ẢNH HƯỞNG CỦA NHIỆT ĐỘ VÀ THỜI GIAN ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN HẠT CA CAO CHẤT LƯỢNG TẠI CHÂU THÀNH, BẾN TRE

Lâm Thị Việt Hà[1], Phan Thị Bích Trâm[1], Trương Trọng Ngôn[2], Hà Thanh Toàn[2]

TÓM TẮT

Lên men hạt rất quan trọng cho quá trình tiền sinh hương vị thơm ngon của các sản phẩm ca cao. Sự lên men cũng làm giảm độ chua và axit béo tự do. Thí nghiệm khảo sát điều kiện tối ưu của yếu tố nhiệt độ và thời gian trong quá trình lên men hạt ca cao, trồng tại Châu Thành, Bến Tre. Nhiệt độ khoảng khảo sát 35°C; 40°C; 45°C; 50°C; thời gian lên men từ 0 đến 8 ngày. Thí nghiệm đồng thời khảo sát sự thay đổi các chỉ tiêu hóa lý - vi sinh vật đặc trưng trong quá trình lên men hạt ca cao. Các chỉ tiêu được ghi nhận theo phương pháp chuẩn AOAC, TCVN 7519 : 2005. Kết quả ghi nhận hạt ca cao đạt chất lượng tốt nhất trong điều kiện lên men nhiệt độ 40°C trong thời gian 6 ngày. Tương ứng với các chỉ tiêu lý hóa sau quá trình lên men đạt chất lượng hạt tốt nhất với độ ẩm 44,68%; pH hạt đạt 5,46; hàm lượng axit ở mức thấp 0,16%; hàm lượng axit béo tự do đạt mức cho phép 0,84%; hệ vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men) phát triển mạnh, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sinh hương cho hạt ca cao. Kết quả đề tài thúc đẩy sự phục hồi và phát triển ngành nông nghiệp trồng cây ca cao và xuất khẩu hạt ca cao chất lượng Việt Nam.

Từ khóa: *Ca cao, lên men hạt, nhiệt độ lên men.*

1. GIỚI THIỆU

Cây ca cao du nhập rất sớm vào Việt Nam theo chân các nhà truyền giáo phương Tây (Phước, 2009) và được trồng rộng rãi ở nhiều tỉnh miền Nam Việt Nam, trong đó Tây Nguyên vẫn được đánh giá là có điều kiện lý tưởng nhất cho phát triển cây ca cao và đồng bằng sông Cửu Long rất thích hợp cho việc trồng ca cao do nhóm đất phù sa của sông Tiền và sông Hậu (Nguyễn và ctv, 2011; Nguyễn Minh Thủy, 2013). Theo thống kê, nhu cầu tiêu dùng sô cô la của Việt Nam khoảng 5.250 tấn/năm và hầu hết đều nhập khẩu từ nước ngoài. Hạt ca cao khô là nguyên liệu sản xuất các sản phẩm có nguồn gốc ca cao và mang lại giá trị dinh dưỡng cao và nguồn xuất khẩu tiềm năng cho nền kinh tế nông nghiệp.

Việt Nam chủ yếu trồng cây giống ca cao ghép đã được công nhận giống cho phép trồng tại các tỉnh phía Nam. Trong giai đoạn 2006 - 2011, Bộ Nông nghiệp và PTNT đã công nhận cho sản xuất giống: TD1, TD2, TD3, TD5, TD6, TD8, TD10, TD14 và 5 cây đầu dòng TC5, TC7, TC11, TC12. Trong số đó (3) giống TD3, TD5 và TD8 được trồng phổ biến nhất tại các huyện trồng ca cao của ĐBSCL do sản lượng và chất lượng trái cao nhất. Sản lượng hạt ca cao khô cao nhất thu được tại tỉnh Bến Tre hơn cả vùng Tây Nguyên - đứng thứ hai và Châu Thành là huyện dẫn đầu về sản lượng ca cao của tỉnh Bến Tre (Puratos Vietnam, 2018; Trần và ctv, 2019).

Hạt ca cao khô được lên men từ hạt tươi, sau đó qua giai đoạn sấy khô và cuối cùng là bảo quản. Trong các quá trình sản xuất hạt khô, quá trình lên men đóng vai trò quan trọng quyết định hương vị ngon của sản phẩm nguồn gốc sô cô la. Quy trình lên men nhất thiết được thực hiện đúng hướng dẫn và kiểm soát chặt chẽ, từ việc chọn đúng loại thùng ủ đến kiểm soát nhiệt độ và thời gian lên men; tạo ẩm độ tốt cho quá trình lên men (Afoakwa, 2015). Hiện nay, sự lên men hạt ca cao chủ yếu phụ thuộc vào yếu tố nhiệt độ tự nhiên (nắng tự nhiên); và quá trình kéo dài từ 5 đến 7 ngày tùy mỗi hộ nông dân và cơ sở sản xuất hạt. Điều này không kiểm soát được sự lên men tạo ra sản phẩm hạt có chất lượng và đạt giá trị xuất khẩu cao.

Phan Thanh Bình và ctv (2008) cho thấy nhiệt độ và thời gian lên men có ảnh hưởng đến chất lượng hạt ca cao, việc xử lý ở nhiệt độ 50°C trong 6 ngày lên men tốt với kết quả hạt nâu đạt 71,7%, pH = 5,62, TA = 0,75 mL NaOH, mùi vị bình thường. Khuyến nghị phương pháp lên men đảo hạt 2 lần trong 6 ngày. Khảo sát lên men tự nhiên theo quy mô nông hộ cho

[1] Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ
[2] Viện Nghiên cứu và Phát triển CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

thấy nhiệt độ khối ủ tăng nhanh và đạt cao nhất vào ngày thứ 3 (53,7°C) sau đó giảm nhẹ và đạt 45°C ở ngày lên men cuối. Các thành phần như protein thô, xơ thô trong hạt giảm, trong khi đó hàm lượng béo thô tăng cao. Hạt ca cao có độ ẩm 7,02% với tỉ lệ hạt nâu 83%; pH = 4,99. Nghiên cứu của Afoakwa *et al.* (2015) cho thấy lên men 6 ngày làm giảm lượng axit trong hạt, giảm hàm lượng đường, protein và mức FFA ở mức chấp nhận. pH khoảng 5,26-5,56; hàm lượng axit béo tự do (FFA) từ 0,47% đến 0,55%.

Nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát sự lên men hạt trong điều kiện nhân tạo của 3 giống TD3, TD5, TD8. Nhiệt độ khảo sát 35°C; 40°C; 45°C; 50°C; thời gian lên men từ 0 ngày đến 8 ngày. Đồng thời tìm hiểu sự thay đổi các chỉ tiêu hóa lý - vi sinh vật đặc trưng trong quá trình lên men hạt ca cao.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Trái ca cao chín của 3 giống TD3, TD5, TD8 được thu hái tại huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre.

- Thu hoạch: Việc thu hái ca cao được thực hiện một cách cẩn thận để tránh làm dập trái, hạn chế được tổn thất và hư hỏng trong quá trình tồn trữ.
- Tồn trữ: Ca cao chín khi thu hoạch được cho vào các bao tải vận chuyển vào nơi khô ráo, thoáng mát để tồn trữ cho đến khi đủ một mẻ lên men (3,8-4 kg hạt) và tiến hành bóc vỏ. Bên cạnh đó việc tồn trữ trái còn làm giảm thể tích lớp cơm nhầy góp phần hạn chế sự sinh ra axit lactic trong giai đoạn lên men yếm khí.
- Bóc vỏ, tách hạt: Được thực hiện bằng cách đập mạnh trái ca cao vào đá hoặc nền xi măng. Sau đó dùng tay tuốt lấy phần hạt cho vào thiết bị lên men.
- Lên men (ủ): Tiến hành cho phần hạt được bóc vỏ vào một túi vải the, cho hạt rỉ bớt dịch quả trong 1 giờ; nhằm giảm lượng dịch rỉ từ 10%-12% (Nguyễn Minh Thủy, 2009). Sau đó, tiến hành dùng lá chuối đã được chuẩn bị lót vào rổ với các lỗ thưa để quá trình thoát dịch diễn ra dễ dàng. Bên cạnh đó lá chuối cũng được khoét lỗ để dịch lên men thoát ra bên ngoài. Dùng vải the dày đậy khối ủ lại. Tiến hành cho vào tủ lên men công nghiệp có điện trở điều khiển được nhiệt độ yêu cầu (kích thước tủ: chiều cao 120 cm x chiều dày 50 cm x chiều ngang 100 cm). Mỗi mẻ ủ sử dụng 10 kg nguyên liệu trái (thu 3,8-4 kg hạt ca cao). Trong quá trình lên men, tiến hành theo dõi các chỉ tiêu thí nghiệm.
- Hạt ca cao sau lên men được cho vào tủ sấy thiết kế có thời gian ngừng giúp cho quá trình sấy hạt ca cao hiệu quả.
- Hóa chất:

Dung dịch NaOH chuẩn 0.1N; Dung dịch phenolphthalein 1%; Na_2CO_3; $CaCO_3$.

NaCl; Folin – Ciocalteu; Methanol; Ethanol; Axit acetic; Ether dầu hỏa 60 – 90.

Nutrient agar, MRS agar, Czapek-Dox Agar, Yeast extract, Pepton.

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến chất lượng hạt ca cao

Mục đích: xác định nhiệt độ và thời gian lên men thích hợp thu được hạt ca cao sau lên men đạt chất lượng tốt nhất.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố và lặp lại 3 lần.

Nhân tố A: nhiệt độ lên men hạt ca cao (°C).

$A_1 = 35$ $A_2 = 40$ $A_3 = 45$ $A_4 = 50$

Nhân tố B: thời gian lên men hạt ca cao (ngày).

$B_1 = 4$ $B_2 = 5$ $B_3 = 6$ $B_4 = 7$ $B_5 = 8$

Tổng số đơn vị thí nghiệm: 4 x 5 x 3 = 60 đơn vị thí nghiệm (đvtn).

Chuẩn bị mẫu và đặt vào tủ lên men với các nhiệt độ theo dõi lần lượt 35°C, 40°C, 45°C và 50°C; tiến hành thu mẫu từ 0 ngày đến 8 ngày và ghi nhận kết quả. Trong quá trình lên men, tiến hành đo nhiệt độ khối ủ ở 3 vị trí khác nhau và lấy mẫu để phân tích chỉ tiêu độ ẩm, pH, axit tổng, hàm lượng lipid, hàm lượng axit béo tự do, vi sinh vật.

2.2.2. Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp phân tích

Bảng 1. Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp phân tích

Chỉ tiêu theo dõi	Phương pháp phân tích
Hàm lượng ẩm (%)	Phương pháp sấy khô đến khối lượng không đổi (TCVN 8151-1-2009).
Hàm lượng lipid (%)	Phương pháp bộ chiết Soxhlet (AOAC 2003.05.2012).

pH	Sử dụng máy đo pH LabX (Japan)
Hàm lượng axit tổng (tính theo axit acetic) %	Dùng dung dịch NaOH 0,1N trung hòa lượng axit trong mẫu (TCVN 6127:2010).
Hàm lượng axit béo tự do (%)	Dùng NaOH 0,1 N trung hòa lượng axit béo tự do trong mẫu (Afoakwa *et al.*, 2015).
Tro (%)	Nung 600°C (AOAC 972.15).
Hàm lượng polyphenol tổng số (mgGAE/g)	Phương pháp Folin - Ciocalteu (Hossain *et al.,* 2013; Afoakwa *et al.*, 2015).
Xác định tổng số vi sinh vật, VK lactic, VK acetic (CFU/g) Định lượng nấm men, nấm mốc (CFU/g) Cảm quan màu tử diệp sau lên men	TCVN 4884:2005/ ISO 4833:2003; TCVN 8275-1, 2:2008/ ISO21527-1,2:2008; Hạt lên men hoàn toàn: tứ diệp của hạt từ màu trắng hoặc tím chuyển sang có màu nâu chocolate và ẩm ướt (Nguyễn Minh Thủy, 2013).

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả tính toán thống kê, phân tích phương sai ANOVA, kiểm định LSD sự sai khác trung bình các nghiệm thức bằng chương trình Statgraphics Centurion 16.1.18. Kết quả được xử lý phần mềm Excel 2013. Thí nghiệm thực hiện với 3 lần lặp lại.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học nguyên liệu

Bảng 2. Thành phần hoá học nguyên liệu

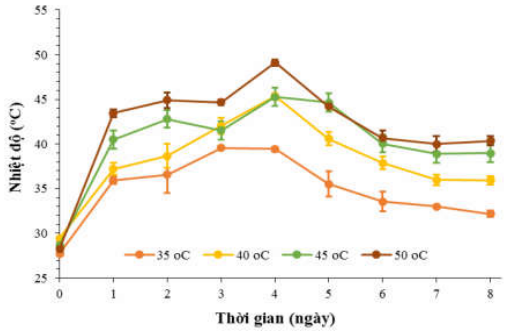
Thành phần hoá học	Giá trị
Độ ẩm (%)	52,96* ± 1,37**
pH	4,85 ± 0,01
Hàm lượng axit (%)	0,34 ± 0,01
Hàm lượng lipid (%)	45,83 ± 0,86
Tro (%)	2,20 ± 0,02
Hàm lượng polyphenol tổng (mgGAE/g)	408,25 ± 4,67

*Ghi chú: *Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại; ** Độ lệch chuẩn (STD) của giá trị trung bình*

Kết quả phân tích ở bảng 2 cho thấy hàm lượng nước trong nguyên liệu khá cao (52,96%), điều này phù hợp với nghiên cứu của Peláez *et al.* (2016). pH nguyên liệu ca cao ở Bến Tre là 4,85 thấp hơn so với báo cáo trước đó của Ardhana và Fleet (2003) (pH = 6,3); nhưng lại cao hơn so với nghiên cứu của Lagunes Gálvez *et al.* (2007) (pH = 4). Hàm lượng polyphenol trong hạt ca cao tương đối cao 408,45 mgGAE/g. Hàm lượng lipid nguyên liệu 45,83% thấp hơn so với nghiên cứu trước đây của Trần và ctv (2010). Điều này có thể lý giải là do thành phần hóa học của hạt ca cao thay đổi theo khí hậu, mùa vụ, quá trình sinh trưởng và điều kiện môi trường.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian ủ đến chất lượng hạt ca cao sau lên men

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến nhiệt độ khối ủ



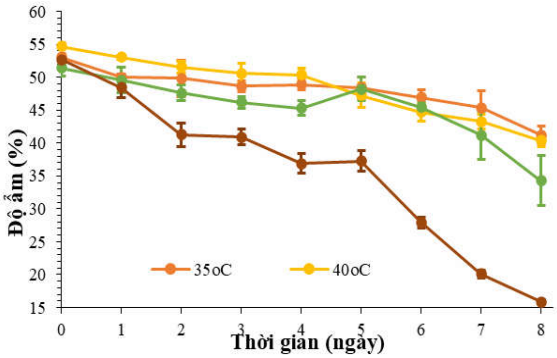
Hình 1. Sự thay đổi nhiệt độ khối ủ theo nhiệt độ và thời gian lên men

Kết quả ở hình 1 cho thấy, hầu hết nhiệt độ các khối ủ đều có xu hướng tăng dần ở các ngày lên men đầu tiên và giảm dần vào các ngày kết thúc quá trình lên men. Nhiệt độ khối ủ sau ngày lên men thứ nhất tăng đáng kể và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,005$) so với các ngày khác. Điều này được giải thích do nhiệt sinh ra từ quá trình hô hấp của hạt và các vi sinh vật tham gia chuyển hóa đường thành rượu trong điều kiện hiếu khí. Ngày thứ 2 của quy trình lên men nhiệt độ vẫn tiếp tục tăng và đạt đỉnh vào ngày thứ 3 và thứ 4 ($p < 0,05$). Ở 50°C, nhiệt độ môi trường khá cao làm cho bề mặt khối ủ nhanh chóng bị khô. Việc mất lớp cơm nhầy, làm cho hoạt động của vi sinh vật

bị ức chế, tạo điều kiện cho nấm mốc phát triển. Ở 45°C cũng đã làm cho hạt xuất hiện nấm mốc từ rất sớm. Ở 40°C, nhiệt độ không quá cao và đạt đỉnh vào ngày thứ 4 (45,35°C), điều này thuận lợi cho sự phát triển của hệ vi sinh vật trong quá trình lên men. Theo Peláez *et al.* (2016) nhiệt độ đạt cao nhất (47,7°C) sau 96 giờ lên men. Amores *et al.* (2009) cho rằng trong quá trình lên men, nhiệt độ khối ủ ca cao thường dao động trong khoảng từ 45 đến 50°C. Nhiệt độ 35°C mặc dù không ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ vi sinh vật nhưng nhiệt độ này vẫn chưa đủ để hạt ca cao lên men hoàn toàn.

Nhiệt độ tăng do sự phát triển mạnh của vi sinh vật chuyển hóa đường thành rượu và rượu thành axit hữu cơ. Sau mỗi lần đảo trộn nhiệt độ tăng nhanh do sự xâm nhập của oxy làm thông thoáng khối ủ tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn hiếu khí phát triển. Giai đoạn này có sự tham gia của vi khuẩn acetic chuyển hóa ethanol thành axit acetic. Phản ứng tỏa ra một lượng nhiệt lớn làm cho nhiệt độ khối ủ tăng lên nhanh chóng. Theo quy tắc chung, khi nhiệt độ quá trình lên men đạt đến 50°C thì chất lượng hạt ca cao khô càng tốt, tuy nhiên trong quá trình lên men nhiệt độ không nên tăng quá mức cho phép sẽ ảnh hưởng đến phẩm chất hạt ca cao khô.

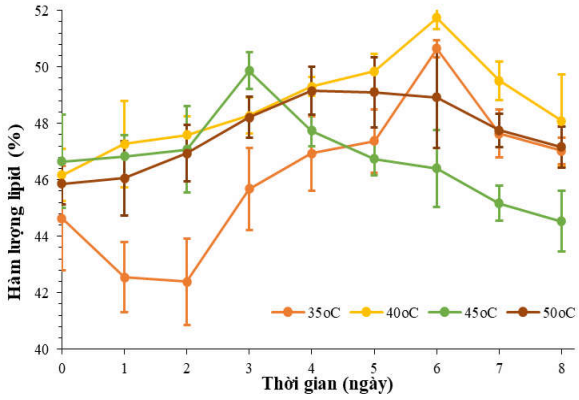
3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến độ ẩm hạt ca cao



Hình 2. Sự thay đổi độ ẩm hạt theo nhiệt độ và thời gian lên men

Hình 2 cho thấy, độ ẩm hạt có xu hướng giảm dần theo thời gian. Ở những ngày đầu của quá trình lên men độ ẩm hạt chỉ giảm nhẹ và có lúc lại tăng lên nhưng giảm mạnh vào các ngày cuối quá trình. Theo Peláez *et al.* (2016), do hoạt động của vi sinh vật làm phân hủy lớp cơm hạt và giải phóng nước tự do trong cơm. Một phần nước sẽ bốc hơi ra bên ngoài làm giảm hàm lượng ẩm. Chính lượng nước thoát ra đã làm cho môi trường thông thoáng hơn tạo điều kiện thuận lợi để các vi khuẩn acetic phát triển và oxy hóa rượu thành axit acetic, tiếp tục chuyển hóa axit acetic thành H_2O và CO_2 (Illeghems *et al.,* 2015). Các axit hữu cơ tạo ra góp phần phá vỡ vách tế bào hạt nước bên ngoài xâm nhập vào bên trong tử diệp, do cấu tạo hạt ca cao có nhiều nibs - mảnh vụn ghép lại (dễ dàng tách thành nhiều mảnh vụn sau khi sấy hạt), nên nước thẩm thấu vào bên trong; là nguyên nhân độ ẩm của hạt ở các nhiệt độ ủ tăng lên. Ở 35°C, do nhiệt độ ở mức thấp nên hàm lượng ẩm giảm ít hơn, có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nhiệt độ khác. Ở 50°C do nhiệt độ ở ngưỡng khá cao nên nước trong hạt bị bốc hơi nhanh ra môi trường làm độ ẩm hạt giảm rất nhanh (15,83% ở ngày lên men thứ 8) ($p < 0,05$). Đối với nhiệt độ ủ ở 45°C cũng vậy, độ ẩm hạt giảm tương đối nhanh và giảm mạnh vào các ngày cuối của quá trình lên men. Việc hạt mất ẩm nhanh đã làm xuất hiện nấm mốc rất sớm trong quá trình lên men. Còn ở 40°C, nhiệt độ không quá cao cũng không quá thấp làm cho độ ẩm hạt luôn ở mức ổn định. Ở ngày 6 của quá trình lên men độ ẩm hạt là 44,68%. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả báo cáo của Rodriguez-Campos *et al.* (2012) độ ẩm hạt giảm xuống còn 43,7% sau 6 ngày lên men.

3.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến hàm lượng lipid hạt ca cao



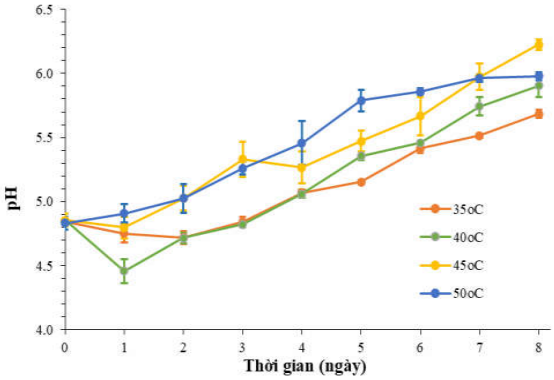
Hình 3. Sự thay đổi hàm lượng lipid theo nhiệt độ và thời gian lên men

Kết quả ở hình 3 cho thấy hàm lượng lipid tăng ở các ngày đầu của quá trình và sau đó giảm vào các ngày cuối. Ở 35°C, hàm lượng lipid có xu hướng giảm ở ngày 1, 2 nhưng sau đó lại tăng lên ở các ngày tiếp theo và giảm ở các ngày 7, 8. Nhiệt độ 35, 45°C hàm lượng lipid trung bình lần lượt là 46,29%, 46,78% và không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. Hàm lượng

béo đạt cao nhất ở 40°C trong 6 ngày lên men và có khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nhiệt độ khác. Sự tăng của hàm lượng lipid trong hạt có khả năng chất béo này là các triglyceride dự trữ được tổng hợp trong suốt quá trình lên men hạt. Theo Nguyễn Minh Thủy (2000) hàm lượng lipid của giống Forastero 31 - 33% trước lên men và 46 - 48% sau khi lên men. Việc giảm hàm lượng lipid ở các ngày cuối quá trình lên men có thể là do hoạt động của các enzyme lipase phân hủy chất béo trung tính trong hạt thành các nhóm axit béo riêng biệt do đó làm tăng nồng độ axit béo tự do dẫn đến biến đổi hương vị trong hạt khi kéo dài quá trình lên men (Afoakwa *et al.,* 2013).

Qua các ngày lên men hạt ca cao sẽ có những biến đổi đáng kể tạo nên tiền hương vị chocolate. Các phản ứng sinh hóa diễn ra ở lớp cơm nhầy và bên trong hạt sẽ làm thay đổi vị chua, vị chát, vị đắng và màu sắc hạt. Vị chua của hạt sẽ thay đổi theo hướng cân bằng giữa trong và ngoài hạt khi kết thúc quá tình lên men.

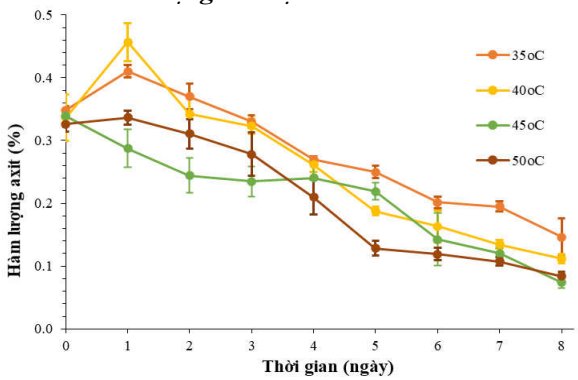
3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến pH hạt ca cao



Hình 4. Sự thay đổi pH hạt theo nhiệt độ và thời gian lên men

Kết quả ở hình 4 cho thấy, pH giảm ở các ngày đầu lên men và tăng dần ở các ngày cuối quá trình đều khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Giá trị pH giảm chứng tỏ trong quá trình lên men xảy ra phản ứng sinh axit. Theo Rivera *et al.* (2012) vi sinh vật trong quá trình lên men chính là nguyên nhân gây ra sự gia tăng độ axit và giảm pH. Việc pH tăng ở các ngày tiếp theo cũng được giải thích, ở giai đoạn sau của quá trình lên men môi trường trở nên thông thoáng hơn là điều kiện thuận lợi để vi khuẩn acetic chuyển hóa rượu thành axit acetic và hơn nữa là H_2O và CO_2. Axit acetic dễ bay hơi và nhanh chóng thoát ra ngoài môi trường làm pH hạt tăng lên. Khi tăng nhiệt độ ủ thì giá trị pH cũng tăng có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các giá trị pH ở các mức nhiệt độ ủ khác nhau ($p< 0,05$). Nhiệt độ ủ càng cao pH hạt càng lớn. Ở 45°C và 50°C pH ở các ngày cuối quá trình đạt cao nhất so với các nhiệt độ khác. Điều này được giải thích do ở điều kiện nhiệt độ quá cao đã ức chế khả năng hoạt động của nấm men ngay ở giai đoạn đầu và vì thế không thể tạo ra cơ chất (rượu) cũng như điều kiện môi trường thuận lợi cho vi khuẩn phát triển ở giai đoạn sau. Hơn nữa, ở nhiệt độ này nấm mốc phát triển mạnh (ngày thứ 4 của quá trình lên men) nên sự tạo thành các hợp chất tạo hương không nhiều. Ở mức 35°C, pH hạt luôn ở mức thấp không đáp ứng được yêu cầu sản phẩm. Mặc dù pH không cao nhưng ở nhiệt độ ủ 40°C cũng đạt được pH ở mức chấp nhận 5,46 sau 6 ngày lên men. pH ở ngày 7, 8 ở 40°C của quá trình đạt giá trị khá cao 5,74 và 5,90 nhưng thời gian lên men quá dài đã làm cho hạt có mùi lạ (mùi khai, thối) kèm theo đó là sự xuất hiện của nấm mốc. Chính vì vậy nhiệt độ 40°C trong 6 ngày lên men sẽ giúp hạt đạt được hương vị sô cô la mong muốn và hạn chế được vị chua không mong muốn.

3.2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến hàm lượng axit hạt ca cao



Hình 5. Sự thay đổi hàm lượng axit theo nhiệt độ và thời gian lên men

Kết quả thể hiện ở hình 5 cho thấy hàm lượng axit tăng sau 24 giờ lên men và giảm dần ở các ngày còn lại có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Việc tăng hàm lượng axit ở ngày đầu lên men là do nấm men chuyển hóa đường thành rượu và tiếp tục chuyển hóa rượu thành axit dưới tác động của vi sinh vật. Ở 35°C, độ axit trung bình đạt cao nhất (0,28%) và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với

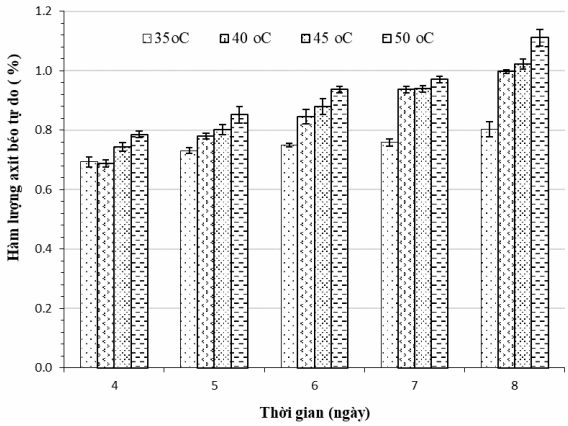
các mức nhiệt độ khác. Ngược lại ở 50°C, có độ axit ở mức thấp nhất (0,21%). Điều này cũng được giải thích bởi vì nhiệt độ cao đã ức chế vi sinh vật phát triển và sinh ra axit. Một lý do khác là nhiệt độ cao đã thúc đẩy sự bay hơi axit acetic một cách nhanh chóng. Tuy nhiên, nhiệt độ cao cũng là nguyên nhân làm cho nấm mốc xuất hiện sớm hơn. Theo Apriyanto *et al.* (2016) việc sinh ra axit hữu cơ rất quan trọng trong quá trình lên men hạt ca cao, axit khuếch tán vào tử diệp và sau đó gây ra phản ứng sinh hóa quan trọng dẫn đến lên men tốt. Sự tổng hợp axit lactic rất phổ biến trong quá trình lên men hạt ca cao được thực hiện theo điều kiện yếm khí (Beckett, 2009).

Từ kết quả, ta nhận thấy độ axit hầu như đạt cao nhất ở ngày thứ 1 của quá trình lên men, sau đó giảm dần và đạt cực tiểu ở những ngày cuối quá trình. Theo Ardhana và Fleet (2003) hàm lượng axit acetic đạt cao nhất ở 72 giờ (3 ngày) lên men và giảm sau đó là do hầu hết axit đã khuếch tán vào tử diệp của hạt và bay hơi do quá trình đảo trộn làm thông thoáng khối ủ. Độ axit trung bình ngày 7 và 8 ở mức thấp lần lượt là 0,14% và 0,1%. Điều này chứng tỏ, thời gian lên men càng dài, hàm lượng axit trong hạt sẽ càng giảm nhưng thời gian lên men dài cũng là nguyên nhân làm cho hạt xuất hiện mùi hôi và nấm mốc. Mặc dù hàm lượng axit hạt ở 40°C trong 6 ngày lên men (0,16%) không đạt ở mức thấp nhất, nhưng ở điều kiện này đã hạn chế được hàm hượng axit sinh ra và nấm mốc phát triển so với ở điều kiện nhiệt độ thấp hơn và dài ngày hơn.

3.2.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men đến hàm lượng axit béo tự do hạt ca cao

Theo Guehi *et al.* (2008), chất lượng hạt ca cao thô cũng phụ thuộc rất nhiều vào hàm lượng axit béo tự do. Hàm lượng axit béo tự do cho biết mức độ ôi hóa của chất béo. Hàm lượng càng cao thì chất béo càng không tươi, đã bị phân hủy hoặc bị oxi hóa một phần. Ngoài ra chỉ số acid cũng làm giảm độ cứng của bơ ca cao (Pontillon, 1998).

Kết quả thống kê cho thấy có sự khác biệt về hàm lượng axit béo giữa các nhiệt độ cũng như thời gian lên men ($p < 0,05$). Nhiệt độ càng cao, thời gian lên men càng dài hàm lượng axit béo tự do càng cao và ngược lại (Hình 6). Hàm lượng axit béo đạt cao nhất ở 50°C trong 8 ngày lên men (1,11%) và thấp nhất ở nhiệt độ ủ 35 °C trong 4 ngày lên men (0,69%). Theo Hiol A (1999) hệ vi sinh vật cũng là nguyên nhân làm gia tăng hàm lượng axit béo tự do, đặc biệt là nấm mốc. Sự hình thành axit béo tự do không phụ thuộc vào kiểu gen hoặc công nghệ lên men (Guehi *et al.,* 2008). Fowler (2009) cho rằng hàm lượng axit béo tự do cao là do hạt được tách ra từ quả thối hoặc hạt nảy mầm.



Hình 6. Sự thay đổi hàm lượng axit béo tự do theo nhiệt độ và thời gian lên men

3.2.7. Sự thay đổi mật số vi sinh vật ở nhiệt độ 40°C trong 6 ngày lên men

Kết quả ở bảng 3 cho thấy mật số vi sinh vật luôn biến đổi trong suốt quá trình lên men. Tổng số vi khuẩn hiếu khí ban đầu có khuynh hướng tăng ở ngày thứ 1 và giảm nhẹ ở ngày thứ 2, đạt mật số cao nhất vào ngày thứ 4 (9,03 log cfu/g) và mật số lại giảm cho đến cuối quá trình lên men. Điều này được giải thích bởi Schwan và Wheals (2004) là do lúc đầu lượng thịt quả còn nhiều ngăn cản quá trình xâm nhập của oxy vào trong khối ủ nên các vi khuẩn hiếu khí khó phát triển. Sau đó nhờ sự phát triển của nấm men đã phân hủy lớp cơm hạt tạo điều kiện thoáng khí hơn thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn hiếu khí. Vì vậy vi khuẩn hiếu khí gia tăng mật số và đạt mật số cao rồi giảm dần theo đường cong sinh trưởng của vi sinh vật.

Lớp cơm nhầy chứa nhiều đường và pH ban đầu rất thích hợp cho sự phát triển của nấm men. Mật số nấm men đạt giá trị cao nhất ở ngày thứ 2 (7,4 log cfu/g) và có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với các ngày còn lại. Theo Ardhana và Fleet (2003) nấm men hiện diện với mật số cao nhất trong quá trình lên men ca cao là 7,0 - 8,0 log cfu/g trong suốt 24 - 36 giờ đầu lên men. Sau đó, mật số này giảm nhanh trong những ngày tiếp theo và đến ngày lên men thứ 6 mật số nấm men còn 5,23 log cfu/g. Sự giảm mật số nấm men trong quá trình lên men là do

khi nấm men gia tăng mật số trong điều kiện hiếu khí ở giai đoạn đầu và trong điều kiện kỵ khí chúng sinh ra rượu ức chế trở lại hoạt động của nấm men. Nhiệt độ khối lên men tăng cao đồng thời pH giảm và điều kiện khối ủ trở nên thông thoáng hơn do một số dòng tạo ra pectinolytic enzyme phá vỡ lớp kết dính vách tế bào cơm hạt. Nhu mô của khối tế bào bị xẹp xuống trong phần cơm gần hạt, kết quả là hình thành những khoảng không do sự xâm nhập của không khí (Ngô và ctv, 2013).

Vi khuẩn axit lactic (LAB) đạt cao nhất vào ngày đầu tiên của quá trình lên men (7,03 log cfu/g) có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,005$). Môi trường yếm khí chính là điều kiện thuận lợi giúp vi khuẩn axit lactic tăng nhanh. Trong lên men ca cao ở Indonesia, LAB đạt cao nhất ở 8 - 9 log cfu/g trong 36 giờ đầu lên men Ardhana và Fleet (2003). Nhưng sau đó giảm xuống vào ngày thứ 2 và tăng nhẹ vào ngày thứ 3, tiếp tục giảm mạnh ở các ngày tiếp theo. Khi điều kiện khối ủ trở nên thoáng khí hơn, tạo điều kiện thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn acid acetic (AAB). Mật số AAB tăng dần theo thời gian lên men và đạt cao nhất vào ngày thứ 4 (8,12 log cfu/g). Theo Ngô và ctv. (2013) mật số AAB đạt cao nhất vào ngày thứ 3 (7,3 log cfu/g). Vi khuẩn acid acetic oxy hóa rượu thành acid acetic và có thể chuyển hóa tiếp acid acetic thành CO_2 và H_2O. Phản ứng này tỏa nhiệt và đưa nhiệt độ khối ủ lên cao. Mật số AAB giảm dần cho đến cuối quá trình lên men 5,93 cfu/g. Điều kiện thông thoáng khí cũng thuận lợi cho sự phát triển của nấm mốc. Mật độ nấm mốc tăng ở ngày đầu, sau đó giảm ở ngày thứ 2 và lại tiếp tục tăng đến cuối giai đoạn lên men (6,23 cfu/g) khi điều kiện thuận lợi hơn.

Bảng 3. Sự thay đổi mật số vi sinh vật theo thời gian lên men ở nhiệt độ 40°C

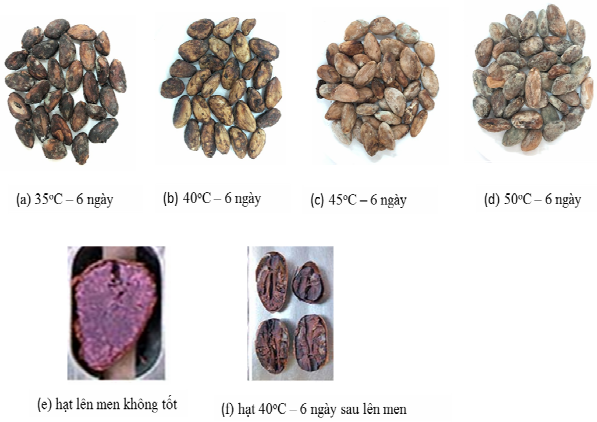
Thời gian (ngày)	Mật số vi sinh vật (log cfu/g)				
	Tổng số VSV	VK Lactic	VK acetic	Nấm men	Nấm mốc
0	$6,7^{**}\pm0,02^{f**}$	$5,02\pm0,01^{g}$	$3,77\pm0,02^{g}$	$4,96\pm0,03^{f}$	$3,47\pm0,01^{f}$
1	$8,03\pm0,02^{e}$	$7,03\pm0,02^{a}$	$6,08\pm0,01^{e}$	$7,09\pm0,02^{b}$	$5,58\pm0,02^{c}$
2	$8,1\pm0,03^{d}$	$6,44\pm0,02^{d}$	$6,43\pm0,02^{d}$	$7,34\pm0,02^{a}$	$5,4\pm0,03^{e}$
3	$8,86\pm0,01^{b}$	$6,96\pm0,03^{b}$	$7,83\pm0,02^{b}$	$7,09\pm0,02^{b}$	$5,42\pm0,02^{e}$
4	$9,03^{a}\pm0,02$	$6,5\pm0,01^{c}$	$8,12\pm0,04^{a}$	$6,66\pm0,01^{c}$	$5,46\pm0,02^{d}$
5	$8,49^{c}\pm0,03$	$6,11\pm0,01^{e}$	$6,81\pm0,02^{c}$	$6,25\pm0,04^{d}$	$6,07\pm0,02^{b}$
6	$8,08^{d}\pm0,02$	$5,76\pm0,02^{f}$	$5,93\pm0,01^{f}$	$5,23\pm0,01^{e}$	$6,23\pm0,03^{a}$

**Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại; ** Độ lệch chuẩn (STD) của giá trị trung bình. Các chữ cái giống nhau biểu thị sự không khác biệt theo cột với mức ý nghĩa 5%.*

3.2.8. Cảm quan hạt sau quá trình lên men

Cần kiểm tra thường xuyên trong quá trình lên men bằng cách cắt đôi hạt để quan sát màu sắc của tử diệp. Hạt đã lên men có màu nâu, chưa lên men hoàn chỉnh có màu tím. Ngoài ra, có thể ngửi mùi của mẻ lên men ủ, khi hạt có mùi giấm do hạt lên men chưa đủ, mùi giấm đã chuyển qua mùi amoniac, do quá trình lên men đã hoàn thành. Lúc này nếu cắt hạt ra thì màu tím đậm của nhóm Forastero và Trinitario đã chuyển sang màu tím nhạt hơi sậm, nghĩa là hạt đã lên men tốt. Lưu ý màu tím của nhóm Trinitario khi chưa ủ có nhạt hơn của nhóm Forastero nhưng vẫn đậm hơn so với hạt đã ủ xong.

Hình 7 cho thấy hạt lên men ở các nhiệt độ khác có sự ẩm mốc trắng và khô (Hình a, c, d). Kết thúc 6 ngày lên men ở nhiệt độ 40°C của thí nghiệm, hạt còn ẩm (b); hạt được kiểm tra bằng cách dùng dao cắt ngang hạt; tử diệp quan sát đã chuyển sang màu nâu chocolate (f) như vậy hạt sau 6 ngày đã lên men hoàn toàn.



Hình 7. Hình ảnh cảm quan hạt sau 6 ngày lên men ở 4 mức nhiệt độ

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Nghiên cứu cho thấy sự khả thi của việc áp dụng môi trường nhiệt độ cho quá trình lên men (ủ) nhằm hạn chế vị chua của hạt ca cao sau lên men và cho chất lượng hạt tốt hơn so với lên men tự nhiên. Hạt ca cao đạt chất lượng cao khi lên men ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 6 ngày. Độ ẩm hạt sau quá trình lên men 44,68%; pH hạt đạt 5,46; hàm lượng axit ở mức thấp 0,16%; hàm lượng axit béo tự do đạt ở mức cho phép 0,84%.

Kiến nghị cần tiếp tục khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ sấy thích hợp góp phần cải thiện hương vị hạt ca cao thô và đánh giá được chất lượng hạt ca cao. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện lên men đến hoạt tính sinh học và khả năng chống oxy hoá trong quá trình lên men hạt ca cao

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Afoakwa, E. O., Kongor JE, Budu AS, Mensah-Brown H, JF Takrama, 2015. Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. J. Nutr. Heal. Food Sci. 2: 9651–9670.

2. Afoakwa, E. O., Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., Saalia, F. K., 2013. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. J. Food Sci. Technol. 50 (6): 1097–1105.

3. Amores, F., Palacios, A., Jimenez, J., Zhang, D., 2009. Environmental environment, genetics, and singling quality attributes of cocoa in the north east of the province of Esmeraldas. Tech. Bull. N 135. Ecuador 119.

4. Apriyanto, M., Sutardi, Supriyanto, Harmayani, E., 2016. Study on effect of fermentation to the quality parameter of cocoa bean in Indonesia. Asian J. Dairy Food Res. 35: 160–163.

5. Ardhana, M. M. and Fleet, G. H., 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. Int. J. Food Microbiol. 86, 87–99.

6. Beckett, S. T., 2009. Industrial chocolate manufacture and use. London: Chapman & Hall. 20–23.

7. Guehi, S. T., Clement-Vidal, A., Dingkuhn, M., Cros, E., Fourny, G., Ratomahenia, R., Moulin, G., 2008. Impact of cocoa processing technologies in free fatty acids formation in stored raw cocoa beans Impact of cocoa processing technologies in free fatty acids formation in stored raw cocoa beans. African J. Agric. Res. 3: 174–179.

8. Illeghems, K., Weckx, S., De Vuyst, L., 2015. Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. Food Microbiol. 50: 54–63.

9. Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., Guiraud, J. P., 2007. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. Int. J. Food Microbiol. 114, 124–130.

10. Ngô Thị Phương Dung, Nguyễn Ngọc Thạch, Huỳnh Xuân Phong, 2013. Xác định mật số và phân lập vi sinh vật trong lên men ca cao. Tạp chí Khoa học – Đại học Cần Thơ 25: 271–280.

11. Nguyễn Minh Thủy, 2013. Giáo trình kỹ thuật sau thu hoạch nông sản. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, 370.

12. Phạm Hồng Đức Phước, 2009. Kỹ thuật trồng ca cao ở Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp. 1-46.

13. Phan Thanh Bình, Phạm Văn Thao và Nguyễn Thị Thoa, 2017. Nghiên cứu bổ sung saccharomyces cerevisiae trong quá trình lên men hạt ca cao để nâng cao chất lượng sản phẩm. Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp Tây Nguyên.

14. Peláez, P. P., Guerra, S., Contreras, D., 2016. Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. Sci. Agropecu.

15. Pontillon, J., 1998. Le beurre de cacao et les matières grasses en chocolaterie, in%: Pontillon, J. éd. Cacao et chocolat%: production, utilisation, caractéristiques. Tech. Doc. Paris, Fr. 257–269.

16. Rivera, M. F., Guzmán-Cedeño, A., Peña, M., Medina, H., Casanova, L., Barrera, A., Nivela, P., 2012. Effect of type and fermentation time on the physical and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.). Natl. type. J. Cienc. y Tecnol. 5(1): 7-12.

17. Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., Lugo-Cervantes, E., 2012. Effect of fermentation time and drying temperature on

volatile compounds in cocoa. Food Chem. 132: 277–288.

18. Schwan, R. F. and Wheals, A. E., 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44, 205–221.

19. Trần Văn Hâu, Lê Thị Thanh Thủy và Phan Thanh Trúc, 2008. Đánh giá một số dòng ca cao có triển vọng tại Cần Thơ. Tạp chí Khoa học – Đại học Cần Thơ.9: 51-58.

20. Trần Văn Hâu, Lê Thị Thanh Thủy và Phan Thanh Trúc, 2010. Đánh giá đặc tính nông học và hàm lượng chất béo trong hạt của một số giống ca cao (*Theobroma cacao* L.) trồng phổ biến tại huyện Châu Thành, tỉnh Bến Tre. Tạp chí Khoa học – Đại học Cần Thơ. 15b: 178–185.

21. Trần Văn Hâu, 2019. Đề án phát triển diện tích trồng cây ca cao tỉnh Bến Tre. 35-46.

22. Nguyễn Bảo Vệ, Trần Văn Hâu và Lê Thanh Phong, 2011. Giáo trình cây công nghiệp dài ngày, Nxb. Đại học Cần Thơ. 9-12.

CHANGE IN TEMPERATURE AND TIME CONDITION DURING FERMENTED COCOA BEAN IN CHAU THANH, BEN TRE

Lam Thi Viet Ha, Phan Thi Bich Tram , Truong Trong Ngon, Ha Thanh Toan

Summary

During cocoa industrial manufacturing, fermentation is crucial to the development of chocolate flavour. This could acompany with decrease in acidity and free fatty acids of beans. This study investigated change in temperature and time during cocoa bean fermentation; the effect of the proximate composition (moisture, total acid and lipid content) and microbial community as well during the fermentation process. The full factorial experiment design with fermented temperature (35°C, 40 °C, 45 °C, 50°C) and time (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 days). The standard analytical methods were identified using AOAC and TCVN 7519: 2005. The results showed that the ideal conditions led to considerable quality cocoa bean which include 40°C for the sixth day of fermentation., Moisture, pH, Acid composition showed the acceptable value of (44.68%; 5.46; 0.16%; respectively). Similarity, the free fatty acid content (FFAs) of the studied condition were below the acceptable limits of 0.84%. The microbial biomass recorded the suitable condition for aroma development during the fermentation. The present work is supporting for the cocoa cultivation and drying cocoa bean production of cocoa development projects in Vietnam.

Keywords: *Cocoa, cocoa bean fermentation, fermentation temperature.*

Người phản biện: TS. Trần Thị Mai
Ngày nhận bài: 22/6/2021
Ngày thông qua phản biện: 23/7/2021
Ngày duyệt đăng: 30/7/2021