

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC LOẠI CHẤT MANG VÀ NHIỆT ĐỘ BẢO QUẢN ĐẾN KHẢ NĂNG SỐNG CỦA CHỦNG *Lactobacillus plantarum* LAB8.1CM SẤY ĐÔNG KHÔ DẠNG BỘT

Vũ Hùng Hải, Trần Trung Giang, Phan Thị Cẩm Tú, Huỳnh Trường Giang*

Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ: htgiang@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 30.01.2026

Ngày chấp nhận đăng: 07.05.2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ bảo quản (4°C và 30°C) và chất mang (dextrose, lactose, skim milk và cám gạo) đến khả năng sống và hoạt tính protease của chủng *Lactobacillus plantarum* LAB8.1CM trong các chế phẩm dạng bột trong 90 ngày. Kết quả cho thấy ở 4°C, mật độ vi khuẩn ở các sản phẩm duy trì ổn định hơn so với bảo quản ở 30°C. Trong đó, skim milk cho hiệu quả bảo vệ tốt nhất ở 4°C với tốc độ suy giảm thấp chỉ $0,004 \pm 0,002/\text{ngày}$, trong khi ở 30°C, giá trị này tăng lên đáng kể với trung bình $0,05 \pm 0,002/\text{ngày}$. Ngược lại, dextrose cho hiệu quả bảo vệ thấp nhất với tốc độ suy giảm lần lượt $0,017 \pm 0,002/\text{ngày}$ ở 4°C và $0,062 \pm 0,001/\text{ngày}$ ở 30°C. Hoạt tính protease giảm dần theo thời gian bảo quản, tuy nhiên ở 4°C hoạt tính cao hơn gấp 2 lần so với 30°C. Đáng chú ý, kết quả không ghi nhận được sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) về hoạt tính protease giữa các chất mang, cũng như tương tác giữa nhiệt độ bảo quản và chất mang ($P > 0,05$). Nhìn chung, việc bảo quản ở nhiệt độ thấp kết hợp với chất mang phù hợp là yếu tố then chốt giúp duy trì khả năng sống và hoạt tính sinh học của chủng *Lactobacillus plantarum* LAB8.1CM trong chế phẩm vi sinh dạng bột.

Từ khóa: Chất mang, hoạt tính protease, *Lactobacillus*, mật độ, nhiệt độ.

Effect of Carrier Materials and Storage Temperature on the Viability of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* LAB8.1CM in Powder Form

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effects of storage temperature (4°C and 30°C) and carrier materials (dextrose, lactose, skim milk, and rice bran) on the viability and enzyme activity of strain *Lactobacillus plantarum* LAB8.1CM in powder formulations after 90 days of storage. The results showed that the viability of probiotic was consistently better maintained at 4°C across all carrier materials compared with storage at 30°C. Among these carriers, skim milk exhibited the highest protective capacity at 4°C, with a minimal cell death rate of $0.004 \pm 0.002/\text{day}$, while storage at 30°C resulted in a considerable increase to an average of $0.05 \pm 0.002/\text{day}$. In contrast, dextrose showed the poorest protective performance, with cell death rates of $0.017 \pm 0.002/\text{day}$ at 4°C and $0.062 \pm 0.001/\text{day}$ at 30°C. In addition, protease activity gradually decreased during storage; however, enzyme activity was maintained at approximately twofold higher levels at 4°C compared with 30°C. Notably, no statistically significant differences ($P > 0.05$) in protease activity were observed among the various carrier materials, and no significant interaction was identified between storage temperature and carrier type ($P > 0.05$). Overall, storage at low temperatures in combination with suitable carrier materials plays a crucial role in preserving the viability and biological activity of *Lactobacillus* sp. in powdered probiotic formulations under experimental conditions.

Keywords: Carrier material, density, *Lactobacillus*, protease activity, temperature.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, chế phẩm vi sinh vật sống có lợi (probiotic) được sử dụng như một giải pháp tiềm năng thay thế cho kháng

sinh, nhằm kiểm soát dịch bệnh và cải thiện sức khỏe tôm nuôi. Các lợi ích của probiotic bao gồm ức chế vi sinh vật gây bệnh, kích thích đáp ứng miễn dịch của vật chủ, cải thiện chất lượng nước và hỗ trợ hấp thu dinh dưỡng thông qua việc

sản sinh các enzyme tiêu hóa (Ringø & cs., 2020). Thực tế, các chủng vi khuẩn được nuôi sinh khối ở quy mô công nghiệp trong điều kiện được kiểm soát nghiêm ngặt các yếu tố môi trường, dinh dưỡng nhằm nâng cao mật số và các đặc tính của vi sinh vật có lợi và sau đó phân phối ra thị trường dưới dạng dung dịch hoặc sản phẩm dạng bột (Cruz & cs., 2012). Tuy nhiên, hiệu quả của chế phẩm vi sinh trong thực tiễn nuôi trồng thủy sản phụ thuộc lớn vào khả năng duy trì trạng thái sống và hoạt tính sinh học của vi khuẩn trong suốt quá trình sản xuất, bảo quản và sử dụng. Theo Nimrat & Vuthiphandchai (2011), sản phẩm vi sinh sử dụng trong nuôi tôm cần đảm bảo đúng số lượng và thành phần loài vi sinh vật như đã công bố và phải duy trì mật độ tế bào sống của từng loài ở mức tối thiểu 10^6 CFU/g sản phẩm nhằm đảm bảo hiệu quả sinh học khi sử dụng. Tương tự, theo quy chuẩn của Việt Nam QCVN02-32-1:2019/BNNT, các chế phẩm vi sinh vật được phép lưu hành trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản phải đáp ứng mật độ vi khuẩn có lợi cao hơn 10^6 CFU/g hoặc ml (Bộ NN&PTNT, 2019). Việc duy trì mật số này là một thách thức lớn, do vi khuẩn có lợi cực kỳ nhạy cảm với các tác động trong quá trình sản xuất (như sấy thăng hoa) và điều kiện môi trường trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Hơn nữa, sự thay đổi trạng thái vật chất của các chế phẩm vi sinh trong giai đoạn bảo quản có thể làm gia tăng các quá trình suy thoái, đồng thời đẩy nhanh sự suy giảm khả năng sống của tế bào vi khuẩn. Nguyên nhân có thể xuất phát từ sự tiếp xúc kéo dài của vi khuẩn lactic (lactic acid bacteria, LAB) với các điều kiện bất lợi như pH, nhiệt độ, thời gian bảo quản, oxy và thành phần dinh dưỡng của môi trường, cũng như các tác nhân khác (Adriana & cs., 2023). Để giải quyết vấn đề này, chất bảo vệ tế bào trong quá trình đông lạnh (cryoprotectant) và các chất mang (carrier materials) như các loại protein (whey, casein), polysaccharide (alginate, chitosan), maltose, lactose hoặc các hợp chất prebiotic đã được nghiên cứu rộng rãi nhằm nâng cao hiệu quả bảo vệ tế bào trong quá trình sản xuất và bảo

quản chế phẩm vi sinh (Yeo & cs., 2011; Ermis & cs., 2021). Bên cạnh đó, nhiệt độ bảo quản được xem là tác nhân quan trọng quyết định tốc độ suy giảm mật số vi khuẩn theo thời gian. Các nghiên cứu trước đây cho thấy chế phẩm vi sinh chứa các dòng lợi khuẩn *Lactobacillus* spp. và các loại chất mang khác nhau khi bảo quản ở nhiệt độ thấp (4°C) vẫn duy trì được mật độ tế bào và hoạt tính sinh học so với ban đầu, trong khi ở nhiệt độ cao (nhiệt độ phòng hoặc 30°C) các thông số suy giảm đáng kể (Sayedboworn & cs., 2018; Mamun & cs., 2021; Buahom & cs., 2023). Gần đây, nhóm tác giả đã phân lập và định danh được chủng *Lactobacillus plantarum* LAB8.1CM mang các đặc tính nổi bật, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ nuôi tôm biển. Trên cơ sở kế thừa các nghiên cứu trước đây, việc khảo sát sự tương tác giữa các loại chất mang và điều kiện nhiệt độ bảo quản đối với chủng lợi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM được xem là cần thiết để tối ưu hóa độ ổn định và duy trì hiệu quả của các chế phẩm vi sinh để làm cơ sở ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh dạng bột có chứa *L. plantarum* LAB8.1CM phục vụ nuôi trồng thủy sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chuẩn bị vi khuẩn

Chủng lợi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM sử dụng trong nghiên cứu hiện tại, thuộc bộ sưu tập giống vi khuẩn có lợi của Phòng Thí nghiệm Chế phẩm sinh học thủy sản (Trường Thủy sản, Đại học Cần Thơ). Chủng vi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM được phục hồi và nuôi trong canh trường MRS Broth ở 37°C trong 24 giờ, sau đó tiến hành thu sinh khối tế bào bằng phương pháp ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4). Tiếp theo, tế bào vi khuẩn được tái huyền phù trong dung dịch chứa 10% sữa tách béo (skim milk) (Himedia, Ấn Độ) như chất bảo quản cho quá trình đông khô lạnh (cryoprotectant) nhằm duy trì mật độ lợi khuẩn trong quá trình sấy thăng hoa (Jagannath & cs., 2010) và bảo quản

-80°C trong 24 giờ trước khi sấy đông khô. Quá trình sấy thăng hoa được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ -80°C và áp suất 20Pa bằng thiết bị BenchTop Pro 9L EG (SP Scientific, Anh) trong 48 giờ. Sau khi sấy, mẫu được rây qua sàng (kích thước lỗ 0,5mm) nhằm thu bột đồng nhất và bảo quản ở 4°C. Mật độ vi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM trong bột sấy khô ban đầu đạt khoảng $4,3 \times 10^9$ CFU/g và được kiểm tra bằng phương pháp cấy trải trên môi trường MRS ở 37°C trong 72 giờ (Shah, 2000).

2.2. Xử lý chất mang

Các chất mang sử dụng trong nghiên cứu bao gồm đường Dextrose (Roquette, Pháp), bột sữa lactose (Hilmar, Mỹ), skim milk (Fonterra, New Zealand) và cám gạo được mua từ các cửa hàng ở địa phương. Các chất mang được xử lý như sau: Nguyên liệu được sấy khô ở 60°C trong 48 giờ đến khi trọng lượng không đổi và tiến hành sàng qua rây có kích thước lỗ 0,5mm để đạt kích thước đồng nhất. Mỗi loại chất mang (100g) được trộn với 400ml nước cất để đạt tỉ lệ 20% (w/v) (Chávez & Ledebøer, 2007), sau đó hỗn hợp được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút với cám gạo và 105°C trong 15 phút với các chất mang còn lại.

2.3. Công thức tạo chế phẩm vi sinh dạng bột

Nhằm đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng về mật độ lợi khuẩn lớn hơn 10^6 CFU/g trong các chế phẩm vi sinh vật theo QCVN02-32-1:2019/BNNT, các chế phẩm trong nghiên cứu được chuẩn bị với mật độ ban đầu $> 10^8$ CFU/g. Cụ thể, trộn 2g bột *L. plantarum* LAB8.1CM sấy khô với 100g cơ chất, kế tiếp bảo quản 4°C trong 6 giờ và -80°C trong 24 giờ. Sau đó, mẫu được sấy thăng hoa ở -80°C với áp suất 20Pa đến khi mẫu khô hoàn toàn. Mẫu sấy khô được nghiền mịn thành bột và rây qua lưới có kích thước lỗ 0,5mm, sau đó bảo quản ở 4°C hoặc 30°C theo điều kiện bố trí thí nghiệm. Mật độ tế bào vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp cấy trải trên môi trường MRS (Shah, 2000). Tổng cộng có 4 công thức phối trộn chế phẩm vi sinh tương ứng với 4 loại chất mang Dextrose (Dex), bột

lactose (Lac), skim milk (SkM) và cám gạo (RiB). Các chế phẩm vi sinh sau đó được trữ trong các túi zip kín khí (5g) và bảo quản ở hai mức nhiệt độ khác nhau là 4°C và 30°C. Như vậy, có 8 nghiệm thức được thực hiện trong nghiên cứu này. Các mức nhiệt độ này phù hợp với điều kiện thực tiễn khi sản phẩm có khả năng bảo quản ở tủ mát hoặc ở nhiệt độ phòng trong quá trình sử dụng sản phẩm. Mật độ vi khuẩn, tốc độ suy giảm mật độ của tế bào, hoạt tính protease được theo dõi vào các thời điểm 1, 7, 14, 21, 30, 60 và 90 ngày. Mỗi loại chế phẩm được chuẩn bị 3 lần lặp.

2.4. Phương pháp phân tích

2.4.1. Xác định mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* trong các chế phẩm

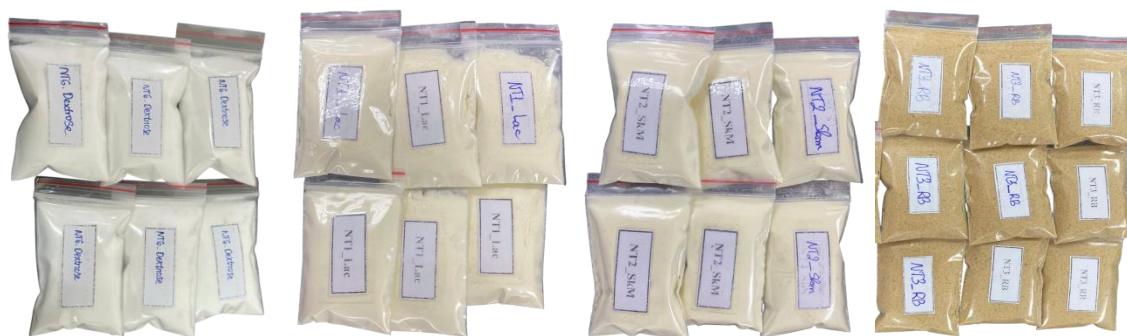
Mật độ vi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM trong các chế phẩm được xác định bằng phương pháp cấy trải (APHA, 2017). Cụ thể, 1g chế phẩm được cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước muối sinh lý (0,9% NaCl) đã tiệt trùng để được độ pha loãng 10^{-1} , lắc đều và tiếp tục pha loãng nước muối sinh lý để được độ pha loãng 10^{-2} - 10^{-6} . Sau đó, 100µl mỗi nồng độ được trải đều trên môi trường MRS với hai lần lặp lại. Các đĩa môi trường vừa cấy vi khuẩn được ủ ở 37°C trong tủ ấm CO₂ (Forma Steri-Cycle i250, Thermo Scientific, Đức) trong 72 giờ (Shah, 2000). Các đĩa được kiểm tra hình thành khuẩn lạc, đếm và chọn số khuẩn lạc ở các đĩa dao động trong khoảng 30-300 khuẩn lạc để đảm bảo độ tin cậy của phương pháp. Mật độ vi khuẩn được xác định theo đơn vị hình thành khuẩn lạc cho mỗi 1g chế phẩm bằng công thức:

Mật độ vi khuẩn (CFU/g) = số khuẩn lạc trung bình $\times$ độ pha loãng $\times 10$

Trong đó: 10 là hệ số quy đổi về g do quá trình pha loãng ban đầu.

2.4.2. Tốc độ suy giảm mật độ tế bào

Tốc độ suy giảm mật độ tế bào (The specific rate of cell death, k) dùng để mô tả tốc độ quần thể vi sinh vật mất đi khả năng sống (viability) dưới tác động của các yếu tố môi trường trong thời gian bảo quản và được tính toán dựa trên nghiên cứu của Tsen & cs. (2007):



Hình 1. Chế phẩm vi sinh sấy thăng hoa dạng bột với các chất mang khác nhau

Hằng số k (1/ngày) = $(1/t) \times (\log N_0 - \log N_t)$

Trong đó: N_0 là mật độ tế bào ở thời điểm bắt đầu bảo quản (CFU/g); N_t là mật độ tế bào ở thời điểm t (CFU/g); t là thời gian bảo quản (ngày).

2.4.3. Phân tích hoạt tính enzyme protease

Chế phẩm được cân lấy 1g cho vào bình tam giác chứa 49ml canh trường MRS broth và ủ ở 37°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, dịch nuôi được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 15 phút tại 4°C để thu phần dịch nổi không tế bào (cell-free supernatant, CFS), sử dụng cho việc xác định hoạt tính enzyme. Hoạt tính protease được xác định trong điều kiện 37°C, sử dụng dịch đệm Tris-HCl 100mM theo phương pháp mô tả bởi Liu & cs. (2009). Cụ thể, 100μl CFS được ủ với 100μl dung dịch casein 1% (chuẩn bị trong đệm Tris-HCl, pH 9,0) trong 10 phút ở 37°C. Phản ứng được dừng lại bằng cách bổ sung 500μl dung dịch axit trichloroacetic 5%. Sau 20 phút, hỗn hợp phản ứng được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút tại 4°C để thu phần dịch nổi. Hoạt tính protease được xác định theo phương pháp Lowry & cs. (1951), sử dụng L-tyrosine (Sigma-Aldrich) làm chất chuẩn. Độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 660nm. Một đơn vị hoạt tính protease (U) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để thủy phân casein và giải phóng 1μg tyrosine/ml/phút (Huỳnh & cs., 2018).

2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn, bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Trong khi, sự khác biệt thống kê giữa các loại chất mang và nhiệt độ bảo quản được phân tích bằng phương pháp

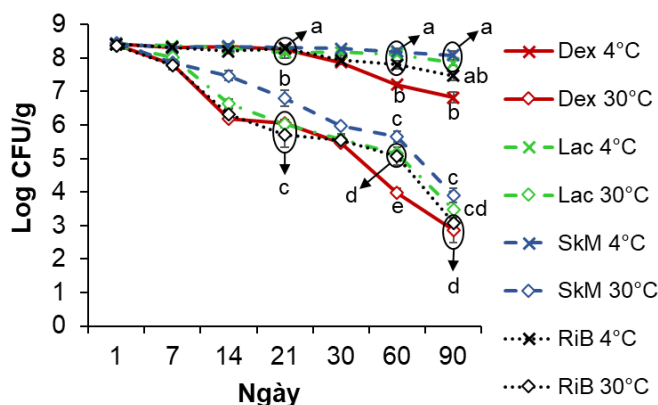
phân tích phương sai hai nhân tố (2-way ANOVA) sử dụng phần mềm IBM-SPSS phiên bản 22.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, NY, USA) ở mức ý nghĩa $P < 0,05$ với phép thử Tukey. Mật độ vi khuẩn được trình bày dưới dạng Log CFU/g bằng công thức $\log_{10} N$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

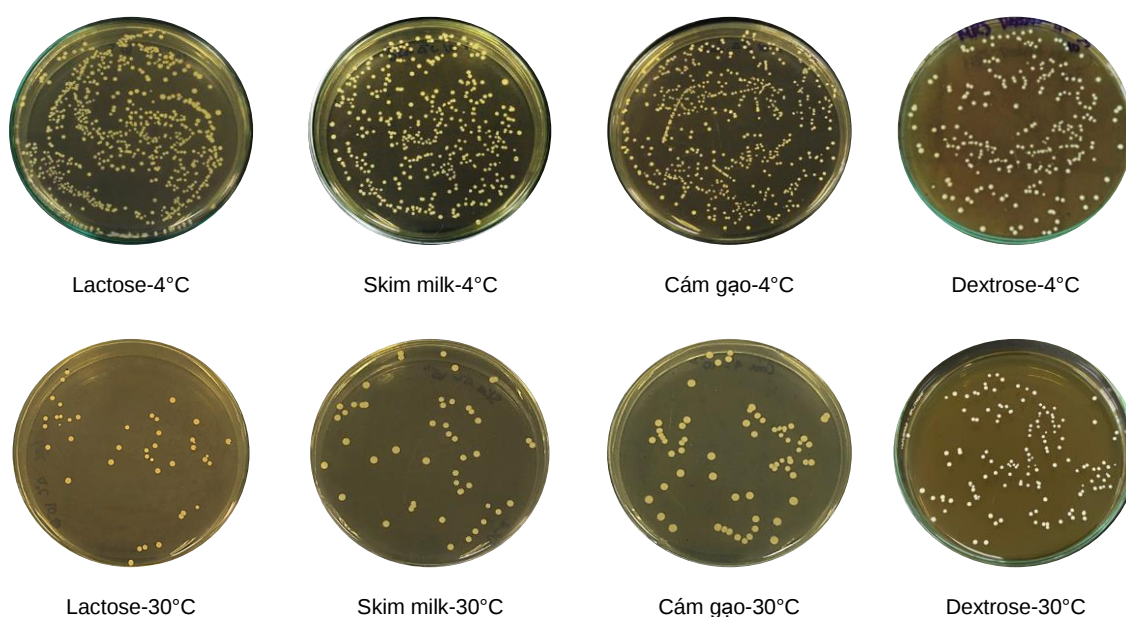
3.1. Biến động mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* trong chế phẩm theo thời gian

Kết quả cho thấy không có mối tương tác có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) giữa các loại chất mang với nhiệt độ bảo quản. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* giảm dần theo gian bảo quản ở tất cả các chế phẩm với sự khác biệt đáng kể giữa các loại chất mang và giữa các mức nhiệt độ bảo quản (Hình 2). Cụ thể, mật độ vi khuẩn trong các chế phẩm duy trì tương đối ổn định trong 21 ngày đầu ở 4°C với dao động 8,165-8,425 LogCFU/g và có xu hướng giảm nhẹ sau 90 ngày với trung bình ở chất mang SkM đạt cao nhất, kế tiếp là Lac và RiB và thấp nhất là Dex (Bảng 1). Ngược lại, ở điều kiện 30°C mật độ vi khuẩn giảm từ $8,401 \pm 0,027$ Log CFU/g còn $6,147 \pm 0,461$ Log CFU/g sau 21 ngày ở tất cả các chế phẩm và giảm rõ rệt vào cuối giai đoạn thí nghiệm, với giá trị trung bình đạt thấp nhất ở chất mang Dex (< 3 Log CFU/g). Nhìn chung, khi bảo quản ở 4°C mật độ vi khuẩn ở tất cả các chế phẩm cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với bảo quản ở 30°C (Bảng 1). Trong số các loại chất mang thì SkM giúp duy trì ổn định mật độ tế bào vi khuẩn trong chế phẩm cao nhất và khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với RiB và Dex, nhưng khác biệt không đáng kể ($P > 0,05$) so với Lac.

Ảnh hưởng của các loại chất mang và nhiệt độ bảo quản đến khả năng sống của chủng *Lactobacillus plantarum* LAB8.1CM sấy đông khô dạng bột



Hình 2. Biến động mật độ lợi khuẩn *Lactobacillus* LAB8.1CM trong thời gian bảo quản



Hình 3. Mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C và 30°C với các nguồn chất mang khác nhau

3.2. Tốc độ suy giảm mật độ tế bào

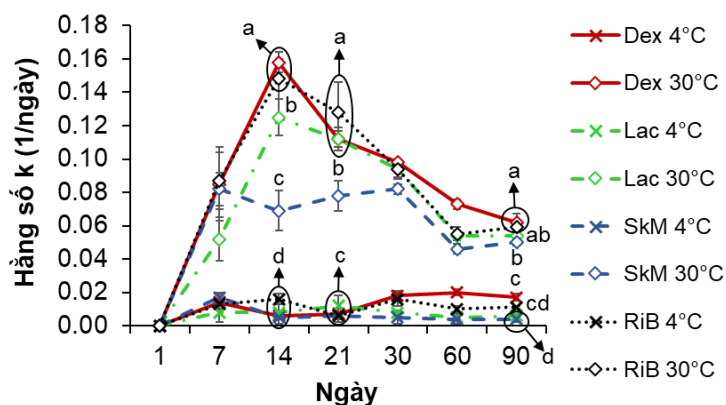
Mặc dù không ghi nhận sự tương tác có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) giữa chất mang và nhiệt độ bảo quản đối với tốc độ suy giảm mật độ tế bào (hàng số k), kết quả vẫn cho thấy tốc độ suy giảm mật số tế bào tăng dần theo thời gian bảo quản, với sự khác biệt đáng kể giữa các chế phẩm cũng như mức nhiệt độ bảo quản (Hình 4). Theo đó, hàng số k sau 14 ngày đạt giá trị cao nhất khi bảo quản ở 30°C và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) giữa các loại chất mang, trong đó SkM đạt giá trị nhỏ nhất ($0,069 \pm 0,012/\text{ngày}$), kế tiếp là Lac

($0,125 \pm 0,011/\text{ngày}$) và cao nhất là RiB ($0,148 \pm 0,012/\text{ngày}$) và Dex ($0,158 \pm 0,006/\text{ngày}$). Trong khi, bảo quản các chế phẩm ở 4°C thì hàng số k đạt giá trị thấp hơn đáng kể, với trung bình dao động 0,005-0,016/ngày và khác biệt không có ý nghĩa ($P > 0,05$) giữa các loại cơ chất. Sau 90 ngày bảo quản, hàng số k khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các loại chất mang ($P < 0,05$), trong đó Dex ghi nhận giá trị cao nhất, trong khi chất mang SkM cho giá trị thấp nhất (Bảng 1). Bên cạnh đó, điều kiện bảo quản ở 4°C cho thấy sự cải thiện có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) về hàng số k so với điều kiện bảo quản ở 30°C.

Bảng 1. Mật độ tế bào *Lactobacillus* sp., hằng số tế bào chết và hoạt tính protease của các chế phẩm sau 90 ngày bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau

Thí nghiệm		Mật độ (Log CFU/g)	k (1/ngày)	Protease (U/ml)
Cơ chất - Nhiệt độ	Dex-4°C	6,825 ^b ± 0,163	0,017 ^c ± 0,002	84,5 ^a ± 7,6
	Dex-30°C	2,851 ^d ± 0,373	0,062 ^a ± 0,005	48,5 ^b ± 10,5
	Lac-4°C	7,863 ^a ± 0,071	0,006 ^d ± 0,001	87,6 ^a ± 4,1
	Lac-30°C	3,466 ^{cd} ± 0,452	0,054 ^{ab} ± 0,006	48,2 ^b ± 3,0
	SkM-4°C	8,083 ^a ± 0,128	0,004 ^d ± 0,002	96,5 ^a ± 9,6
	SkM-30°C	3,898 ^c ± 0,224	0,050 ^b ± 0,002	53,7 ^b ± 16,2
	RiB-4°C	7,470 ^{ab} ± 0,128	0,011 ^{cd} ± 0,001	89,4 ^a ± 7,6
	RiB-30°C	3,065 ^d ± 0,172	0,059 ^a ± 0,002	44,8 ^b ± 5,3
Cơ chất	Dex	4,838 ^C ± 2,192	0,040 ^A ± 0,025	66,5 ^A ± 21,4
	Lac	5,665 ^{AB} ± 2,426	0,030 ^{BC} ± 0,027	67,9 ^A ± 21,8
	SkM	5,991 ^A ± 2,298	0,027 ^C ± 0,025	75,1 ^A ± 26,3
	RiB	5,268 ^B ± 2,417	0,035 ^{AB} ± 0,027	67,1 ^A ± 25,1
Nhiệt độ	4°C	7,560 ^A ± 0,511	0,010 ^B ± 0,005	89,5 ^A ± 7,9
	30°C	3,320 ^B ± 0,502	0,056 ^A ± 0,006	48,8 ^B ± 9,3
Two-way ANOVA				
Cơ chất		*	*	ns
Nhiệt độ		*	*	*
Cơ chất × Nhiệt độ		ns	ns	ns

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có ký tự A, B, C hoặc a, b, c, d... giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$); *: $P < 0,05$; ns: $P > 0,05$.



Hình 4. Tốc độ suy giảm mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* sp. khi bảo quản ở 4°C và 30°C với các nguồn chất mang khác nhau

3.3. Hoạt tính enzyme protease

Kết quả ghi nhận giữa chất mang và nhiệt độ bảo quản không có sự tương tác ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) về hoạt tính của chủng vi khuẩn (Bảng 1). Tuy nhiên, hoạt tính protease có xu hướng giảm theo thời gian bảo quản và khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) giữa các mức nhiệt độ bảo

quản, trong khi không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) giữa các loại chất mang tại cùng một điều kiện nhiệt độ (Hình 5). Cụ thể, sau 30 ngày bảo quản ở 30°C, hoạt tính protease giảm mạnh từ $111,8 \pm 5,1$ U/ml xuống còn $62,2 \pm 4,7$ U/ml và tiếp tục suy giảm sau 90 ngày, đạt trung bình $48,8 \pm 3,7$ U/ml. Ngược lại, ở 4°C, hoạt tính protease giảm chậm hơn, từ

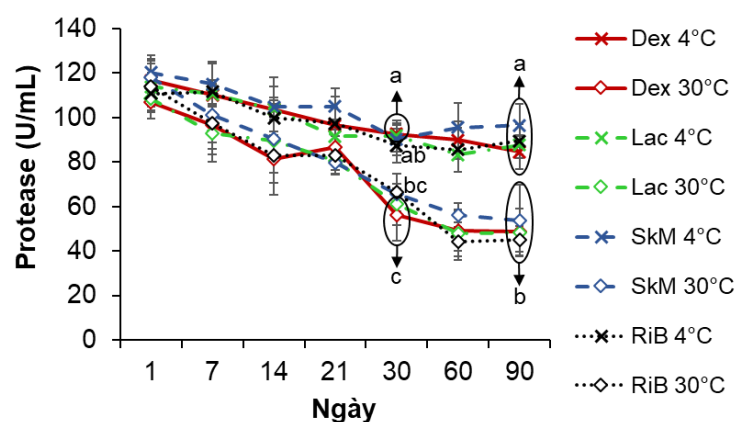
115,4 ± 4,1 U/ml xuống 90,5 ± 2,3 U/ml sau 30 ngày và duy trì tương đối ổn định trong khoảng 83,3-96,5 U/ml cho đến cuối thời gian thí nghiệm.

4. THẢO LUẬN

Để một chế phẩm vi sinh vật đảm bảo được sự ổn định về chất lượng và mang lại lợi ích sức khỏe thì các dòng lợi khuẩn phải duy trì được trạng thái sống với mật độ tế bào đủ lớn trong thời gian bảo quản. Nói cách khác, các chủng vi khuẩn trong chế phẩm cần tồn tại ở dạng sống với mật độ đủ cao trong thời gian bảo quản, đồng thời có khả năng chịu đựng các điều kiện bất lợi trong quá trình sản xuất và bảo quản dài hạn, cũng như thích nghi với các môi trường khắc nghiệt của dạ dày và ruột để đến được vị trí tác động và phát huy hiệu quả sinh học mong muốn (Ermis & cs., 2021). Trong bối cảnh đó, chất mang (carrier) đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao khả năng sống của lợi khuẩn thông qua việc tạo ra hàng rào bảo vệ vật lý, giúp hạn chế các tác động bất lợi từ môi trường bên ngoài, đồng thời cung cấp nguồn dinh dưỡng cần thiết nhằm duy trì trạng thái sinh lý ổn định của tế bào vi khuẩn trong quá trình bảo quản (Yeo & cs., 2011; Mamun & cs., 2021). Trong nghiên cứu hiện tại, chế phẩm chứa vi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM được bảo quản với chất mang sữa tách béo (SkM) cho hiệu quả tốt nhất cả về mật độ tế bào sống và hoạt tính enzyme. Điều này phù hợp với các báo cáo trước đây, cho thấy việc lựa chọn chất mang đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì

khả năng sống và ổn định sinh lý của vi khuẩn *Lactobacillus* trong quá trình bảo quản. Nghiên cứu của Savedboworn & cs. (2018) chỉ ra rằng sự kết hợp giữa đạm từ gạo (rice protein) làm chất mang và các chất bảo quản (protectants) như fructooligosaccharides (FOS), gum arabic, inulin, polydextrose và xylitol có thể duy trì mật độ vi khuẩn *L. plantarum* TISTR 2075 ổn định và giảm tốc độ suy giảm trong suốt thời gian bảo quản dài hạn, cả ở 4°C và 30°C. Tương tự, Buahom & cs. (2023) cho thấy hệ chất mang gồm cám gạo, chitosan và carboxymethyl cellulose với tỷ lệ 6:1:1 cải thiện đáng kể tỷ lệ sống của vi khuẩn lactic sau quá trình sấy thăng hoa (95,8-98,6%) và sấy phun (94,4-98,2%), đồng thời bảo vệ tế bào vi khuẩn trước các điều kiện bất lợi như môi trường axit và muối mật của vật chủ. Hay nghiên cứu khác của Mamun & cs. (2021) ghi nhận việc sử dụng sữa tách béo làm chất bảo quản trong quá trình đông lạnh (cryoprotectant) kết hợp với tinh bột gạo (rice starch) làm chất mang trong quá trình sấy thăng hoa giúp duy trì mật độ vi khuẩn *L. plantarum* TISTR 2083 cao và tăng tỷ lệ sống khoảng 60% sau 60 ngày bảo quản ở nhiệt độ phòng và trên 90% khi bảo quản ở 4°C.

Nghiên cứu hiện tại cho thấy, mật độ tế bào *L. plantarum* LAB8.1CM trong các chế phẩm giảm đáng kể trong quá trình bảo quản, đặc biệt ở nhiệt độ cao. Sau 90 ngày, mật độ vi khuẩn trong các chế phẩm bảo quản ở 30°C giảm xuống dưới ngưỡng cho phép (10^6 CFU/g), trong khi ở 4°C mật độ được duy trì tương đối ổn định.



Hình 5. Hoạt tính protease của lợi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM khi bảo quản ở 4°C và 30°C với các nguồn chất mang khác nhau

Kết quả tương đồng với báo cáo trước đây của Nguyễn Thị Lâm Đoàn & Đặng Thảo Yến Linh (2018) về sự suy giảm mật độ lợi khuẩn lactic trong quá trình bảo quản. Theo đó, mật độ lợi khuẩn duy trì ổn định khi bảo quản lạnh 4°C sau 40 ngày ($1,24 \times 10^9$ CFU/g) và giảm nhẹ sau 50 ($0,99 \times 10^9$ CFU/g) và 60 ngày ($0,37 \times 10^9$ CFU/g). Trong khi ở điều kiện nhiệt độ phòng, mật độ tế bào bắt đầu giảm sau 30 ngày và thấp hơn ngưỡng cho phép (10^6 CFU/g) sau 60 ngày bảo quản. Nghiên cứu khác của Wirunpan & cs. (2016) cũng cho thấy rằng thức ăn tôm ép viên với vi khuẩn *Lactococcus lactis* 1464 bằng công nghệ tầng sôi (fluidized bed drying) khi bảo quản ở 4°C vẫn duy trì được mật độ tế bào sau 6 tháng mà không có sự suy giảm đáng kể ($P > 0,05$) so với ban đầu. Trong khi đó, tỷ lệ chết của vi khuẩn tăng rõ rệt khi bảo quản ở 30°C, với tốc độ suy giảm mật độ (hằng số k) ở 4°C (6×10^{-7} /giờ) thấp hơn đáng kể so với ở 30°C (5×10^{-4} /giờ), cho thấy nhiệt độ bảo quản cao ảnh hưởng đến khả năng sống sót của vi khuẩn. Tương tự, Savedboworn & cs. (2018) ghi nhận khả năng sống của tế bào *L. plantarum* TISTR 2075 trong sản phẩm sấy đông khô duy trì tương đối ổn định ở 4°C lên tới 180 ngày cao hơn so với 90 ngày ở 30°C với sự suy giảm mật độ tế bào tương ứng 1,02 và 2,30 log CFU/g và hằng số k dao động lần lượt $1,20 \times 10^{-2}$ – $5,39 \times 10^{-2}$ /ngày ở 4°C và $5,79 \times 10^{-2}$ – $2,24 \times 10^{-1}$ /ngày ở 30°C. Nhìn chung, bảo quản ở nhiệt độ thấp (4°C) được xem là điều kiện tối ưu để duy trì mật số vi khuẩn *Lactobacillus* trong chế phẩm vi sinh vật ổn định trong thời gian dài. Ở nhiệt độ thấp, các tế bào vi khuẩn hầu như ở trạng thái nghỉ, với hoạt động trao đổi chất giảm đáng kể, giúp hạn chế sự suy giảm số lượng tế bào sống, ngăn cản kiệt các nguồn dinh dưỡng dự trữ và giảm tích tụ các sản phẩm phụ độc hại (Cheng & cs., 2022). Điều này giúp ngăn chặn sự cạn kiệt dinh dưỡng dự trữ và giảm tích tụ các sản phẩm phụ độc hại. Sự suy giảm mật độ tế bào quan sát được trong nghiên cứu này, đặc biệt ở điều kiện 30°C, có thể liên quan đến các biến đổi cấu trúc màng tế bào trong quá trình bảo quản. Cụ thể, quá trình oxy hóa lipid làm gia tăng tỷ lệ axit béo bão hòa/không bão hòa trong màng, dẫn đến giảm tính linh động và tăng tính thấm của màng tế bào (Albadran & cs., 2015). Đồng thời, sự hình thành các gốc tự do trong quá trình này có thể gây tổn

hại đến DNA và cấu trúc màng, từ đó làm giảm khả năng sống của tế bào vi khuẩn trong các sản phẩm sấy khô (Fu & Chen, 2011; Santivarangkna & cs., 2008). Cơ chế này phù hợp với xu hướng suy giảm mật độ tế bào mạnh hơn ở 30°C so với 4°C được ghi nhận trong nghiên cứu.

Nghiên cứu hiện tại bước đầu đã cung cấp những thông tin quan trọng về khả năng sống của vi khuẩn *L. plantarum* LAB8.1CM trong các chế phẩm sử dụng các loại chất mang và nhiệt độ bảo quản khác nhau, làm cơ sở quan trọng cho việc phát triển sản phẩm ứng dụng vào thực tiễn sản xuất. Tuy nhiên, một số vấn đề quan trọng cũng cần được sáng tỏ trong các nghiên cứu tiếp theo. Cụ thể là, ảnh hưởng của hoạt độ nước (water activity, a_w), độ ẩm, vật liệu đóng gói, hàm lượng oxy và thành phần chất bảo vệ; cơ chế ổn định màng tế bào trong điều kiện sấy và bảo quản; ảnh hưởng chất bảo vệ tế bào trong quá trình đông lạnh lên khả năng sống sót và hoạt tính của vi khuẩn khi được bảo quản trong các chất mang khác nhau và sự thay đổi mật độ vi khuẩn khi có và không có chất mang.

5. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy chất mang skim milk cho hiệu quả cao nhất trong việc duy trì mật độ tế bào sống và hoạt tính enzyme protease của chủng *L. plantarum* LAB8.1CM trong quá trình bảo quản. Tốc độ suy giảm mật độ tế bào (k) tăng rõ rệt khi bảo quản ở 30°C và thấp hơn đáng kể khi bảo quản ở 4°C, khẳng định vai trò quan trọng của nhiệt độ đối với độ ổn định của lợi khuẩn. Tuy nhiên, kết quả không ghi nhận mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa nhiệt độ bảo quản và loại chất mang, cho thấy ảnh hưởng của từng yếu tố là tương đối độc lập. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở khoa học cho việc lựa chọn chất mang và điều kiện bảo quản phù hợp nhằm nâng cao hiệu quả và chất lượng của các chế phẩm vi sinh vật sử dụng trong nuôi trồng thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thuộc nhiệm vụ Khoa học Công nghệ cấp Bộ “Nghiên cứu phát triển synbiotic từ các probiotic và prebiotic có nguồn gốc tự nhiên nhằm cải

thiện enzyme tiêu hóa, tăng trưởng, miễn dịch và sức đề kháng của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* ở Đồng bằng sông Cửu Long” (Mã số đề tài: B2024-TCT-03). Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn em Lê Thị Bích Tuyền đã hỗ trợ trong quá trình thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adriana M., Misael C. & Liliana S. (2023). Evaluation of viability, physicochemical properties, and digestibility of freeze-dried *Weissella cibaria* microcapsules during storage. *Food Packaging and Shelf Life*. 40: 101164.
- Albadran, H.A., Chatzifragkou A., Khutoryanskiy V.V. & Charalampopoulos D. (2015). Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International*. 74: 208-216.
- APHA (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater, 23th edition. American Public Health Association 800 I Street, NW, Washington, DC.
- Bộ NN&PTNT (2019). QCVN 02-32-1:2019/ BNNPTNT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về sản phẩm xử lý môi trường nuôi trồng thủy sản - Phần 1: hóa chất, chế phẩm sinh học. Truy cập từ https://vbpl.vn/FileData/TW/Lists/vbpq/Attachments/137799/VanBanGoc_08-2019-TT-BNN-QC.pdf ngày 06/12/2025.
- Buahom J., Siripornadulsil S., Sukon P., Sooksawat T. & Siripornadulsil W. (2023). Survivability of freeze- and spray-dried probiotics and their effects on the growth and health performance of broilers. *Veterinary World*. 16(9): 1849-1865.
- Chávez B.E. & Ledebor A.M. (2007). Drying of Probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*. 25(7-8): 1193-1201.
- Cheng Z., Yan X., Wu J., Weng P. & Wu Z. (2022). Effects of freeze drying in complex lyoprotectants on the survival, and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum* L1 and *Lactobacillus fermentum* L2. *Cryobiology*. 105: 1-9.
- Cruz P.M., Ibáñez A.L., Hermosillo O.A.M. & Saad H.C.R. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*. pp. 1-13.
- Ermis E. (2021). A review of drying methods for improving the quality of probiotic powders and characterization. *Drying Technology*. 40(11): 2199-2216.
- Fu N. & Chen X.D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*. 44(5): 1127-1149.
- Huynh T.G., Chi C.C., Nguyen T.P., Tran T.T.H., Cheng A.A. & Liu C.H. (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 46: 2416-2428.
- Jagannath A., Raju P. & Bawa A. (2010). Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. *LWT*. 43(8): 1197-1203.
- Liu C.H., Chiu C.S., Ho P.L. & Wang S.W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of applied microbiology*. 107(3): 1031-1041.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
- Mamun A., Masniyom P. & Maneesri J. (2021). Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2083 in protectant during low-temperature drying and storage. *Sains Malaysiana*. 50(8): 2229-2240.
- Nimrat S. & Vuthiphandchai V. (2011). In vitro evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. *African Journal of Biotechnology*. 10(22): 4643-4650.
- Nguyễn Thị Lâm Đoàn & Đặng Thảo Yến Linh (2018). Các đặc điểm phân loại và tạo chế phẩm probiotic vừa vi khuẩn lactic phân lập từ ruột gà. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 8(93): 67-74.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*. 105(1): 1-13.
- Savedboworn W., Teawsomboonkit K., Surichay S., Riansa-Ngawong W., Rittisak S., Charoen R. & Phattayakorn K. (2018). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Biotechnology*. 28(3): 795-805.
- Shah N. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83(4): 894-907.
- Tsen E.H., Lin Y.P., Huang H.W & King A.E. (2007). Accelerated storage testing of freeze-dried immobilized *Lactobacillus acidophilus*-fermented banana media. *Journal of Food Processing and Preservation*. 31: 688-701.
- Wirunpan M., Savedboworn W. & Wanchaitanawong P. (2016). Survival and shelf life of *Lactobacillus lactis* 1464 in shrimp feed pellet after fluidized bed drying. *Agriculture and Natural Resources*. 50(1): 1-7.
- Yeo S.K., Ewe J.A., Tham C.S.C. & Liong M.T. (2011). Carriers of Probiotic Microorganisms. In: M.T. Liong (Ed.): *Biology, Genetics and Health Aspects* Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 191-220.