

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG LÊN MEN KOMBUCHA, SINH TỔNG HỢP AXIT GLUCORONIC CỦA NẤM MEN *Zygoascus meyeræ* VÀ VI KHUẨN *Komagataeibacter saccharivorans*

Phù Thị Thanh Khiết^{1*}, Trần Việt Quyền¹,

Eng Disivetvathana¹, Lê Thái Anh Thư²

¹Khoa Khoa học Thực phẩm và Sức khỏe, Trường Đại học Kiên Giang

²Khoa Kỹ thuật và Công nghệ, Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp

*Email: pttkhiết@vnkgu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện nhằm đánh giá khả năng lên men kombucha và sinh tổng hợp axit glucuronic của hệ cộng sinh *Zygoascus meyeræ* và *Komagataeibacter saccharivorans*. Điều kiện lên men được khảo sát bao gồm: Nồng độ đường ban đầu (15, 20, 25, 30°Brix) và nhiệt độ môi trường lên men (20, 25, 30, 35°C). Chỉ tiêu theo dõi như sau: pH, chất khô hoà tan tổng số (TSS), đường khử, axit tổng, axit glucuronic ở 3, 6, 9, 12 ngày lên men. Kết quả cho thấy, hệ cộng sinh *Zygoascus meyeræ* và *Komagataeibacter saccharivorans* phát triển tương hỗ trong điều kiện khảo sát, thể hiện qua các chỉ tiêu ghi nhận như sau: pH và TSS giảm liên tục theo thời gian lên men; quá trình sinh tổng hợp axit hữu cơ và axit glucuronic tăng theo sự phát triển của hệ cộng sinh; đường khử tăng lên ở ngày lên men thứ 3, sau đó giảm ở các ngày lên men tiếp theo. Trong đó, nồng độ đường ban đầu 20°Brix, nhiệt độ môi trường lên men 25°C, ở 9 ngày lên men cho thấy khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic cao nhất, đạt 74,33 mg/L (pH: 3,02 ± 0,07; TSS: 10,00 ± 0,87°Brix; đường khử: 14,69 ± 0,64 mg/mL; axit tổng 7,03 ± 0,08 mg/mL).

Từ khoá: Glucuronic axit, *Komagataeibacter saccharivorans*, kombucha, *Zygoascus meyeræ*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kombucha là nước uống lên men từ hệ cộng sinh vi khuẩn và nấm men (SCOBY - Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), men trong môi trường nước trà và đường [1]. Hệ vi sinh SCOBY là con giống khởi động quá trình lên men nước uống kombucha [2, 3], trong đó nấm men *Zygoascus meyeræ* tham gia vào quá trình chuyển hóa đường thành rượu tương tự như *Saccharomyces cerevisiae*, chúng thường có mặt trong quá trình lên men nước trái cây [4]. *Komagataeibacter* là một chi vi khuẩn thuộc họ *Acetobacteraceae*, trong quá trình lên men kombucha thì loài điển hình là *Komagataeibacter xylinus* (*Gluconacetobacter xylinus* hoặc *Acetobacter xylinum*) [5], đây là loài vi khuẩn chính trong môi trường lên men kombucha, chúng sinh tổng hợp

các axit hữu cơ như axit acetic và axit glucuronic, tham gia vào quá trình hình thành màng cellulose trên bề mặt dịch trà, đây là môi trường để hệ cộng sinh SCOBY phát triển [6]. Axit glucuronic là hợp chất được quan tâm đặc biệt, chúng được tạo ra do quá trình oxy hóa glucose bởi vi khuẩn acetic thuộc giống *Komagataeibacter*, axit glucuronic có đặc tính khử độc mạnh, là thành phần có giá trị dinh dưỡng và tốt cho sức khỏe con người [7].

Thời gian gần đây, nước uống kombucha được sử dụng phổ biến vì những lợi ích mà nó mang đến cho sức khỏe của người dùng. Ngoài các sản phẩm kombucha lên men công nghiệp thì hộ gia đình có thể lên men bằng cách tự tạo con giống theo phương pháp dân gian, hoặc mua con giống tại các chợ truyền thống, do cá nhân tự tạo và nhân giống bán. Vì vậy, nguồn gốc của con giống gần như

không được xác định rõ, thành phần hệ vi sinh trong con giống có thể bao gồm những loài gây hại cho sức khỏe, sau quá trình lên men các loài này có khả năng sinh ra độc tố trong sản phẩm. Trong quá trình lên men, hệ cộng sinh không được kiểm soát, nhóm vi khuẩn lactic hoặc vi khuẩn acetic phát triển mạnh, kết quả của quá trình lên men làm cho sản phẩm có pH thấp, vị chua mạnh, khi uống vào ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme có trong dạ dày. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định điều kiện men kombucha, khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic của nấm men *Zygoascus meyeriae* và vi khuẩn *Komagataeibacter saccharivorans* được phân lập tại tỉnh Kiên Giang.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hoá chất và thiết bị

Nguyên liệu: Nấm men *Zygoascus meyeriae* và vi khuẩn *Komagataeibacter saccharivorans* đã được phân lập, tuyển chọn và định danh từ các mẫu kombucha nuôi thủ công tại khu vực tỉnh Kiên Giang (chợ Rạch Sỏi và chợ Minh Lương); trà đen Phúc Long túi 0,5 kg (độ ẩm $\leq 10\%$; tanin $\geq 6\%$); đường saccharose Biên Hòa Pure túi 1 kg (độ ẩm $\leq 0,05\%$; độ Pol $\geq 99,80\%$).

Các hoá chất sử dụng gồm: NaOH (Trung Quốc), sodium potassium tartrate (Trung Quốc), 3,5-Dinitrosalicylic axit (Ấn Độ), D-glucose (Trung Quốc), kit K-Uronic của hãng Megazyme (Ireland) được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Hóa chất miền Nam, thành phố Cần Thơ.

Thiết bị, dụng cụ: Khúc xạ kế cầm tay Atago (ATC, Atago, Nhật Bản) độ phân giải 0,2%, độ chính xác $\pm 0,2\%$; pH kế để bàn (HI5222, Hanna, Italia) độ phân giải 0,001 - 0,01, độ chính xác $\pm 0,002 - 0,01$; máy đo quang phổ UV-Vis (722N, Inesa, Trung Quốc) dải bước sóng 380 - 1.000 nm, độ chính xác ± 2 nm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Chuẩn bị môi trường lên men: Nước đun sôi để nguội (50 - 60°C), cho 5% (w/v) trà đen vào ngâm 10 - 15 phút, lọc bỏ bã lấy phần nước trà, để nguội đến 30°C.

Chuẩn bị giống: Tăng sinh giống vi khuẩn và nấm men để đạt mật số 10^5 tế bào/mL.

- *Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu bổ sung vào nước trà sử dụng lên men nước uống kombucha:*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, 1 nhân tố (nồng độ đường sucrose trong nước trà). Chuẩn bị dịch trà ở nồng độ đường 15, 20, 25, 30°Brix, cho hệ cộng sinh (nấm men: vi khuẩn) tỷ lệ 1: 1, chủng 4% (v/v) vào dịch trà đã chuẩn bị [8], lên men tĩnh và hiếu khí ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Theo dõi các chỉ tiêu: pH, TSS, đường khử, axit tổng, axit glucuronic ngày lên men 3, 6, 9, 12.

- *Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường lên men nước uống kombucha:*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, 1 nhân tố (nhiệt độ lên men). Chuẩn bị dịch trà ở nồng độ đường đã chọn ở thí nghiệm trên, cho hệ cộng sinh (nấm men: Vi khuẩn) tỷ lệ 1: 1, chủng 4% (v/v) vào dịch trà đã chuẩn bị, lên men tĩnh và hiếu khí ở nhiệt độ: 20, 25, 30, 35°C. Theo dõi các chỉ tiêu: pH, TSS, đường khử, axit tổng, axit glucuronic ngày lên men 3, 6, 9, 12.

2.2.2. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu lý hoá

Xác định pH: Dùng pH kế để bàn Hanna, thực hiện theo mô tả của Nguyễn Thị Phương và Nguyễn Thúy Hương (2018) [8].

Xác định TSS: Dùng khúc xạ kế Alpha Atago, thực hiện theo mô tả của Nguyễn Thị Phương và Nguyễn Thúy Hương (2018) [8].

Xác định đường khử bằng phương pháp 3,5-Dinitrosalicylic axit (DNS) [9].

Xác định axit tổng bằng phương pháp chuẩn độ [10].

Xác định hàm lượng axit glucuronic bằng phương pháp đo phân cực với lượng D-glucuronic, lượng NADH được hình thành thông qua hoạt động của uronate dehydrogenase (UDH) được đo ở bước sóng 340 nm [11].

2.2.3. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Excel (phiên bản 2021) sử dụng để tính toán và vẽ các đồ thị. Kết quả thu được trong các thí nghiệm được biểu thị bằng giá

trị trung bình. Phần mềm thống kê Statgraphic Centurion (phiên bản 19.01.0002) sử dụng phân tích phương sai (Analysis of variance - ANOVA) kiểm định mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê

của các nghiệm thức thông qua LSD với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu đến quá trình lên men nước uống kombucha

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu đến pH, TSS, lượng đường khử và axit tổng trong quá trình lên men nước uống kombucha

Nồng độ đường (°Brix)	Thời gian (ngày)	pH	TSS (°Brix)	Đường khử (mg/mL)	Axit tổng (mg/mL)
15	3	5,04 ± 0,13 ^h	13,00 ± 0,50 ^{cd}	19,17 ± 1,00 ⁱ	2,73 ± 0,31 ^b
	6	4,11 ± 0,19 ^f	9,17 ± 0,29 ^b	13,69 ± 1,35 ^{cd}	5,20 ± 0,53 ^c
	9	3,50 ± 0,09 ^d	7,50 ± 0,87 ^a	11,19 ± 1,38 ^b	6,44 ± 0,24 ^{ef}
	12	3,20 ± 0,10 ^{bc}	7,33 ± 0,29 ^a	10,40 ± 1,38 ^b	7,47 ± 0,35 ^h
20	3	4,64 ± 0,11 ^g	17,17 ± 0,29 ^g	22,41 ± 0,90 ⁱ	4,89 ± 0,21 ^c
	6	3,73 ± 0,15 ^e	13,50 ± 0,00 ^{de}	16,58 ± 1,61 ^{gh}	6,32 ± 0,14 ^{de}
	9	3,26 ± 0,12 ^c	9,17 ± 0,76 ^b	14,36 ± 1,21 ^{efg}	7,04 ± 0,18 ^g
	12	3,10 ± 0,10 ^{abc}	8,43 ± 0,40 ^{ab}	11,36 ± 0,96 ^{bc}	7,97 ± 0,20 ⁱ
25	3	4,90 ± 0,11 ^h	22,17 ± 0,29 ⁱ	27,48 ± 2,56 ^k	5,02 ± 0,26 ^c
	6	3,98 ± 0,13 ^f	14,50 ± 1,00 ^{ef}	22,64 ± 2,01 ^j	6,00 ± 0,00 ^d
	9	3,23 ± 0,12 ^c	13,00 ± 1,00 ^{cd}	16,37 ± 1,32 ^{fgh}	6,54 ± 0,27 ^{ef}
	12	2,97 ± 0,12 ^a	12,17 ± 1,04 ^c	14,23 ± 1,42 ^{ef}	8,08 ± 0,43 ⁱ
30	3	4,44 ± 0,08 ^g	24,83 ± 0,29 ^j	32,04 ± 2,06 ^l	5,28 ± 0,24 ^c

30

	6	$3,73 \pm 0,23^e$	$17,50 \pm 1,00^g$	$25,98 \pm 0,97^k$	$6,80 \pm 0,14^{fg}$
	9	$3,49 \pm 0,06^d$	$17,00 \pm 1,73^g$	$22,84 \pm 1,00^i$	$7,05 \pm 0,36^{gh}$
	12	$3,00 \pm 0,17^{ab}$	$15,17 \pm 0,76^f$	$18,40 \pm 2,50^{hi}$	$7,95 \pm 0,22^i$

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột, những cột có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD ở độ tin cậy 95%.

3.1.1. pH và TSS

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, 6 ngày đầu lên men pH giảm mạnh, đến ngày 9 và 12 pH giảm nhưng ít hơn so với thời gian đầu. Kết quả thí nghiệm tương tự với kết quả nghiên cứu của Malbaša và cs (2008) [12], Massoud và cs (2022) [13], khảo sát tác động của nồng độ đường ban đầu ảnh hưởng đến giá trị pH của dịch trà trong quá trình lên men nước uống kombucha.

Khi thay đổi nồng độ đường ban đầu 15 - 30°Brix, TSS ghi nhận thay đổi khác biệt có ý nghĩa thống kê ở tất cả các nồng độ. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, TSS có xu hướng giảm theo các mốc thời gian khảo sát. Thời gian lên men 12 ngày tổng số chất khô hòa tan ghi nhận giảm ít, ở mốc thời gian này, các mẫu có nồng độ đường ban đầu 15, 20, 25°Brix có tổng số chất khô hòa tan đo được khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với ngày 9, trừ mẫu 30°Brix. Qua đó cho thấy, ở nồng độ đường cao không thuận lợi cho quá trình chuyển hóa và sinh tổng hợp các chất khi lên men nước uống kombucha.

Sự thay đổi của pH và TSS liên quan mật thiết đến hoạt động của vi sinh vật trong quá trình lên men [6]. Giai đoạn đầu lên men, khi chủng giống khởi động vào môi trường nước trà, vi khuẩn và nấm men sẽ trải qua quá trình thích nghi với môi trường sau đó tăng trưởng và đi vào ổn định để thực hiện các hoạt động trao đổi cũng như sinh tổng hợp các chất. Chỉ số pH và TSS có xu hướng giảm theo thời gian lên men, do quá trình lên men nấm men sử dụng đường làm cơ chất phát triển sinh khối, chuyển hóa một phần đường thành ethanol nên tổng số chất khô hòa tan giảm theo thời gian, đồng thời vi khuẩn acetic chuyển hóa một phần ethanol sinh ra thành các axit hữu cơ

làm cho pH giảm [2, 3]. Giai đoạn lên men tiếp theo, mật số vi sinh có xu hướng giảm, sau thời gian phát triển cực đại và ổn định các hoạt động trao đổi chất diễn ra mạnh làm cơ chất trong môi trường bị tiêu hao, đồng thời các axit sinh tổng hợp tích lũy theo thời gian làm pH của môi trường nước trà giảm mạnh. Điều này không thuận lợi để nấm men phát triển, lúc này mật số nấm men bắt đầu giảm, các hoạt động chuyển hóa diễn ra chậm dần, kéo theo lượng ethanol sinh ra giảm đi làm cho vi khuẩn acetic phát triển hạn chế hơn giai đoạn lên men trước, điều này thể hiện qua chỉ số pH và TSS đo được giảm, nhưng không nhiều như giai đoạn trước.

3.1.2. Đường khử và axit tổng

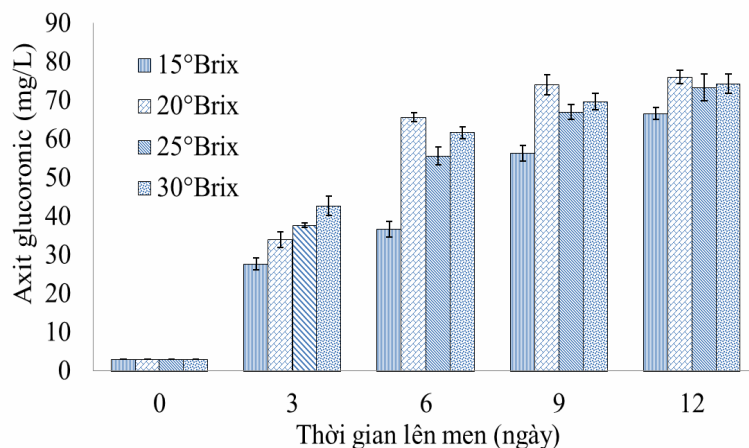
Kết quả ở bảng 1 cho thấy, đường khử tăng ở ngày lên men thứ 3, sau đó giảm ở các ngày 6, 9 và 12, giảm ít vào các ngày lên men cuối. Điều này được giải thích như sau, theo Antolak và cs (2021) [14], đường khử có trong nước trà chủ yếu là đường glucose, fructose, đây là kết quả của quá trình nấm men hoạt động sinh ra enzyme inverter thủy phân đường sucrose thành glucose, fructose, vì vậy làm lượng đường khử đo được ở ngày thứ 3 tăng lên so với ngày đầu lên men. Tiếp theo, nấm men dùng đường glucose để thực hiện các quá trình trao đổi chất tạo thành ethanol, vì vậy ở ngày lên men tiếp theo lượng đường khử có xu hướng giảm (ngày 6 và 9), sau đó giảm chậm lại (ngày 9 và 12) do điều kiện bất lợi về môi trường sống nên khả năng hoạt động của hệ cộng sinh bị hạn chế, lượng đường tiêu hao không còn nhiều như giai đoạn trước.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, axit tổng tăng mạnh trong thời gian đầu lên men (ngày 3 và 6) và tiếp tục tăng (ngày 9 và 12), nhưng ít hơn so với

thời gian đầu. Theo thời gian lên men, khi thay đổi nồng độ đường ban đầu từ 15 - 30°Brix, lượng axit tổng đo được tăng theo các mốc thời gian khảo sát. Điều này được giải thích như sau, nồng độ đường dùng trong quá trình lên men kombucha ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của hệ cộng sinh và sự tương tác giữa các vi sinh vật trong hệ cộng sinh, vì vậy các hợp chất sinh tổng hợp được thu nhận cũng thay đổi [14].

Từ các chỉ tiêu phân tích cho thấy, nồng độ đường 15 và 20°Brix có sự ổn định trong quá trình lên men ở ngày 9 và 12, thể hiện qua kết quả thống kê chỉ tiêu TSS và đường khử (15°Brix); pH và TSS (20°Brix). Trong đó, nồng độ đường 20°Brix 9 ngày lên men ghi nhận khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nồng độ đường 25°Brix 9 ngày lên men.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ đường ban đầu đến quá trình sinh tổng hợp axit glucuronic



Hình 1. Biểu đồ khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic theo thời gian lên men tương ứng với sự thay đổi nồng độ đường ban đầu

Đồ thị hình 1 cho thấy, hàm lượng axit glucuronic tăng theo mốc thời gian khảo sát, ngày lên men thứ 6 hàm lượng axit glucuronic ghi nhận ở các mẫu có xu hướng tăng, trong đó tăng mạnh nhất ở mẫu có nồng độ đường ban đầu 20°Brix, tương ứng với hàm lượng đo được là 65,67 mg/L. Ngày lên men thứ 9 và 12, kết quả ghi nhận hàm lượng axit glucuronic tiếp tục tăng ở tất cả các mẫu, nhưng tăng ít hơn so với ngày lên men thứ 6, trong đó mẫu có nồng độ đường ban đầu 20°Brix có hàm lượng axit glucuronic ngày 9 và 12 khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nồng độ đường dùng trong quá trình lên men kombucha ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của hệ cộng sinh và sự tương tác giữa các vi sinh vật trong hệ cộng sinh, vì vậy các chất sinh tổng hợp trong quá trình lên men cũng thay đổi [14]. Trong đó, axit glucuronic là kết quả của quá trình oxy hóa đường glucose trong môi trường có sự hoạt động của vi khuẩn acetic. Ở giai đoạn đầu (ngày lên men thứ 3 và 6), lượng glucose trong môi trường còn nhiều

và vi khuẩn acetic hoạt động mạnh nên môi trường nước trà rất giàu axit glucuronic, giai đoạn tiếp theo lượng đường glucose giảm, đây là cơ chất để vi khuẩn và nấm men thực hiện các quá trình trao đổi chất, vì vậy lượng glucose bị oxy hóa tạo thành axit glucuronic ít dần [15].

Kết quả cho thấy, nồng độ đường 20°Brix có hàm lượng axit glucuronic cao nhất ở các ngày khảo sát 6, 9 và 12, nên nồng độ ban đầu 20°Brix được cố định cho bố trí thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến lên men nước uống kombucha

3.3.1. pH và TSS

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, khi thay đổi nhiệt độ môi trường lên men 20 - 35°C, pH của mẫu có xu hướng giảm theo các mốc thời gian khảo sát. pH được ghi nhận giảm nhanh ở 6 và 9 ngày lên men, sau đó giai đoạn 9 - 12 ngày pH giảm ít hơn so với giai đoạn ban đầu. Kết quả trên được giải thích như sau, nhiệt độ môi trường là một trong nhiều yếu tố tác động đến quá trình phát triển của

hệ vi sinh vật cộng sinh trong quá trình lên men trà kombucha. Theo Antolak và cs (2021) [14], nhiệt độ môi trường từ 20 - 30°C là khoảng thích hợp cho sự phát triển của hệ cộng sinh lên men kombucha, tuy nhiên ở điều kiện nhiệt độ cận cuối (gần về mức nhiệt độ 20°C) thì quá trình phát triển và trao đổi chất của hệ cộng sinh chậm dần nên kết quả thí nghiệm cho thấy pH của các mẫu lên

men ở 20°C cao hơn so với các mẫu 25 và 30°C. Đồng thời, nhiệt độ tăng trưởng tối ưu cho vi khuẩn *Komagataeibacter xylinus* các giá trị nằm trong khoảng từ 18 - 25°C, nhiệt độ tối ưu của *Zygosaccharomyces rouxii* gần 30°C nên các mẫu lên men ở nhiệt độ môi trường 25 và 30°C có sự ổn định ở các ngày lên men thứ 9 và 12 [16].

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến pH, TSS, đường khử và axit tổng trong quá trình lên men nước uống kombucha

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (ngày)	pH	TSS (°Brix)	Đường khử (mg/mL)	Axit tổng (mg/mL)
	0	5,5 ± 00,00 ^l	20,00 ± 0,00 ^k	4,33 ± 0,76 ^a	1,20 ± 0,02 ^a
20	3	5,03 ± 0,12 ^k	18,33 ± 0,29 ^j	16,28 ± 0,75 ^g	3,04 ± 0,39 ^b
	6	4,27 ± 0,21 ⁱ	14,50 ± 0,87 ^h	14,74 ± 1,17 ^{ef}	4,36 ± 0,37 ^{cd}
	9	3,63 ± 0,15 ^{gh}	13,00 ± 1,00 ^g	12,17 ± 1,00 ^c	5,33 ± 0,39 ^e
	12	3,40 ± 0,26 ^{ef}	12,50 ± 0,50 ^{fg}	13,67 ± 0,76 ^{de}	7,50 ± 0,30 ⁱ
25	3	4,40 ± 0,10 ⁱ	15,83 ± 0,76 ⁱ	22,48 ± 0,92 ^j	4,48 ± 0,14 ^{cd}
	6	3,53 ± 0,15 ^{fg}	12,67 ± 0,29 ^{fg}	20,25 ± 1,10 ⁱ	6,19 ± 0,25 ^f
	9	3,02 ± 0,07 ^{cd}	10,00 ± 0,87 ^{de}	14,69 ± 0,64 ^{ef}	7,03 ± 0,08 ^h
	12	2,97 ± 0,12 ^{bc}	8,50 ± 0,50 ^b	16,60 ± 0,53 ^g	8,40 ± 0,36 ^j
30	3	4,64 ± 0,07 ^j	16,67 ± 0,76 ⁱ	21,42 ± 1,20 ^{if}	4,16 ± 0,14 ^c
	6	3,80 ± 0,13 ^h	12,33 ± 0,29 ^{fg}	18,42 ± 0,86 ^h	5,41 ± 0,41 ^e
	9	3,21 ± 0,12 ^{de}	10,67 ± 0,58 ^e	13,04 ± 1,29 ^{cd}	6,56 ± 0,28 ^{fg}

	12	$3,07 \pm 0,15^{cd}$	$9,67 \pm 0,58^{cd}$	$15,87 \pm 0,40^{fg}$	$8,23 \pm 0,25^j$
35	3	$3,83 \pm 0,06^h$	$14,17 \pm 0,29^h$	$25,70 \pm 1,03^k$	$4,59 \pm 0,06^d$
	6	$3,30 \pm 0,10^e$	$12,00 \pm 0,00^f$	$20,69 \pm 0,81^i$	$6,70 \pm 0,12^{gh}$
	9	$2,77 \pm 0,06^a^b$	$8,83 \pm 0,76^{bc}$	$13,64 \pm 0,57^{cde}$	$7,57 \pm 0,18^i$
	12	$2,63 \pm 0,06^a$	$6,67 \pm 0,29^a$	$10,62 \pm 0,68^b$	$8,91 \pm 0,06^k$

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại, Trong cùng một cột, những cột có chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo phép thử LSD ở độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, khi thay đổi nhiệt độ môi trường lên men 20 - 35°C thì TSS của mẫu được ghi nhận có xu hướng giảm theo các mốc thời gian khảo sát. Cụ thể, ở nồng độ đường ban đầu của các mẫu được cố định ở 20°Brix, ở ngày 3 và 6 của quá trình lên men, TSS đo được giảm mạnh ở tất cả các mẫu ở nhiệt độ môi trường lên men khác nhau, trong đó nhiệt độ môi trường lên men 25 và 30°C có TSS đo được khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Ngày lên men thứ 9 và 12, TSS ở các mẫu giảm ít hơn so với giai đoạn đầu, trong đó mẫu có nhiệt độ lên men 20°C ghi nhận TSS ngày 9 và 12 khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Theo Neffe-Skocińska và cs (2017) [17], trong quá trình lên men nước uống kombucha, TSS thay đổi liên quan mật thiết đến sự phát triển hoặc ức chế của hệ cộng sinh, ngược lại sự phát triển này cũng góp phần làm thay đổi tổng số chất khô hòa tan của môi trường.

3.3.2. Đường khử và axit tổng

Khi thay đổi nhiệt độ môi trường lên men như đã khảo sát thì hàm lượng axit tổng được ghi nhận tăng theo các mốc thời gian khảo sát. Cụ thể như sau, lượng axit tổng của mẫu ngày 0 là 0,12 mg/mL, đến ngày lên men thứ 3 tất cả các mẫu có lượng axit tổng tăng. Kết quả ở các ngày lên men tiếp theo cho thấy, lượng axit tổng tăng lên và khác biệt có ý nghĩa thống kê theo các mốc thời gian khảo sát từ 6 - 12 ngày lên men. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Nhan và cs

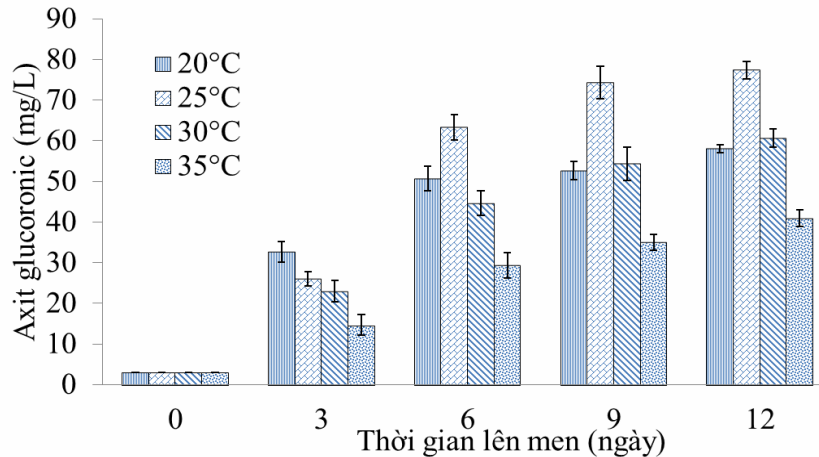
(2020) [18] khi khảo sát nhiệt độ môi trường lên men kombucha từ 10 - 28°C. Tran và cs (2020) [19] khi nghiên cứu về nhiệt độ lên men nước uống kombucha từ 20 - 30°C trong 10 ngày lên men, quá trình tiêu hao đường và quá trình axit hóa diễn ra nhanh hơn ở nhiệt độ lên men 30°C, điều này được giải thích, khi lên men ở nhiệt độ cao làm tăng tốc độ động học của các quá trình phản ứng, thúc đẩy quá trình trao đổi và tạo ra các chất mạnh mẽ hơn. Bên cạnh đó, nghiên cứu của De Filippis và cs (2018) [16] cho thấy, nhiệt độ lên men kombucha ở 30 - 25°C là điều kiện thuận lợi cho quần thể vi khuẩn acetic tổng hợp và trao đổi chất so với nhiệt độ lên men 20°C. Điều này phù hợp với kết quả ghi nhận của thí nghiệm ở điều kiện lên men 25°C, lượng axit tổng thu nhận được cao hơn so với 20 và 30°C.

Kết quả cho thấy, khi thay đổi nhiệt độ môi trường lên men 20 - 35°C, lượng đường khử của các mẫu được ghi nhận có sự thay đổi theo các mốc thời gian khảo sát. Cụ thể như sau, quá trình lên men kombucha, hàm lượng đường khử tăng lên ở ngày lên men thứ 3, sau đó giảm xuống đến ngày lên men thứ 12. Hàm lượng đường khử trong nước trà ở mẫu ngày 0 là 4,3 mg/mL, sau 3 ngày lên men lượng đường khử tăng lên ở cả các mẫu. Hàm lượng đường khử ở ngày lên men thứ 6 bắt đầu giảm và tương tự như vậy ở ngày lên men thứ 9 và 12, trong đó nhiệt độ lên men 25°C vào ngày 9 và 12 lượng đường khử ghi nhận cao hơn so với các điều kiện lên men còn lại. Trong quá

trình lên men kombucha, đường khử chuyển hóa phụ thuộc vào quá trình trao đổi chất của hệ cộng sinh, mà điều kiện nhiệt độ môi trường lên men góp phần tác động đến hoạt động của hệ cộng sinh [14].

Qua các chỉ tiêu phân tích và so sánh cho thấy, nhiệt độ môi trường 25°C thích hợp lên men nước uống kombucha từ hệ cộng sinh *Komagataeibacter xylinus* và *Zygosaccharomyces rouxii*.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến quá trình sinh tổng hợp axit glucuronic



Hình 2. Biểu đồ khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic theo thời gian lên men tương ứng với sự thay đổi nhiệt độ môi trường lên men

Kết quả khảo sát nhiệt độ môi trường lên men 20, 25, 30, 35°C ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic theo mốc thời gian lên men được trình bày ở hình 2, hàm lượng axit glucuronic được ghi nhận tăng theo các mốc thời gian khảo sát. Cụ thể như sau, mẫu đối chứng có hàm lượng axit glucuronic 0,003 mg/L, sau 3 ngày lên men hàm lượng axit glucuronic tăng đều ở tất cả các mẫu; ngày lên men thứ 6 và 9 các hàm lượng axit glucuronic vẫn tăng nhưng ít hơn so với giai đoạn đầu. Trong đó, nhiệt độ môi trường lên men 25°C cho hàm lượng axit glucuronic tăng vượt trội ở ngày thứ 6 kéo dài đến ngày thứ 9 và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở ngày thứ 12 của quá trình lên men. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Neffe-Skocińska và cs (2017) [17], theo đó hàm lượng axit glucuronic trong sản phẩm kombucha thu được khi lên men ở điều kiện 25°C cao hơn so với 20°C hoặc 30°C.

4. KẾT LUẬN

Hệ cộng sinh *Zygoascus meyeri* và *Komagataeibacter saccharivorans* có khả năng lên men kombucha ở nồng độ đường ban đầu 15 - 30°Brix, nhiệt độ lên men 20 - 35°C trong thời gian khảo sát 12 ngày cho thấy, hệ cộng sinh vi khuẩn

và nấm men phát triển tương hỗ, thể hiện qua các chỉ tiêu được ghi nhận: pH và TSS giảm liên tục theo thời gian lên men; quá trình sinh tổng hợp axit hữu cơ và axit glucuronic tăng theo sự phát triển của hệ cộng sinh; đường khử tăng lên ở ngày lên men thứ 3 sau đó giảm ở các ngày lên men tiếp theo. Trong đó, điều kiện lên men kombucha ở nồng độ đường ban đầu 20°Brix, nhiệt độ môi trường lên men 25°C cho thấy nấm men *Zygoascus meyeri* và vi khuẩn *Komagataeibacter saccharivorans* có khả năng sinh tổng hợp axit glucuronic cao nhất sau 9 ngày lên men, đạt 74,33 mg/L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kozyrovska, N. O., Reva, O. M., Goginyan, V. B., Devera, J. P. (2012). Kombucha microbiome as a probiotic: A view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. *Biopolymers and Cell*, 28(2), 103 - 113.
2. 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.

3. Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food microbiology*, 220, 63 - 72.
4. Larroque, M. N., Carrau, F., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., Medina, K. (2021). Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108 - 123.
5. Parte, A. C. (2018). LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio. net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 68(6), 1825 - 1829.
6. 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.
7. Gomes, R. J., de Fatima Borges, M., de Freitas Rosa, M., Castro-Gómez, R. J. H., Spinoso, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 139 - 151.
8. Nguyễn Thị Phương & Nguyễn Thúy Hương (2018). Phân lập và tuyển chọn hệ cộng sinh giữa nấm men và vi khuẩn trong lên men trà thủy sâm (Kombucha) nhằm nâng cao hàm lượng acid glucuronic. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ*, 54(1), 13 - 19.
9. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426 - 428.
10. Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thị Hằng, Lê Lan Chi (2005). *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, 87 - 89.
11. Moon, T. S., Yoon, S. H., Ching, M. J. T. M., Lanza, A. M., Prather, K. L. J. (2009). Enzymatic assay of D-glucuronate using uronate dehydrogenase. *Analytical biochemistry*, 392(2), 183 - 185.
12. Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M., Došenović, I. (2008). Effect of sucrose concentration on the products of kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*, 108(3), 926 - 932.
13. Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N., Khosravi-Darani, K. (2022). All aspects of antioxidant properties of kombucha drink. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 12, 4018 - 4027.
14. Antolak, H., Piechota, D. and Kucharska, A. (2021). Kombucha tea-A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(10), 1541 - 1561.
15. Yavari, N., Mazaheri-Assadi, M., Mazhari, Z. H., Moghadam, M. B., Larijani, K. (2018). Glucuronic acid rich kombucha-fermented pomegranate juice. *Journal of Food Research*, 7(1), 61 - 69.
16. 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.
17. Nefke-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.
18. Nhan, H. T. H., Vy, C. T. T., Nhat, N. T. M., Linh, V. T. K. (2020). Development of a fermented beverage from white mulberry juice using the kombucha consortium. *Journal of Technical Education Science*, 60, 44 - 57.
19. Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tournet-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 - 988.

STUDY ON THE FERMENTATION ABILITY OF KOMBUCHA, GLUCURONIC ACID BIOSYNTHESIS
OF *Zygoascus meyeri* AND *Komagataeibacter saccharivorans*

Phu Thi Thanh Khiet¹, Tran Viet Quyen¹,

Eng Disivetvathana¹, Le Thai Anh Thu²

¹Food and Health Science Department, Kien Giang University

²Technique and Technology Department, Dong Thap Community College

Summary

The study was conducted to evaluate the ability to ferment kombucha and biosynthesis of glucuronic acid of the symbiotic system *Zygoascus meyeri* and *Komagataeibacter saccharivorans*. The fermentation conditions examined included initial sugar concentrations (15, 20, 25, 30°Brix) and fermentation temperatures (20, 25, 30, 35°C). Parameters monitored during fermentation included pH, total soluble solids (TSS), reducing sugars, total acids and glucuronic acid on days 3, 6, 9 and 12 of fermentation. The fermentation conditions were investigated, initial sugar concentration (15, 20, 25, 30° Brix) and fermentation environment temperature (20, 25, 30, 35°C); the following monitoring indicators were used: pH, total soluble solids (TSS), reducing sugar, total acid, glucuronic acid at 3, 6, 9, 12 days of fermentation. The results showed that the symbiotic system of *Zygoascus meyeri* and *Komagataeibacter saccharivorans* exhibited mutual development under the investigated conditions, as reflected in the following observations: pH and TSS decreased continuously over the fermentation period; the biosynthesis of organic acids and glucuronic acid increased alongside the development of the symbiotic system and reducing sugars increased by day 3 of fermentation and then decreased in subsequent days. Under the conditions of an initial sugar concentration of 20°Brix and a fermentation temperature of 25°C, the highest glucuronic acid biosynthesis was achieved on day 9 of fermentation, reaching 74.33 mg/L (pH: 3.02 ± 0.07 ; TSS: $10.00 \pm 0.87^\circ\text{Brix}$; reducing sugars: 14.69 ± 0.64 mg/mL; total acids: 7.03 ± 0.08 mg/mL).

Keywords: *Glucuronic acid, Komagataeibacter saccharivorans, kombucha, Zygoascus meyeri.*

Ngày nhận bài: 18/11/2024

Ngày chuyển phản biện: 26/11/2024

Ngày thông qua phản biện: 20/12/2024

Ngày duyệt đăng: 8/01/2025