



DOI:10.22144/ctujos.2024.328

## TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN KOMBUCHA TỪ TRÀ NỖN TÔM

Lưu Minh Châu<sup>1</sup>, Đặng Triệu Minh Anh<sup>2</sup>, Đặng Triệu Minh Khuê<sup>2</sup>, Nguyễn Ngọc Thanh<sup>1</sup>, Bùi Hoàng Đăng Long và Huỳnh Xuân Phong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Sinh viên ngành Công nghệ sinh học Khóa 46, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): hxphong@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 01/04/2024

Sửa bài (Revised): 25/06/2024

Duyệt đăng (Accepted): 26/07/2024

**Title:** Optimization of fermentation conditions for kombucha from tender shoot tea

**Author(s):** Luu Minh Chau, Dang Trieu Minh Anh, Dang Trieu Minh Khue, Nguyen Ngoc Thanh, Bui Hoang Dang Long and Huynh Xuan Phong\*

**Affiliation(s):** Can Tho University

### TÓM TẮT

Trà nõn tôm là một loại trà xanh có hương thơm và chất lượng cao. Nghiên cứu được thực hiện nhằm tối ưu hóa điều kiện lên men kombucha từ trà nõn tôm thông qua khảo sát các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình lên men gồm hàm lượng trà (0,6-1,0 % w/v), hàm lượng giống vi sinh vật (6,0-10,0% w/v), hàm lượng chất khô hòa tan (16,0-20,0°Brix) và pH (3,5-5,0). Các yếu tố liên quan đến quá trình lên men như nhiệt độ (25, 28-32, 35°C) và thời gian (2-14 ngày) cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy hàm lượng trà 0,8% w/v, hàm lượng giống 10% w/v, hàm lượng chất khô hòa tan 18°Brix, pH là 4,34, lên men ở nhiệt độ phòng (28-32°C) trong 8 ngày là các điều kiện thích hợp cho quá trình lên men kombucha giai đoạn đầu (F1) để tạo ra sản phẩm đạt chất lượng cao cả về chỉ tiêu hóa lý và cảm quan.

**Từ khóa:** Kombucha, lên men chính, tối ưu hóa, trà nõn tôm, trà xanh

### ABSTRACT

Tender shoot tea is a type of green tea with a delicate flavor and high quality. The study was conducted to optimize fermentation conditions for kombucha from tender shoot tea by investigating factors affecting the fermentation process, including tea content (0.6-1.0% w/v), starter content (6.0-10.0% w/v), soluble solids content (16.0-20.0°Brix), pH (3.5-5.0). Factors such as temperature (25, 28-32, 35°C) and time (2-14 days) of fermentation were also investigated. The results showed that tea content was 0.8% w/v, starter content was 10% w/v, soluble solids content was 18°Brix, and pH was 4.34, fermented at room temperature (28-32°C) for 8 days were suitable conditions for the primary fermentation (F1) of kombucha to create products with high quality in both physicochemical and organoleptic characteristics.

**Keywords:** Kombucha, primary fermentation, optimization, tender shoot tea, green tea

## 1. GIỚI THIỆU

Trà nổi tằm là một loại trà xanh thuộc dòng trà cao cấp và được nhiều người ưa chuộng vì hương vị thơm ngon. Sau khi chế biến có màu xanh lục tươi sáng, khi pha nước trà có màu vàng ánh xanh. Hương vị của trà nổi tằm thường rất thơm, dịu nhẹ và có hậu vị ngọt. Trà nổi tằm chủ yếu được trồng và sản xuất tại Thái Nguyên, một tỉnh nổi tiếng với truyền thống trồng trà lâu đời ở Việt Nam do khu vực này có điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng lý tưởng cho việc trồng trà đạt chất lượng cao. Trong trà có chứa nhiều hợp chất hoạt tính sinh học như carotenoid, acid phenolic, flavonoid, coumarin, alkaloid, polyacetylen, saponin và terpenoid, chính những hợp chất này đã tạo nên hương vị của trà (Wang et al., 2022). Nghiên cứu của Lin et al. (1996) cho thấy tổng hàm lượng polyphenol trong lá non cao hơn đáng kể so với lá già và thân. Ngoài ra, hàm lượng polyphenol trong chồi và trong lá của các loại trà khác nhau cũng có sự khác nhau: trà xanh > trà trắng > trà vàng > trà ô long > trà đen (Ning et al., 2016). Chính vì vậy, trà nổi tằm đặc biệt so với các loại trà thông thường, bởi quy trình thu hái chuẩn gồm một búp non mới mọc và một lá non kề sát bên dưới. Đây có thể được xem như là phần tinh túy nhất của cây trà, chứa nhiều chất dinh dưỡng và hương vị nhất. Trà không chỉ là một thức uống thú vị mà còn mang lại nhiều lợi ích sức khỏe đáng kể. Việc sử dụng trà hàng ngày có thể giúp cải thiện sức khỏe tổng quát, từ tăng cường hệ miễn dịch đến cải thiện chức năng não và hỗ trợ giảm cân (Sharma et al., 2007).

Kombucha là một trong những đồ uống lên men truyền thống được tạo ra bằng cách lên men trà ngọt nhờ hệ vi sinh vật gồm vi khuẩn và nấm men (còn gọi là SCOBY). Trà lên men (kombucha) có nguồn gốc ở Đông Bắc Trung Quốc (Mãn Châu) và được sử dụng vào thời nhà Tần (Ling Chi) để giải độc và cung cấp năng lượng (Coelhe et al., 2016). Cho đến ngày nay, kombucha đã trở nên phổ biến trên toàn thế giới bởi hương vị độc đáo của nó. Sự kết hợp hài hòa giữa vị chua của acid, vị ngọt của đường, vị chất nhẹ của trà đã tạo một thức uống giải khát trong những ngày hè nóng bức (Greenwalt et al., 2000; Bishop et al., 2022). Ngoài ra, việc tiêu thụ kombucha được cho là mang lại nhiều lợi ích sức khỏe cho con người như chứa nhiều vi khuẩn có lợi, giúp cải thiện hệ vi sinh đường ruột và hỗ trợ tiêu hóa; chứa nhiều chất chống oxy hóa giúp bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do gốc tự do; hỗ trợ hệ miễn dịch và hỗ trợ quá trình thải độc cơ thể thông qua việc cải thiện chức năng gan và thận (Jayabalan et al., 2014; Leal et al., 2018; Kitwetcharoen et al.,

2023). Trong nghiên cứu này, quy trình lên men kombucha từ trà nổi tằm được nghiên cứu với mục đích nhằm tạo nên loại thức uống mới từ dòng trà cao cấp, giúp nâng tầm giá trị của trà nổi tằm về cả về mặt sinh học và dinh dưỡng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và hóa chất

Trà nổi tằm được sản xuất bởi Công ty trách nhiệm hữu hạn Thương mại Dịch vụ Sản xuất Tâm Thái (414A, đường Thông Nhất, phường Tân Thịnh, thành phố Thái Nguyên).

Giống SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) được cung cấp bởi cửa hàng Mộc Miên (9/33, đường Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường An Cư, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ) và được nhân giống theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau 10 ngày lên men, màng nấm kombucha với mật số nấm men đạt  $6,9 \times 10^6$  CFU/mL và mật số vi khuẩn acetic là  $5,4 \times 10^6$  CFU/mL.

Hóa chất: NaOH chuẩn 0,1 N (Cemaco, Việt Nam), phenolphthalein (Jinhua, Trung Quốc), ethanol (Merck, Đức), tri-butyl phosphate (Sigma-Aldrich, Đức), 3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma-Aldrich, Đức), quercetin (Sigma-Aldrich, Đức),  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ , NaOH,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , (Xilong Scientific, Trung Quốc), đường sucrose (Biên Hòa, Việt Nam).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà nổi tằm

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM – Response Surface Methodology) được sử dụng để thiết kế thí nghiệm và bố trí tối ưu hóa các nhân tố khảo sát bao gồm hàm lượng trà (0,6-1,0% w/v), hàm lượng giống SCOBY (6,0-10,0% w/v); hàm lượng chất khô hòa tan (16,0-20,0°Brix) và pH (3,5-5,0). Thí nghiệm được thiết kế theo mô hình Box-Behken bởi phần mềm Design Expert 11.0, mỗi nhân tố được mã hóa với 3 mức độ (-1; 0; 1) với tổng số thí nghiệm là 29, bao gồm 5 điểm trung tâm. Trà nổi tằm được cho vào bình thủy tinh và bổ sung nước sôi với hàm lượng như bố trí thí nghiệm. Sau 15 phút ngâm, trà được lọc để loại bỏ xác trà và thu hồi dịch trà. Sau đó, dịch trà được điều chỉnh Brix và pH như bố trí thí nghiệm bằng đường sucrose và acid acetic. Hỗn hợp trà đường được chuyển vào các bình lên men 250 mL và bổ sung màng nấm SCOBY để đạt hàm lượng giống như bố trí thí nghiệm. Bình lên men được đặt bằng vải cotton đã nhúng qua cồn 96° (tạo

điều kiện hiếu khí và hạn chế nhiễm các vi sinh vật khác) và ủ 10 ngày ở nhiệt độ phòng (28-32°C) (khu vực tránh sáng). Các chỉ tiêu được xác định bao gồm pH, Brix, hàm lượng acid tổng và hàm lượng ethanol sau quá trình lên men kết hợp đánh giá cảm quan sản phẩm.

**2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà nấm tôm**

Sau khi khảo sát các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men kombucha F1 từ trà nấm tôm ở thí nghiệm 2.2.1, thí nghiệm được bố trí với hàm lượng trà, Brix, pH và hàm lượng giống SCOBY đã được xác định. Bình lên men được đặt bằng vải cotton đã nhúng qua cồn 96° và ủ 10 ngày ở các mức nhiệt độ khác nhau gồm 25°C, nhiệt độ phòng (28-32°C) và 35°C. Các chỉ tiêu bao gồm pH, Brix, hàm lượng acid tổng, hàm lượng ethanol, hàm lượng đường khử và hàm lượng flavonoid cũng như cảm quan sản phẩm được xác định để đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men.

**2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà nấm tôm**

Sau khi xác định được nhiệt độ đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà nấm tôm, quá trình lên men được thực hiện với các nhân tố đã được xác định (hàm lượng trà, Brix, pH, hàm lượng giống SCOBY và nhiệt độ). Các chỉ tiêu sau lên men (pH, Brix, hàm lượng acid tổng, hàm lượng ethanol, hàm lượng đường khử và hàm lượng flavonoid) được theo dõi và đánh giá cảm quan sản phẩm trong 2, 4, 6, 8, 10, 12 và 14 ngày.

**2.2.4. Phương pháp phân tích chỉ tiêu và xử lý số liệu**

- Xác định pH bằng máy đo pH Horiba (pH1100, Nhật Bản) và °Brix được xác định bằng khúc xạ kế Atago (Master-2α, Nhật Bản).
- Hàm lượng acid tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ (Nguyen & Hwang, 2016).
- Hàm lượng ethanol được xác định dựa trên phản ứng với tri-n-butyl phosphate và kali chromate (Sriariyanun et al., 2019).
- Hàm lượng đường khử được phân tích bằng phương pháp DNS (Gonçalves et al., 2010).
- Hàm lượng flavonoid được xác định bằng theo phương pháp tạo phức màu với aluminum chloride trong môi trường kiềm (Kim et al., 2003).

Đánh giá cảm quan sản phẩm: Thang điểm cảm quan được xây dựng dựa theo tiêu chuẩn Việt Nam

(TCVN) 12828:2019 về nước giải khát và TCVN 3215:1979 về sản phẩm thực phẩm (phương pháp cho điểm). Phương pháp đánh giá, cho điểm cảm quan đối với nước giải khát lên men được xây dựng dựa vào các chỉ tiêu gồm: Màu sắc, độ trong, mùi và vị. Cảm quan được đánh giá với 9 thành viên dựa trên thang điểm cảm quan đã xây dựng. Tiêu chuẩn này sử dụng hệ 20 điểm xây dựng trên một thang thống nhất có 6 bậc (0 đến 5) và cho điểm 5 là cao nhất cho một tiêu chuẩn.

- Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ) và Design - Expert 11.0 (StatEase Inc., Hoa Kỳ).

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà nấm tôm**

Để xác định cụ thể hơn giá trị tối ưu của một số nhân tố chính ảnh hưởng đến quá trình lên men kombucha từ trà nấm tôm, nghiên cứu đã tiến hành thực nghiệm đa yếu tố. Theo đó, thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nhân tố, 3 lần lặp lại theo phương pháp Box-Behnken được đề xuất bởi phần mềm Design - Expert 11.0. Trong đó, nhân tố thí nghiệm gồm có hàm lượng trà, Brix, pH, hàm lượng giống SCOBY và thí nghiệm được lên men ở nhiệt độ phòng (28-32°C) trong 10 ngày. Kết quả ghi nhận Brix, pH, hàm lượng ethanol và hàm lượng acid tổng sau quá trình lên men được trình bày ở Bảng 1.

Từ Bảng 1 có thể thấy rằng sau 10 ngày lên men ở nhiệt độ phòng thì độ Brix và pH ở tất cả các nghiệm thức đều giảm so với bố trí thí nghiệm ban đầu. Điều này cho thấy quá trình lên men kombucha đã được thực hiện bởi hệ vi sinh vật có mặt trong nấm SCOBY. Trong quá trình lên men, nấm men tạo ra một loại enzyme gọi là invertase (còn được gọi β-fructofuranosidase) xúc tác quá trình phân hủy sucrose thành hai thành phần chính là glucose và fructose. Sau đó, nấm men sử dụng đường đơn tạo ra ethanol thông qua con đường đường phân để tạo ra pyruvate và nhờ 2 enzyme pyruvate decarboxylase, alcohol dehydrogenase tiếp tục chuyển hóa thành sản phẩm cuối cùng là ethanol (Rodrussamee et al., 2011). Một số nấm men thuộc chi *Saccharomyces* thì ưa thích glucose, trong khi một số loại nấm men khác thuộc chi *Zygosaccharomyces* lại ưa thích fructose hơn (Jayabalan et al., 2014). Kết quả cho thấy hàm lượng

ethanol ở nghiệm thức NT5, NT10 và NT25 cho hàm lượng ethanol cao nhất trong số 29 nghiệm thức khảo sát và có khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Ngược lại, ở các NT9, NT12, NT20, NT20, NT21 và NT22 cho hàm lượng ethanol thấp nhất trong 29 nghiệm thức với hàm lượng ethanol nằm trong khoảng 1,49-1,58% v/v. Đồng thời, khi kết thúc quá trình lên men, hàm lượng acid tổng cũng được ghi nhận và dao động trong khoảng 2,04-4,86 g/L. Lượng acid tổng trong kombucha có nguồn gốc từ một số acid hữu cơ như acid acetic,

gluconic, glucuronic, citric, L-lactic, malic, tartaric, malonic, oxalic, succinic, pyruvic,... được tạo ra trong quá trình lên men bởi vi sinh vật hiện diện trong nguồn giống ban đầu (Jayabalan et al., 2014; Bishop et al., 2022). Trong đó, vi khuẩn acetic đóng vai trò chính trong việc sử dụng glucose để tạo ra acid gluconic và oxy hóa ethanol để tạo ra acid acetic thông qua các enzyme alcohol dehydrogenase và aldehyde dehydrogenase. Acid acetic là hợp chất hữu cơ tạo ra mùi vị giấm đặc trưng thường gắn liền với kombucha (Wang et al., 2022).

**Bảng 1. Kết quả một số chỉ tiêu của kombucha sau 10 ngày lên men ở nhiệt độ phòng**

NT	Nhân tố				Chỉ tiêu sau lên men			
	Hàm lượng trà (% w/v)	Tỷ lệ giống SCOBY (% w/v)	°Brix	pH	°Brix	pH	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hàm lượng acid tổng (g/L)
1	0,8	8,0	18	4,25	17,5 <sup>d</sup>	3,3 <sup>cdefg</sup>	1,91 <sup>d</sup>	4,71 <sup>ab</sup>
2	1,0	10	18	4,25	17,1 <sup>d</sup>	3,31 <sup>bedef</sup>	1,85 <sup>def</sup>	3,94 <sup>ef</sup>
3	0,8	6,0	20	4,25	19 <sup>abc</sup>	3,34 <sup>abcde</sup>	2,02 <sup>c</sup>	4,18 <sup>cdef</sup>
4	1,0	8,0	16	4,25	15,3 <sup>ef</sup>	3,45 <sup>ab</sup>	1,72 <sup>hi</sup>	3,78 <sup>fg</sup>
5	0,8	10	18	4,25	17,3 <sup>d</sup>	3,34 <sup>abcde</sup>	2,26 <sup>a</sup>	4,52 <sup>abcd</sup>
6	0,8	10	18	3,50	17,5 <sup>d</sup>	3,23 <sup>efgh</sup>	2,07 <sup>bc</sup>	4,24 <sup>bcdef</sup>
7	0,8	8,0	18	4,25	17,4 <sup>d</sup>	3,29 <sup>defg</sup>	2,12 <sup>b</sup>	4,04 <sup>def</sup>
8	0,8	6,0	18	5,00	17,3 <sup>d</sup>	3,29 <sup>defg</sup>	2,01 <sup>c</sup>	4,16 <sup>def</sup>
9	0,6	6,0	20	4,25	19,5 <sup>a</sup>	3,13 <sup>hi</sup>	1,58 <sup>j</sup>	2,04 <sup>l</sup>
10	0,8	10	18	4,25	17,1 <sup>d</sup>	3,25 <sup>efgh</sup>	2,26 <sup>a</sup>	4,86 <sup>a</sup>
11	0,8	8,0	18	3,50	17,1 <sup>d</sup>	3,27 <sup>efgh</sup>	1,88 <sup>de</sup>	3,25 <sup>h</sup>
12	0,6	8,0	18	5,00	17,2 <sup>d</sup>	3,24 <sup>efgh</sup>	1,56 <sup>jk</sup>	2,58 <sup>ijk</sup>
13	0,8	8,0	16	5,00	15,1 <sup>f</sup>	3,41 <sup>abcd</sup>	2,15 <sup>b</sup>	2,42 <sup>jkl</sup>
14	0,8	8,0	18	4,25	17,5 <sup>d</sup>	3,26 <sup>efgh</sup>	2,12 <sup>b</sup>	4,32 <sup>bcde</sup>
15	0,8	8,0	20	3,50	18,9 <sup>bc</sup>	3,26 <sup>efgh</sup>	1,93 <sup>d</sup>	3,15 <sup>h</sup>
16	0,8	6,0	16	4,25	15,5 <sup>ef</sup>	3,26 <sup>efgh</sup>	1,99 <sup>b</sup>	3,32 <sup>gh</sup>
17	0,8	8,0	18	4,25	17,5 <sup>d</sup>	3,24 <sup>efgh</sup>	2,12 <sup>b</sup>	4,66 <sup>abc</sup>
18	0,8	8,0	18	4,25	17,3 <sup>d</sup>	3,23 <sup>efgh</sup>	2,12 <sup>b</sup>	4,66 <sup>abc</sup>
19	1,0	8,0	20	4,25	18,9 <sup>abc</sup>	3,02 <sup>i</sup>	1,69 <sup>i</sup>	3,12 <sup>h</sup>
20	0,6	8,0	18	3,50	17,4 <sup>d</sup>	3,18 <sup>fgh</sup>	1,57 <sup>j</sup>	2,24 <sup>kl</sup>
21	0,6	8,0	16	4,25	15,7 <sup>e</sup>	3,22 <sup>efgh</sup>	1,49 <sup>k</sup>	2,22 <sup>kl</sup>
22	0,6	8,0	20	4,25	19,3 <sup>ab</sup>	3,17 <sup>gh</sup>	1,54 <sup>jk</sup>	2,36 <sup>kl</sup>
23	1,0	8,0	18	5,00	17,2 <sup>d</sup>	3,31 <sup>bedef</sup>	1,79 <sup>fgh</sup>	3,01 <sup>hi</sup>
24	1,0	6,0	18	4,25	17,3 <sup>d</sup>	3,33 <sup>abcde</sup>	1,81 <sup>efg</sup>	3,14 <sup>h</sup>
25	0,8	10	18	4,25	17,1 <sup>d</sup>	3,44 <sup>abc</sup>	2,26 <sup>a</sup>	4,86 <sup>a</sup>
26	1,0	8,0	18	3,50	17,3 <sup>d</sup>	3,44 <sup>ab</sup>	1,83 <sup>efg</sup>	2,52 <sup>jkl</sup>
27	0,8	6,0	18	3,50	17,3 <sup>d</sup>	3,35 <sup>abcde</sup>	1,75 <sup>ghi</sup>	2,88 <sup>hij</sup>
28	0,8	10	16	4,25	15,3 <sup>ef</sup>	3,47 <sup>a</sup>	1,92 <sup>d</sup>	4,42 <sup>abcde</sup>
29	0,8	8,0	20	5,00	15,8 <sup>a</sup>	3,45 <sup>a</sup>	1,79 <sup>fgh</sup>	3,12 <sup>h</sup>

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $p < 0,05$ ).

Sau khi xử lý bởi phần mềm, kết quả phân tích phương sai (ANOVA) và mức ý nghĩa thống kê dựa trên 2 chỉ tiêu là hàm lượng ethanol và hàm lượng acid tổng được trình bày trong Bảng 2 và Bảng 3. Kết quả phân tích cho thấy cả 2 mô hình đều có ý nghĩa khi giá trị p đều nhỏ hơn 0,0001. Ngoài ra, dựa

trên hệ số xác định R<sup>2</sup> cũng cho thấy mức độ phù hợp của mô hình. Giá trị càng gần với 1 thì mối tương quan giữa giá trị thực nghiệm và giá trị dự đoán càng tốt (Liu et al., 2003). Trong đó, giá trị R<sup>2</sup> đạt lần lượt là 0,9060 và 0,9165 đối với mô hình phân tích dựa trên hàm lượng ethanol và hàm lượng

acid sinh ra. Bên cạnh đó, khi kiểm định Lack of fit (sự thiếu phù hợp của mô hình) thì giá trị p đều lớn hơn 0,05 và điều này cũng đã khẳng định mô hình này là hoàn toàn phù hợp.

**Bảng 2. ANOVA kết quả xử lý thống kê theo mô hình thử nghiệm Box-Behnken dựa trên hàm lượng ethanol sau quá trình lên men**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Sum of Squares
Model	1,33	14	0,0954	9,64	< 0,0001	Significant
A-Hàm lượng trà	0,0766	1	0,0766	7,75	0,0147	
B-Hàm lượng giống	0,0381	1	0,0381	3,85	0,0698	
C-Brix	0,0041	1	0,0041	0,4173	0,5287	
D-pH	0,0272	1	0,0272	2,75	0,1197	
AB	0,0008	1	0,0008	0,0815	0,7795	
AC	0,0047	1	0,0047	0,4774	0,5009	
AD	0,0002	1	0,0002	0,0227	0,8823	
BC	0,0028	1	0,0028	0,2871	0,6005	
BD	0,0106	1	0,0106	1,07	0,3181	
CD	0,0714	1	0,0741	7,21	0,0178	
A <sup>2</sup>	0,6459	1	0,6459	65,28	< 0,0001	
B <sup>2</sup>	0,0078	1	0,0078	0,7880	0,3897	
C <sup>2</sup>	0,0725	1	0,0725	7,32	0,0170	
D <sup>2</sup>	0,0678	1	0,0678	6,86	0,0202	
<b>Residual</b>	0,1385	14	0,0099			
Lack of fit	0,1032	8	0,0129	2,19	0,1769	Not significant
Pure Error	0,0353	6	0,0059			
<b>Cor Total</b>	1,47	28				
<b>Std. Dev.</b>	0,0995	<b>R<sup>2</sup></b>		0,9060		
<b>Mean</b>	1,90	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>		0,8120		
<b>C.V. %</b>	5,23	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>		0,4715		

**Bảng 3. ANOVA kết quả xử lý thống kê theo mô hình thử nghiệm Box-Behnken dựa trên hàm lượng acid tổng sau quá trình lên men**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	Sum of Squares
Model	21,32	14	1,52	10,97	< 0,0001	Significant
A-Hàm lượng trà	1,41	1	1,41	10,15	0,0066	
B-Hàm lượng giống	0,6988	1	0,6988	5,03	0,0415	
C-Brix	0,0024	1	0,0024	0,0172	0,8976	
D-pH	0,0481	1	0,0481	0,3468	0,5653	
AB	0,0081	1	0,0081	0,0582	0,8128	
AC	0,0515	1	0,0515	0,3710	0,5522	
AD	0,0056	1	0,0056	0,0450	0,8434	
BC	0,1782	1	0,1782	1,28	0,2763	
BD	0,6994	1	0,6994	5,04	0,0415	
CD	0,0707	1	0,0707	0,5090	0,4873	
A <sup>2</sup>	7,37	1	0,737	53,10	< 0,0001	
B <sup>2</sup>	0,0052	1	0,0052	0,0375	0,8493	
C <sup>2</sup>	1,80	1	1,80	12,96	0,0029	
D <sup>2</sup>	4,13	1	4,13	29,74	< 0,0001	
<b>Residual</b>	1,94	14	0,1388			
Lack of fit	1,53	8	0,1912	2,77	0,1155	Not significant
Pure Error	0,4139	6	0,0690			
<b>Cor Total</b>	23,26	28				
<b>Std. Dev.</b>	0,3726	<b>R<sup>2</sup></b>		0,9165		
<b>Mean</b>	3,54	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>		0,8329		
<b>C.V. %</b>	10,52	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>		0,3781		

Hơn nữa, dựa trên kết quả xử lý thống kê từ Bảng 2 cho thấy hàm lượng trà ảnh hưởng có ý nghĩa đến sự hình thành ethanol trong quá trình lên men kombucha. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy sự tương tác giữa Brix\*pH, hàm lượng trà\*hàm lượng trà, Brix\*Brix, pH\*pH đến sự hình thành ethanol với giá trị p đều nhỏ hơn 0,05. Tương tự như hàm lượng ethanol, hàm lượng acid tổng sinh ra cũng chịu ảnh hưởng bởi hàm lượng trà, hàm lượng giống với p lần lượt là 0,0066 và 0,0415 (p<0,05). Bảng 3 còn cho thấy sự tương tác giữa hàm lượng giống\*pH, hàm

lượng trà\*hàm lượng trà, Brix\*Brix, pH\*pH cũng có ảnh hưởng đến sự hình thành lượng acid trong trong dịch lên men kombucha với độ tin cậy 95%.

Kết quả phân tích số liệu từ mô hình thử nghiệm Box-Behnken cho thấy mức độ phù hợp của mô hình có thể chấp nhận. Theo đó, 45 nghiệm thức với các thông số tối ưu được đề xuất bởi phần mềm Design-Expert. Ba tổ hợp có hàm lượng ethanol và acid tổng lý thuyết phù hợp được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm xác nhận và kết quả được trình bày ở Bảng 4.

**Bảng 4. Hàm lượng ethanol và acid tổng theo lý thuyết và thực tế sau 10 ngày lên men**

NT	Nhân tố					Chỉ tiêu				
	Hàm lượng trà (% w/v)	Hàm lượng giống SCOBY (% w/v)	Brix (°Brix)	pH	Brix (°Brix)	pH	Hàm lượng ethanol thực tế (% v/v)	Hàm lượng ethanol lý thuyết (% v/v)	Hàm lượng acid tổng thực tế (g/L)	Hàm lượng acid tổng lý thuyết (g/L)
1	0,9	10,0	19,0	4,50	18,0	3,19	2,12	2,07	4,48	4,55
25	0,8	10,0	20,0	4,10	19,0	3,37	2,25	2,16	4,15	4,08
44	0,8	10,0	18,0	4,34	17,0	3,25	2,15	2,18	4,36	4,34

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy, ở NT1, NT25 và NT44 cho hàm lượng ethanol thực tế lần lượt là 2,12, 2,25 và 2,15% v/v, cao hơn so với hàm lượng ethanol lý thuyết lần lượt là 2,07, 2,16 và 2,18% v/v. Tương tự, hàm lượng acid tổng giữa thực tế và lý thuyết có mức chênh lệch chỉ nằm trong khoảng 0,02-0,07 g/L. Việc thử nghiệm để xác nhận điều kiện tối ưu đã một lần nữa khẳng định kết quả dự đoán của mô hình có độ tin cậy để có thể ứng dụng trong nghiên cứu tối ưu hóa quá trình lên men kombucha từ trà non tằm.

Bên cạnh đó, kombucha ở 3 nghiệm thức cũng được đánh giá cảm quan và kết quả cho thấy NT44 với hàm lượng trà 0,8% w/v, hàm lượng giống 10% w/v, Brix 18 và pH 4,34 đạt điểm cảm quan cao nhất (5/5 điểm) cả về độ trong, màu sắc, mùi, vị của sản phẩm sau lên men. Do đó, NT44 được chọn là nghiệm thức tối ưu để tiến hành lên men khảo sát nhiệt độ và thời gian ở thí nghiệm sau.

**3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà non tằm**

Hầu hết các quá trình lên men đều bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ trong suốt quá trình lên men, việc duy trì nhiệt độ lên men tối ưu là cần thiết để vi sinh vật

có thể đạt mật số thích hợp và sinh ra các enzyme cần thiết cho hoạt động lên men để tạo ra sản phẩm tốt nhất có thể (Watawana et al., 2015). Nhiệt độ thấp (dưới 20°C) có thể làm cho quá trình lên men diễn ra chậm hơn. Vi khuẩn và nấm men hoạt động yếu, dẫn đến việc sản xuất acid acetic và các hợp chất khác bị giảm, làm chậm quá trình phát triển hương vị đặc trưng của kombucha. Ngược lại, nhiệt độ cao (trên 30°C) làm quá trình lên men diễn ra quá nhanh, dẫn đến việc sản xuất quá nhiều ethanol và acid acetic, làm mất cân bằng hương vị của kombucha và sản phẩm không thể tiêu thụ được. Các nghiên cứu trước đây cho thấy nhiệt độ dao động từ 22-30°C là nhiệt độ lý tưởng cho sự phát triển của vi khuẩn và nấm men trong kombucha. Ở nhiệt độ này, vi sinh vật hoạt động mạnh mẽ, dẫn đến quá trình lên men diễn ra nhanh và hiệu quả (Bishop et al., 2022).

Trong thí nghiệm này, kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men kombucha ở các mức nhiệt độ là 25°C, nhiệt độ phòng (28-32°C) và 35°C thông qua ghi nhận các chỉ tiêu Brix, pH, hàm lượng ethanol, hàm lượng acid tổng, hàm lượng đường khử và hàm lượng flavonoid được trình bày trong Bảng 5.

**Bảng 5. Kết quả một số chỉ tiêu của kombucha sau 10 ngày lên men ở các mức nhiệt độ khác nhau**

Nhiệt độ (°C)	Brix (°Brix)	pH	Hàm lượng đường khử (g/L)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng flavonoid (g/L)
25	17,6 <sup>a</sup>	4,04 <sup>a</sup>	15,4 <sup>b</sup>	0,97 <sup>c</sup>	2,16 <sup>c</sup>	0,55 <sup>b</sup>
28-32 (nhiệt độ phòng)	17,0 <sup>a</sup>	3,25 <sup>b</sup>	23,2 <sup>a</sup>	2,15 <sup>a</sup>	4,36 <sup>b</sup>	0,67 <sup>a</sup>
35	16,4 <sup>b</sup>	2,91 <sup>c</sup>	12,8 <sup>c</sup>	1,49 <sup>b</sup>	5,25 <sup>a</sup>	0,49 <sup>c</sup>

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $p < 0,05$ )

Từ số liệu trong Bảng 5 có thể thấy rằng nhiệt độ có ảnh hưởng quá trình lên men kombucha. Cụ thể là khi nhiệt độ càng cao thì giá trị Brix và pH có xu hướng giảm. Điều này cho thấy, vi sinh vật hoạt động mạnh ở 35°C hơn 2 mức nhiệt độ còn lại (25 và nhiệt độ phòng) dẫn đến việc tiêu thụ đường (chất khô hòa tan) nhiều nhất và còn khoảng 16,4°Brix. Đồng thời, giá trị pH cũng giảm từ 4,34 còn 2,91. Ngoài ra, hàm lượng đường khử còn lại sau quá trình lên men ở 35°C cũng đạt giá trị thấp nhất (12,8 g/L) và có khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Trong khi đó, đường khử có trong sản phẩm kombucha lên men ở nhiệt độ phòng ghi nhận với hàm lượng cao nhất (23,2 g/L). Nguyên nhân có thể là do ở khoảng nhiệt độ 28-32°C thích hợp cho sự phát triển của các chủng nấm men, từ đó sẽ đẩy nhanh quá trình lên men cũng như việc tạo ra nhiều enzyme invertase giúp phân cắt đường sucrose thành glucose và fructose (là hai loại đường khử được xác định bằng phương pháp DNS). Bên cạnh đó, nếu nhiệt độ thấp hơn sẽ làm hạn chế sự hoạt động của nấm men vì thể lượng đường khử tạo ra ở nhiệt độ 25°C có giá trị thấp nhất chỉ khoảng 15,4 g/L.

Xét về hàm lượng ethanol, kết quả từ Bảng 5 cho thấy lượng ethanol sau 10 ngày lên men kombucha ở nhiệt độ phòng (28-32°C) là cao nhất 2,15% v/v và có khác biệt nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Kế đến là hàm lượng ethanol khi lên men ở 35°C và 25°C với giá trị lần lượt là 1,49 và 0,97% v/v. Do đa số chủng nấm men phát triển tối ưu ở nhiệt độ 28-32°C, nấm men sử dụng nguồn đường carbohydrate, cụ thể là đường sucrose được bổ sung vào trong dịch trà để chuyển hóa thành ethanol, CO<sub>2</sub> cùng một số các acid hữu cơ khác. Tuy nhiên, có sự không tương quan về sự giảm độ Brix nhiều nhất và hàm lượng ethanol sinh ra (không cao nhất) ở nhiệt độ 35°C. Để giải thích cho điều này, có thể là do sự phát triển quá mức dẫn đến việc ethanol bị oxy hóa thành acid acetic bởi nhóm vi khuẩn acid acetic. Bên cạnh ethanol, các loại acid cũng được tạo ra song song trong quá trình lên men kombucha.

Trong đó, acid hữu cơ chính trong đồ uống là acid acetic. Vi khuẩn acetic sử dụng glucose để sản xuất acid gluconic và sự hiện diện của acid này kích thích nấm men sản xuất ethanol, sau đó được vi khuẩn acetic sử dụng để phát triển và tạo ra nhiều acid acetic hơn (Tran et al., 2020). Kết quả từ Bảng 5 cho thấy với hàm lượng acid tổng tăng dần theo các mức nhiệt độ khảo sát ở 25°C, nhiệt độ phòng (28-32°C), 35°C với giá trị thu được lần lượt là 2,16, 4,36 và 5,25 g/L. Kết quả này phù hợp với sự giảm dần của Brix và pH đã được giải thích trước đó.

Flavonoid là một nhóm các hợp chất có hoạt tính sinh học được tạo ra trong quá trình trao đổi chất của thực vật. Flavonoid có thể được tìm thấy trong trái cây và rau quả. Đặc tính chống oxy hóa của polyphenol mang lại lợi ích sức khỏe liên quan đến trà và kombucha, chẳng hạn như ngăn ngừa ung thư, tăng khả năng miễn dịch, giảm viêm và viêm khớp (Anantachoke et al., 2023). Do đó, hàm lượng flavonoid trong kombucha được lên men ở các nhiệt độ khác nhau cũng được xác định và thể hiện trong Bảng 5. Kết quả cho thấy hàm lượng flavonoid tạo ra trong quá trình lên men cũng có sự chênh lệch ở các mức nhiệt độ, cụ thể là ở nhiệt độ phòng có hàm lượng cao nhất là 0,67 g/L, kết đến là ở 25°C đạt 0,55 g/L và thấp nhất ở 35°C là 0,49 g/L. Những thay đổi về hàm lượng flavonoid trong quá trình lên men có thể là do ở các nhiệt độ khác nhau thì quá trình trao đổi chất của vi sinh vật trong quá trình lên men kombucha cũng có sự khác nhau. Các loại enzyme hay các hợp chất sinh ra từ hệ vi sinh vật trong SCOBY có thể phân hủy hay làm thay đổi tính chất của flavonoid (Gaggia et al., 2018; Jakubczyk et al., 2020).

Nhìn chung, từ các kết quả cho thấy nhiệt độ đã làm ảnh hưởng đến quá trình lên men kombucha thông qua việc làm thay đổi hàm lượng của một số hợp chất chính trong sản phẩm. Quá trình trao đổi chất của vi sinh vật trong quá trình lên men kombucha rất phức tạp do trong SCOBY không chỉ chứa một vi sinh vật mà là hệ cộng sinh giữa nhiều vi sinh vật có liên quan mật thiết với nhau. Tuy

nhiên, có một số loài vi sinh vật luôn được tìm thấy trong tất cả các SCOBY đó chính là nhóm vi khuẩn acetic và nấm men (Villarreal-Soto et al., 2018). Chính vì thành phần vi sinh trong SCOBY khác nhau và mỗi vi sinh vật có phản ứng cụ thể với sự thay đổi nhiệt độ, việc tiến hành lên men kombucha ở các nhiệt độ khác nhau có thể tạo ra sự khác biệt đáng kể về thành phần hóa học của kombucha được sản xuất. Trong nghiên cứu của Neffe-Skocińska et al. (2017) đã xác định điều kiện tối ưu cho quá trình lên men đồ uống trà kombucha là nhiệt độ 25°C và thời gian 10 ngày để thu được sản phẩm có chất lượng lý hóa, vi sinh và cảm quan tốt hay nghiên cứu của de Filippis et al. (2018) cho thấy rằng nhiệt độ lên men được thay đổi từ 20°C đến 30°C đã làm thay đổi mật số quần thể vi sinh, từ đó gây ra sự thay đổi đáng kể về hàm lượng acid glucuronic và acid gluconic cũng như polyphenol tổng có trong kombucha được sản xuất.

Ngoài việc phân tích các chỉ tiêu, sản phẩm được đánh giá cảm quan về các chỉ tiêu như độ trong, màu sắc, mùi, vị. Kết quả cho thấy sản phẩm kombucha sau 10 ngày lên men ở nhiệt độ phòng 28-32°C nhận

được sự yêu thích nhất. Sản phẩm được điểm tuyệt đối (5/5 điểm) ở tất cả các chỉ tiêu do trong suốt không vẩn đục, màu sắc đặc trưng của trà nõn tôm, mùi thơm dễ chịu và vị chua ngọt hài hòa. Như vậy, nhiệt độ phòng (28-32°C) là nhiệt độ thích hợp để lên men kombucha và được chọn để tiến hành khảo sát ở thí nghiệm tiếp theo.

### 3.3. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà nõn tôm

Trong các quá trình lên men thì thời gian đóng vai trò quan trọng do nó có ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng và hương vị của sản phẩm cuối cùng. Tương tự, đối với quá trình lên men kombucha, việc lựa chọn thời gian để kết thúc quá trình phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thành phần mong muốn, đặc điểm cảm quan và quy định an toàn khi sử dụng sản phẩm. Sau khi xác định hàm lượng trà, hàm lượng giống, Brix, pH và nhiệt độ lên men, thí nghiệm này tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian (2-14 ngày) đến quá trình lên men kombucha F1 từ trà nõn tôm. Kết quả theo dõi quá trình lên men được trình bày trong Bảng 6.

**Bảng 6. Kết quả một số chỉ tiêu của kombucha lên men ở nhiệt độ phòng (28-32°C) theo các mốc thời gian khác nhau**

Thời gian (ngày)	Brix (°Brix)	pH	Hàm lượng đường khử (g/L)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng flavonoid (g/L)
2	17,8 <sup>a</sup>	3,96 <sup>a</sup>	15,4 <sup>f</sup>	1,44 <sup>g</sup>	2,94 <sup>f</sup>	0,69 <sup>a</sup>
4	17,6 <sup>ab</sup>	3,85 <sup>b</sup>	18,1 <sup>c</sup>	1,52 <sup>f</sup>	3,24 <sup>c</sup>	0,64 <sup>c</sup>
6	17,4 <sup>ab</sup>	3,52 <sup>c</sup>	20,8 <sup>c</sup>	1,89 <sup>e</sup>	3,78 <sup>d</sup>	0,52 <sup>d</sup>
8	17,2 <sup>ab</sup>	3,28 <sup>d</sup>	25,7 <sup>a</sup>	2,04 <sup>d</sup>	4,08 <sup>c</sup>	0,65 <sup>c</sup>
10	17,0 <sup>b</sup>	3,25 <sup>d</sup>	23,2 <sup>b</sup>	2,15 <sup>c</sup>	4,36 <sup>b</sup>	0,67 <sup>b</sup>
12	16,2 <sup>c</sup>	3,11 <sup>e</sup>	20,1 <sup>cd</sup>	2,21 <sup>b</sup>	4,89 <sup>a</sup>	0,68 <sup>ab</sup>
14	15,8 <sup>c</sup>	2,88 <sup>f</sup>	19,2 <sup>de</sup>	2,36 <sup>a</sup>	5,04 <sup>a</sup>	0,68 <sup>ab</sup>

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% ( $p < 0,05$ )

Dựa vào kết quả trong Bảng 6, ta nhận thấy rằng giá trị Brix và pH của sản phẩm giảm dần theo thời gian. Cụ thể là độ Brix giảm lần lượt từ ngày 2 đến ngày 14, từ 17,8°Brix xuống 15,8°Brix và giá trị pH từ 3,96 giảm xuống 2,88. Điều này cho thấy quá trình lên men đã được diễn ra nhờ vào hoạt động của các chủng vi sinh có trong màng nấm SCOBY. Chúng sử dụng lượng đường để sinh trưởng, phát triển và sản phẩm thu được là các acid hữu cơ dẫn đến việc làm giảm pH của dịch sau lên men. Ngược lại, hàm lượng đường khử tăng dần theo thời gian lên men từ ngày 2 đến ngày 8 (15,4-25,7 g/L) và có xu hướng giảm sau đó (25,7-19,2 g/L). Do trong thời gian đầu, nấm men thích nghi và phát triển về mặt số, đồng thời làm tăng enzyme invertase đã giúp phân cắt đường sucrose tạo ra 2 loại đường khử là

glucose và fructose nên hàm lượng đường khử tăng dần theo thời gian. Sau một thời gian, hàm lượng đường khử lại có xu hướng giảm do vi sinh vật sử dụng các loại đường này để chuyển hóa thành các hợp chất khác nhau bao gồm ethanol và acid hữu cơ. Tuy nhiên, đây là cũng là hai hợp chất có thể gây ức chế ngược đến hoạt động của hệ sinh vật trong kombucha và cũng như bảo vệ đồ uống kombucha chống lại các vi sinh vật xâm nhiễm (Dufresne & Farnworth, 2000).

Hàm lượng ethanol được tạo ra trong kombucha tăng lần lượt qua các ngày lên nhờ vào hoạt động lên men của các chủng nấm men trong SCOBY, cụ thể hàm lượng ethanol thay đổi lần lượt theo thứ tự ngày 2 - ngày 4 - ngày 6 - ngày 8 - ngày 10 - ngày 12 - ngày 14 là 1,44 - 1,52 - 1,89 - 2,04 - 2,15 - 2,21 -

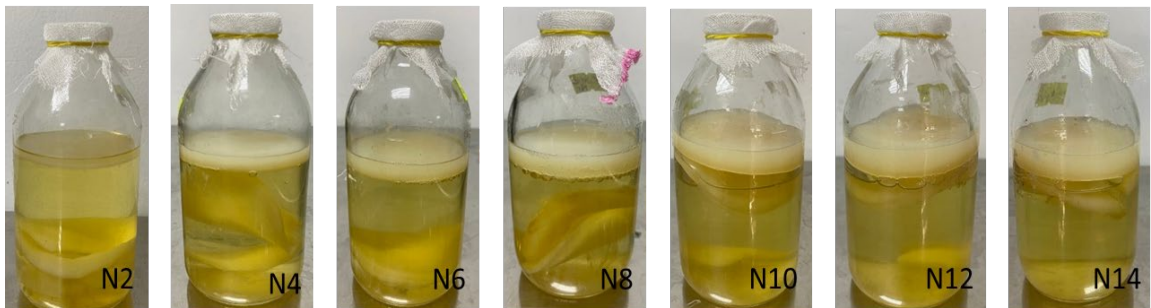


2,6% v/v. Tương tự, acid tổng cũng được tạo ra song song với ethanol trong suốt quá trình lên men kombucha, hàm lượng acid tổng cũng có xu hướng tăng dần theo thời gian lần lượt là 2,94 - 3,24 - 3,78 - 4,08 - 4,36 - 4,89 - 5,04 g/L. Trong quá trình lên men, hàm lượng acid tổng tăng nhanh chóng là do vi khuẩn acetic sử dụng các hợp chất được sản xuất bởi nấm men để sản xuất nhiều loại acid hữu cơ khác nhau như acid acetic, gluconic, glucuronic, lactic, succinic,... Bên cạnh đó, vi khuẩn acetic cũng sản xuất màng cellulose và theo thời gian lên men thì màng cellulose trở nên dày hơn, dẫn đến tình trạng không đủ oxy để cung cấp và làm đình trệ tiến trình sinh trưởng và phát triển. Mặc dù vậy, vi khuẩn acetic vẫn có phát triển tiếp tục thêm một thời gian khi trong môi trường thiếu oxy và còn có các chủng khác có thể tồn tại trong môi trường kỵ khí (Guillamón & Mas, 2011).

Hàm lượng flavonoid trong kombucha sau lên men từ trà nấm tằm cũng có sự biến đổi theo thời gian. Giai đoạn đầu hàm lượng flavonoid có sự giảm nhẹ từ ngày 2 đến ngày 6, lần lượt là 0,69, 0,64, 0,52 g/L, sau đó lại tăng lên từ 0,52-0,68 g/L (ngày 6 đến ngày 14). Trong nghiên cứu trước đây của Jakubczyk et al. (2020) thì hàm lượng flavonoid lên

men kombucha trà xanh cũng nhận thấy có sự tăng giảm ở giai đoạn giữa của quá trình lên men. Nguyên nhân có thể là do sự tương tác hay chuyển hóa giữa các hợp chất với lượng flavonoid có sẵn trong trà để có thể làm tăng hoặc giảm theo thời gian. Ngoài ra, hàm lượng flavonoid có trong sản phẩm còn tùy thuộc vào hàm lượng trà bổ sung, loại trà sẽ cho ra hàm lượng flavonoid cũng như mùi vị khác nhau (Cardoso et al., 2020; Ozyurt, 2020).

Nhìn chung, lên men cộng sinh trong kombucha đã làm thay đổi các chỉ số khảo sát liên tục theo thời gian, vì thế việc kiểm soát thời gian lên men là điều cần thiết để thu được sản phẩm có giá trị và an toàn cho sức khỏe. Mặc dù hầu hết các hoạt động chống oxy hóa thu được đều tăng lên theo thời gian, nhưng việc lên men kéo dài không được khuyến khích do sự tích tụ acid hữu cơ (Villarreal-Soto et al., 2018). Các giá trị pH nằm trong phạm vi được coi là an toàn cho con người nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,2 (Nummer et al., 2013). Giá trị pH dưới 2,5 có nồng độ acid acetic cao, có nguy cơ gây hại cho sức khỏe người tiêu dùng. Tuy nhiên, giá trị pH > 4,2 có thể ảnh hưởng đến mức độ an toàn của đồ uống về mặt vi sinh.



**Hình 1. Sản phẩm kombucha ở các thời gian lên men khác nhau**

Cảm quan cũng là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá đồ uống. Do đó, sản phẩm sau lên men (Hình 1) được đánh giá và sự đánh giá chỉ được tính ở ngày thứ 6 vì lúc này các chỉ tiêu lên men cũng như mùi vị mới bắt đầu thể hiện rõ hơn. Kết quả cảm quan được ghi nhận thông qua điểm đánh giá trung bình về độ trong, màu sắc, mùi, vị. Trong đó, kombucha lên men trong 6 ngày được các thành viên cảm nhận là chưa đạt được cảm quan vì vẫn ngọt hơn do đường chưa được chuyển hóa hoàn toàn, hương vị nhẹ nhàng, ít chua và có mùi thơm nhẹ của sản phẩm. Ở ngày thứ 8 sau lên men nhận được điểm đánh giá khá cao. Lúc này hương vị của kombucha trở nên cân bằng giữa ngọt và chua và có hương thơm rõ ràng hơn. Ở ngày 10, 12 thì nhận được điểm thấp hơn và sau 14 ngày lên men thì sản

phẩm không thể chấp nhận do kombucha có vị chua rõ rệt, độ ngọt giảm đi nhiều và mùi vị đậm đà đối với cảm quan của một số thành viên. Do đó, trà kombucha lên men liên tục trong 8 ngày được chọn là thời gian thích hợp nhất cho sản phẩm lên men F1 kombucha từ trà nấm tằm.

#### 4. KẾT LUẬN

Quá trình lên men kombucha F1 từ trà nấm tằm đã được tối ưu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo mô hình Box-Behnken, thu được kết quả tại các điểm nhân tố tối ưu gồm hàm lượng trà 0,8% w/v, hàm lượng giống 10% w/v, hàm lượng chất khô hòa tan 18°Brix và pH ban đầu là 4,34. Bên cạnh đó, nhiệt độ và thời gian lên men cũng được khảo sát và kết quả xác định quá trình lên men liên

tục trong 8 ngày ở nhiệt độ phòng 28-32°C thu được sản phẩm có chất lượng lý hóa và cảm quan cao nhất, trên cơ sở này làm tiền đề cho việc nghiên cứu

ứng dụng trên quy mô pilot đến mô hình sản xuất công nghiệp để sản phẩm có thể xuất hiện trên thị trường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anantachoke, N., Duangrat, R., Sutthiphakul, T., Ochaikul, D., & Mangmool, S. (2023). Kombucha beverages produced from fruits, vegetables, and plants: A review on their pharmacological activities and health benefits. *Foods*, 12(9), 1818. <https://doi.org/10.3390/foods12091818>
- Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D., & Thompson-Witrick, K. A. (2022). Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Food Chemistry Advances*, 1, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100025>
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D'Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., Martino, H. S. D., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L. & de Barros, F. A. R. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128, 108782. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>
- Coelho, R. M. D., de Almeida, A. L., do Amaral, R. Q. G., da Mota, R. N., & de Sousa, P. H. M. (2020). Kombucha. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, 73, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International*, 33(6), 409-421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)
- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., ... & Di Gioia, D. (2018). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
- Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), 2046-2048. <https://doi.org/10.1039/C0AY00525H>
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. (2000). Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), 976-981. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>
- Guillamón, J. M., & Mas, A. (2017). Acetic acid bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 43-64.
- Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants*, 9(5), 447. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
- Kitwetcharoen, H., Phung, L. T., Klanrit, P., Thanonkeo, S., Tippyawat, P., Yamada, M., & Thanonkeo, P. (2023). Kombucha healthy drink-recent advances in production, chemical composition and health benefits. *Fermentation*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010048>
- Lin, Y. L., Juan, I. M., Chen, Y. L., Liang, Y. C., & Lin, J. K. (1996). Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(6), 1387-1394. <https://doi.org/10.1021/jf950652k>
- Liu, J. Z., Weng, L. P., Zhang, Q. L., Xu, H., & Ji, L. N. (2003). Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 317-323. <https://doi.org/10.1023/A:1023622925933>
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha

- nutritional compounds and metabolites. *Cyta-Journal of Food*, 16(1), 390-399.  
<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., & Kolożyn-Krajewska, D. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *Cyta-Journal of Food*, 15(4), 601-607.  
<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>
- Nguyen, L., & Hwang, E. S. (2016). Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt supplemented with aronia (*Aronia melanocarpa*) juice. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(4), 330.  
<https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.330>
- Ning, J., Li, D., Luo, X., Ding, D., Song, Y., Zhang, Z., & Wan, X. (2016). Stepwise identification of six tea (*Camellia sinensis* (L.)) categories based on catechins, caffeine, and theanine contents combined with fisher discriminant analysis. *Food Analytical Methods*, 9, 3242-3250.  
<https://doi.org/10.1007/s12161-016-0518-2>
- Nummer, B. A. (2013). Special report: Kombucha brewing under the food and drug administration model food code: Risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76(4), 8-11.
- Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Suprayogi, Limtong, S., Kosaka, T., & Yamada, M. (2011). Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1573-1586. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3218-2>
- Sharma, V. K., Bhattacharya, A., Kumar, A., & Sharma, H. K. (2007). Health benefits of tea consumption. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(3), 785-792.  
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v6i3.14660>
- Sriariyanun, M., Mutrakulcharoen, P., Tapaamorndech, S., Cheenkachorn, K., & Rattanaporn, K. (2019). A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of ethanol in fermentation products. *Oriental Journal of Chemistry*, 35(2), 744-750. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/350234>
- Tiêu chuẩn Việt Nam: (TCVN) 12828:2019. Nước giải khát. Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định. Bộ Khoa học và Công nghệ (2019).
- Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 3215:1979. Sản phẩm thực phẩm - Phân tích cảm quan. Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước ban hành (1979).
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: Impacts on the chemical composition of the beverage. *Foods*, 9(7), 963.  
<https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X. X., & Mutukumira, A. N. (2022). Kombucha: Production and microbiological research. *Foods*, 11(21), 3456.  
<https://doi.org/10.3390/foods11213456>
- Wang, Y., Shao, S., Xu, P., Chen, H., Lin-Shiau, S. Y., Deng, Y. T., & Lin, J. K. (2012). Fermentation process enhanced production and bioactivities of oolong tea polysaccharides. *Food Research International*, 46(1), 158-166.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.027>
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 591869.  
<https://doi.org/10.1155/2015/591869>