Institute of Biotechnology and Environmental Research, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Bio Nong Lam Company Limited, Ho Chi Minh City, Vietnam

SUMMARY

The bacterial strains *Lactobacillus* spp. and *Cordyceps militaris* are added to the yogurt fermentation process to enhance its value and benefits. The freeze-drying technology is also applied to create new states for yogurt, aiming to bring a novel experience to consumers. Surveying the lactic acid production ability of 7 strains of *Lactobacillus* spp. (designated from SH1 to SH7) shows that strains SH1, SH6, and SH7 exhibit high lactic acid production capabilities with concentrations of 2.04 mg/mL, 1.98 mg/mL, and 2.19 mg/mL, respectively. These strains are identified as *Lactobacillus plantarum* through molecular biological identification. The strains SH1, SH6, and SH7 were cultured in MRS broth, and after 24 hours, their respective high cell counts were 5.27×10^9 CFU/mL, 6.7×10^9 CFU/mL, and 8.8×10^{10} CFU/mL. Subsequently, these 3 *Lactobacillus* spp. strains were fermented (at 0.5% and 1% ratios) with commercial yogurt and supplemented with *Cordyceps militaris* (0.1 - 0.5%). Results showed that SH1 produced smooth yogurt with a gel - like texture at the 0.5% supplementation ratio after 12 hours of fermentation. Sensory evaluation preferred yogurt supplemented with 0.3% *Cordyceps militaris*, scoring 4.2 points (based on aroma, taste, texture, and color). Biological characterization of the yogurt indicated antioxidant activity with an IC₅₀ value of 16.43 mg/mL and showed no inhibitory effects against *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.. The yogurt is frozen at - 30°C, freeze-dried at 40°C under vacuum pressure below 500 mTorr, and then further dried at 45°C, resulting in a bacterial count of *Lactobacillus* spp. at 1.3×10^7 CFU/g, with adenosine content of 23.9 mg/kg and cordycepin content of 29.0 mg/kg. The freeze-dried yogurt met safety standards for microbiological criteria according to TCVN 7030:2016 and was well-received by consumers, achieving a preference score of 4.1 out of 5.

Keywords: Antioxidant, *Cordyceps militaris*, freeze-drying, *Lactobacillus* spp., yogurt.

* Author for correspondence: Tel: 0909575223; Email: phuoctho022010@gmail.com