

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Vũ Khắc Nhượng và Hà Minh Trung, 1983. *Phương pháp nghiên cứu bệnh cây* (tài liệu dịch). Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
- Viện bảo vệ thực vật, 1997. *Phương pháp nghiên cứu bảo vệ thực vật*. NXB Nông nghiệp Hà Nội.
- Baldassarri, L., Creti, R., Recchia, S., Pataracchia, M., Alfalone, G., Orefici, G., Campoccia, D., Montanaro, L. & Arciola, C. R., 2006. *Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices*. Int J Artif Organs 29, 402–406.
- Kotzé, J.M., 1981. *Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa*. Plant Disease Reporter 65, 945-950.
- Kotzé J.M., 2000. *Black spot*. In Compendium of Citrus Diseases, LW Timmer SM Garnsey, JH Graham, eds. St Paul, Minnesota, USA: APS Press, 23-25.

Identification of pesticide type and application time for controlling of black spot disease on Phuc Trach pummelo at Huong Khe, Ha Tinh

Vu Viet Hung, Nguyen Thi Tuyet, Duong Xuân Thuong, Nguyen Ngoc Ha

Abstract

Black spot disease (*Phyllosticta citricarpa*) is a dangerous disease and has a great impact on productivity, quality of Phuc Trach Pummelo in Huong Khe district, Ha Tinh province. Disease is normally appeared from May to early June yearly and causes severe damage to the pummel yield and quality in mid-July to early September. In order to establish a procedure for integrated pest management of black spot disease, the study on identification of pesticide type and application time was carried out. The results showed that among used pesticides, the Score 250 EC (the active chemical substance is *Difenoconazolen*) was the most effective in controlling the disease. The most effective for time spraying was 6 to 7 weeks after the end of flowering. Appropriate number of sprays was 3 times with 15 days interval.

Key words: Black spot disease, Phuc Trach pummelo, yield, quality

Ngày nhận bài: 2/10/2016

Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh

Ngày phản biện: 8/10/2016

Ngày duyệt đăng: 25/10/2016

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *Mycoplasma hyopneumoniae* TỪ MẪU BỆNH PHẨM LỢN

Võ Thành Thìn¹, Đặng Văn Tuấn¹, Lê Đình Hải¹

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và định danh được vi khuẩn *M. hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) từ mẫu bệnh phẩm lợn. Đã tiến hành thu thập được 200 phổi lợn có biểu hiện viêm tại một số lò mổ ở nhiều tỉnh khu vực miền Trung Việt Nam. Mẫu dịch rửa phế quản, tằm bông ngoáy phế quản và tổ chức phế quản phổi được xử lý từ các mẫu phổi để phân lập vi khuẩn *M. hyopneumoniae*. Đã phân lập được 8 chủng nghi *M. hyopneumoniae* từ 200 mẫu phổi trên môi trường Friis. Bằng phương pháp real-time PCR và giải trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* cho thấy cả 8 chủng phân lập được đều thuộc loài *M. hyopneumoniae*. Phân tích trình tự nucleotit trên gen *16S rRNA* cho thấy không có sự khác biệt về di truyền giữa của các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được.

Từ khóa: Lợn, viêm phổi, *M. hyopneumoniae*, phân lập

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* là nguyên nhân gây ra bệnh viêm phổi địa phương (Enzootic pneumonia) ở lợn trên toàn thế giới (Ross, 1986, Sibila *et al.*, 2009). Chúng được phân lập lần đầu tiên vào năm 1965 tại Anh và Mỹ (Goodwin *et al.*, 1967; Mare and

Switzer, 1965). Bệnh xuất hiện ở hầu hết các vùng chăn nuôi lợn với tỷ lệ nhiễm *M. hyopneumoniae* từ 38% đến 100% (Simionatto *et al.*, 2013). Trong điều kiện tự nhiên, vi khuẩn *M. hyopneumoniae* gây bệnh viêm phổi với những đặc trưng như tỷ lệ nhiễm cao, tỷ lệ chết thấp. Lợn nhiễm bệnh thường có chỉ số tiêu

¹ Phân viện Thú y miền Trung

tổn thức ăn cao hơn nhiều so với lợn bình thường. Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* xâm nhập vào cơ thể lợn sẽ phá hủy hệ thống tế bào tiết chất nhờn trên niêm mạc đường hô hấp, tạo điều kiện cho các tác nhân thứ phát xâm nhập gây bệnh. Lợn nhiễm bệnh thường có triệu chứng không rõ ràng hoặc không có triệu chứng (Ross, 1986).

Việc phân lập *M. hyopneumoniae* từ mẫu bệnh phẩm là rất khó khăn (Friis, 1975). Đặc điểm của vi khuẩn này là phát triển chậm, đòi hỏi môi trường giàu chất dinh dưỡng và pH ổn định trong suốt quá trình phát triển của chúng (Razin *et al.*, 1998). Do đó, các phương pháp như PCR, miễn dịch huỳnh quang hay ELISA thường được sử dụng như công cụ để chẩn đoán bệnh thay cho việc nuôi cấy phân lập. Mặc dù vậy, việc phân lập vi khuẩn từ mẫu bệnh phẩm là rất cần thiết để thực hiện các nghiên cứu sâu hơn về chủng vi khuẩn gây bệnh. Do đó, mục tiêu trong nghiên cứu này là phân lập và định danh được chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* từ mẫu bệnh phẩm phổi lợn, làm cơ sở cho nghiên cứu lựa chọn chủng giống để sản xuất vắc-xin phòng bệnh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu nghiên cứu: Phổi lợn nghi nhiễm *Mycoplasma* lấy từ lợn nái và lợn thịt tại lò mổ các tỉnh khu vực miền Trung Việt Nam.

- Môi trường Friis để phân lập, nuôi cấy vi khuẩn *M. hyopneumoniae*.

- Hóa chất, sinh phẩm dùng trong phản ứng PCR, real-time PCR, giải trình tự gen: Kit chiết tách DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega), Kit thực hiện phản ứng real-time PCR (Invitrogen Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG Kit), GoTaq green master mix (Promega), QIAquick PCR purification Kit (Qiagen), BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher), các cặp môi (IDT).

- Đối chứng dương chuẩn (mẫu DNA của vi khuẩn *M. hyopneumoniae* NCTC 10110): Do Viện Nghiên cứu Thú y vùng Venice - Italia (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venzie - Italy) cung cấp.

Bảng 1. Trình tự nucleotit của các cặp môi dùng để định danh *M. hyopneumoniae*

Phản ứng	Gen	Trình tự nucleotit (5' → 3')	Nguồn
PCR	16s rRNA	583-F: TTG ATC CTG GCT CAG G	Pettersson <i>et al.</i> , 1996
		390-R: CTT GTG CGG GYY CCC GTC AAT TC	
Real-time PCR	ldh	Probe: CCGAATTGATAGCTCAAATTACGAA	Kleiboeker, 2004
		F: TGCCGGTGAATGTTTCTG	
		R: CCGGCGAGAACTGGATA	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy và xử lý mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là phổi lợn nguyên vẹn có các biểu hiện bệnh tích viêm, nhục hóa hoặc rắn chắc màu đỏ sậm đến tím xám được lấy trực tiếp từ lợn thịt, lợn nái tại lò mổ. Mẫu được gói trong túi nylon sạch, bảo quản trong thùng đá và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ.

Mẫu phổi được xử lý để thu huyền dịch ban đầu là dịch rửa phế quản, tắm bông ngoáy phế quản hoặc mẫu mô - phế quản phổi được nghiền trong môi trường Friis. Huyền dịch ban đầu được sử dụng để phân lập vi khuẩn *M. hyopneumoniae*.

Tất cả huyền dịch ban đầu được bảo quản ở 2 đến 8°C và tiến hành phân lập vi khuẩn trong vòng tối đa 24 giờ. Khi xử lý mẫu phổi, phải lựa chọn phế quản

nhỏ nhất và xa nhất có thể để hạn chế tạp nhiễm *M. hyorhynis* và một số vi khuẩn khác.

2.2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn *Mycoplasma spp.*

Vi khuẩn *Mycoplasma spp.* được phân lập theo Nicholas và Baker (1998), Dahlia *et al.* (2009) và kỹ thuật chuyển giao từ Viện Thú y Italia (IZSve). Các bước tiến hành được tóm tắt như sau: (1) Lấy 200µl huyền dịch ban đầu cấy sang lọ có chứa 2ml môi trường Friis. (2) Ủ các lọ phân lập cùng với một số lọ đối chứng âm (môi trường Friis không cấy mẫu) ở 37°C/ 5% CO₂ trong 4 đến 6 tuần. Mẫu được coi là dương tính khi màu của môi trường Friis chuyển sang màu vàng chanh, không đục, không lắng cặn, trong khi đó màu của lọ đối chứng không đổi. Những mẫu dương tính được cấy chuyển lên môi trường

Friis agar, ủ 37°C/5% CO₂ trong 4 đến 6 tuần để quan sát khuẩn lạc. (3) Khi xuất hiện khuẩn lạc trên mặt thạch thì tiến hành chọn một khuẩn lạc riêng lẻ cấy chuyển lên môi trường Friis để tăng sinh thuần khiết. (4) Bảo quản chủng phân lập được ở -86°C.

2.2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn *M. hyopneumoniae*

Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* được định danh bằng phản ứng real-time PCR theo theo Kleiboecker (2004) và giải trình tự gen *16s rRNA* theo Pettersson *et al.* (1996) sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1).

- Mẫu DNA của vi khuẩn *Mycoplasma spp.* phân lập được chiết tách bằng bộ Kit Wizard Genomic DNA Purification do Promega (Mỹ). Quy trình chiết tách được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Phản ứng real-time PCR được thực hiện với bộ Kit Invitrogen Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG trên hệ thống máy RT-PCR IQ5 (Bio-Rad - USA). Phản ứng rPCR được đánh giá dương tính khi giá trị Ct của mẫu ≤ 35.

- Phản ứng PCR khuếch đại gen *16s rRNA* được thực hiện trên máy luân nhiệt Biorad thermal cycler.

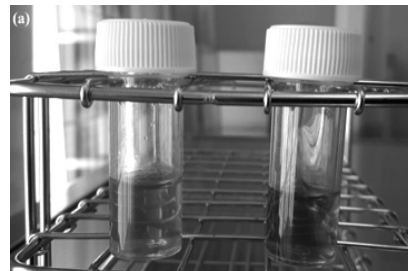
Sản phẩm PCR khuếch đại gen *16s rRNA* được tinh sạch bằng bộ Kit QIAquick PCR purification (Qiagen). Trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* được giải mã tại Công ty TNHH thương mại, sản xuất và dịch vụ Nam Khoa, TP. Hồ Chí Minh. Trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* được so sánh với trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* của các chủng *M. hyopneumoniae* tham chiếu trên Genbank bằng phần mềm BLAST. Kết quả giám định các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được dựa vào mức độ tương đồng nucleotit trên gen *16s rRNA* giữa những chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được với các trình tự của các chủng *M. hyopneumoniae* tham chiếu đã được đăng tải trên Genbank.

Phân tích tính tương đồng gen giữa các chủng phân lập được và các chủng tham chiếu được thực hiện bằng phần mềm BioEdit (version 7.2.5) theo phương pháp ClustalW Multiple Alignment / No Bootstrap NJ tree (Hall, 2001). Trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* của các chủng *M. hyopneumoniae* tham chiếu trên Genbank có mã số là JN935889 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, chủng ATCC 27714), CP003802 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, chủng 7422) và CP003131 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, chủng 168-L).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Mycoplasma*

Mẫu bệnh phẩm phổi lợn với bệnh tích viêm, nhục hóa hoặc rắn chắc màu đỏ sậm đến tím xám được lấy trực tiếp từ lợn thịt, lợn nái tại nhiều lò mổ khác nhau thuộc các tỉnh khu vực miền Trung. Trong tổng số 200 mẫu phân lập trên môi trường Friis, có 8 mẫu làm màu môi trường chuyển sang vàng chanh, không đục, không lắng cặn trong khi đó màu của lọ đối chứng âm không đổi (Hình 1a). Như vậy, 8/200 mẫu bệnh phẩm này có thể dương tính với *M. hyopneumoniae*. Tiến hành cấy chuyển những mẫu này lên môi trường Friis agar, sau thời gian nuôi cấy thấy xuất hiện khuẩn lạc nhỏ, tròn lồi, không có tâm sẫm màu, không có vòng sáng xung quanh (hình 1b), đường kính khuẩn lạc khoảng 0,025 – 0,1mm. Theo Ross và Whittlestone (1983), Nicholas và Baker (1998) cho rằng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* chỉ phát triển trên môi trường nhân tạo sau thời gian nuôi cấy khoảng 5 đến 6 tuần, khuẩn lạc thường không có hình trứng chên như những loài *Mycoplasma* khác. Như vậy, bước đầu có thể kết luận rằng 8 chủng vi khuẩn phân lập được có thể thuộc loài *M. hyopneumoniae*.



Hình a



Hình b

Hình 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *M. hyopneumoniae* trên môi trường nuôi cấy

(a) Môi trường Friis: Mẫu phân lập (trái), màu môi trường chuyển sang vàng chanh (dương tính); Mẫu đối chứng (phải): Màu môi trường không thay đổi (âm tính)

(b) Môi trường Friis agar: Khuẩn lạc *M. hyopneumoniae* (10X)

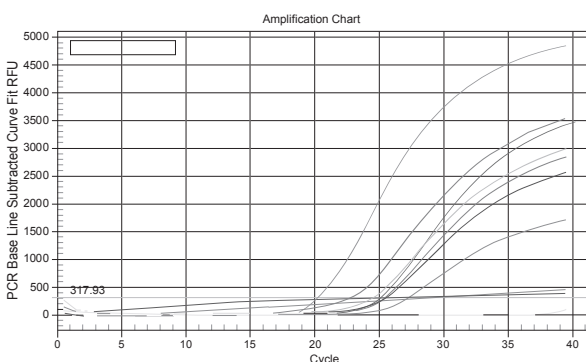
3.2. Kết quả định danh các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập

3.2.1. Kết quả giám định *M. hyopneumoniae* bằng phản ứng real-time PCR

Phản ứng real-time PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu phát hiện gen *ldh* mã hóa cho L-lactate dehydrogenase protein của vi khuẩn *M. hyopneumoniae*. Kết quả phản ứng cho thấy cả 8 chủng này đều dương tính với gen *ldh*. Giá trị Ct của các mẫu được trình bày ở bảng 2 và minh họa ở hình 2.

Bảng 2. Kết quả định danh *M. hyopneumoniae* bằng phản ứng real-time PCR

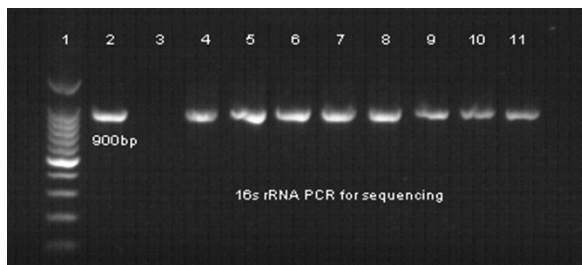
TT	Chủng phân lập	Giá trị Ct	Kết quả
1	PV3952	24,74	+
2	PV4490	25,61	+
3	PV1702	25,24	+
4	PV45	23,03	+
5	NT5F	25,62	+
6	M157	29,50	+
7	M183	27,41	+
8	M100	25,24	+
9	Đối chứng dương	20,58	+
10	Đối chứng âm	39,41	-



Hình 2. Phản ứng real-time PCR định danh *M. hyopneumoniae*

3.2.2. Kết quả giám định *M. hyopneumoniae* bằng giải trình tự gen *16s rRNA*

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại gen *16s rRNA* của 8 chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được. Chiều dài đoạn gen được khuếch đại khoảng 900bp, từ vùng U1 (10 - 34) đến vùng U5 (924 - 902) của *rrnA* và *rrnB* operon (Hình 3). Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose, sau đó tinh sạch để giải trình tự nucleotit. Đoạn gen được giải trình tự có độ dài 825bp.

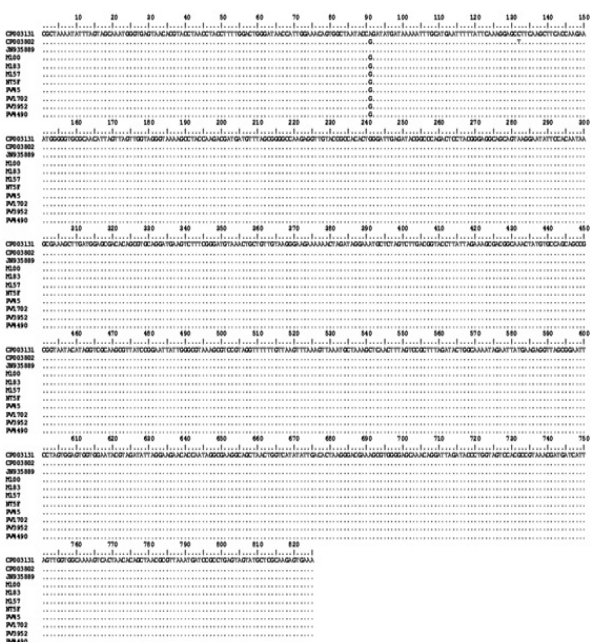


Hình 3. Sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại gen *16s rRNA*

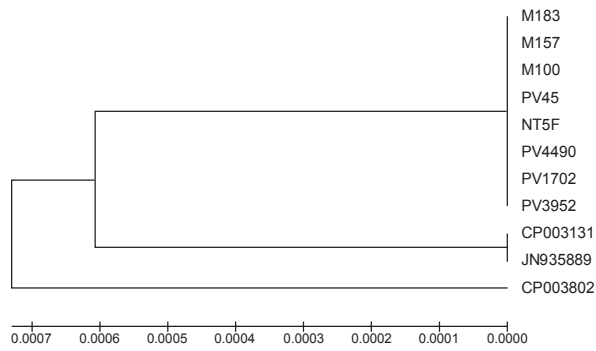
Giếng 1: Thang chuẩn DNA 100bp; giếng 2: Đối chứng dương; giếng 3: Đối chứng âm; giếng 4-11: Mẫu DNA của 8 chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* phân lập

Kết quả so sánh trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* giữa 8 chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được cho thấy không có bất kỳ sự sai khác nào giữa các chủng phân lập được. Kết quả tra cứu bằng phần mềm BLAST cũng cho thấy cả 8 chuỗi nucleotit trên gen *16s rRNA* của các chủng *M. hyopneumoniae* chúng tôi phân lập được hoàn toàn tương đồng với gen *16s rRNA* của loài *M. hyopneumoniae* đã được công bố trên Genbank. Kết quả so sánh trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* giữa 8 chủng *M. hyopneumoniae* phân lập và chủng tham chiếu được thể hiện ở hình 4 và hình 5.

Như vậy, từ kết quả phân tích bằng real-time PCR và giải trình tự gen *16s rRNA*, tất cả 8 chủng *Mycoplasma* chúng tôi phân lập được từ mẫu bệnh phẩm lợn đều thuộc loài *M. hyopneumoniae*.



Hình 4. Trình tự nucleotit trên gen *16s rRNA* của các chủng *M. hyopneumoniae*



Hình 5. Cây phả hệ xác định mối quan hệ của các chủng *M. hyopneumoniae* dựa vào trình tự nucleotide trên gen *16s rRNA*

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* từ mẫu phổi lợn. Không có sự khác biệt về trình tự nucleotide trên gen 16S rRNA giữa các chủng phân lập cũng như so sánh với các chủng tham chiếu trên ngân hàng gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dahlia, H., Tan, L.J., Zarrahimah, Z., Maria, J., 2009.** Isolation of *Mycoplasma hyosynoviae* from pneumonic lung of swine. *Trop Biomed.*, 26(3), 341-345.
- Friis, N. F., 1975.** Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med*, 27, 337-9.
- Goodwin, R. F. W., Pomeroy, A. P. & Whittlestone P., 1967.** Characterization of *Mycoplasma suis pneumoniae*: a mycoplasma causing enzootic pneumonia of pigs. *Epidemiology & Infection*, 65, 85-96.
- Hall, T., 2001.** BioEdit version 5.0.6 manual, *North Carolina State University*.

Kleiboeker, S.B., 2004. Development of Real-time, multiplex PCR/RT-PCR assays for improved PRDC pathogen detection. University of Missouri-Columbia.

Mare, C. J. & Switzer, W. P., 1965. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin*, 60, 841-6.

Nicholas, R. and Baker, S., 1998. Recovery of *Mycoplasma* from animals. In: *Methods in Molecular Biology (Vol. 104): Mycoplasma protocols*. Edited by: Miles, R.J., Nicholas, R.A.J. A. *Humana Press*, 37-43.

Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M. & Johansson, K. E., 1996. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *Journal of Bacteriology*, 178, 4131-42.

Razin, S., Yogev, D. & Naot, Y., 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1094-1156.

Ross, R.F. and Whittlestone, P., 1983. Recovery of identification and serological response to porcine Mycoplasma. In *Method in Mycoplasmaology (II)*, Academic Press, Inc., 115 - 127.

Sibila, M., Pierers, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F. & Segales, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal*, 181, 221-231.

Simionatto, S., Marchioro, S. B., Maes, D. & Dellagostin, O. A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Vet Microbiol*, 165, 234-42.

Isolation and identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lung samples of pigs

Vo Thanh Thin, Dang Van Tuan, Le Dinh Hai

Abstract

The purpose of this study was to isolate and identify *M. hyopneumoniae* from lung samples of pigs. A total of 200 entire lung samples, which contain macroscopic lesions typical of mycoplasmal pneumonia, were collected from slaughter houses in Central region of Vietnam. Bronchi washing liquid, bronchi swabs and lung tissue were taken for *M. hyopneumoniae* isolation. Eight supposed *M. hyopneumoniae* strains were isolated on Friis medium. Identification of supposed strains was carried out, using specific real-time PCR and sequencing the *16S rRNA* gene. The result revealed that, all isolated strains were *M. hyopneumoniae* species. Analysis of nucleotide sequence of *16S rRNA* gene showed that there was no difference between 8 *M. hyopneumoniae* isolated strains.

Key words: Pigs, pneumonia, *M. hyopneumoniae*, isolation

Ngày nhận bài: 15/8/2016

Người phản biện: TS. Nguyễn Tùng

Ngày phản biện: 22/8/2016

Ngày duyệt đăng: 25/8/2016

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG NẤM MEN *Saccharomyces cerevisiae* TRONG CHẾ BIẾN NƯỚC QUẢ TÁO MÈO (*Docynia indica*) LÊN MEN CÓ ĐỘ CỒN THẤP

Nguyễn Đức Hanh¹, Hoàng Thị Lệ Hằng¹,
Hoàng Thị Tuyết Mai¹, Nguyễn Văn Lợi²

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát các yếu tố ảnh hưởng chính đến chất lượng của dịch táo mèo sau công đoạn lên men sử dụng chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, từ đó xác định được các thông số công nghệ phù hợp nhằm tạo ra sản phẩm nước táo mèo lên men có độ cồn thấp. Kết quả thu được khi tiến hành lên men dịch ép táo mèo đã điều chỉnh đến các hàm lượng chất khô từ 14 - 20°Bx và pH từ 3,0 - 4,2 với tỷ lệ nấm men được bổ sung ban đầu từ 0,005- 0,020% cho thấy: Dịch lên men có hàm lượng chất khô hòa tan tổng số ban đầu là 18°Bx và có pH=3,4 khi được bổ sung chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với tỷ lệ 0,01% sẽ tạo ra sản phẩm nước táo mèo lên men đạt chất lượng tốt nhất. Sản phẩm có hàm lượng etanol đạt 5,2%v/v.

Từ khóa: Lên men, táo mèo, nấm men

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quả táo mèo (*Docynia indica*) có vị chua chát và hương thơm rất đặc trưng, theo các nghiên cứu hiện đại cho thấy táo mèo có tác dụng kháng khuẩn, cường tim, làm giãn mạch vành, chống rối loạn nhịp tim, hạ áp, bảo vệ tế bào gan, tăng cường miễn dịch, an thần, ức chế ngưng tập tiểu cầu, điều chỉnh rối loạn lipid máu, xơ vữa động mạch, phòng ngừa đau thắt ngực, nhồi máu cơ tim, béo phì, viêm cầu thận cấp và mãn tính, hậu sản, ứ trệ, giảm kích thích ruột, tiêu chảy, lỵ (Nguyễn Thị Minh Thư, 2012). Cùng theo đà phát triển của xã hội, không chỉ có các loại đồ uống truyền thống mà ngày càng có nhiều các loại đồ uống du nhập từ nước ngoài sang mang hương vị mới lạ, một trong số đó phải kể tới đồ uống lên men có độ cồn thấp dạng cider. Việc nghiên cứu sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong lên men dịch ép từ quả táo mèo sẽ tạo ra một loại đồ uống mới từ nguồn nguyên liệu trong nước vừa có hương vị đặc trưng vừa có tác dụng tốt đối với sức khỏe, giúp đa dạng hóa sản phẩm chế biến, làm tăng hiệu quả kinh tế cho cây táo mèo.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Dịch quả táo mèo: Dịch ép quả táo mèo có hàm lượng chất khô hòa tan tổng số là 9,2°Bx, hàm lượng axit là 1,45%, hàm lượng tanin là 1,84%, pH = 3,0.

Chủng nấm men: *Saccharomyces cerevisiae* được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Đồ uống - Viện Công nghiệp thực phẩm.

Đường saccharose tinh luyện.

Hóa chất: HCl 15%, NaOH 10%, Xanh metylen,

NaOH 0,1N, KOH 10%, KOH 2,5N, Feri xianua 1%, indigocarmin, H₂SO₄ 25%, Dung dịch KMnO₄ 0,05N, than hoạt tính.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Xác định tỷ lệ phối trộn dịch táo mèo/ nước thích hợp: Tiến hành phối trộn dịch táo mèo/ nước với tỷ lệ: 1/1; 1/3; 1/5; 1/7; 1/9.

Xác định hàm lượng chất khô hòa tan tổng số của dịch lên men: Dịch ép táo mèo được chia thành các mẫu có cùng thể tích 300 ml và được điều chỉnh bằng đường saccharose đến hàm lượng chất khô hòa tan tổng số (TSS):14, 16, 18, 20°Bx, pH – 4,0 rồi được thanh trùng và làm nguội đến 16±1°C, tiến hành bổ sung chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với tỷ lệ tiếp giống là 0,015%.

Xác định pH của dịch lên men: Các mẫu dịch ép táo mèo được bổ sung đường đến nồng độ cơ chất thích sau đó bổ sung nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với tỷ lệ tiếp giống là 0,015% và sử dụng axit citric và natri acetat điều chỉnh pH đến các giá trị khác nhau 3,0; 3,2; 3,4; 3,8; 4,2. Tiến hành lên men ở nhiệt độ 16±1°C trong thời gian khảo sát 14 ngày.

Xác định tỷ lệ tiếp giống nấm men: Dịch ép táo mèo được chia thành các mẫu có cùng thể tích (V = 300ml) rồi được điều chỉnh về nồng độ cơ chất và pH thích hợp rồi được bổ sung nấm men với các tỷ lệ tiếp giống khảo sát 0,005; 0,010; 0,015; 0,020% (nấm men dạng khô đã được hoạt hóa trước khi lên men).

2.2.2. Môi trường hoạt hóa giống

Nấm men khô được hoạt hóa trước khi cấy giống bằng cách bổ sung vào dịch đường 10% với tỷ lệ nấm

¹ Viện Nghiên cứu Rau quả; ² Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội