

**ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

TRẦN THANH QUỲNH ANH

**KHAI THÁC MỘT SỐ TÍNH CHẤT CÓ LỢI CỦA VI KHUẨN
LACTIC, NẤM MEN *Saccharomyces cerevisiae* VÀ ỨNG DỤNG
TRONG CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ
NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
Ngành: Công nghệ thực phẩm**

HUẾ - 2026

Công trình hoàn thành tại: Trường Đại học Nông Lâm Huế, Đại học Huế

Người hướng dẫn: GS.TS. ĐỖ THỊ BÍCH THUY

PGS. TS. VÕ VĂN QUỐC BẢO

Phản biện 1:

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

Phản biện 2:

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

Phản biện 3:

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

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế họp tại:

.....

Vào hồi.....giờ....., ngàytháng.....năm 20.....

Có thể tìm thấy luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc Gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

**ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

TRẦN THANH QUỲNH ANH

**KHAI THÁC MỘT SỐ TÍNH CHẤT CÓ LỢI CỦA VI KHUẨN
LACTIC, NẤM MEN *Saccharomyces cerevisiae* VÀ ỨNG DỤNG
TRONG CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ
NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

Ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số: 9540101

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
GS. TS ĐỖ THỊ BÍCH THỦY
PGS. TS VÕ VĂN QUỐC BẢO**

HUẾ - 2026

CHƯƠNG 1: MỞ ĐẦU

1.1. Tính cấp thiết của đề tài

LAB từ lâu đã được sử dụng trong nhiều quy trình lên men thực phẩm truyền thống nhằm cải thiện hương vị, kéo dài thời gian bảo quản và tăng giá trị dinh dưỡng. Đặc biệt, nhiều loài LAB còn được công nhận là vi sinh vật an toàn (Generally Recognized As Safe, GRAS), có tiềm năng probiotic, và đã được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất thực phẩm chức năng và dược phẩm sinh học. Các tác động probiotic của LAB đối với sức khỏe con người đã được chứng minh trên nhiều phương diện: (i) Cân bằng hệ vi sinh đường ruột thông qua cạnh tranh bám dính với vi khuẩn gây bệnh và tiết bacteriocin; (ii) Điều hòa chuyển hóa lipid bằng cách làm giảm hấp thu cholesterol và triglyceride, từ đó góp phần phòng ngừa bệnh tim mạch; (iii) Kích thích đáp ứng miễn dịch niêm mạc nhờ tác động lên các tế bào miễn dịch ruột; và (iv) Ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh trong đường tiêu hóa. Một điểm đặc biệt đáng chú ý là nhiều loài LAB có khả năng sinh tổng hợp GABA - một amino acid phi protein có vai trò là chất dẫn truyền thần kinh ức chế chính trong hệ thần kinh trung ương. GABA tham gia vào cơ chế giảm căng thẳng, chống lo âu và cải thiện giấc ngủ.

Song song với LAB, nấm men *S. cerevisiae* là loài vi sinh vật đã gắn bó với đời sống con người từ hàng nghìn năm, được sử dụng rộng rãi trong sản xuất bia, rượu vang, bánh mì và nhiều sản phẩm lên men khác. Ngoài vai trò truyền thống, *S. cerevisiae* còn được đánh giá là có tiềm năng probiotic. Trong công nghiệp thực phẩm, chủng nấm men này vừa đảm nhận chức năng công nghệ (tạo ethanol, CO₂, các hợp chất hương vị) vừa mang lại lợi ích sức khỏe. Chính vì vậy, việc kết hợp LAB và *S. cerevisiae* trong quá trình đồng lên men (co-culture fermentation) được xem là một xu hướng mới đầy tiềm năng.

Từ những cơ sở nêu trên có thể thấy, việc nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và kết hợp LAB với nấm men *S. cerevisiae* nhằm tận dụng đồng thời các đặc tính probiotic, khả năng sinh GABA và các hợp chất có hoạt tính sinh học trong sản phẩm lên men và vai trò công nghệ trong quá trình lên men có ý nghĩa khoa học và thực tiễn sâu sắc. Đây không chỉ là bước đi cần thiết trong xu hướng phát triển thực phẩm bảo vệ sức khỏe và dược phẩm sinh học có nguồn gốc tự nhiên, mà còn là cơ sở để nâng cao giá trị nông sản Việt Nam, góp phần hiện đại hóa ngành công nghệ thực phẩm và hội nhập với xu hướng nghiên cứu quốc tế. Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: **“Khai thác một số tính chất có lợi của vi**

khuẩn lactic, nấm men Saccharomyces cerevisiae và ứng dụng trong công nghệ thực phẩm”.

1.2. Mục tiêu nghiên cứu

1.2.1. Mục tiêu tổng quát

Mục tiêu tổng quát của nghiên cứu là khai thác và ứng dụng các tính chất có lợi của LAB và nấm men *S. cerevisiae* nhằm phát triển các sản phẩm thực phẩm lên men giàu hợp chất có hoạt tính sinh học như polyphenol tổng số (Total phenolic compounds, TPC), GABA và tiềm năng probiotic tốt cho sức khỏe.

1.2.2. Mục tiêu cụ thể

Tuyển chọn chủng LAB phân lập từ măm rò và tôm chua Huế có tiềm năng probiotic, khả năng sinh GABA cao và *S. cerevisiae* từ bánh men lên men dịch ép thanh long đỏ sản xuất sản phẩm giàu hoạt tính sinh học tốt cho sức khỏe. Từ đó, ứng dụng các chủng *S. cerevisiae* để sản xuất dịch ép thanh long đỏ lên men có hoạt tính dược tính cao. Đồng thời, chủng LAB và *S. cerevisiae* tuyển chọn được kết hợp để lên men hỗn hợp dịch ép thanh long đỏ và sữa nhằm phát triển thành một sản phẩm lên men độc đáo đa chức năng tốt cho sức khỏe do có tính chất probiotic, chứa GABA và các hợp chất dược tính.

1.3. Ý nghĩa của luận án

1.3.1. Ý nghĩa khoa học

Những kết quả thu được sẽ góp phần hoàn thiện cơ sở dữ liệu khoa học về hệ vi sinh vật có ích trong công nghệ thực phẩm như sau:

- Phản ánh một phần về các loài LAB có mặt trong măm rò và tôm chua Huế cũng như tính chất về tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA của chúng.
- Khẳng định sự có mặt của chủng nấm men *S. cerevisiae* trong bánh men và khả năng lên men dịch ép thanh long đỏ của nó.
- Mở rộng hướng nghiên cứu ứng dụng kết hợp LAB và nấm men để lên men *in situ* trong phát triển thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

1.3.2. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả của nghiên cứu có thể được ứng dụng trực tiếp trong phát triển sản phẩm lên men kết hợp LAB và *S. cerevisiae* giàu GABA, lợi khuẩn probiotic và các hợp chất chống oxy hóa từ nguyên liệu trái cây nhiệt đới. Điều này không chỉ góp phần làm phong phú thị trường thực phẩm bảo vệ sức khỏe tại Việt Nam mà còn đáp ứng xu hướng tiêu dùng toàn cầu hướng đến các sản phẩm “tự nhiên - an toàn - tốt cho sức khỏe”. Việc sử dụng thanh long ruột đỏ làm nguyên liệu lên men còn mang

lại lợi ích kinh tế - xã hội thiết thực, giúp gia tăng giá trị nông sản, hạn chế tình trạng ứ đọng do mùa vụ và mở ra hướng khai thác bền vững cho ngành chế biến nông sản. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn có thể trở thành cơ sở để doanh nghiệp tham khảo trong đổi mới quy trình công nghệ, phát triển sản phẩm quy mô công nghiệp, từ đó góp phần nâng cao năng lực cạnh tranh của ngành công nghệ thực phẩm Việt Nam trong tiến trình hội nhập quốc tế.

1.4. Điểm mới của luận án

Những điểm mới của luận án:

- Đã xác định được các chủng LAB mới phân lập từ mứt rô Huế và khảo sát một cách có hệ thống tiềm năng probiotic cùng như khả năng sinh tổng hợp GABA của chúng. Đồng thời, chủng nấm men mới, *S. cerevisiae* M7, từ bánh men được tuyển chọn và định danh.

- Sử dụng chủng nấm men *S. cerevisiae* M7 để sản xuất sản phẩm mới là dịch thanh long đỏ lên men không chỉ chứa ethanol mà còn có mặt với hàm lượng cao các hoạt chất có hoạt tính sinh học và khả năng chống oxy hoá. Việc sử dụng thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) làm cơ chất lên men không chỉ khai thác đặc tính giàu chất chống oxy hóa tự nhiên của loại quả này mà còn mang lại hương đi mới trong gia tăng giá trị cho nông sản đặc trưng của Việt Nam.

- Khai thác đồng thời hai nhóm vi sinh vật hữu ích: Đề tài không chỉ tập trung vào LAB hoặc nấm men *S. cerevisiae* riêng lẻ, mà còn nghiên cứu đồng lên men (co-culture fermentation) bởi hai loại vi sinh vật này để tạo sản phẩm. Sản phẩm tạo thành là thực phẩm lên men có sự kết hợp của probiotic, GABA và hợp chất chống oxy hóa từ trái cây và dịch sữa. Đây là sự tích hợp đa chức năng mà ít công trình trước đây triển khai đồng thời trên nền vi sinh vật và nguyên liệu của bản địa.

CHƯƠNG 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Tổng quan về LAB, một số tính chất có lợi và ứng dụng

Trong những năm gần đây, nhóm LAB có vai trò tuyệt vời của trong ngành công nghiệp thực phẩm nhờ vào các sản phẩm trao đổi chất và chức năng probiotic của chúng. LAB có thể tạo hương vị cho sản phẩm thực phẩm do kết quả lên men lactic. Đồng thời, quá trình trao đổi chất của chúng còn tạo ra các loại acid béo mạch ngắn, amine, bacteriocin, vitamin và exopolysaccharide (EPS) và GABA giúp tăng giá trị dinh dưỡng và kéo dài thời gian sử dụng của thực phẩm. Trong phần này chủ yếu giới thiệu về sự tạo thành các sản phẩm trao đổi chất trong quá trình lên men thực phẩm và một số tính chất về tiềm năng probiotic của LAB.

2.2. Nấm men và ứng dụng

2.2.1. Giới thiệu về nấm men và ứng dụng trong công nghệ thực phẩm

2.2.1.1. Giới thiệu về nấm men

Nấm men đơn bào, có nhân thật, thường có hình bầu dục. Trên môi trường thạch, khuẩn lạc nấm men có màu trắng đục, vàng hoặc hồng nhạt, bề mặt tế bào thường khô và căng. Nấm men được ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm như trong công nghệ sản xuất bánh, lên men sản xuất đồ uống có cồn, trong thực phẩm lên men sữa, trong sản xuất cồn sinh học, trong sản xuất chế phẩm probiotic.

Bánh men là một dạng của men rượu (có nguồn gốc từ Trung Quốc) chứa vi sinh vật (nấm mốc, nấm men và vi khuẩn) dùng để sản xuất rượu. Hệ vi sinh vật này thủy phân tinh bột thành đường (do nấm mốc) và lên men đường thành ethanol (chủ yếu do *S. cerevisiae*). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đặt mục tiêu tuyển chọn chủng *S. cerevisiae* từ bánh men có khả năng lên men dịch ép thanh long đỏ và nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện lên men đến chất lượng sản phẩm.

2.2.1.2. Ứng dụng nấm men trong công nghệ thực phẩm

Nấm men được ứng dụng rộng rãi trong chế biến thực phẩm như sản xuất bánh, lên men thịt và lên men sữa. Ngoài ra, chúng còn là giống khởi động cho sản xuất ethanol sinh học từ nhiều nguyên liệu khác nhau, và một số loài được công nhận là probiotic có lợi cho sức khỏe.

2.2.2. Nấm men trong sản xuất đồ uống lên men

Nấm men có vai trò quan trọng trong ứng dụng lên men sản xuất đồ uống có cồn để sản xuất các sản phẩm như bia, rượu vang, rượu cao độ, rượu sake, rượu shochu và rượu chưng cất. *S. cerevisiae* là loài quan trọng nhất liên quan đến sản xuất rượu vang

2.2.2.1. Nấm men trong sản xuất bia

Quá trình sản xuất bia gồm nhiều giai đoạn, trong đó lên men là khâu trọng yếu, sử dụng nấm men để chuyển hóa đường từ malt đại mạch. Nấm men tạo ra sản phẩm chính là ethanol và CO₂, cùng với một loạt hợp chất bậc hai (ester, rượu, acid).

Những hợp chất này (gồm cả các hợp chất lưu huỳnh) quyết định hương vị và mùi thơm đặc trưng, tạo nên giá trị cảm quan của bia.

2.2.2.2. Nấm men trong sản xuất rượu vang

Nấm men là tác nhân vi sinh vật quan trọng trong lên men sản xuất rượu vang. Trong quá trình lên men rượu vang, nấm men chuyển hóa đường nho thành ethanol, CO₂ và một số sản phẩm thứ cấp như ester, acid hữu cơ, rượu cao, aldehyde, ceton, polyol, các hợp chất lưu huỳnh dễ bay hơi và các tính chất cảm quan khác của sản phẩm.

2.2.2.3. Nấm men trong sản xuất dịch trái cây lên men

Nhiều loại trái cây như dứa, thanh long, dưa hấu, táo, mận,...., đặc biệt là thanh long đỏ giàu hoạt chất sinh học (betalain, polyphenol), được lên men bằng *S. cerevisiae* để tạo ra đồ uống chứa cồn và các chất dinh dưỡng có lợi. Do thanh long đỏ dễ hư hỏng và có giá trị cao, việc chế biến thành đồ uống lên men là cần thiết để tiêu thụ và tăng giá trị. Mục tiêu là nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện lên men để thu được sản phẩm có hoạt tính sinh học tốt nhất.

2.3. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình lên men dịch trái cây

Quá trình lên men dịch trái cây chịu ảnh hưởng lớn từ chủng vi sinh vật, trong đó *S. cerevisiae* là loài nấm men sử dụng phổ biến nhất trong lên men dịch trái cây, đòi hỏi phải tuyển chọn chủng thuần để kiểm soát hương vị cuối cùng của sản phẩm. Bên cạnh đó, các yếu tố môi trường như hàm lượng đường, pH và nhiệt độ cũng là nhân tố quan trọng. Việc tối ưu hóa nhiệt độ và pH không chỉ hỗ trợ hoạt động của nấm men mà còn giúp chiết xuất tối đa các hợp chất có hoạt tính sinh học và ức chế hiệu quả sự phát triển của vi khuẩn gây hư hỏng.

2.4. Một số công trình nghiên cứu liên quan đến đề tài

2.4.1. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan đến tiềm năng probiotic của LAB

Việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn LAB có tiềm năng probiotic đã được nghiên cứu ở trong nước và trên thế giới, tập trung đánh giá các đặc tính quan trọng như khả năng chịu đựng môi trường đường tiêu hóa (pH thấp, muối mật, dịch tụy) và tính an toàn (không tan máu, kháng kháng sinh). Nhiều nghiên cứu đã được công bố như: Đỗ Thị Bích Thủy (2010) đã phân lập chủng *L. fermentum* MC9 từ măng chua Huế cho thấy tiềm năng tốt qua khả năng sống sót ở pH 2 và tự kết dính cao. Mục tiêu nghiên cứu của Võ Văn Quốc Bảo và cs (2016) nhằm phân lập các chủng *L. pentosus* và *L. fermentum* từ mứt ruốc Huế thể hiện khả năng tự kết dính cao (75%) và hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với *Salmonella* và *E. coli* (vòng vô khuẩn 10,6-12,9 mm). Tương tự, các chủng từ sản phẩm lên men truyền thống (như *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*) cũng thể hiện tính chất probiotic mạnh, bao gồm chịu acid, muối mật tốt và kỵ nước mạnh (trên 40%), được chọn để sản xuất chế phẩm theo

nguyên cứu của Srinivash và cs (2023). Ngoài ra, theo Chowdhury và cs (2023) chủng *Lactobacillus sp.* từ sản phẩm lên men Ấn Độ cho thấy khả năng phát triển ở pH rộng (3-7), ức chế *E. coli* và kháng được một số kháng sinh (streptomycin, vancomycin, kanamycin), đồng thời không gây tan máu.

2.4.2. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan đến khả năng sinh tổng hợp GABA của LAB

Nghiên cứu về sinh tổng hợp GABA bởi vi sinh vật ở Việt Nam vẫn còn hạn chế, nhưng đã có những nỗ lực đáng chú ý trong việc xác định các thông số công nghệ phù hợp. Các nghiên cứu trong nước đã tuyển chọn thành công các chủng LAB từ các nguồn truyền thống như: Nguyễn Thị Diễm Hương và cs (2020) đã phân lập chủng *P. pentosaceus* MN12 từ mứt nêm và tối ưu hóa điều kiện lên men để đạt hàm lượng GABA cao nhất (2597,12 mg/L ở pH 7, 45°C). Tương tự, nghiên cứu của Lê Thị Huyền Trang và Đỗ Thị Bích Thủy (2020), chủng *L. farciminis* M23 và *L. pentosus* R1 cũng được tối ưu hóa khả năng sản xuất GABA ở 40-45°C với 1-2% MSG. Trên thế giới, theo Kanklai và cs (2021) các chủng như *Lvl. brevis* F064A từ thực phẩm Thái Lan đã được chứng minh có khả năng sinh GABA cao (2,85 mg/mL) và được ứng dụng lên men nước dâu tằm. Ngoài ra, việc tối ưu hóa lên men bán rắn gạo lứt bằng *Lactobacillus sp.* đã cho thấy tiềm năng tăng hàm lượng GABA lên gần 50% (từ 4,64 mg/g lên 6,93 mg/g) trong điều kiện tối ưu (36°C, 48 giờ), mở ra hướng phát triển sản phẩm giàu GABA bởi Kwon và cs (2023).

2.4.3. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan đến phân lập, định danh chủng nấm men và sản xuất dịch trái cây lên men

Nhiều nghiên cứu trong nước và quốc tế đã tập trung vào việc tuyển chọn các chủng nấm men *S. cerevisiae* có khả năng lên men dịch quả hiệu quả để sản xuất đồ uống có cồn. Cụ thể tại Việt Nam, Nguyễn Văn Bá và cs (2021) đã phân lập và định danh thành công dòng *S. cerevisiae* S6 từ quả hồng xiêm, với các điều kiện lên men được tối ưu hóa (pH ban đầu 4,5; Bx 24; nhiệt độ phòng). Tương tự, Nguyễn Ngọc Thanh và cs (2021), chủng *S. cerevisiae* FBY015 được phân lập từ quả măng cầu xiêm, được lên men với pH ban đầu 4,0; Bx25 ở 25°C. Các sản phẩm rượu vang thu được đều đạt nồng độ ethanol cao, từ 10,1% đến 10,7% (v/v). Bên cạnh đó, nghiên cứu quốc tế cũng đã sử dụng *S. cerevisiae* phân lập từ rượu cọ để lên men nước ép dưa hấu ở 15°C, thu được sản phẩm có độ cồn 9,86% (v/v) với chất lượng cảm quan được chấp nhận, chứng minh tính khả thi trong việc phát triển các sản phẩm rượu vang thay thế bởi Hafsat và cs (2015).

CHƯƠNG 3: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

3.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các chủng LAB được phân lập và định danh từ mứt rở Huế,
- Các chủng LAB phân lập từ tôm chua Huế sử dụng trong nghiên cứu đã được định danh và công bố, hiện đang được bảo quản tại trung tâm lưu trữ vi khuẩn BCCM/LMG, Đại học Ghent, Vương Quốc Bỉ
- Chủng *S. cerevisiae* được phân lập từ bánh men,
- Dịch ép từ các loại trái cây (thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*), dứa (*Ananas comosus*) và dưa hấu (*Citrullus lanatus*)), sữa đậu nành và sữa tươi không đường TH True milk.

3.1.2. Phạm vi nghiên cứu

Phạm vi nghiên cứu tập trung vào việc phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật từ các nguồn thực phẩm truyền thống của Huế và bánh men. Các chủng tuyển chọn sau đó sẽ được ứng dụng trong các quy trình lên men.

3.1.3. Địa điểm và thời gian thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Khoa Cơ khí và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế và phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Thời gian thực hiện: Từ tháng 11/2022 đến tháng 11/2025

3.2. Nội dung nghiên cứu: Nghiên cứu tiến hành thực hiện 4 nội dung cụ thể như sau:

- (1) Phân lập, định danh và tuyển chọn chủng LAB có tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA cao;
- (2) Nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng được tuyển chọn;
- (3) Nghiên cứu ảnh hưởng của một số thông số công nghệ lên chất lượng dịch trái cây lên men bởi chủng nấm men được phân lập và tuyển chọn từ bánh men;
- (4) Sản xuất sản phẩm lên men mới giàu tiềm năng probiotic và các hoạt chất có hoạt tính sinh học.

3.3. Phương pháp nghiên cứu

3.3.1. Một số phương pháp phân tích sử dụng trong nghiên cứu

Bảng 3.1. Một số phương pháp phân tích sử dụng trong nghiên cứu

Thứ tự	Nội dung	Phương pháp
1	Định danh vi khuẩn lactic	<i>MALDI-TOF MS</i> , giải trình tự gene <i>PheS</i>
2	Định danh nấm men	Giải trình tự vùng ITS rDNA và so sánh trình tự với cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST
3	Phương pháp phân tích hàm lượng GABA	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)
4	Phương pháp xác định hàm lượng TPC	Phương pháp xác định quang phổ hấp thụ (OD)
5	Phương pháp xác định hàm lượng betalain	
6	Phương pháp xác định mật độ tế bào	
7	Một số phương pháp xác định các tính chất về tiềm năng probiotic của LAB gồm: khả năng chịu acid, khả năng tự kết dính và đồng kết dính, khả năng bám dính với dung môi, khả năng chịu pepsin, khả năng chịu muối mật và dịch tụy	
8	Phương pháp khảo sát khả năng kháng kháng sinh và ức chế vi khuẩn	Phương pháp khuếch tán đĩa thạch
9	Phương pháp đánh giá cảm quan	Phương pháp thị hiếu
10	Phương pháp phân tích thống kê	Sử dụng phần mềm SPSS và MINITAB
11	Phương pháp tối ưu hóa bằng quy hoạch thực nghiệm	Phương pháp thiết kế bề mặt đáp ứng (RSM). Thiết kế quy hoạch trực giao tâm xoay (CCD).

3.3.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

3.3.2.1. Bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của một số thông số công nghệ lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng LAB được tuyển chọn

Các thí nghiệm được thực hiện đơn nhân tố, gồm mật độ tế bào ban đầu, hàm lượng MSG bổ sung, nguồn carbon và nguồn nitơ bổ sung, thay thế saccharose và peptone bởi nguồn nguyên liệu tự nhiên, pH ban đầu, nhiệt độ và thời gian nuôi cấy.

3.3.2.2. Bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của một số thông số công nghệ lên chất lượng dịch trái cây lên men bởi chủng nấm men được tuyển chọn

Chất lượng dịch trái cây lên men được đánh giá thông qua các chỉ tiêu gồm hàm lượng anthocyanin, TPC, betacyanin và betaxanthin và hoạt tính chống oxy hóa. Các yếu tố ảnh hưởng đến các chỉ tiêu này là mật độ tế bào ban đầu, Bx ban đầu, pH ban đầu, nhiệt độ lên men và thời gian lên men. Thí nghiệm được thực hiện theo khảo sát ảnh hưởng đơn yếu tố.

3.3.2.3. Bố trí thí nghiệm nghiên cứu sản xuất sản phẩm lên men mới giàu tiềm năng probiotic và các hoạt chất có hoạt tính sinh học

Chất lượng dịch hỗn hợp lên men giữa dịch trái cây và sữa bởi chủng LAB và nấm men được đánh giá thông qua các chỉ tiêu gồm nồng độ ethanol, anthocyanin, TPC, betacyanin, betaxanthin, hoạt tính chống oxy và chất lượng cảm quan (màu sắc, mùi, vị). Các yếu tố ảnh hưởng đến các chỉ tiêu này là tỉ lệ phối trộn của dịch trái cây và sữa, nhiệt độ lên men và thời gian lên men.

CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Phân lập, định danh và tuyển chọn chủng LAB có tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA cao

4.1.1. Kết quả phân lập

Phân lập được 20 chủng LAB từ mẫu rò

4.1.2. Kết quả định danh các chủng LAB dựa vào phổ MALDI-TOF MS

Trong số 20 chủng phân lập từ mẫu rò, các chủng thuộc loài *L. fermentum* có số lượng nhiều nhất (12 chủng) và 2 chủng thuộc loài *L. farciminis*.

4.1.3. Kết quả định danh bằng giải trình tự gene *PheS*

5 chủng còn lại thuộc loài *L. pentosus*

4.1.4. Khảo sát tiềm năng probiotic của các chủng LAB

4.1.3.1. Khả năng sống sót của các chủng LAB qua đường tiêu hóa

Khả năng chống chịu qua đường tiêu hoá là tiêu chí đầu tiên để kết luận các chủng vi sinh vật có tiềm năng probiotic. Theo đó, các chủng này phải sống sót qua môi trường của dạ dày (chịu acid (pH = 2 - 3), chịu pepsin (một loại protease)), môi trường ruột non (chịu được muối mật và dịch tụy). Kết quả về *khả năng chịu pH thấp* cho thấy tỷ lệ tế bào sống sót của các chủng LAB trong dịch acid có pH 2,5 sau 4 giờ dao động từ $63,823 \pm 3,740\%$ đến $140,184 \pm 2,866\%$. Khả năng sống sót trong môi trường mô phỏng như trong đường ruột con người có *muối mật và dịch tụy* của các chủng LAB khá cao (>78%). Trong đó, có đến 34 chủng có phần trăm sống sót trên 90%.

4.1.3.2. Khả năng kết dính và bám dính

Khả năng *tự kết dính* của các chủng được khảo sát, dao động từ $5,209 \pm 0,510\%$ đến $99,240 \pm 0,685\%$. Tỷ lệ phần trăm *đồng kết dính* của các chủng LAB được khảo sát với các chủng vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 từ $0,178 \pm 0,060\%$ đến $21,136 \pm 0,403\%$, với *Sta. aureus* ATCC 25923 từ $0,484 \pm 0,057\%$ đến $25,236 \pm 0,345\%$ và với *S. typhimurium* ATCC 14028 từ $3,071 \pm 0,433\%$ đến $49,544 \pm 2,237\%$. Các chủng *L. pentosus* (M1, M3, M4), *L. farciminis* M18, *L. fermentum* (M21, M43, M46, M17) và *P. acidilactici* (TC1, TC2, TC3, TC4, TC5, TC6, TC24) không có khả năng kết dính với *E. coli*. Chủng *L. fermentum* (M21, M25), *P. acidilactici* (TC1, TC2, TC3, TC8) và *L. fermentum* TC10 không có khả năng kết dính với *Sta. aureus*. Bên cạnh đó, các chủng *L. farciminis* M28, *L. fermentum* (M34, M42, M43, M44, TC17) và *P. acidilactici* (TC4, TC6, TC24) lại không có khả năng kết dính với *S. typhimurium*. Khả năng *bám dính dung môi* (ethyl acetate và xylene) của các chủng LAB dao động trong khoảng từ $0,644 \pm 0,281\%$ đến $60,467 \pm 0,623\%$.

4.1.3.3. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng LAB

Kết quả cho thấy đa số các chủng LAB được khảo sát nhạy cảm (NR) đối với Chloramphenicol (25 chủng), Clindamycin (22 chủng), Erythromycin (30 chủng), và Tetracyclin (27 chủng) và kháng lại (R) được với Ampicillin (29 chủng) Gentamycin (30 chủng), Streptomycin (36 chủng) và Kanamycin (37 chủng) và Vancomycin (36 chủng).

4.1.3.4. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh

Đối với *E. Coli* ATCC 25922, các chủng LAB có khả năng kháng khá cao. Tất cả các chủng khảo sát đều có khả năng kháng *E. Coli* ATCC 25922 với các mức độ khác nhau. Theo đó các chủng *L. pentosus* (M1, M2, M5), *L. fermentum* (M21, M22, M38, M41, M42, M43, M44, M46), *L. farciminis* M31, *P. acidilactici* (TC1, TC2, TC3, TC5, TC7, TC8, TC9, TC24, TC29), *L. fermentum* (TC10, TC11, TC12, TC13, TC14, TC15, TC16, TC17, TC18) có khả năng kháng *E.coli* ATCC 25922 mạnh với đường kính vòng vô khuẩn trên 10 mm. Các chủng còn lại *L. pentosus* (M3,M4), *L. farciminis* M18, *L. fermentum* (M24, M25, M34, M40) và *P. acidilactici* (TC4, TC6) có khả năng kháng yếu hơn với đường kính vô khuẩn trong khoảng 5 - 10 mm.

Kết quả khảo sát khả năng kháng *S. Typhymurium* ATCC 14028 của các chủng LAB phân lập từ măm rò và tôm chua cho thấy, khả năng kháng khá tương đồng với các công bố ở trước đó, với đường kính vòng vô khuẩn biểu hiện khá lớn, khả năng kháng khá mạnh, đáp ứng được tiềm năng probiotic trong hệ tiêu hóa của con người.

4.1.5. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp GABA của các chủng LAB

Nhìn chung, các chủng đều có khả năng sinh GABA cao. Trong đó, *P. acidilactici* TC7 có hàm lượng GABA cao nhất ($8,764 \pm 0,138$ mM) và *P. acidilactici* TC24 có hàm lượng GABA thấp nhất ($1,109 \pm 0,102$ mM). Các chủng còn lại có khả năng sinh tổng hợp GABA thấp hơn TC7 và cao hơn TC24.

Kết luận của kết quả khảo sát tuyển chọn thông qua tiềm năng probiotic và khả năng sinh GABA: Qua kết quả khảo sát, chủng *P. acidilactici* TC7 thể hiện một số tính chất có tiềm năng probiotic tốt hơn so với các chủng còn lại. Mặt khác khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng này là cao nhất. Chính vì vậy, chủng *P. acidilactici* TC7 được chọn để tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 4.6. Khả năng sinh GABA của các chủng LAB

Chủng	Hàm lượng GABA (mM)	Chủng	Hàm lượng GABA (mM)	Chủng	Hàm lượng GABA (mM)	Chủng	Hàm lượng GABA (mM)
<i>L. pentosus</i> M1	3,585 ^{mno} ± 0,197	<i>L. farciminis</i> M28	7,110 ^c ± 0,175	<i>P. acidilactici</i> TC1	1,893 st ± 0,063	<i>L. fermentum</i> TC11	7,127 ^c ± 0,149
<i>L. pentosus</i> M2	6,270 ^{de} ± 0,156	<i>L. farciminis</i> M31	7,072 ^c ± 0,171	<i>P. acidilactici</i> TC2	1,983 ^s ± 0,192	<i>L. fermentum</i> TC12	4,698 ⁱ ± 0,109
<i>L. pentosus</i> M3	6,535 ^d ± 0,115	<i>L. fermentum</i> M34	7,820 ^b ± 0,109	<i>P. acidilactici</i> TC3	3,088 ^{pq} ± 0,229	<i>L. fermentum</i> TC13	6,930 ^c ± 0,120
<i>L. pentosus</i> M4	5,289 ^h ± 0,241	<i>L. fermentum</i> M38	5,076 ^h ± 0,294	<i>P. acidilactici</i> TC4	4,231 ^{jk} ± 0,196	<i>L. fermentum</i> TC14	3,044 ^q ± 0,178
<i>L. pentosus</i> M5	6,892 ^c ± 0,143	<i>L. fermentum</i> M40	6,400 ^{de} ± 0,171	<i>P. acidilactici</i> TC5	5,754 ^g ± 0,269	<i>L. fermentum</i> TC15	5,157 ^h ± 0,156
<i>L. farciminis</i> M18	7,232 ^c ± 0,208	<i>L. fermentum</i> M41	6,118 ^{ef} ± 0,180	<i>P. acidilactici</i> TC6	3,996 ^{kl} ± 0,085	<i>L. fermentum</i> TC16	5,920 ^{fg} ± 0,206
<i>L. fermentum</i> M21	4,331 ^j ± 0,321	<i>L. fermentum</i> M42	3,548 ^{no} ± 0,329	<i>P. acidilactici</i> TC7	8,764^a ± 0,138	<i>L. fermentum</i> TC17	3,855 ^{lmn} ± 0,085
<i>L. fermentum</i> M22	5,293 ^h ± 0,222	<i>L. fermentum</i> M43	4,345 ^j ± 0,271	<i>P. acidilactici</i> TC8	6,364 ^{de} ± 0,106	<i>L. fermentum</i> TC18	2,148 ^{rs} ± 0,144
<i>L. fermentum</i> M24	4,414 ^{ij} ± 0,261	<i>L. fermentum</i> M44	2,398 ^r ± 0,289	<i>P. acidilactici</i> TC9	1,614 ^t ± 0,107	<i>P. acidilactici</i> TC24	1,109 ^u ± 0,102
<i>L. fermentum</i> M25	3,381 ^{op} ± 0,209	<i>L. fermentum</i> M46	3,907 ^{klm} ± 0,198	<i>L. fermentum</i> TC10	6,554 ^d ± 0,146	<i>P. acidilactici</i> TC29	5,894 ^{fg} ± 0,262

Chú thích: Các tế bào được nuôi trong môi trường MRS ở mật độ tế bào ban đầu 10^7 CFU/mL có pH 6,2 ở 37°C trong 24 giờ.

Các chữ cái in thường không giống nhau thể hiện sự khác nhau có nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

4.2. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng được tuyển chọn

4.2.1. Ảnh hưởng của mật độ tế bào ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Hàm lượng GABA tích lũy trong môi trường nuôi cấy cao nhất khi ở mật độ tế bào ban đầu của LAB trong các công bố trên nằm trong khoảng từ 10^6 CFU/mL đến 10^7 CFU/mL, cho thấy tương đồng với kết quả trong nghiên cứu này. Mật độ tế bào ban đầu 10^7 CFU/mL của chủng *P. acidilactici* TC7 được chọn để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

4.2.2. Ảnh hưởng của hàm lượng MSG bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Hàm lượng MSG 1,5% bổ sung trong môi trường nuôi cấy là phù hợp nhất để chủng LAB này để sản xuất GABA cao nhất.

4.2.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Trong hai nguồn carbon bổ sung là saccharose và maltose, hàm lượng GABA thu được trong môi trường không sai khác về thống kê. Tuy nhiên, saccharose là nguồn nguyên liệu dễ kiếm và rẻ tiền nên được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

4.2.4. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Hàm lượng saccharose bổ sung vào môi trường 2% là thích hợp nhất để tạo môi trường nuôi cấy chủng *P. acidilactici* TC7 sinh GABA cao, nên được chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo,

4.2.5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Peptone là nguồn nitơ thích hợp cho *P. acidilactici* TC7 sinh tổng hợp GABA nên được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

4.2.6. Ảnh hưởng của hàm lượng peptone bổ sung lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Việc bổ sung 2% peptone vào môi trường MRS là phù hợp nhất cho quá trình sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7.

4.2.7. Ảnh hưởng của việc thay thế saccharose bởi dịch trái cây lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Thay thế hàm lượng saccharose bổ sung vào môi trường thích hợp là dịch thanh long đỏ (50 mL/100 mL môi trường) để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

4.2.8. Ảnh hưởng của việc thay thế peptone bằng dịch sữa lên khả năng sinh tổng hợp GABA của chủng *P. acidilactici* TC7

Dịch sữa bò được lựa chọn để thay thế cho lượng peptone trong môi trường nuôi cấy cho các thí nghiệm tiếp theo. Hàm lượng dịch sữa bò thích hợp là 50 mL/100 mL môi trường.

4.2.9. Ảnh hưởng của pH ban đầu lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Từ kết quả nghiên cứu này, giá trị pH 6 được chọn làm yếu tố cố định khi tiến hành thí nghiệm tiếp theo

4.2.10. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Hàm lượng GABA cao nhất ở nhiệt độ nuôi cấy là 40°C. Do đó, nhiệt độ này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

4.2.11. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7

Từ 24 đến 72 giờ lên men, số lượng tế bào của *P. acidilactici* TC7 tăng đều từ $9,080 \pm 0,006$ log CFU/mL đến $9,225 \pm 0,010$ log CFU/mL với sự tích lũy hàm lượng GABA dần dần đến mức tối đa là $30,784 \pm 0,104$ mM.

Dịch thanh long đỏ được sử dụng để tuyển chọn nấm men và lên men ở các nội dung tiếp theo. Hỗn hợp thanh long đỏ và sữa tươi không đường TH True milk được dùng làm nguyên liệu để lên men sản xuất sản phẩm mới bởi giống khởi động có sự kết hợp LAB và nấm men. Các thông số công nghệ trong kết quả này (mật độ tế bào ban đầu, pH ban đầu, nhiệt độ lên men) được sử dụng để thiết kế trong thí nghiệm nghiên cứu tạo sản phẩm lên men hỗn hợp thanh long đỏ và sữa tươi không đường TH True milk.

4.3. Ảnh hưởng của một số thông số công nghệ lên chất lượng dịch trái cây lên men bởi chủng nấm men được tuyển chọn

4.3.1. Phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm men

Trong số 32 khuẩn lạc nấm men phân lập từ môi trường Hansen, 18 chủng (ký hiệu từ M1 đến M18) được phân loại là nấm men dựa trên hình thái tế bào quan sát

được bằng kính hiển vi điện tử quét (ở vật kính E40). Các chủng nấm men này được sàng lọc khả năng sản xuất ethanol bằng cách lên men dịch quả thanh long đỏ ở 28°C trong 24 giờ. Kết quả cho thấy có bốn chủng (M2, M7, M11 và M17) có khả năng lên men tạo ra ethanol. Trong số các chủng có khả năng lên men sản xuất ethanol, M7 tạo ra tỷ lệ thể tích ethanol cao hơn ($6,3 \pm 0,3\%$) so với M2, M11 và M17 ở nhiệt độ xử lý sơ bộ 70°C. Ngoài ra, hàm lượng TPC tính theo GAE ($27,22 \pm 5,41$ mgGAE/mL), anthocyanin tính theo CGE ($10,02 \pm 0,25$ mgCGE/L), betacyanin ($50,37 \pm 0,99$ mg/L) và betaxanthin ($43,60 \pm 0,72$ mg/L) và khả năng loại gốc tự do DPPH ($57,65 \pm 0,35\%$) của nước ép thanh long đỏ được xử lý sơ bộ ở 70 °C và lên men bởi chủng M7 cao hơn đáng kể so với các chủng khác. Tóm lại, kết quả của nghiên cứu này cho thấy rằng nhiệt độ xử lý sơ bộ 70°C và việc sử dụng chủng M7 dường như phù hợp nhất cho việc sản xuất rượu từ nước ép thanh long ruột đỏ và do đó được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả định danh đã xác định chủng M7 là loài *S. cerevisiae*, đây là loài nấm men hữu dụng trong công nghiệp sản xuất rượu. Nó không chỉ lên men nước quả hay môi trường chứa hàm lượng đường cao thành ethanol mà còn tạo ra các hợp chất thứ cấp với hương vị đặc trưng.

4.3.2. Ảnh hưởng của một số thông số công nghệ lên chất lượng dịch trái cây lên men bởi *S. cerevisiae* M7

4.3.2.1. Ảnh hưởng của mật độ tế bào ban đầu

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy mật độ tế bào ban đầu là 10^8 CFU/mL là hợp lý để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

4.3.2.2. Ảnh hưởng của hàm lượng chất khô ban đầu

Từ nghiên cứu này, có thể kết luận rằng hàm lượng saccharose ban đầu 18% (m/V) là tối ưu để tạo ra rượu thanh long đỏ có hồ sơ chống oxy hóa cao.

4.3.2.3. Ảnh hưởng của pH

Kết quả của nghiên cứu cho thấy pH ban đầu 3,5 là tối ưu cho quá trình lên men rượu từ nước ép thanh long đỏ bởi *S. cerevisiae* M7 xét về hàm lượng ethanol, nồng độ polyphenol, betacyanin, betaxanthin và hoạt tính chống oxy hóa của rượu.

4.3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả cho thấy hàm lượng rượu cao nhất ($13,06 \pm 0,24\%$), hàm lượng TPC biểu thị bằng GAE ($37,59 \pm 0,87$ mg GAE /mL), anthocyanin biểu thị bằng CGE ($11,41 \pm 0,38$ mgCGE/L), betacyanin ($65,63 \pm 0,49$ mg/L) và betaxanthin ($61,16 \pm 0,96$ mg/L) đạt được ở nhiệt độ lên men 30°C.

4.3.2.5. Ảnh hưởng của thời gian

Hàm lượng ethanol trong rượu tăng dần từ ngày đầu tiên đến ngày thứ sáu của quá trình lên men, đạt giá trị tối đa là $12,12 \pm 0,15\%$, trong khi tiếp tục lên men sau thời điểm này không tạo ra thêm lượng ethanol đáng kể. Song song với sự gia tăng của hàm lượng ethanol, nồng độ các hợp chất polyphenol (tính theo GAE), anthocyanin (tính theo CGE), betacyanin, betaxanthin và hoạt tính chống oxy hóa của rượu cũng tăng đều đặn trong sáu ngày đầu tiên của quá trình lên men và đạt giá trị cực đại lần lượt là $37,79 \pm 0,38$ mgGAE/mL, $11,22 \pm 0,31$ mgCGE/L, $65,18 \pm 0,82$ mg/L, $60,47 \pm 1,29$ mg/L và $65,41 \pm 0,44\%$.

4.4. Sản xuất sản phẩm lên men mới giàu tiềm năng probiotic và các hoạt chất có hoạt tính sinh học

Đây là thí nghiệm được thiết kế có kế thừa kết quả của các mục từ 4.1 đến 4.3. Các kết quả trên được sử dụng để bố trí thí nghiệm như sau:

(1) Chủng *P. acidilactici* TC7 được sử dụng làm giống khởi động (kết quả tuyển chọn từ mục 4.1 dựa vào tiềm năng probiotic tốt và khả năng sinh tổng hợp GABA cao của nó). Chủng này được đồng lên men với *S. cerevisiae* M7 (kết quả tuyển chọn từ phần 4.2 dựa vào khả năng lên men tạo dịch thanh long đỏ lên men có hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học và khả năng chống oxy hoá cao).

(2) Các thông số công nghệ thu được trong kết quả mục 4.2 (để thu được hàm lượng GABA tích lũy trong môi trường cao) và kết quả phần 4.3 (sản xuất ra dịch thanh long đỏ lên men có chất lượng cao) được thừa kế để thiết kế bố trí các mức thí nghiệm (mật độ tế bào ban đầu, pH ban đầu, nhiệt độ lên men) trong mục này (mục 4.4).

(3) Nguyên liệu lên men được lựa chọn trong thí nghiệm này là dịch thanh long đỏ và sữa tươi không đường TH True milk dựa vào kết quả khảo sát sự thay thế nguồn C và N tự nhiên để *P. acidilactici* TC7 sinh tổng hợp GABA cao (kết quả mục 4.2).

Thí nghiệm đồng lên men hỗn hợp dịch thanh long đỏ và sữa tươi TH True milk bởi *P. acidilactici* TC7 và *S. cerevisiae* M7 được khảo sát ảnh hưởng một số yếu tố (tỷ lệ phối trộn nguyên liệu, nhiệt độ và thời gian lên men) đến các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm (nồng độ ethanol, hàm lượng TPC, anthocyanin, betacyanin, betaxanthin, hoạt tính chống oxy và chất lượng cảm quan (màu sắc, mùi, vị).

4.4.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ phối trộn dịch trái cây và sữa

Tỷ lệ 3:1 thể hiện sự vượt trội khi đồng thời đạt mức cao nhất ở hầu hết các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng như polyphenol ($17,093 \pm 0,156$ mgGAE/mL), anthocyanin ($4,437 \pm 0,367$ mgCGE/L), betacyanin ($23,207 \pm 0,345$

mg/L), betaxanthin ($17,363 \pm 0,348$ mg/L) cùng với hoạt tính chống oxy hóa ($22,650 \pm 0,181\%$). Kết quả cảm quan cho thấy tỷ lệ 3:1 được đánh giá cao nhất ở cả ba tiêu chí màu sắc, mùi và vị.

Bảng 4.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn nguyên liệu đến một số chỉ tiêu của dịch lên men

Stt	Chỉ tiêu	Tỷ lệ				
		1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
1	Hàm lượng Ethanol (%)	$2,713^c$ $\pm 0,287$	$1,633^d$ $\pm 0,071$	$1,297^d$ $\pm 0,211$	$3,267^b$ $\pm 0,295$	$3,870^a$ $\pm 0,181$
2	Hàm lượng TPC (mgGAE/mL)	$12,043^c$ $\pm 0,064$	$8,840^d$ $\pm 0,108$	$7,007^e$ $\pm 0,168$	$16,020^b$ $\pm 0,200$	$17,093^a$ $\pm 0,156$
3	Hàm lượng Anthocyanin (mgCGE/L)	$2,540^c$ $\pm 0,305$	$1,827^d$ $\pm 0,085$	$1,280^e$ $\pm 0,161$	$3,720^b$ $\pm 0,433$	$4,437^a$ $\pm 0,367$
4	Hoạt tính chống oxy hóa DPPH (%)	$15,220^c$ $\pm 0,255$	$11,040^d$ $\pm 0,145$	$8,943^e$ $\pm 0,127$	$19,193^b \pm$ $0,189$	$22,650^a$ $\pm 0,181$
5	Hàm lượng Betacyanin (mg/L)	$15,673^c$ $\pm 0,401$	$10,590^d$ $\pm 0,240$	$7,957^e$ $\pm 0,119$	$21,237^b$ $\pm 0,248$	$23,207^a$ $\pm 0,345$
6	Hàm lượng Betaxanthin (mg/L)	$11,893^c$ $\pm 0,153$	$7,897^d$ $\pm 0,116$	$5,897^e$ $\pm 0,162$	$15,713^b$ $\pm 0,189$	$17,363^a$ $\pm 0,348$
7	Hàm lượng GABA (mM)	$21,840^c$ $\pm 0,190$	$29,625^b$ $\pm 0,383$	$35,081^a$ $\pm 0,240$	$14,505^e$ $\pm 0,077$	$15,916^d$ $\pm 0,227$

Chú thích: CGE, cyanidin 3-glucoside equivalent; GAE, gallic acid equivalent.

Số liệu là giá trị trung bình của ba lần phân tích lặp lại \pm độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

4.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men

Khi nhiệt độ tăng từ 30°C đến 35°C , các chỉ tiêu hóa sinh đồng loạt đạt giá trị cao nhất. Cụ thể, ở 35°C , hàm lượng ethanol ($4,637 \pm 0,461\%$) phản ánh quá trình chuyển hóa đường thành rượu thuận lợi nhất, trong khi polyphenol ($17,693 \pm 0,480$ mgGAE/mL) và anthocyanin ($4,850 \pm 0,276$ mgCGE/L) được giữ ổn định, góp phần

làm gia tăng khả năng chống oxy hóa ($22,963 \pm 0,264\%$). Đồng thời, betacyanin và betaxanthin – hai nhóm sắc tố quyết định màu sắc tự nhiên – cũng đạt cực đại ($23,983 \pm 0,321$ mg/L và $17,857 \pm 0,537$ mg/L), giúp sản phẩm có màu sắc đẹp, tương ứng với đánh giá cảm quan màu sắc cao nhất ($7,17 \pm 0,834$). Ở 35°C nhận điểm đánh giá cao nhất ở cả ba tiêu chí màu sắc ($7,17 \pm 0,834$), mùi ($7,13 \pm 0,776$) và vị ($7,23 \pm 0,858$). Sự đồng bộ giữa hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học và cảm quan cho thấy ở 35°C sản phẩm vừa đạt được sự hài hòa về cấu trúc hóa học, vừa tối ưu về chất lượng cảm nhận của người sử dụng sản phẩm.

Bảng 4.12. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến một số chỉ tiêu của dịch lên men

Stt	Chỉ tiêu	Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)				
		25	30	35	40	45
1	Hàm lượng Ethanol (%)	2,797 ^b $\pm 0,169$	4,700 ^a $\pm 0,387$	4,637^a $\pm 0,461$	3,247 ^b $\pm 0,274$	2,207 ^c $\pm 0,223$
2	Hàm lượng TPC (mgGAE/mL)	15,570 ^c $\pm 0,464$	17,437 ^{ab} $\pm 0,244$	17,693^a $\pm 0,480$	16,747 ^b $\pm 0,391$	13,650 ^d $\pm 0,449$
3	Hàm lượng Anthocyanin (mgCGE/L)	2,923 ^c $\pm 0,221$	4,737 ^a $\pm 0,265$	4,850^a $\pm 0,276$	4,073 ^b $\pm 0,127$	2,423 ^d $\pm 0,302$
4	Hoạt tính chống oxy hóa DPPH (%)	20,540 ^b $\pm 0,230$	22,890 ^a $\pm 0,187$	22,963^a $\pm 0,264$	20,923 ^b $\pm 0,119$	18,230 ^c $\pm 0,345$
5	Hàm lượng Betacyanin (mg/L)	19,500 ^c $\pm 0,314$	23,627 ^a $\pm 0,373$	23,983^a $\pm 0,321$	21,843 ^b $\pm 0,273$	18,683 ^d $\pm 0,340$
6	Hàm lượng Betaxanthin (mg/L)	16,667 ^b $\pm 0,389$	18,140 ^a $\pm 0,336$	17,857^a $\pm 0,537$	17,107 ^b $\pm 0,135$	14,430 ^c $\pm 0,318$
7	Hàm lượng GABA (mM)	4,973 ^d $\pm 0,188$	6,877 ^c $\pm 0,204$	16,473^a $\pm 0,237$	11,976 ^b $\pm 0,211$	6,682 ^c $\pm 0,214$

Chú thích: CGE, cyanidin 3-glucoside equivalent; GAE, gallic acid equivalent. Số liệu là giá trị trung bình của ba lần phân tích lặp lại \pm độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

4.4.3. Ảnh hưởng của thời gian lên men

Thời gian lên men có ảnh hưởng rõ rệt đến cả chỉ tiêu các hợp chất sinh học lẫn cảm quan, trong đó 24 giờ là thời điểm tốt nhất. Thời gian lên men 24 giờ là điểm cân bằng lý tưởng: ethanol đạt mức cao ($4,800 \pm 0,223\%$) nhưng chưa gây ảnh hưởng xấu

đến cảm quan, GABA đạt cực đại ($16,473 \pm 0,367$ mM), các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa đều ở mức cao nhất, đồng thời sản phẩm giữ được màu sắc, mùi và vị hài hòa. Đây chính là thời điểm nên lựa chọn để tối ưu hóa cả giá trị chức năng và chất lượng cảm quan của sản phẩm.

Bảng 4.14. Ảnh hưởng của thời gian đến một số chỉ tiêu của dịch lên men

Stt	Chỉ tiêu	Thời gian (giờ)			
		12	24	36	48
1	Hàm lượng Ethanol (%)	3,510 ^b ± 0,219	4,800^a ± 0,223	4,580 ^a ± 0,363	4,810 ^a ± 0,305
2	Hàm lượng TPC (mgGAE/mL)	12,427 ^b ± 0,421	17,577^a ± 0,327	17,293 ^a ± 0,388	17,453 ^a ± 0,203
3	Hàm lượng Anthocyanin (mgCGE/L)	3,673 ^b ± 0,275	4,953^a ± 0,175	4,640 ^a ± 0,436	5,223 ^a ± 0,313
4	Hoạt tính chống oxy hóa DPPH (%)	11,707 ^b ± 0,587	23,183^a ± 0,318	22,777 ^a ± 0,496	23,420 ^a ± 0,435
5	Hàm lượng Betacyanin (mg/L)	21,017 ^b ± 1,020	24,297^a ± 0,227	24,807 ^a ± 0,261	24,750 ^a ± 0,550
6	Hàm lượng Betaxanthin (mg/L)	12,413 ^b ± 1,138	17,737^a ± 0,326	17,813 ^a ± 0,261	18,030 ^a ± 0,151
7	Hàm lượng GABA (mM)	9,047 ^c ± 0,050	16,473^a ± 0,367	11,928 ^b ± 0,171	12,043 ^b ± 0,084

Chú thích: CGE, cyanidin 3-glucoside equivalent; GAE, gallic acid equivalent.

Số liệu là giá trị trung bình của ba lần phân tích lặp lại ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

4.4.4. Kết quả tối ưu hóa chế độ lên men sinh tổng hợp GABA cao

Để tối ưu hóa điều kiện lên men nhằm nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp GABA, hai yếu tố chính được lựa chọn khảo sát là nhiệt độ và thời gian, với khoảng biến thiên lần lượt từ 25 đến 40°C và từ 12 đến 36 giờ (Bảng 4.16).

Bảng 4.16. Ma trận quy hoạch thực nghiệm và kết quả thí nghiệm

TT	Yếu tố ảnh hưởng				Kết quả đầu ra
	Mã hóa		Giá trị thực		GABA (Y)
	X ₁	X ₂	Nhiệt độ lên men (°C)	Thời gian lên men (giờ)	
1	-1	-1	25	12	8,792
2	1	-1	40	12	8,057
3	-1	1	25	36	13,454
4	1	1	40	36	7,778
5	-1,414	0	21,9	24	9,433
6	1,414	0	43,1	24	9,100
7	0	-1,414	32,5	7,03	9,942
8	0	1,414	32,5	40,97	11,932
9	0	0	32,5	24	17,472
10	0	0	32,5	24	16,967
11	0	0	32,5	24	16,669
12	0	0	32,5	24	16,471
13	0	0	32,5	24	17,273

Chú thích: Các giá trị mã hóa (X₁, X₂) tương ứng với hai yếu tố đầu vào trong quá trình lên men: X₁ - nhiệt độ lên men (°C), X₂ - thời gian lên men (giờ). Các yếu tố này được khảo sát ở năm mức mã hóa: -1, 0, +1, -1,414 và +1,414, theo thiết kế thí nghiệm mặt đáp ứng (RSM).

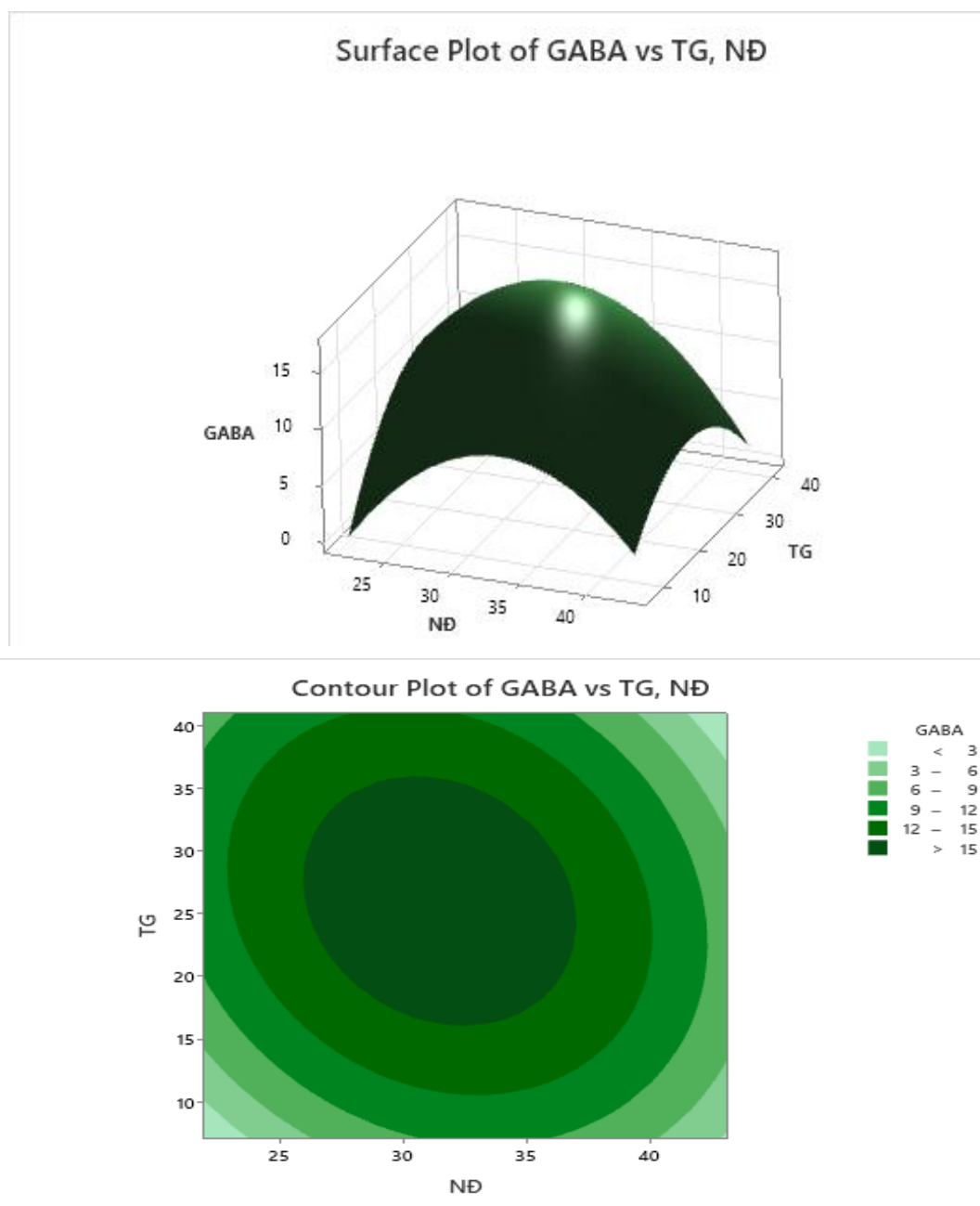
Từ kết quả đầu ra của 13 thí nghiệm (Bảng 4.16), phương trình hồi quy của các hàm mục tiêu sau khi loại bỏ những hệ số có giá trị $p > 0,05$ được thiết lập với R² tương ứng và kết quả tối ưu hóa (Bảng 4.17). Từ kết quả (Bảng 4.16) cho thấy: (1) Mô hình là mô hình bậc hai, hệ số tuyến tính (4,834 và 1,575) có nghĩa là khi tăng nhiệt độ hoặc thời gian, GABA ban đầu có xu hướng tăng. (2) Hệ số R² rất cao cho mô hình (96,720%) cho thấy mô hình này rất đáng tin cậy trong việc dự đoán chỉ số GABA dựa trên nhiệt độ và thời gian lên men. (3) Sự hiện diện của các hệ số bậc hai (-0,07106 và -0,02196) âm trong phương trình cho thấy rằng hàm mục tiêu đều có một điểm cực đại (tối ưu) trong khoảng nghiên cứu. (4) Sự có mặt của hệ số tương tác (-0,01373) trong phương trình GABA cho thấy rằng khi tăng đồng thời nhiệt độ và thời gian thì hiệu ứng cộng hưởng không tích cực (làm giảm hàm lượng GABA).

Bảng 4.17. Phương trình hồi quy và kết quả tối ưu hóa

Hàm mục tiêu	Phương trình hồi quy	R ²	Giá trị cực đại (nhiệt độ lên men tối ưu (31,536°C) và thời gian lên men tối ưu (25,927 giờ))	Kết quả thí nghiệm kiểm chứng
GABA	$Y = -79,52 + 4,834 X_1 + 1,575 X_2 - 0,07106 X_1^2 - 0,02196 X_2^2 - 0,01373 X_1 * X_2$	96,720%	17,103 mM	17,387 ± 0,160 mM

Kết quả giải các phương trình hồi quy (Bảng 4.17) cho thấy, nhiệt độ lên men tối ưu và thời gian lên men tối ưu là 31,536°C và 25,927 giờ. Tại nhiệt độ và thời gian lên men tối ưu giá trị cực đại của hàm tối ưu GABA là 17,103 mM. So với kết quả thí nghiệm kiểm chứng tại điều kiện tối ưu (31,536°C và 25,927 giờ) hàm lượng GABA là 17,387 ± 0,160 mM cho thấy kết quả thực tế thu được khi tiến hành thí nghiệm tại điều kiện tối ưu (31,536°C và 25,927 giờ) cho thấy rằng giá trị thực nghiệm kiểm chứng rất gần với giá trị dự đoán của mô hình. Điều này chứng tỏ rằng phương trình hồi quy đã xây dựng có khả năng dự đoán chính xác giá trị tối ưu và các điều kiện tối ưu tìm được là đáng tin cậy. Điều này cung cấp cơ sở vững chắc cho việc áp dụng các điều kiện này trong thực tế để đạt được hiệu quả mong muốn.

Để thể hiện một cách trực quan về kết quả tối ưu hóa, bề mặt đáp ứng, biểu đồ 3D cho thấy mối quan hệ giữa hai yếu tố đầu vào (trục X và Y) và một đáp ứng đầu ra (trục Z), tương ứng với phương trình hồi quy (Bảng 4.17) được trình bày ở Hình 4.29.



Hình 4.29. Biểu đồ bề mặt đáp ứng, đường đồng mức thể hiện trực quan về kết quả tối ưu hóa

Như vậy, kết quả nghiên cứu khẳng định nhiệt độ và thời gian lên men là hai yếu tố quyết định đến hiệu suất sinh tổng hợp GABA. Mô hình hồi quy bậc hai có độ tin cậy cao ($R^2 = 96,720\%$) cho thấy khả năng dự đoán chính xác sự biến thiên hàm lượng GABA. Điều kiện tối ưu được xác định là $31,536^\circ\text{C}$ và $25,927$ giờ, tại đó hàm lượng GABA dự đoán đạt $17,103$ mM. Kết quả kiểm chứng ($17,387 \pm 0,160$ mM) phù hợp với mô hình, chứng tỏ các điều kiện tối ưu có cơ sở khoa học và tiềm năng ứng dụng thực tiễn trong nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp GABA.

CHƯƠNG 5: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận

- Từ các sản phẩm lên men truyền thống Huế, 20 chủng LAB phân lập, được định danh từ mắm rò và 20 chủng LAB từ tôm chua (đã công bố định danh) được tuyển chọn dựa trên tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp GABA. Trong đó, *P. acidilactici* TC7 nổi bật với khả năng chịu pH thấp, kháng muối mật, bám dính tốt, ức chế vi sinh vật gây hại và đặc biệt sinh tổng hợp GABA ở mức cao ($8,764 \pm 0,138$ mM), nên được chọn làm chủng nghiên cứu chính.

- Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh GABA của *P. acidilactici* TC7 được khảo sát và tối ưu hóa; điều kiện thích hợp gồm mật độ gieo cấy ban đầu là 10^7 CFU/mL, 1,5% MSG, 2% saccharose, 2% peptone, pH 6, nhiệt độ 40°C trong 72 giờ. Thay thế saccharose và peptone bằng hỗn hợp thanh long đỏ - sữa tươi không đường TH, cho hàm lượng GABA $30,784 \pm 0,104$ mM.

- Chủng nấm men M7 được định danh là *S. cerevisiae*, cho kết quả lên men nước ép thanh long đỏ vượt trội, hàm lượng ethanol đạt $12,12 \pm 0,15\%$, giàu các hợp chất sinh học gồm $37,79 \pm 0,38$ mgGAE/mL TPC, $11,22 \pm 0,31$ mgCGE/L anthocyanin, $65,18 \pm 0,82$ mg/L betacyanin, $60,47 \pm 1,29$ mg/L betaxanthin và hoạt tính chống oxy hóa là $65,41 \pm 0,44\%$. Điều kiện tối ưu gồm mật độ gieo cấy 10^8 CFU/mL, hàm lượng chất khô 18%, pH 3,5, nhiệt độ 30°C trong 6 ngày. - Thực hiện đồng lên men bởi *P. acidilactici* TC7 và *S. cerevisiae* M7 trong hỗn hợp thanh long đỏ - sữa bò (tỷ lệ 3:1) ở 35°C trong 24 giờ tạo sản phẩm giàu GABA ($16,473 \pm 0,367$ mM), giàu hợp chất sinh học ($4,800 \pm 0,223\%$ ethanol, $17,577 \pm 0,327$ mgGAE/mL TPC, $4,953 \pm 0,175$ mgCGE/L anthocyanin, $24,297 \pm 0,227$ mg/L betacyanin, $17,737 \pm 0,326$ mg/L betaxanthin và hoạt tính chống oxy hóa là $23,183 \pm 0,318\%$) và đạt điểm chất lượng cảm quan cao nhất về màu sắc, mùi và vị lần lượt là $7,400 \pm 0,621$; $7,600 \pm 0,498$ và $7,030 \pm 0,718$. Mô hình hồi quy xác định điều kiện tối ưu ($31,536^\circ\text{C}$; 25,927 giờ) với giá trị dự đoán GABA 17,103 mM, phù hợp thực nghiệm $17,387 \pm 0,160$ mM ($R^2 = 96,720\%$), chứng minh tính ổn định và khả năng ứng dụng công nghệ. Hàm lượng các hợp chất sinh học trong hỗn hợp dịch lên men ở điều tối ưu là $4,870 \pm 0,153\%$ ethanol, $17,972 \pm 0,129$ mgGAE/mL TPC, $5,302 \pm 0,215$ mgCGE/L anthocyanin, $25,289 \pm 0,218$ mg/L betacyanin, $18,639 \pm 0,301$ mg/L betaxanthin và hoạt tính chống oxy hóa đạt được $24,135 \pm 0,119\%$.

5.2. Kiến nghị

- Nghiên cứu hoàn thiện sản phẩm và kiểm tra các chỉ tiêu về an toàn thực phẩm theo tiêu chuẩn.

- Tiếp tục mở rộng phân lập và tuyển chọn vi sinh vật bản địa từ nhiều nguồn nguyên liệu và sản phẩm lên men truyền thống khác nhằm xây dựng tập hợp chủng giống đa dạng phục vụ nghiên cứu và ứng dụng.

- Nghiên cứu chuyên sâu cơ chế sinh tổng hợp GABA của *P. acidilactici* TC7 ở cấp độ sinh hóa và di truyền, làm cơ sở cho việc cải tiến chủng.

- Khai thác khả năng đồng nuôi cấy giữa LAB và nấm men trên các loại dịch quả, sữa và nguyên liệu nông sản khác để phát triển thêm các sản phẩm lên men mới giàu hoạt chất sinh học.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Tran Thanh Quỳnh Anh**, Nguyen Tien An & Do Thi Bich Thuy (2025). Characterization of Red Dragon Fruit Wine Fermented with a Newly Identified Yeast Strain *Saccharomyces cerevisiae* M7. *Food Technology and Biotechnology*, 63(1), 4-13. (Scopus và SCI, Q2)
<https://doi.org/10.17113/ftb.63.01.25.8784>
2. **Trần Thanh Quỳnh Anh**, Đỗ Thị Bích Thủy & Nguyễn Thị Vân Anh (2025). Một số tính chất về tiềm năng probiotic của các chủng *Lactobacillus pentosus*. *Tạp chí khoa học và công nghệ nông nghiệp*, 9(1), 4752-4762.
<https://doi.org/10.46826/hauf-jasat.v9n1y2025>
3. **Trần Thanh Quỳnh Anh**, Võ Văn Quốc Bảo & Đỗ Thị Bích Thủy (2025). Tuyển chọn chủng *Lactobacillus fermentum* có tiềm năng probiotic và khả năng sinh tổng hợp gamma aminobutyric axit (GaBa) cao nhằm ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng. *Tạp chí Nông Nghiệp & Môi Trường*, số đặc biệt tháng 9, 154-163.
4. **Trần Thanh Quỳnh Anh & Đỗ Thị Bích Thủy** (2023). Ảnh hưởng của sự thay thế nguồn nguyên liệu tự nhiên và một số điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp gamma-aminobutyric acid của chủng *Pediococcus acidilactici* TC7. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 132(3D), 111-122.
<http://doi.org/10.26459/hueunijard.v132i3D.7247>
5. **Trần Thanh Quỳnh Anh & Đỗ Thị Bích Thủy** (2023). Ảnh hưởng của mật độ tế bào ban đầu và thành phần môi trường đến khả năng sinh tổng hợp gamma - aminobutyric acid bởi chủng *Pediococcus acidilactici* TC7. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 146(4), 76-83.
<https://tapchi.vaas.vn/vi/tap-chi/anh-huong-cua-mat-do-te-bao-ban-dau-va-thanh-phan-moi-truong-den-kha-nang-sinh-tong-hop>

**HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY**

TRAN THANH QUYNH ANH

**EXPLOITING SOME BENEFICIAL PROPERTIES OF LACTIC
ACID BACTERIA, *Saccharomyces cerevisiae* YEAST
AND THEIR APPLICATION IN FOOD TECHNOLOGY**

**SUMMARY OF DOCTORAL THESIS MAJOR:
FOOD TECHNOLOGY**

HUE - 2026

The research was completed at: University of Agriculture and Forestry, Hue University

**Supervisors: Prof. Dr. DO THI BICH THUY
Assoc. Prof. Dr. VO VAN QUOC BAO**

Reviewer 1:

.....
.....

Reviewer 2:

.....
.....

Reviewer 3:

.....
.....

The thesis will be defended at the Hue University Doctoral Thesis Evaluation Committee meeting at:

.....

**At hour.....minutes, on the.....day
of.....month..... 20.....**

The thesis can be found at the libraries of:

- The National Library of Vietnam**
- The Library of the University of Agriculture and Forestry, Hue University**

**HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY**

TRAN THANH QUYNH ANH

**EXPLOITING SOME BENEFICIAL PROPERTIES OF LACTIC
ACID BACTERIA, *Saccharomyces cerevisiae* YEAST
AND THEIR APPLICATION IN FOOD TECHNOLOGY**

**SUMMARY OF DOCTORAL THESIS MAJOR: FOOD
TECHNOLOGY**

Major: Food Technology

Code: 9540101

SCIENTIFIC SUPERVISORS:

Prof. Dr. DO THI BICH THUY

Assoc. Prof. Dr. VO VAN QUOC BAO

HUE - 2026

CHAPTER 1: INTRODUCTION

1.1. The rationale of the study

Lactic acid bacteria (LAB) have long been used in many traditional food fermentation processes to improve flavor, extend shelf life, and increase nutritional value. In particular, many LAB species are recognized as Generally Recognized As Safe (GRAS) microorganisms, possess probiotic potential, and have been widely applied in the production of functional foods and biopharmaceuticals. The probiotic effects of LAB on human health have been demonstrated in many ways: (i) Balancing the gut microbiota by competing for adhesion with pathogenic bacteria and secreting bacteriocins; (ii) Regulating lipid metabolism by reducing the absorption of cholesterol and triglycerides, thereby contributing to the prevention of cardiovascular diseases; (iii) Stimulating mucosal immune responses through their effect on intestinal immune cells; and (iv) Inhibiting the growth of pathogenic microorganisms in the digestive tract. A particularly noteworthy point is that many LAB species can synthesize GABA, a non-protein amino acid that acts as the primary inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. GABA is involved in mechanisms for reducing stress, combating anxiety, and improving sleep.

In parallel with LAB, the yeast species *S. cerevisiae* has been associated with human life for thousands of years, widely used in the production of beer, wine, bread, and many other fermented products. Besides its traditional role, *S. cerevisiae* is also considered to have probiotic potential. In the food industry, this yeast strain serves both a technological function (producing ethanol, CO₂, and flavor compounds) and provides health benefits. Therefore, combining LAB and *S. cerevisiae* in a co-culture fermentation process is seen as a new and promising trend.

Based on the aforementioned grounds, the research on isolating, selecting, and combining LAB with the yeast *S. cerevisiae* to simultaneously leverage their probiotic properties, ability to produce GABA and other bioactive compounds in the fermentation production, and their technological role in the fermentation process has profound scientific and practical significance. This is not only a necessary step in the trend of developing health-protective foods and biopharmaceuticals, but also a basis for enhancing the value of Vietnamese agricultural products, contributing to the modernization of the food technology industry, and integrating with international research trends. For these reasons, we conducted research on the topic:

“Exploiting some beneficial properties of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* yeast and their application in food technology.”

1.2. Research objectives

1.2.1. Overall Objective

The overall objective of this research is to exploit and apply the beneficial properties of LAB and *S. cerevisiae* yeast to develop fermented food products enriched with bioactive compounds, such as Total Phenolic Compounds (TPC) and GABA, and possessing strong probiotic potential for health benefits.

1.2.2. Specific Objectives

The research aims to screen and select LAB strains isolated from Hue's *mam ro* (fermented fish sauce) and *tom chua* (fermented shrimp) based on their probiotic potential and high GABA-producing capacity, along with selecting *S. cerevisiae* from rice starter (*banh men*) for red dragon fruit juice fermentation. This will be followed by applying the selected *S. cerevisiae* strain to produce fermented red dragon fruit juice with enhanced pharmacological activity. Concurrently, the selected LAB and *S. cerevisiae* strains will be used in a co-fermentation of a red dragon fruit juice-milk mixture to develop a unique multifunctional fermented product offering superior health benefits due to its probiotic properties, high GABA content, and other medicinal compounds.

1.3. Significance of the thesis

1.3.1. Scientific significance

The results obtained will contribute to the scientific database on beneficial microorganisms in food technology as follows:

- It partially reflects the LAB species present in Hue's *mam ro* and *tom chua*, as well as their probiotic potential and ability to synthesize GABA.
- It confirms the presence of the yeast strain *S. cerevisiae* in *banh men* and its ability to ferment red dragon fruit juice.
- It expands the research direction for applying the combination of LAB and yeast for *in situ* fermentation in the development of health-protective foods.

1.3.2. Practical significance

The results of this study can be directly applied to the development of fermented products combining LAB and *S. cerevisiae*, which are rich in GABA, probiotic bacteria, and antioxidant compounds from tropical fruit ingredients. This not only contributes to enriching the functional food market in Vietnam but also meets the global consumer trend towards products that are "natural - safe - healthy."

The use of red-fleshed dragon fruit as a fermentation substrate also brings tangible socio-economic benefits, helping to increase the value of agricultural products, reduce seasonal overstocking, and open up a sustainable exploitation direction for the agricultural processing industry. Furthermore, the research results can serve as a basis for businesses to innovate their technological processes and develop products on an industrial scale, thereby contributing to enhancing the competitiveness of Vietnam's food technology industry in the process of international integration.

1.4. Novelty of the Thesis

The novel points of the thesis are:

- The identification of new LAB strains isolated from *mam ro* and a systematic survey of their probiotic potential and GABA synthesis ability. Concurrently, a new yeast strain, *S. cerevisiae* M7, was selected and identified from *banh men*.

- The selected yeast strain, *S. cerevisiae* M7, was utilized to develop a novel product: fermented red dragon fruit juice. This product contains not only ethanol but also high concentrations of bioactive compounds and exhibits significant antioxidant activity. Using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) as the fermentation substrate not only exploits the fruit's natural antioxidant-rich properties but also provides a novel approach to value addition for this characteristic Vietnamese agricultural product.

- The project involves the simultaneous exploitation of two beneficial microbial groups: The research focuses not just on LAB or *S. cerevisiae* individually, but on co-culture fermentation using both microorganisms to generate a final product. This resulting fermented food is a multifunctional composite combining probiotics, GABA, and antioxidant compounds derived from fruit and milk media. This represents a multipurpose integration rarely implemented simultaneously on indigenous microbial strains and local raw materials in previous studies.

CHAPTER 2: LITERATURE REVIEW

2.1. Overview of lactic acid bacteria (LAB), their beneficial properties and applications

In recent years, the LAB group has played a crucial role in the food industry due to their metabolic products and probiotic functions. LAB can impart flavor to food products as a result of lactic fermentation. At the same time, their metabolism also produces short-chain fatty acids, amines, bacteriocins, vitamins, exopolysaccharides (EPS), and GABA, which increase nutritional value and extend the shelf life of food. This section primarily introduces the formation of metabolic products during food fermentation and some properties related to the probiotic potential of LAB.

2.2. Yeast and applications

2.2.1. Introduction to Yeast and Applications in Food Technology

2.2.1.1. Introduction to Yeast

Yeasts are single-celled, eukaryotic microorganisms, typically oval in shape. On agar medium, yeast colonies are opaque white, yellow, or pale pink, and their cell surfaces are often dry and taut. Yeasts are widely applied in the food industry, such as in the production of bread, the fermentation of alcoholic beverages, in fermented dairy products, in the production of bioethanol, and in the production of probiotic preparations.

Banh men is a form of rice wine starter, a mixture that can include molds, yeasts, and bacteria. The microorganisms in *banh men* have the ability to hydrolyze starch into sugar (primarily due to molds) and ferment the sugar solution into alcohol (primarily due to yeasts). The origin of *banh men* is from China, after which it spread to other Asian countries. Among the microorganisms present in *banh men*, the *S. cerevisiae* strain has been reported as the main ethanol-producing agent.

2.2.1.2. Applications of Yeast in Food Technology

Yeast is widely utilized in food processing for bread production, meat fermentation, and dairy fermentation. Furthermore, they serve as starter cultures for the production of bioethanol from diverse raw materials. Importantly, certain species are recognized as valuable probiotics with significant health benefits.

2.2.2. Yeast in Fermented Beverage Production

Yeast plays a crucial role in the fermentation applications for alcoholic beverage production, yielding products such as beer, wine, high-gravity spirits, sake,

shochu, and distilled spirits. *S. cerevisiae* is the most significant species involved in winemaking.

2.2.2.1. Yeast in Beer Production

The brewing process involves multiple stages, with fermentation being the critical step, utilizing yeast to convert sugars derived from barley malt. The yeast generates ethanol and CO₂ as primary products, along with a range of secondary metabolites (esters, higher alcohols, organic acids). These compounds (including sulfur compounds) are decisive in shaping the characteristic flavor and aroma profiles, thus establishing the sensory value of the beer.

2.2.2.2. Yeast in Wine Production

Yeast is the pivotal microbial agent in winemaking fermentation. During wine fermentation, yeast converts grape sugars into ethanol, CO₂ and various secondary products, such as esters, organic acids, higher alcohols, aldehydes, ketones, polyols, volatile sulfur compounds, and other sensory attributes of the product.

2.2.2.3. Yeast in Fermented Fruit Juice Production

Numerous fruits, including pineapple, dragon fruit, watermelon, apple, plum, etc., are fermented using *S. cerevisiae* to produce alcoholic and nutritious beverages. Red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*), in particular, is rich in bioactive compounds (betalains, polyphenols). Given that red dragon fruit is highly perishable and valuable, processing it into fermented beverages is essential for consumption and value enhancement. The goal is to investigate the optimization of fermentation conditions to obtain a product with the best possible bioactivity.

2.3. Factors Affecting Fruit Juice Fermentation Process

The fermentation process of fruit juice is significantly influenced by the microbial strain employed. *S. cerevisiae* is the most widely used yeast species in fruit must fermentation, necessitating the selection of pure cultures to effectively control the final product's flavor profile. Beyond the microbial factor, environmental parameters such as sugar concentration, pH level, and temperature are also critical determinants. Optimizing both temperature and pH is essential; it not only supports optimal yeast activity but also aids in the maximum extraction of bioactive compounds and effectively inhibits the proliferation of spoilage microorganisms.

2.4. Relevant Research Works

2.4.1. Domestic and International Studies on the Probiotic Potential of LAB

The screening and selection of LAB strains with probiotic potential have been widely studied both domestically and internationally, focusing on evaluating critical

characteristics such as tolerance to the gastrointestinal tract environment (low pH, bile salt tolerance, and pancreatic fluid) and safety profile (non-hemolytic activity, antibiotic resistance). Several studies have been published: Do Thi Bich Thuy (2010) isolated the *L. fermentum* MC9 strain from *mang chua Hue*, which showed good potential via survival at pH 2 and high auto-aggregation ability. The research goal of Vo Van Quoc Bao *et al.* (2016) was to isolate *L. pentosus* and *L. fermentum* strains from *mam ruoc Hue* that exhibited high auto-aggregation (75%) and strong antimicrobial activity against *Salmonella* and *E. coli* (inhibition zone of 10.6-12.9 mm). Similarly, according to Srinivash *et al.* (2023), strains from traditional fermented products (such as *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*) also displayed robust probiotic traits, including good acid and bile salt tolerance and high hydrophobicity (over 40%), leading to their selection for probiotic formulation. Furthermore, Chowdhury *et al.* (2023) reported that a *Lactobacillus sp.* strain from an Indian fermented product demonstrated the capacity for growth over a wide pH range (3-7), inhibition of *E. coli*, and resistance to several antibiotics (streptomycin, vancomycin, kanamycin), while being non-hemolytic.

2.4.2. Domestic and International Studies on the GABA Biosynthesis Capability of LAB

Research into GABA biosynthesis by microorganisms in Vietnam remains limited, but notable efforts have been made to determine appropriate technological parameters. Domestic studies have successfully screened and selected LAB strains from traditional sources: Nguyen Thị Diem Huong *et al.* (2020) isolated the *P. pentosaceus* MN12 strain from *mam nem Hue* and optimized fermentation conditions to achieve the highest GABA concentration (2597.12 mg/L at pH 7, 45°C). Similarly, in research by Le Thi Huyen Trang and Do Thi Bich Thuy (2020), the strains *L. farciminis* M23 and *L. pentosus* R1 were also optimized for GABA production capacity at 40-45°C with 1-2% MSG. Globally, Kanklai *et al.* (2021) demonstrated that strains like *Lvl. brevis* F064A from Thai food had high GABA-producing ability (2.85 mg/mL) and were applied in mulberry juice fermentation. Furthermore, Kwon *et al.* (2023) showed that optimizing solid-state fermentation (SSF) of brown rice using a *Lactobacillus sp.* demonstrated the potential to increase GABA content by nearly 50% (from 4.64 mg/g to 6.93 mg/g) under optimal conditions (36°C, 48 hours), opening a path for developing GABA-rich products.

2.4.3. Domestic and International Studies on Yeast Strain Isolation, Identification, and Fermented Fruit Juice Production

Numerous domestic and international studies have focused on the screening and selection of *S. cerevisiae* strains capable of efficient fruit must fermentation for alcoholic beverage production. Specifically in Vietnam, Nguyen Van Ba *et al.* (2021) successfully isolated and identified the *S. cerevisiae* S6 strain from sapodilla (*hong xiem*), with optimized fermentation conditions (initial pH 4.5; 24°Bx; at room temperature). Similarly, in the research by Nguyen Ngoc Thanh *et al.* (2021), the *S. cerevisiae* FBY015 strain, isolated from soursop (*mang cau xiem*), was fermented with an initial pH of 4.0, 25°Bx at 25°C. The resulting wine products consistently achieved high ethanol concentrations, ranging from 10.1% to 10.7% (v/v). Furthermore, international research, as documented by Hafsat *et al.* (2015), also utilized *S. cerevisiae* isolated from palm wine to ferment watermelon juice at 15°C, yielding a product with an alcohol content of 9.86% (v/v) and acceptable sensory quality, thereby demonstrating the feasibility of developing alternative wine products.

CHAPTER 3: RESEARCH METHODOLOGY

3.1. Research Subjects and Scope

3.1.1. Research subject

- LAB strains isolated and identified from *mam ro* Hue,
- LAB strains isolated from *tom chua* Hue, which were identified and published, and are currently preserved at the BCCM/LMG Bacteria Collection, Ghent University, Belgium,
- *S. cerevisiae* strain isolated from *banh men*,
- Fruit juices (red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*), pineapple (*Ananas comosus*), and watermelon (*Citrullus lanatus*)), soymilk, and unsweetened fresh milk (TH True Milk brand).

3.1.2. Scope of the Study

The scope of this research is primarily focused on the isolation and screening of microbial strains from traditional food sources of Hue and *banh men*. The selected strains will subsequently be applied in various fermentation processes.

3.1.3. Experiment location and time

The experiments were conducted at the laboratory of the faculty of engineering and technology, University of Agriculture and Forestry, Hue University, and at the laboratory of the Institute of Biotechnology, Hue University. The research was carried out from November 2022 to November 2025.

3.2. Research contents

The study was conducted with four specific contents:

- (1) Isolation, identification, and selection of LAB strains with probiotic potential and high GABA synthesis ability.
- (2) Investigation of the effect of culture conditions on the GABA synthesis ability of the selected strain.
- (3) Investigation of the effect of some technological parameters on the quality of fermented fruit juice by the yeast strain isolated and selected from *banh men*.
- (4) Production of a new fermented product with high probiotic potential and bioactive compounds.

3.3. Research resources

3.3.1. Analytical methods used in the study

Table 3.1. Analytical methods used in the study

No.	Content	Method
1	Lactic acid bacteria (LAB) identification	<i>MALDI-TOF MS, PheS</i> gene sequencing
2	Yeast identification	ITS rDNA sequencing and sequence comparison with the GenBank database using the BLAST tool
3	Method for determining GABA content	High pressure liquid chromatography (HPLC)
4	Method for determining TPC content	Absorbance Spectrophotometry (OD)
5	Method for determining betalain content	
6	Method for determining cell density	
7	Methods for determining some probiotic properties of LAB, including: acid tolerance, auto-aggregation and co-aggregation ability, solvent adhesion ability, pepsin tolerance, bile salt and pancreatic fluid tolerance	
8	Method for investigating antibiotic resistance and bacterial inhibition	Agar disk diffusion method
9	Sensory evaluation method	Preference method
10	Statistical analysis method	Using SPSS and MINITAB software
11	Optimization method using experimental design	Response Surface Methodology (RSM). Central Composite Design (CCD)

3.3.2. Experimental design methods

3.3.2.1. Experimental design for the effect of some technological parameters on the GABA synthesis ability of the selected LAB strain

The experiments were conducted using a single-factor approach, including: initial cell density, supplemented MSG concentration, supplemented carbon and nitrogen sources, replacing saccharose and peptone with natural sources, initial pH, temperature, and incubation time.

3.3.2.2. Experimental design for the effect of some technological parameters on the quality of fruit juice fermented by the selected yeast strain

The quality of the fermented fruit juice was evaluated based on the content of anthocyanin, TPC, betacyanin, and betaxanthin, as well as antioxidant activity. The factors affecting these parameters were: initial cell density, initial Bx, initial pH, fermentation temperature, and fermentation time. The experiments were performed as a single factor influence survey.

3.3.2.3. Experimental design for the production of a new fermented product rich in probiotic potential and bioactive compounds

The quality of the fermented mixture of fruit juice and milk by the selected LAB and yeast strains was evaluated based on the following parameters: ethanol concentration, anthocyanin, TPC, betacyanin, betaxanthin, antioxidant activity, and sensory quality (color, aroma, taste). The factors influencing these parameters were: the mixing ratio of fruit juice and milk, fermentation temperature, and fermentation time.

CHAPTER 4: RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Isolation, identification, and selection of LAB strains with probiotic potential and high GABA synthesis ability

4.1.1. Isolation results

A total of 20 LAB strains were isolated from *mam ro*.

4.1.2. Identification results of LAB strains

Among the 20 strains isolated from *mam ro*, strains belonging to the species *L. fermentum* were the most numerous (12 strains), followed by 2 strains of *L. farciminis*.

4.1.3. Identification results by *PheS* gene sequencing

The remaining five strains belong to the species *L. pentosus*.

4.1.4. Survey of probiotic potential of LAB strains

4.1.4.1. Survival of LAB strains in the gastrointestinal tract

Survival in the digestive tract is the primary criterion for concluding that microbial strains have probiotic potential. Accordingly, these strains must survive the harsh conditions of the stomach (acid tolerance (pH 2-3), pepsin tolerance (a type of protease)) and the small intestine (tolerance to bile salts and pancreatic fluid). The results for low pH tolerance showed that the survival rate of LAB strains in an acidic solution at pH 2.5 after 4 hours ranged from $63.823 \pm 3.740\%$ to $140.184 \pm 2.866\%$. Bile salt and pancreatic fluid tolerance The survival rate of the LAB strains in a simulated human intestinal environment with bile salts and pancreatic fluid was quite high (>78%). Of these, 34 strains had a survival percentage of over 90%.

4.1.4.2. Aggregation and adhesion ability

The auto-aggregation ability of the strains was surveyed, ranging from $5.209 \pm 0.510\%$ to $99.240 \pm 0.685\%$. The percentage of co-aggregation of the LAB strains with *E. coli* ATCC 25922 strains ranged from $0.178 \pm 0.060\%$ to $21.136 \pm 0.403\%$, with *Sta. aureus* ATCC 25923 from $0.484 \pm 0.057\%$ to $25.236 \pm 0.345\%$, and with *S. typhimurium* from $3.071 \pm 0.433\%$ to $49.544 \pm 2.237\%$. The strains *L. pentosus* (M1, M3, M4), *L. farciminis* M18, *L. fermentum* (M21, M43, M46, M17), and *P. acidilactici* (TC1, TC2, TC3, TC4, TC5, TC6, TC24) showed no aggregation with *E. coli*. The strains *L. fermentum*(M21, M25), *P. acidilactici* (TC1, TC2, TC3, TC8), and *L. fermentum* TC10 showed no aggregation with *Sta. aureus*. In addition, the strains *L. farciminis* M28, *L. fermentum* (M34, M42, M43, M44, TC17), and *P. acidilactici* (TC4, TC6, TC24) showed no aggregation with *S. typhimurium* ATCC

14028. The solvent adhesion ability (ethyl acetate and xylene) of the LAB strains ranged from $0.644 \pm 0.281\%$ to $60.467 \pm 0.623\%$.

4.1.4.3. Antibiotic resistance of LAB strains

The results showed that most of the LAB strains surveyed were susceptible (NR) to Chloramphenicol (25 strains), Clindamycin (22 strains), Erythromycin (30 strains), and Tetracycline (27 strains), and were resistant (R) to Ampicillin (29 strains), Gentamycin (30 strains), Streptomycin (36 strains), Kanamycin (37 strains), and Vancomycin (36 strains).

4.1.4.4. Inhibition of pathogenic bacteria

Against *E. coli* ATCC 25922, the LAB strains showed a fairly high resistance. All surveyed strains were able to inhibit *E. coli* ATCC 25922 to varying degrees. Accordingly, the strains *L. pentosus* (M1, M2, M5), *L. fermentum* (M21, M22, M38, M41, M42, M43, M44, M46), *L. farciminis* M31, *P. acidilactici* (TC1, TC2, TC3, TC5, TC7, TC8, TC9, TC24, TC29), and *L. fermentum* (TC10, TC11, TC12, TC13, TC14, TC15, TC16, TC17, TC18) showed strong resistance to *E. coli* with an inhibition zone diameter over 10 mm. The remaining strains *L. pentosus* (M3, M4), *L. farciminis* M18, *L. fermentum* (M24, M25, M34, M40), and *P. acidilactici* (TC4, TC6) showed weaker resistance with an inhibition zone diameter between 5 and 10 mm.

The survey results of the resistance of LAB strains isolated from *mam ro* and *tom chua* to *S. typhimurium* ATCC 14028 showed that the resistance was quite similar to previous publications, with a large inhibition zone diameter, indicating strong resistance that meets the potential of a probiotic in the human digestive system.

4.1.5. Survey of GABA synthesis ability of LAB strains

In general, all strains had a high ability to produce GABA. Among them, *P. acidilactici* TC7 had the highest GABA content (8.764 ± 0.138 mM) and *P. acidilactici* TC24 had the lowest (1.109 ± 0.102 mM). The remaining strains had a GABA synthesis ability lower than TC7 and higher than TC24.

Conclusion of the selection survey through probiotic potential and GABA synthesis ability: Based on the survey results, the strain *P. acidilactici* TC7 exhibited better probiotic potential than the other strains. Furthermore, its GABA synthesis ability was the highest. Therefore, the strain *P. acidilactici* TC7 was selected for subsequent research.

Table 4.6. GABA synthesis ability of LAB Strains

Strains	GABA (mM)	Strains	GABA (mM)	Strains	GABA (mM)	Strains	GABA (mM)
<i>L. pentosus</i> M1	3.585 ^{mno} ± 0197	<i>L. farciminis</i> M28	7.110 ^c ± 0.175	<i>P. acidilactici</i> TC1	1.893 st ± 0.063	<i>L. fermentum</i> TC11	7.127 ^c ± 0.149
<i>L. pentosus</i> M2	6.270 ^{de} ± 0.156	<i>L. farciminis</i> M31	7.072 ^c ± 0.171	<i>P. acidilactici</i> TC2	1.983 ^s ± 0.192	<i>L. fermentum</i> TC12	4.698 ⁱ ± 0.109
<i>L. pentosus</i> M3	6.535 ^d ± 0.115	<i>L. fermentum</i> M34	7.820 ^b ± 0.109	<i>P. acidilactici</i> TC3	3.088 ^{pq} ± 0.229	<i>L. fermentum</i> TC13	6.930 ^c ± 0.120
<i>L. pentosus</i> M4	5.289 ^h ± 0.241	<i>L. fermentum</i> M38	5.076 ^h ± 0.294	<i>P. acidilactici</i> TC4	4.231 ^{jk} ± 0.196	<i>L. fermentum</i> TC14	3.044 ^q ± 0.178
<i>L. pentosus</i> M5	6.892 ^c ± 0.143	<i>L. fermentum</i> M40	6.400 ^{de} ± 0.171	<i>P. acidilactici</i> TC5	5.754 ^g ± 0.269	<i>L. fermentum</i> TC15	5.157 ^h ± 0.156
<i>L. farciminis</i> M18	7.232 ^c ± 0.208	<i>L. fermentum</i> M41	6.118 ^{ef} ± 0.180	<i>P. acidilactici</i> TC6	3.996 ^{kl} ± 0.085	<i>L. fermentum</i> TC16	5.920 ^{fg} ± 0.206
<i>L. fermentum</i> M21	4.331 ^j ± 0.321	<i>L. fermentum</i> M42	3.548 ^{no} ± 0.329	<i>P. acidilactici</i> TC7	8.764^a± 0.138	<i>L. fermentum</i> TC17	3.855 ^{lmn} ± 0.085
<i>L. fermentum</i> M22	5.293 ^h ± 0.222	<i>L. fermentum</i> M43	4.345 ⁱ ± 0.271	<i>P. acidilactici</i> TC8	6.364 ^{de} ± 0.106	<i>L. fermentum</i> TC18	2.148 ^{rs} ± 0.144
<i>L. fermentum</i> M24	4.414 ^{ij} ± 0.261	<i>L. fermentum</i> M44	2.398 ^r ± 0.289	<i>P. acidilactici</i> TC9	1.614 ^t ± 0.107	<i>P. acidilactici</i> TC24	1.109 ^u ± 0.102
<i>L. fermentum</i> M25	3.381 ^{op} ± 0.209	<i>L. fermentum</i> M46	3.907 ^{klm} ± 0.198	<i>L. fermentum</i> TC10	6.554 ^d ± 0.146	<i>P. acidilactici</i> TC29	5.894 ^{fg} ± 0.262

Note: The cells were cultured in MRS medium at an initial cell density of 10⁷ CFU/mL with a starting pH of 6.2 at 37°C for 24 hours. Dissimilar lowercase letters indicate a statistically significant difference (Duncan's test, p < 0,05).

4.2. Effect of culture conditions on the GABA synthesis ability of the selected strain

4.2.1. Effect of initial cell density on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

The highest accumulated GABA content in the culture medium was at an initial cell density of LAB between 10^6 CFU/mL and 10^7 CFU/mL, which is consistent with the results of this study. An initial cell density of 10^7 CFU/mL of the *P. acidilactici* TC7 strain was chosen for the next experiment.

4.2.2. Effect of added MSG content on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

Adding 1.5% MSG to the culture medium was most suitable for this LAB strain to produce the highest amount of GABA.

4.2.3. Effect of added carbon source on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

Between the two added carbon sources, saccharose and maltose, the GABA content obtained in the medium was not statistically different. However, saccharose is an easily accessible and inexpensive source, so it was chosen for subsequent experiments.

4.2.4. Effect of added saccharose content on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

Adding 2% saccharose to the medium was the most suitable for the *P. acidilactici* TC7 strain to produce high GABA, so it was chosen for subsequent studies.

4.2.5. Effect of added nitrogen source on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

Peptone was the most suitable nitrogen source for *P. acidilactici* TC7 to synthesize GABA, so it was used for subsequent experiments.

4.2.6. Effect of added peptone content on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

The addition of 2% peptone to the MRS medium was the most suitable for the GABA synthesis of the *P. acidilactici* TC7 strain.

4.2.7. Effect of replacing saccharose with fruit juice on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

The appropriate amount of added saccharose was replaced with red dragon fruit juice (50 mL/100 mL of medium) for subsequent experiments.

4.2.8. Effect of replacing peptone with milk on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

Cow's milk was chosen to replace the peptone in the culture medium for subsequent experiments. The appropriate amount of cow's milk was 50 mL/100 mL of medium.

4.2.9. Effect of initial pH on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

From this study's results, a pH value of 6 was chosen as a fixed factor for subsequent experiments.

4.2.10. Effect of incubation temperature on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

The highest GABA content was at an incubation temperature of 40°C. Therefore, this temperature was used for subsequent experiments.

4.2.11. Effect of incubation time on GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7

From 24 to 72 hours of fermentation, the cell count of *P. acidilactici* TC7 steadily increased from 9.080 ± 0.006 log CFU/mL to 9.225 ± 0.010 log CFU/mL, with a gradual accumulation of GABA to a maximum of 30.784 ± 0.104 mM.

Red dragon fruit juice was used to select yeast and for fermentation in subsequent sections. The mixture of red dragon fruit and TH True Milk unsweetened fresh milk was used as the raw material for fermentation to produce a new product using a combined LAB and yeast starter culture. The technological parameters from these results (initial cell density, initial pH, fermentation temperature) were used to design the experiments for the research on creating the fermented product from the red dragon fruit and TH True milk unsweetened fresh milk mixture.

4.3. Effect of some technological parameters on the quality of fruit juice fermented by the selected yeast strain

4.3.1. Isolation, selection, and identification of yeast strains

Among the 32 yeast colonies isolated from Hansen's medium, 18 strains (coded from M1 to M18) were classified as yeast based on cell morphology observed by a scanning electron microscope (at 40x objective). These yeast strains were screened for their ability to produce ethanol by fermenting red dragon fruit juice at 28°C for 24 hours. The results showed that four strains (M2, M7, M11, and M17) were capable of fermenting and producing ethanol. Among the ethanol-producing strains, M7 produced a higher volume percentage of ethanol ($6.3 \pm 0.3\%$) than M2, M11, and M17 at a preliminary treatment temperature of 70°C. In addition, the TPC content in GAE (27.22 ± 5.41 mgGAE/mL), anthocyanin in CGE (10.02 ± 0.25 mgCGE/L), betacyanin (50.37 ± 0.99 mg/L), and betaxanthin (43.60 ± 0.72 mg/L), and the DPPH free radical scavenging activity ($57.65 \pm 0.35\%$) of the red dragon fruit juice preliminarily treated at 70°C and fermented by the M7 strain were significantly higher than those of the other strains. In summary, the results of this study showed that a preliminary treatment temperature of 70°C and the use of strain M7 seemed most suitable for producing wine from red dragon fruit juice and were therefore chosen for subsequent experiments. Identification results confirmed that strain M7 is the species *S. cerevisiae*, which is a useful yeast in the wine

production industry. It not only ferments fruit juice or media with high sugar content into ethanol but also produces secondary compounds with characteristic flavors.

4.3.2. Effect of some technological parameters on the quality of fruit juice fermented by *S. cerevisiae* M7

4.3.2.1. Effect of initial cell density

The results of this study showed that an initial cell density of 10^8 CFU/mL was reasonable for carrying out subsequent experiments.

4.3.2.2. Effect of initial dry matter content

From this study, it can be concluded that an initial saccharose content of 18% (m/V) is optimal for producing red dragon fruit wine with a high antioxidant profile.

4.3.2.3. Effect of pH

The study results showed that an initial pH of 3.5 is optimal for the fermentation of red dragon fruit wine by *S. cerevisiae* M7 in terms of ethanol content, polyphenol concentration, betacyanin, betaxanthin, and antioxidant activity of the wine.

4.3.2.4. Effect of temperature

The results showed that the highest alcohol content ($13.06 \pm 0.24\%$), TPC content in GAE (37.59 ± 0.87 mg GAE/mL), anthocyanin in CGE (11.41 ± 0.38 mgCGE/L), betacyanin (65.63 ± 0.49 mg/L), and betaxanthin (61.16 ± 0.96 mg/L) were achieved at a fermentation temperature of 30°C.

4.3.2.5. Effect of Time

The ethanol content in the wine gradually increased from the first to the sixth day of fermentation, reaching a maximum value of $12.12 \pm 0.15\%$, while continued fermentation after this point did not produce a significant amount of additional ethanol. Parallel to the increase in ethanol content, the concentration of polyphenol compounds (in GAE), anthocyanin (in CGE), betacyanin, betaxanthin, and the antioxidant activity of the wine also steadily increased during the first six days of fermentation and reached maximum values of 37.79 ± 0.38 mgGAE/mL, 11.22 ± 0.31 mgCGE/L, 65.18 ± 0.82 mg/L, 60.47 ± 1.29 mg/L, and $65.41 \pm 0.44\%$, respectively.

4.4. Production of a new fermented product rich in probiotic potential and bioactive compounds

This experiment was designed to build upon the results from sections 4.1 to 4.3. The results were used to set up the experiment as follows:

(1) The strain *P. acidilactici* TC7 was used as the starter culture (selected from section 4.1 based on its good probiotic potential and high GABA synthesis ability). This strain was co-fermented with *S. cerevisiae* M7 (selected from section 4.3 based

on its ability to ferment red dragon fruit juice with high content of bioactive compounds and antioxidant capacity).

(2) The technological parameters obtained in section 4.2 (to achieve high accumulated GABA content in the medium) and section 4.3 (to produce high-quality fermented red dragon fruit juice) were inherited to design the experimental levels (initial cell density, initial pH, fermentation temperature) in this section (section 4.4).

(3) The raw materials selected for this experiment were red dragon fruit juice and TH True milk unsweetened fresh milk, based on the results of the survey on replacing natural C and N sources for high GABA synthesis by *P. acidilactici* TC7 (results from section 4.2).

The co-fermentation experiment of the red dragon fruit juice and TH True milk fresh milk mixture by *P. acidilactici* TC7 and *S. cerevisiae* M7 investigated the effect of several factors (raw material mixing ratio, temperature, and fermentation time) on product quality parameters (ethanol concentration, TPC content, anthocyanin, betacyanin, betaxanthin, antioxidant activity, and sensory quality (color, aroma, taste)).

4.4.1. Effect of fruit juice and milk mixing ratio

The 3:1 ratio demonstrated superiority by simultaneously achieving the highest levels of most important bioactive compounds such as polyphenols (17.093 ± 0.156 mgGAE/mL), anthocyanins (4.437 ± 0.367 mgCGE/L), betacyanins (23.207 ± 0.345 mg/L), and betaxanthins (17.363 ± 0.348 mg/L), along with antioxidant activity ($22.650 \pm 0.181\%$). Sensory evaluation results showed that the 3:1 ratio was rated highest in all three criteria: color, aroma, and taste.

Table 4.10. Effect of raw material mixing ratio on certain parameters of the fermentation broth

No.	Parameters	Mixing ratio				
		1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
1	Ethanol (%)	2.713 ^c ± 0.287	1.633 ^d ± 0.071	1.297 ^d ± 0.211	3.267 ^b ± 0.295	3.870^a ± 0.181
2	TPC (mgGAE/mL)	12.043 ^c ± 0.064	8.840 ^d ± 0.108	7.007 ^e ± 0.168	16.020 ^b ± 0.200	17.093^a ± 0.156
3	Anthocyanin (mgCGE/L)	2.540 ^c ± 0.305	1.827 ^d ± 0.085	1.280 ^e ± 0.161	3.720 ^b ± 0.433	4.437^a ± 0.367
4	DPPH radical scavenging activity (%)	15.220 ^c ± 0.255	11.040 ^d ± 0.145	8.943 ^e ± 0.127	19.193 ^b ± 0.189	22.650^a ± 0.181

No.	Parameters	Mixing ratio				
		1:1	1:2	1:3	2:1	3:1
5	Betacyanin (mg/L)	15.673 ^c ± 0.401	10.590 ^d ± 0.240	7.957 ^e ± 0.119	21.237 ^b ± 0.248	23.207^a ± 0.345
6	Betaxanthin (mg/L)	11.893 ^c ± 0.153	7.897 ^d ± 0.116	5.897 ^e ± 0.162	15.713 ^b ± 0.189	17.363^a ± 0.348
7	GABA (mM)	21.840 ^c ± 0.190	29.625 ^b ± 0.383	35.081 ^a ± 0.240	14.505 ^c ± 0.077	15.916^d ± 0.227

Note: CGE, cyanidin 3-glucoside equivalent; GAE, gallic acid equivalent. Data are expressed as the mean of three replicates ± standard deviation (SD). Different letters denote statistically significant differences ($p < 0,05$)

4.4.2. Effect of fermentation temperature

As the temperature increased from 30°C to 35°C, all biochemical parameters reached their highest values. Specifically, at 35°C, the ethanol content ($4.637 \pm 0.461\%$) reflected the most favorable sugar-to-alcohol conversion, while polyphenols (17.693 ± 0.480 mgGAE/mL) and anthocyanins (4.850 ± 0.276 mgCGE/L) were kept stable, contributing to an increase in antioxidant capacity ($22.963 \pm 0.264\%$). Simultaneously, betacyanins and betaxanthins the two pigment groups that determine natural color also reached their maximum (23.983 ± 0.321 mg/L and 17.857 ± 0.537 mg/L), giving the product a beautiful color, corresponding to the highest sensory score for color (7.17 ± 0.834). At 35°C, the product received the highest scores for all three criteria: color (7.17 ± 0.834), aroma (7.13 ± 0.776), and taste (7.23 ± 0.858). The consistency between the content of bioactive substances and sensory evaluation shows that at 35°C, the product achieves both a harmonious chemical structure and an optimal sensory quality for the consumer.

Table 4.12. Effect of temperature on certain parameters of the fermentation broth

No.	Parameters	Temperature (°C)				
		25	30	35	40	45
1	Ethanol (%)	2.797 ^b ± 0.169	4.700 ^a ± 0.387	4.637^a ± 0.461	3.247 ^b ± 0.274	2.207 ^c ± 0.223
2	TPC (mgGAE/mL)	15.570 ^c ± 0.464	17.437 ^{ab} ± 0.244	17.693^a ± 0.480	16.747 ^b ± 0.391	13.650 ^d ± 0.449
3	Anthocyanin (mgCGE/L)	2.923 ^c ± 0.221	4.737 ^a ± 0.265	4.850^a ± 0.276	4.073 ^b ± 0.127	2.423 ^d ± 0.302

4	DPPH radical scavenging activity (%)	20.540 ^b ± 0.230	22.890 ^a ± 0.187	22.963^a ± 0.264	20.923 ^b ± 0.119	18.230 ^c ± 0.345
5	Betacyanin (mg/L)	19.500 ^c ± 0.314	23.627 ^a ± 0.373	23.983^a ± 0.321	21.843 ^b ± 0.273	18.683 ^d ± 0.340
6	Betaxanthin (mg/L)	16.667 ^b ± 0.389	18.140 ^a ± 0.336	17.857^a ± 0.537	17.107 ^b ± 0.135	14.430 ^c ± 0.318
7	GABA (mM)	4.973 ^d ± 0.188	6.877 ^c ± 0.204	16.473^a ± 0.237	11.976 ^b ± 0.211	6.682 ^c ± 0.214

Note: CGE, cyanidin 3-glucoside equivalent; GAE, gallic acid equivalent. Data are expressed as the mean of three replicates ± standard deviation (SD). Different letters denote statistically significant differences ($p < 0,05$)

4.4.3. Effect of fermentation time

Fermentation time had a clear effect on both the biological compounds and sensory parameters, with 24 hours being the optimal point. A fermentation time of 24 hours is the ideal balance: ethanol reached a high level ($4.800 \pm 0.223\%$) without negatively affecting the sensory experience, GABA reached its maximum (16.473 ± 0.367 mM), bioactive compounds and antioxidant activity were at their highest levels, and the product maintained a harmonious color, aroma, and taste. This is the optimal time to choose to maximize both the functional value and sensory quality of the product.

Table 4.14. *Effect of fermentation time on certain parameters of the fermentation broth*

No.	Parameters	Time (giò)			
		12	24	36	48
1	Ethanol (%)	3.510 ^b ± 0.219	4.800^a ± 0.223	4.580 ^a ± 0.363	4.810 ^a ± 0.305
2	TPC (mgGAE/mL)	12.427 ^b ± 0.421	17.577^a ± 0.327	17.293 ^a ± 0.388	17.453 ^a ± 0.203
3	Anthocyanin (mgCGE/L)	3.673 ^b ± 0.275	4.953^a ± 0.175	4.640 ^a ± 0.436	5.223 ^a ± 0.313
4	DPPH radical scavenging activity (%)	11.707 ^b ± 0.587	23.183^a ± 0.318	22.777 ^a ± 0.496	23.420 ^a ± 0.435

5	Betacyanin (mg/L)	21.017 ^b ± 1.020	24.297^a ± 0.227	24.807 ^a ± 0.261	24.750 ^a ± 0.550
6	Betaxanthin (mg/L)	12.413 ^b ± 1.138	17.737^a ± 0.326	17.813 ^a ± 0.261	18.030 ^a ± 0.151
7	GABA (mM)	9.047 ^c ± 0.050	16.473^a ± 0.367	11.928 ^b ± 0.171	12.043 ^b ± 0.084

Note: CGE, cyanidin 3-glucoside equivalent; GAE, gallic acid equivalent. Data are expressed as the mean of three replicates ± standard deviation (SD). Different letters denote statistically significant differences ($p < 0,05$)

4.4.4. Optimization results for fermentation to synthesize high GABA

To optimize the fermentation conditions for enhanced GABA synthesis, two main factors temperature and time were chosen for the study. The ranges for these variables were 25 to 40°C and 12 to 36 hours, respectively (Table 4.16).

Table 4.16. Experimental design matrix and experimental results

No.	Influencing factor				Output results
	Coded		Real value		GABA (Y)
	X ₁	X ₂	Fermentation temperature (°C)	Fermentation time (h)	
1	-1	-1	25	12	8.792
2	1	-1	40	12	8.057
3	-1	1	25	36	13.454
4	1	1	40	36	7.778
5	-1.414	0	21.9	24	9.433
6	1.414	0	43.1	24	9.100
7	0	-1.414	32.5	7.03	9.942
8	0	1.414	32.5	40.97	11.932
9	0	0	32.5	24	17.472
10	0	0	32.5	24	16.967
11	0	0	32.5	24	16.669
12	0	0	32.5	24	16.471
13	0	0	32.5	24	17.273

Note: Coded values (X₁, X₂) correspond to the two input factors in the fermentation process: X₁ - fermentation temperature (°C), X₂ - fermentation time (hours). These factors were tested at five coded levels: -1, 0, +1, -1.414, and +1.414, following the Response Surface Methodology (RSM) experimental design.

Based on the output results of the 13 experiments (Table 4.16), the regression equation for the objective functions, after removing coefficients with a p-value > 0.05, was established with the corresponding R² value and optimization results (Table 4.17). The results show that: (1) The model is a quadratic model, with linear coefficients (4.834 and 1.575) meaning that as temperature or time increases, the initial GABA tends to increase. (2) The model's very high R² value (96.720%) indicates that this model is highly reliable for predicting the GABA index based on fermentation temperature and time. (3) The presence of negative quadratic coefficients (-0.07106 and -0.02196) in the equation indicates that the objective function has a maximum (optimal) point within the study range. (4) The presence of the interaction coefficient (-0.01373) in the GABA equation suggests that when temperature and time are increased simultaneously, the synergistic effect is not positive (it reduces the GABA content).

Table 4.17. Regression Equation and Optimization Results

Objective function	Regression equation	R²	Maximum value (Optimal fermentation temp (31.536 °C) and optimal fermentation time (25.927 hours))	Verified experimental result
GABA	$Y = -79.52 + 4.834 X_1 + 1.575 X_2 - 0.07106 X_1^2 - 0.02196 X_2^2 - 0.01373 X_1 * X_2$	96.720%	17.103 mM	17.387 ± 0,160 mM

Solving the regression equations (Table 4.17) shows that the optimal fermentation temperature and time are 31.536°C and 25.927 hours, respectively. At these optimal conditions, the maximum value of the GABA objective function is 17.103 mM. Compared to the verified experimental result at these optimal conditions (31.536 °C and 25.927 hours), the GABA content was 17.387 ± 0.160 mM. This shows that the actual value obtained from the experiment under optimal conditions is very close to the predicted value of the model. This proves that the developed regression equation can accurately predict the optimal value and that the

optimal conditions found are reliable. This provides a solid basis for applying these conditions in practice to achieve the desired efficiency.

To visually represent the optimization results, a response surface 3D plot showing the relationship between the two input factors (X and Y axes) and the output response (Z axis), corresponding to the regression equation (Table 4.17), is presented in Figure 4.29.

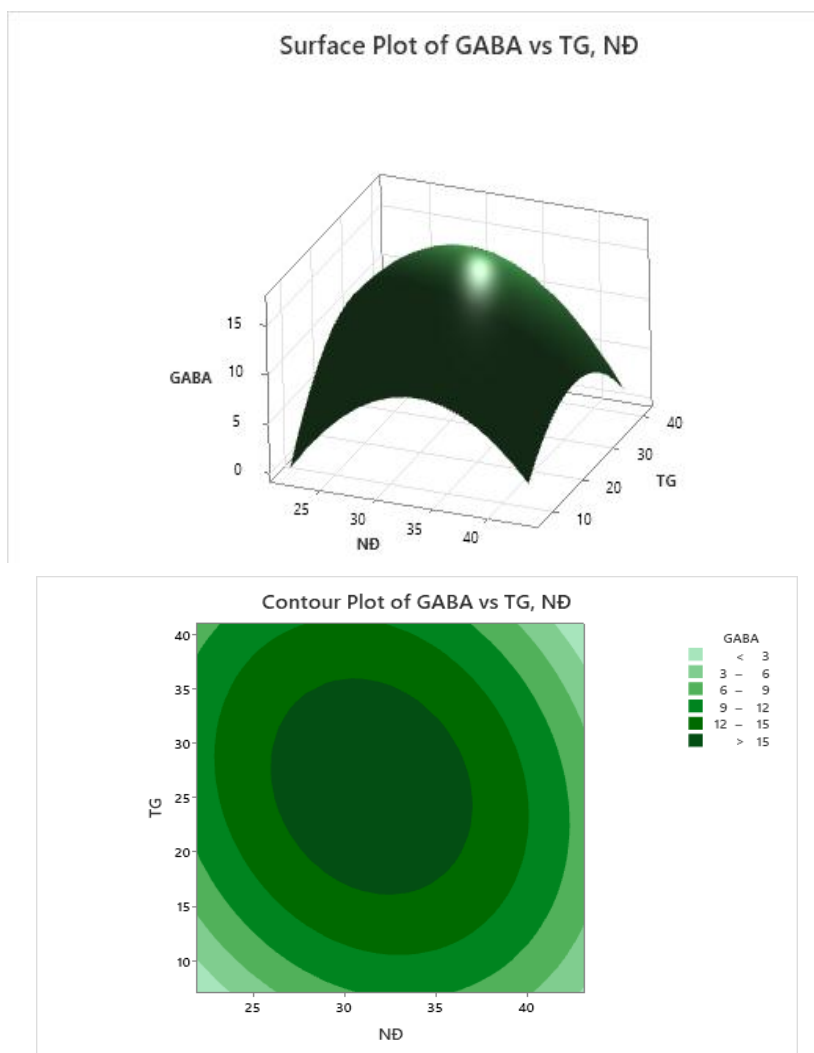


Figure 4.29. Response surface and contour plots visualizing the optimization results

The research results confirm that fermentation temperature and time are two decisive factors for the efficiency of GABA synthesis. The highly reliable quadratic regression model ($R^2 = 96.720\%$) shows a precise ability to predict variations in GABA content. The optimal conditions were determined to be 31.536°C and 25.927 hours, at which the predicted GABA content reached 17.103 mM. The verified result (17.387 ± 0.160 mM) aligns with the model, proving that the optimal conditions are scientifically sound and have potential for practical application in enhancing GABA biosynthesis efficiency.

CHAPTER 5: CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS

5.1. Conclusion

- From traditional Hue fermented products, 20 LAB strains were isolated and identified from *mam ro*, and 20 LAB strains from *tom chua* (previously identified) were selected based on their probiotic potential and GABA synthesis ability. Among these, *P. acidilactici* TC7 stood out with its ability to tolerate low pH and bile salts, strong adhesion, inhibit harmful microorganisms, and, notably, synthesize a high level of GABA (8.764 ± 0.138 mM), thus it was chosen as the main research strain.

- The factors affecting the GABA synthesis of *P. acidilactici* TC7 were surveyed and optimized. The suitable conditions included an initial inoculation density of 10^7 CFU/mL, 1.5% MSG, 2% saccharose, 2% peptone, pH 6, and a temperature of 40°C for 72 hours. Replacing saccharose and peptone with a red dragon fruit-TH unsweetened fresh milk mixture resulted in a GABA content of 30.784 ± 0.104 mM.

-Yeast strain M7 was identified as *S. cerevisiae*. It showed superior performance in fermenting red dragon fruit juice, with ethanol content reaching $12.12 \pm 0.15\%$, and being rich in bioactive compounds including 37.79 ± 0.38 mgGAE/mL TPC, 11.22 ± 0.31 mgCGE/L anthocyanin, 65.18 ± 0.82 mg/L betacyanin, 60.47 ± 1.29 mg/L betaxanthin, and an antioxidant activity of $65.41 \pm 0.44\%$. The optimal conditions included an inoculation density of 10^8 CFU/mL, 18% dry matter, pH 3.5, and a temperature of 30°C for 6 days. Co-fermentation by *P. acidilactici* TC7 and *S. cerevisiae* M7 in a red dragon fruit-cow's milk mixture (3:1 ratio) at 35°C for 24 hours created a product rich in GABA (16.473 ± 0.367 mM) and other bioactive compounds ($4.800 \pm 0.223\%$ ethanol, 17.577 ± 0.327 mgGAE/mL TPC, 4.953 ± 0.175 mgCGE/L anthocyanin, 24.297 ± 0.227 mg/L betacyanin, 17.737 ± 0.326 mg/L betaxanthin, and antioxidant activity of $23.183 \pm 0.318\%$). It also received the highest sensory quality scores for color, aroma, and taste, at 7.400 ± 0.621 , 7.600 ± 0.498 , and 7.030 ± 0.718 , respectively. The regression model determined the optimal conditions (31.536°C; 25.927 hours) with a predicted GABA value of 17.103 mM, which aligned well with the experimental result of 17.387 ± 0.160 mM ($R^2 = 96.720\%$), proving the stability and technological applicability. The content of bioactive compounds in the fermented mixture at optimal conditions were $4.870 \pm 0.153\%$ ethanol, 17.972 ± 0.129 mgGAE/mL TPC, 5.302 ± 0.215 mgCGE/L anthocyanin, 25.289 ± 0.218 mg/L betacyanin, 18.639 ± 0.301 mg/L betaxanthin, and antioxidant activity reached $24.135 \pm 0.119\%$.

5.2. Recommendations

- Finalize product development and test the food safety parameters (or indicators) according to standards.
- Continue to expand the isolation and selection of indigenous microorganisms from various raw materials and other traditional fermented products to build a diverse collection of strains for research and application.
- Conduct in-depth research on the GABA synthesis mechanism of *P. acidilactici* TC7 at the biochemical and genetic levels as a basis for strain improvement.
- Explore the co-culture potential of LAB and yeast in other fruit juices, milk, and agricultural raw materials to develop new fermented products rich in bioactive compounds.

LIST OF PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

1. Tran Thanh Quynh Anh, Nguyen Tien An & Do Thi Bich Thuy (2025). Characterization of Red Dragon Fruit Wine Fermented with a Newly Identified Yeast Strain *Saccharomyces cerevisiae* M7. *Food Technology and Biotechnology*, 63(1), 4-13. (Scopus and SCI, Q2). <https://doi.org/10.17113/ftb.63.01.25.8784>
2. Tran Thanh Quynh Anh, Do Thi Bich Thuy & Nguyen Thi Van Anh (2025). Some Probiotic Properties of *Lactobacillus pentosus* Strains. *Journal of Agriculture and Technology*, 9(1), 4752-4762. <https://doi.org/10.46826/huaf-jasat.v9n1y2025>
3. Tran Thanh Quynh Anh, Vo Van Quoc Bao & Do Thi Bich Thuy (2025). Selection of *Lactobacillus fermentum* Strain with High Probiotic Potential and Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Synthesis Ability for Application in Functional Food Production. *Journal of Agriculture & Environment, Special Issue in September*, 154-163.
4. Tran Thanh Quynh Anh & Do Thi Bich Thuy (2023). Effect of Replacing Natural Ingredients and Some Culture Conditions on the Gamma-Aminobutyric Acid Biosynthesis Ability of *Pediococcus acidilactici* TC7. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, 132(3D), 111-122. <http://doi.org/10.26459/hueunijard.v132i3D.7247>
5. Tran Thanh Quynh Anh & Do Thi Bich Thuy (2023). Effect of Initial Cell Density and Medium Composition on the Gamma-Aminobutyric Acid Biosynthesis Ability of *Pediococcus acidilactici* TC7. *Journal of Agricultural Science and Technology of Vietnam*, 146(4), 76-83. <https://tapchi.vaas.vn/vi/tap-chi/anh-huong-cua-mat-do-te-bao-ban-dau-va-thanh-phan-moi-truong-den-kha-nang-sinh-tong-hop>