

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN KOMBUCHA F2 TỪ TRÀ XANH BỔ SUNG THANH LONG RUỘT ĐỎ (*Hylocereus polyrhizus*)

Lưu Minh Châu, Lê Thị Trúc Đào, Nguyễn Phạm Thiên Trang,
Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ

*Email: hxphong@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 14/8/2024; Ngày nhận bài sửa: 26/9/2024; Ngày chấp nhận đăng: 30/9/2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm hoàn thiện quy trình lên men kombucha F2 từ trà xanh bổ sung thanh long ruột đỏ thông qua việc xác định các điều kiện tối ưu để tạo ra sản phẩm có chất lượng và cảm quan tốt. Nghiên cứu khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men như phương pháp xử lý thanh long ruột đỏ (cắt hạt lựu 1x1 cm; dịch quả), hàm lượng trái cây bổ sung (5 - 15% w/v), pH (3,0 - 4,0), nhiệt độ (25 - 35 °C), thời gian lên men F2 (3 - 13 ngày). Kết quả cho thấy thanh long ruột đỏ được cắt hạt lựu (1 x 1 cm) và bổ sung với tỷ lệ là 15% (w/v), pH 3,52, lên men ở 29 °C trong 7 ngày, sản phẩm có hàm lượng ethanol ở mức 2,98% (v/v), acid tổng là 3,32 g/L, lượng đường khử 10,80 g/100 mL, vitamin C ở mức 46,93 mg/L và flavonoid là 904,63 mg/L. Sản phẩm cũng đạt được đánh giá cảm quan cao cả về độ trong và màu sắc, mùi, vị. Kết quả nghiên cứu cho thấy sản phẩm kombucha từ trà xanh bổ sung thanh long ruột đỏ là một sản phẩm tiềm năng có màu sắc và hương vị hấp dẫn góp phần đa dạng hóa sản phẩm các loại đồ uống lên men nói chung và kombucha nói riêng.

Từ khóa: Kombucha, lên men phụ, thanh long ruột đỏ, tối ưu hóa, trà xanh.

1. MỞ ĐẦU

Ngày nay, con người không còn xa lạ với các loại đồ uống lên men như bia, rượu, sữa chua, kefir hay kombucha. Tuy nhiên, do sự tiến bộ của xã hội nên con người ngày càng quan tâm đến sức khỏe nhiều hơn. Bên cạnh đó, việc sử dụng các loại đồ uống có cồn cao thường xuyên sẽ gây ra các tác động tiêu cực đến sức khỏe. Sản phẩm có nguồn gốc từ sữa cũng có thể gây ảnh hưởng xấu đối với người bị dị ứng với lactose. Do đó, kombucha là một trong những sự lựa chọn phù hợp với người tiêu dùng. Không giống với các sản phẩm lên men khác, kombucha là sản phẩm của nhiều quá trình lên men tùy vào hệ vi sinh vật có trong “con giống SCOBY (symbiotic colony of bacteria and yeast)”, bao gồm quá trình lên men rượu nhờ nấm men, lên men acid acetic nhờ nhóm vi khuẩn acetic và lên men acid lactic nhờ nhóm vi khuẩn lactic [1]. Chính điều này đã tạo nên một loại thức uống với hương vị đặc trưng, là sự kết hợp của nhiều yếu tố như chua nhẹ do quá trình lên men tạo ra acid acetic và acid lactic, ngọt nhẹ của lượng đường còn sót lại sau quá trình lên men, một ít vị chát và mùi thơm của trà và đặc biệt là tạo cảm giác sủi bọt tương tự như soda hoặc nước ngọt có gas. Không chỉ vậy, kombucha còn trở nên phổ biến nhờ vào những lợi ích sức khỏe phong phú như tăng cường hệ miễn dịch và hệ tiêu hóa, giúp giảm huyết áp và cholesterol, giảm cân, giảm viêm khớp và ức chế sự phát triển của ung thư [2]. Tuy nhiên, để nâng cao giá trị dinh dưỡng và hương vị của kombucha, việc bổ sung các loại trái cây giàu dưỡng chất vào sản phẩm đang được nhiều nhà nghiên cứu và nhà sản xuất quan tâm. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước đã được thực hiện để cải thiện và làm mới hương vị của sản phẩm, có thể kể đến một số loại kombucha từ các loại trái cây như anh đào, nho, lựu, măng cầu, nhãn v.v [3-7].

Trong số các loại trái cây, thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) là loại trái cây phổ biến và có diện tích canh tác lớn tại Việt Nam. Thanh long ruột đỏ nổi bật với hàm lượng vitamin, khoáng chất cùng các hợp chất chống oxy hóa, đặc biệt là flavonoid, polyphenol và betalain [8], đồng thời có hương vị ngọt thanh và màu sắc đỏ tươi bắt mắt. Ngoài ra, nó còn mang lại một số lợi ích sức khỏe cho con

người bao gồm khả năng hỗ trợ giảm cân, cải thiện tiêu hóa, giảm cholesterol trong máu, giúp ngăn ngừa ung thư và tăng cường hệ thống miễn dịch [9]. Mặc dù đã có nhiều kombucha thương mại bổ sung các loại trái cây khác nhau nhưng thực tế gần như chưa có công bố liên quan đến quy trình sản xuất kombucha bổ sung thanh long ruột đỏ.

Do đó, việc nghiên cứu quy trình lên men kombucha bổ sung thanh long ruột đỏ không chỉ nhằm mục tiêu tăng cường hàm lượng dinh dưỡng của sản phẩm mà còn để đánh giá tiềm năng của loại trái cây này đối với hương vị, màu sắc và tính chất cảm quan của kombucha. Hơn nữa, việc hiểu rõ các điều kiện lên men tối ưu sẽ giúp cải thiện hiệu quả sản xuất và đảm bảo chất lượng sản phẩm cuối cùng. Vì vậy, nghiên cứu này không chỉ mang lại giá trị khoa học mà còn có ý nghĩa thực tiễn cao trong việc tận dụng nguồn trái cây phong phú tại Việt Nam, mở ra những cơ hội mới trong việc phát triển các sản phẩm kombucha đa dạng trên thị trường. Nghiên cứu nhằm tạo ra sản phẩm kombucha bổ sung thanh long ruột đỏ được chấp nhận về mặt cảm quan với các thông số hóa lý cơ bản. Từ đó, là cơ sở định hướng nghiên cứu phân tích và xác định sự tham gia của từng nhóm cũng như cả cộng đồng vi sinh vật trong quá trình lên men để góp phần cung cấp thêm cơ sở khoa học cho quá trình lên men kombucha.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Trà xanh được cung cấp từ công ty LUYU (100% lá trà sấy khô). Thanh long ruột đỏ được mua tại siêu thị Mega Cần Thơ (phường Tân An, thành phố Cần Thơ), những quả chín đều, có trọng lượng 300 - 450 g/quả, không bị thối hay dập nát được lựa chọn để dùng trong thí nghiệm. Thanh long được chia thành hai phần: 1 phần được sử dụng để cắt thành hạt lựu (1 x 1 cm) và 1 phần được ép để lấy dịch bằng máy ép Panasonic (Model MJ-H100, Nhật Bản).

Giống SCOBY từ công ty BID (phường Cái Khế, thành phố Cần Thơ). Giống SCOBY được nhân giống để chuẩn bị lên men trong 10 ngày, màng nấm kombucha được xác định với mật số nấm men, vi khuẩn acetic và vi khuẩn lactic lần lượt là $6,3 \times 10^6$ CFU/mL, $5,1 \times 10^6$ CFU/mL và $7,5 \times 10^5$ CFU/mL.

Hóa chất: Ethanol (Merck, Đức); 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), tri-butyl phosphate (TBP), quercetin (Sigma-Aldrich, Đức); NaNO_2 , AlCl_3 , NaOH , $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, I_2 , KI (Xilong Scientific, Trung Quốc); NaOH (Cemaco, Việt Nam); đường sucrose (Biên Hòa, Việt Nam).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của phương pháp xử lý thanh long ruột đỏ đến quá trình lên men kombucha

Quá trình lên men kombucha F1 được thực hiện với các điều kiện đã được xác định [10]. Trà xanh được ngâm trong nước đã đun sôi với tỷ lệ 1,4% (w/v) trong 15 phút và lọc để thu dịch trà. Dịch trà được bổ sung đường sucrose đến 18 °Brix và điều chỉnh pH 4,4 bằng acid acetic. Dịch trà đường được phân phối vào các bình lên men, để nguội và bổ sung nấm SCOBY với hàm lượng là 12% (w/v). Bình lên men được đậy bằng vải cotton đã được xử lý với cồn 96% và lên men tĩnh trong 12 ngày ở nhiệt độ phòng (28 - 32 °C). Sau khi kết thúc giai đoạn lên men F1, dịch trà kombucha được lọc, điều chỉnh Brix 17 và pH 3,5. Tiếp theo, thanh long ruột đỏ với hàm lượng cố định 10% w/v được bổ sung ở 2 dạng xử lý là cắt hạt lựu (1 x 1 cm) và ép lấy dịch. Bình lên men được đậy kín và lên men tĩnh trong 7 ngày ở nhiệt độ phòng (28 - 32 °C). Khi kết thúc quá trình lên men, mẫu được thu thập để phân tích các chỉ tiêu bao gồm pH, Brix, hàm lượng acid tổng, ethanol, đường khử, flavonoid, vitamin C và cảm quan.

2.2.2. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình lên men kombucha F2

Sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM, Response Surface Methodology) để thiết kế và bố trí thí nghiệm tối ưu hóa các yếu tố bao gồm hàm lượng trái cây (5 - 15% w/v), pH (3-4) và nhiệt độ (2-35 °C). Thí nghiệm tối ưu hóa được thiết kế theo mô hình Box-Behnken sử dụng phần mềm Design-Expert 11.0 (Stat-Ease Inc., Hoa Kỳ), mỗi yếu tố được mã hóa với 3 mức độ. Sau khi kết thúc giai đoạn lên men F1, dịch trà kombucha được lọc và cố định TSS ở 17 °Brix. Lượng trái cây và pH dịch lên men được điều chỉnh về các giá trị như bố trí thí nghiệm và lên men tĩnh trong 7 ngày ở nhiệt độ phòng (28 - 32 °C). Các chỉ tiêu phân tích bao gồm Brix, pH, ethanol và hàm lượng acid tổng được xác định để đánh giá sự ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình lên men kombucha F2.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình lên men kombucha F2

Sử dụng các kết quả tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến trình lên men kombucha F2 từ trà xanh bổ sung thanh long ruột đỏ, thí nghiệm này được thực hiện để xác định thời gian lên men ở 6 mức (3, 5, 7, 9, 11 và 13 ngày). Các chỉ tiêu của sản phẩm kombucha (Brix, pH, ethanol, hàm lượng acid tổng, đường khử, flavonoid, vitamin C) và cảm quan được kiểm tra ở các mốc thời gian theo bố trí.

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

Giá trị pH được xác định bằng máy đo pH Horiba (pH1100, Nhật Bản). Sử dụng khúc xạ kế Atago (Master-2 α , Nhật Bản) để xác định tổng số chất khô hòa tan (TSS, °Brix). Hàm lượng acid tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,01 N [11]. Hàm lượng ethanol được xác định dựa trên phản ứng với TBP và kali chromate [12]. Hàm lượng đường khử được xác định dựa trên phản ứng với DNS [13]. Hàm lượng flavonoid được xác định bằng phương pháp chuẩn độ phức màu với AlCl₃ [14]. Hàm lượng vitamin C được xác định thông qua phương pháp chuẩn độ với I₂ [15]. Sản phẩm được đánh giá cảm quan dựa theo bảng điểm (Bảng 1) được xây dựng viện dẫn theo TCVN 12828:2019 về nước giải khát [16] và TCVN 3215:1979 về sản phẩm thực phẩm (phân tích cảm quan và phương pháp cho điểm) [17]. Phương pháp đánh giá, cho điểm cảm quan đối với nước giải khát lên men với 3 chỉ tiêu (độ trong và màu sắc, mùi, vị). Cảm quan được thực hiện với 9 thành viên thông qua việc đánh giá với thang điểm có 6 bậc (0 đến 5) cho mỗi chỉ tiêu. Hệ số quan trọng của các chỉ tiêu cảm quan về độ trong và màu sắc, mùi và vị lần lượt là 0,8, 1,2 và 2,0 (tổng hệ số: 4; thang điểm 20).

Bảng 1. Mức cho điểm các chỉ tiêu của sản phẩm kombucha xây dựng dựa theo TCVN 3215:1979

Tên chỉ tiêu	Điểm số	Yêu cầu
Độ trong và màu sắc	5	Trong suốt, không vẩn đục và vật thể lạ. Màu hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
	4	Trong suốt, không vẩn đục, có ít vật thể lạ. Màu đặc trưng cho sản phẩm.
	3	Trong, tương đối nhiều vật thể lạ, nhỏ thô trầm trọng, có màu có khác một ít so với màu đặc trưng.
	2	Hơi đục, có nhiều vật thể lạ, thô. Màu khác nhiều hơn so với màu đặc trưng.
	1	Đục, nhiều cặn lắng, có nhiều vật thể lạ, nhỏ, thô trầm trọng. Màu không đặc trưng cho sản phẩm.
	0	Vẩn đục, màu bẩn, sản phẩm bị hỏng.
Mùi	5	Hòa hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
	4	Chưa hòa hợp, thơm đặc trưng cho sản phẩm nhưng hơi khó nhận thấy.
	3	Hơi nồng, thoáng mùi lạ, ít đặc trưng cho sản phẩm.
	2	Nồng, thoáng mùi lạ, ít đặc trưng cho sản phẩm.
	1	Nồng, hăng, mùi lạ rõ, không đặc trưng.
	0	Có mùi lạ, khó chịu của sản phẩm bị hỏng.
Vị	5	Hòa hợp, êm dịu, hậu tốt, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
	4	Chưa hòa hợp, hậu vừa phải, đặc trưng cho sản phẩm bình thường.
	3	Chưa hòa hợp, hơi gắt và sốc, hậu yếu, ít đặc trưng cho sản phẩm.
	2	Đắng, sốc, thoáng vị lạ, rất ít đặc trưng cho sản phẩm.
	1	Đắng sốc, vị lạ, không có đặc trưng của sản phẩm.
	0	Có vị lạ, khó chịu của sản phẩm bị hỏng.

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 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. Ảnh hưởng của phương pháp xử lý thanh long ruột đỏ đến quá trình lên men kombucha F2

Lên men kombucha giai đoạn hai (F2) bằng cách bổ sung trái cây không chỉ cải thiện hương vị và giá trị dinh dưỡng mà còn hỗ trợ quá trình lên men, tạo ra các sản phẩm kombucha đa dạng về màu sắc và mùi vị. Tuy quá trình lên men phụ (hay lên men F2) không bắt buộc nhưng việc kết hợp trái cây lên men giai đoạn này giúp nâng cao chất lượng và sức hấp dẫn của kombucha, phù hợp với nhiều sở thích và nhu cầu khác nhau của người tiêu dùng. Theo đó, thanh long ruột đỏ đã được lựa chọn để bổ sung vào kombucha lên men từ trà xanh. Trong thí nghiệm này, thanh long ruột đỏ được thử nghiệm ở 2 dạng xử lý là cắt thành hạt lựu (1x1 cm) và ép lấy nước. Kết quả các chỉ tiêu của sản phẩm kombucha được tổng hợp trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả các chỉ tiêu của kombucha sau lên men khi bổ sung thanh long ruột đỏ ở các phương pháp xử lý khác nhau

Phương pháp xử lý	TSS (°Brix)	pH	Hàm lượng đường khử (g/100 mL)	Hàm lượng ethanol (%) v/v	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng vitamin C (mg/L)	Hàm lượng flavonoid (mg/L)	Tổng điểm trung bình có trọng lượng
Cắt khối	15,00 ^b	3,26 ^a	9,38 ^b	2,31 ^a	2,68 ^a	32,27 ^a	799,63 ^a	18,80
Nước ép	15,50 ^a	3,22 ^b	10,98 ^a	2,25 ^b	2,56 ^b	27,13 ^b	772,13 ^b	16,60

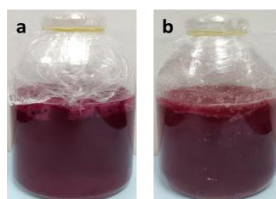
Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy có sự thay đổi về hàm lượng TSS và pH trong lên men phụ (F2), cụ thể là giảm so với giá trị TSS (ở mức 17 °Brix) và pH 3,50 cố định lúc ban đầu. Kết quả này đã thể hiện, ở điều kiện lên men kỵ khí thì hệ vi sinh vật SCOBY vẫn tiếp tục phát triển bằng cách sử dụng nguồn dinh dưỡng còn lại sau giai đoạn lên men chính (F1) và nguồn dinh dưỡng có trong thanh long được bổ sung. Đồng thời nhận thấy rằng tất cả các chỉ tiêu ghi nhận sau quá trình lên men ở cả 2 nghiệm thức xử lý nguyên liệu đều có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê.

So với giai đoạn lên men F1 trong điều kiện hiếu khí, giai đoạn lên men F2 được diễn ra trong điều kiện kỵ khí, chính điều này đã tạo điều kiện cho sự hoạt động mạnh mẽ của nấm men. Lúc này, nấm men sản sinh ra enzyme invertase phân cắt đường sucrose còn sót lại và đường dịch quả tạo ra đường glucose và fructose. Sau đó, nấm men chuyển đường đơn để tạo ra pyruvate và tiếp tục chuyển hóa thành sản phẩm cuối là ethanol nhờ enzyme pyruvate decarboxylase và alcohol dehydrogenase [18]. Trong khi đó, điều kiện kỵ khí sẽ làm chậm quá trình lên men của vi khuẩn acetic do đây là nhóm vi khuẩn Gram âm hiếu khí bắt buộc. Mặc dù vậy, vi khuẩn acetic vẫn có thể thực hiện quá trình oxy hóa ethanol thành acid acetic nhưng quá trình sẽ diễn ra chậm hơn so với ở điều kiện hiếu khí [19].

Ở nghiệm thức 1, hàm lượng ethanol của sản phẩm là 2,31% (v/v) và lượng acid tổng là 2,68 g/L, cao hơn so với kombucha ở nghiệm thức 2 lần lượt là 2,25% (v/v) và 2,56 g/L. Điều này cũng tương ứng với kết quả ở nghiệm thức 2 có hàm lượng đường khử (10,98 g/100 mL) cao hơn so với nghiệm thức 1 (9,38 g/100 mL), kết quả này có thể lý giải là do vi sinh vật đã sử dụng lượng đường khử nhiều hơn để thực hiện quá trình lên men. Nhìn chung, kết quả chứng tỏ rằng quá trình lên men của nghiệm thức 1 diễn ra nhanh hơn. Mặc dù được bổ sung với cùng hàm lượng là 10% nhưng việc xử lý nguyên liệu đã có tác động ý nghĩa đến quá trình lên men. Nguyên nhân có thể là do việc bổ sung thanh long ruột đỏ cắt nhỏ hạt lựu đã cung cấp hàm lượng dinh dưỡng cao hơn so với thanh long ép lấy nước. Việc ép để thu nhận dịch quả đã vô tình loại bỏ các thành phần dinh dưỡng có trong thịt quả như carbohydrate, protein, béo, khoáng, vitamin và đặc biệt là chất xơ [20]. Điều này cũng giải thích cho việc hàm lượng vitamin C và flavonoid trong nghiệm thức 1 cao khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 2.

Ngoài sự khác nhau giữa các chỉ tiêu hóa lý giữa lên men kombucha thanh long ruột đỏ cắt nhỏ hạt lựu và kombucha thanh long ruột đỏ ép lấy nước thì giá trị về mặt cảm quan cũng có sự khác nhau. Ở nghiệm thức 1, sản phẩm cho ra có màu đỏ trong, không vẩn đục, mùi vị hòa hợp và đạt 18,80/20 điểm. Ngược lại, ở nghiệm thức 2, sản phẩm cho ra có màu đỏ đậm, hơi vẩn đục do thịt quả bị ép nên sẽ chứa các hạt pectin, khi uống có vị gắt nhẹ, chưa phù hợp cho sản phẩm kombucha và đạt 16,60/20 điểm (Hình 1).



Hình 1. Kombucha bổ sung thanh long ruột đỏ ở dạng cắt khối (a) và ở dạng nước ép (b)

Tóm lại, phương pháp xử lý thanh long ruột đỏ bằng cách cắt hạt lựu (1x1 cm) là phù hợp để bổ sung vào kombucha ở giai đoạn lên men F2. Sản phẩm tạo ra có màu sắc, mùi vị và điểm đánh giá cảm quan cao của 9 thành viên. Các chỉ số thu được như pH, Brix, ethanol, acid tổng, vitamin C và flavonoid đã đáp ứng về yêu cầu của một loại thức uống kombucha với mục đích tăng cường giá trị và dinh dưỡng của sản phẩm.

3.2. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình lên men kombucha F2

Việc bổ sung trái cây vào giai đoạn lên men F2 giúp cải thiện hương vị và tăng giá trị dinh dưỡng. Tuy nhiên, để tăng hiệu quả và giảm chi phí sản xuất, tối ưu hóa giai đoạn lên men kombucha F2 là một bước quan trọng để xác định giá trị tối ưu của một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men. Nghiên cứu được thực hiện với 3 nhân tố theo phương pháp Box-Behnken sử dụng phần mềm Design-Expert 11.0. Nhân tố bố trí tối ưu hóa gồm hàm lượng thanh long ruột đỏ, pH và nhiệt độ lên men. Kết quả ghi nhận các chỉ số sau quá trình lên men được thể hiện ở Bảng 3. Kết quả cho thấy các nhân tố khảo sát gồm hàm lượng thanh long, pH và nhiệt độ có ảnh hưởng đến quá trình lên men. Sau 7 ngày lên men trong điều kiện kỵ khí, TSS và pH ở tất cả các nghiệm thức đều giảm, TSS trong khoảng 14,00 - 16,33 °Brix và pH 2,85 - 3,65. Trong số 17 nghiệm thức (NT) được đề xuất, kết quả cho thấy NT7, NT14 cho hàm lượng ethanol cao nhất, lần lượt là 2,95 và 3,06% (v/v) và có khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại với độ tin cậy 95%. Ngược lại, ở NT15 cho hàm lượng ethanol thấp nhất với hàm lượng ethanol là 2,07% (v/v). Bên cạnh đó, xét về hàm lượng acid tổng có trong sản phẩm thì NT7 là cao nhất (3,76 g/L) và NT8 là thấp nhất (2,30 g/L), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Bảng 3. Kết quả các chỉ tiêu của kombucha sau lên men theo bố trí CCD

Nghiệm thức	Nhân tố			Chỉ tiêu theo dõi			
	Hàm lượng thanh long (% w/v)	pH	Nhiệt độ (°C)	Brix (°Brix)	pH	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hàm lượng acid tổng (g/L)
1	10	3,5	30	15,33 ^{bcd}	3,26 ^f	2,33 ^g	2,76 ^{fgh}
2	10	4	35	15,33 ^{bcd}	3,65 ^{ab}	2,68 ^d	3,12 ^{bcd}
3	10	3,5	30	15,17 ^{cde}	3,25 ^f	2,53 ^f	2,72 ^{fgh}
4	5	4	30	15,00 ^{de}	3,59 ^b	2,16 ^{hij}	2,74 ^{fgh}
5	15	3	30	15,00 ^{de}	2,87 ^{gh}	2,74 ^{cd}	3,36 ^b
6	10	3	35	14,83 ^e	2,85 ^{gh}	2,63 ^{def}	2,80 ^{fgh}
7	15	3,5	35	14,00 ^f	3,30 ^{def}	2,95 ^{ab}	3,76 ^a
8	10	4	25	15,83 ^{abc}	3,66 ^a	2,65 ^{de}	2,30 ⁱ
9	5	3	30	15,00 ^{de}	2,82 ^h	2,14 ^{hij}	2,64 ^{gh}
10	10	3,5	30	15,17 ^{cde}	3,25 ^f	2,22 ^{ghi}	2,60 ^h
11	10	3	25	16,00 ^{ab}	2,91 ^g	2,55 ^{ef}	3,10 ^{cde}
12	10	3,5	30	15,17 ^{cde}	3,40 ^c	2,24 ^{gh}	2,70 ^{fgh}
13	5	3,5	35	14,67 ^{ef}	3,29 ^{ef}	2,12 ^{ij}	2,94 ^{def}
14	15	4	30	15,17 ^{cde}	3,65 ^{ab}	3,06 ^a	3,18 ^{bcd}
15	5	3,5	25	15,33 ^{bcd}	3,35 ^{cde}	2,07 ^j	2,86 ^{efg}
16	10	3,5	30	15,67 ^{abcd}	3,31 ^{def}	2,30 ^g	2,74 ^{fgh}
17	15	3,5	25	16,33 ^a	3,36 ^{cd}	2,83 ^{bc}	3,28 ^{bc}

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. 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 độ tin cậy 95%.

Trong thí nghiệm này, việc tối ưu hóa quá trình lên men với 2 chỉ tiêu chính là hàm lượng ethanol và acid tổng. Kết quả sau khi phân tích bởi phần mềm được trình bày trong bảng phân tích phương sai (ANOVA) dưới đây (Bảng 4 và 5). Kết quả thực nghiệm cho thấy cả 2 mô hình thống kê đều có ý nghĩa (giá trị p-value đều nhỏ hơn 0,05). Trong đó, mô hình thống kê dựa trên hàm lượng ethanol có p-value = 0,0006 và mô hình thống kê dựa trên hàm lượng acid tổng có $p < 0,0001$. Bên cạnh đó, để xác định mức độ thích hợp của mô hình, hệ số xác định R^2 cần được xem xét và đánh giá. Giá trị R^2 càng gần 1 thì mô hình tối ưu hóa càng tốt [21]. Theo đó, giá trị R^2 đạt lần lượt là 0,9566 và 0,9811 đối với mô hình phân tích theo hàm lượng ethanol và acid tổng. Sự thiếu phù hợp của mô hình (Lack of fit) thu được với giá trị p-value lớn hơn 0,05 đã chứng minh các mô hình là hoàn toàn phù hợp. Mặt khác, theo Myers et al., một mô hình được cho là tốt khi R^2 thường lớn và để đánh giá hiệu quả của mô hình, không chỉ đánh giá R^2 mà còn đánh giá R^2 điều chỉnh, R^2 dự đoán [22]. Trong nghiên cứu này, R^2 điều chỉnh, R^2 dự đoán đều đạt giá trị khá cao và lớn hơn 0,80.

Ở mô hình phân tích hàm lượng ethanol, kết quả ở Bảng 4 có hệ số biến động thấp (CV%) là 3,94%, cho thấy dữ liệu tập trung quanh giá trị trung bình, biểu thị tính ổn định cao. Bên cạnh đó dựa vào bảng ANOVA đã cho thấy hàm lượng thanh long với p-value < 0,05 có ảnh hưởng ý nghĩa đến sự hình thành ethanol. Mặt khác, pH và nhiệt độ ở dạng bậc hai cũng có tác động ý nghĩa đến quá trình lên men. Tương tự, ở Bảng 5, mô hình phân tích hàm lượng acid tổng cũng có hệ số biến động thấp (CV%) là 2,48%. Khi đánh giá về giá trị p-value, kết quả cho thấy hàm lượng acid tổng chịu ảnh hưởng bởi cả 3 nhân tố thử nghiệm. Hơn nữa, sự tương tác giữa hàm lượng thanh long $\times$ nhiệt độ, pH $\times$ nhiệt độ và hàm lượng thanh long $\times$ hàm lượng thanh long, nhiệt độ $\times$ nhiệt độ cũng có ảnh hưởng đến lượng acid sinh ra trong sản phẩm kombucha với mức ý nghĩa 5%.

Bảng 4. ANOVA kết quả xử lý thống kê theo mô hình thử nghiệm Box-Behnken dựa trên hàm lượng ethanol sau quá trình lên men F2

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do (df)	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p
Mô hình	1,48	9	0,1639	17,15	0,0006
A - Hàm lượng thanh long	1,19	1	1,19	124,89	< 0,0001
B - pH	0,0300	1	0,0300	3,14	0,1197
C - Nhiệt độ	0,0098	1	0,0098	1,03	0,3449
AB	0,0225	1	0,0225	2,35	0,1688
AC	0,0012	1	0,0012	0,1282	0,7309
BC	0,0006	1	0,0006	0,0654	0,8055
A ²	0,0046	1	0,0046	0,4798	0,5108
B ²	0,1188	1	0,1188	12,44	0,0096
C ²	0,0773	1	0,0773	8,09	0,0249
Phần dư	0,0669	7	0,0096		
Sự thiếu phù hợp của mô hình	0,0060	3	0,0020	0,1308	0,9368
Sai số ngẫu nhiên	0,0609	4	0,0152		
Tổng	1,54	16	R^2		0,9566
Độ lệch chuẩn	0,0978	R^2 hiệu chỉnh			0,9008
Trung bình	2,48	R^2 dự đoán			0,8763
C.V. (%)	3,94	Độ chính xác thích hợp			12,7874

Bảng 5. 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 F2

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do (đf)	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p
Mô hình	1,89	9	0,2105	40,35	< 0,0001
A - Hàm lượng thanh long	0,7200	1	0,7200	138,01	< 0,0001
B - pH	0,0392	1	0,0392	7,51	0,0289
C - Nhiệt độ	0,1458	1	0,1458	27,95	0,0011
AB	0,0196	1	0,0196	3,76	0,0938
AC	0,0400	1	0,0400	7,67	0,0277
BC	0,3136	1	0,3136	60,11	0,0001
A ²	0,4530	1	0,4530	86,83	<0,0001
B ²	0,0114	1	0,0114	2,18	0,1831
C ²	0,1334	1	0,1334	25,57	0,0015
Phần dư	0,0365	7	0,0052		
Sự thiếu phù hợp của mô hình	0,0210	3	0,0070	1,80	0,2860
Sai số ngẫu nhiên	0,0155	4	0,0039		
Tổng	1,93	16	R ²		0,9811
Độ lệch chuẩn	0,0722	R ² hiệu chỉnh			0,9568
Trung bình	2,92	R ² dự đoán			0,8134
C.V. (%)	2,48	Độ chính xác thích hợp			25,2718

Mối tương quan giữa hàm lượng thanh long, pH và nhiệt độ thông qua phương trình hồi quy dựa trên hàm lượng ethanol và acid tổng được xây dựng bằng phần mềm Design-Expert 11.0 như sau:

$$\text{Ethanol} = 14,88975 - 0,075150 \times A - 4,73150 \times B - 0,307700 \times C + 0,030000 \times AB + 0,000700 \times AC - 0,005000 \times BC + 0,001320 \times A^2 + 0,672000 \times B^2 + 0,005420 \times C^2$$

$$\text{Acid tổng} = 18,93600 - 0,224400 \times A - 1,76400 \times B - 0,832200 \times C - 0,028000 \times AB + 0,004000 \times AC + 0,112000 \times BC + 0,013120 \times A^2 - 0,208000 \times B^2 + 0,007120 \times C^2$$

Trong đó A, B, C là giá trị hàm lượng trái cây, pH và nhiệt độ.

Từ các kết quả phân tích, 44 nghiệm thức lý thuyết với các giá trị tối ưu được thiết lập bởi phần mềm Design-Expert 11.0 (kèm theo hàm lượng ethanol và acid tổng dự đoán). Từ 44 nghiệm thức này, 3 tổ hợp nghiệm thức được đề xuất với hàm lượng ethanol và acid tổng lý thuyết phù hợp để thực hiện thử nghiệm xác nhận. Kết quả thiur nghiệm xác nhận 3 tổ hợp tối ưu được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả các chỉ tiêu theo lý thuyết và thực tế sau 7 ngày lên men F2

Nghiệm thức	Nhân tố			Chỉ tiêu hóa lý						Tổng điểm trung bình có trọng lượng
	Hàm lượng thanh long (% w/v)	pH	Nhiệt độ (°C)	TSS (°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	15	4,00	35	16,0	3,68	3,19	3,22	3,80	3,83	18,70
41	12	4,00	35	16,0	3,59	2,92	2,94	3,44	3,40	18,60
43	15	3,52	29	16,0	3,37	2,77	2,75	3,32	3,28	19,14

Từ kết quả ở Bảng 6, NT1, NT41 và NT43 có hàm lượng ethanol thực tế lần lượt là 3,19%, 2,92% và 2,77% (v/v), cao hơn so với giá trị lý thuyết, lần lượt là 3,22%, 2,94% và 2,75% (v/v). Tương tự, giá trị acid tổng giữa thực tế và lý thuyết với độ chênh lệch chỉ khoảng 0,03 - 0,04 g/L. Việc xác nhận điều kiện tối ưu đã củng cố hơn nữa kết quả dự đoán của mô hình có độ tin cậy. Thành phẩm kombucha thu được từ 3 nghiệm thức xác nhận cũng được xác định các chỉ tiêu cảm quan. Kết quả cho thấy NT43 với hàm lượng trái cây 15% (w/v), pH 3,52 và nhiệt độ lên men ở 29 °C đạt đánh giá cảm quan cao nhất cả về độ trong và màu sắc, mùi, vị cũng như mức độ yêu thích. Do đó, NT43 được lựa chọn là để xác định thời gian lên men thích hợp.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men kombucha F2

Đối với quá trình lên men kombucha giai đoạn F2 có bổ sung trái cây thì thời gian lên men ảnh hưởng lớn đến hương vị, độ chua, hàm lượng CO₂ cũng như giá trị sinh học và dinh dưỡng của sản phẩm cuối cùng. Việc kiểm soát thời gian lên men là rất quan trọng để tạo ra kombucha có hương vị cân bằng, độ chua và sủi bọt mong muốn, cùng với lợi ích dinh dưỡng tốt nhất. Sau khi xác định các giá trị tối ưu về hàm lượng thanh long bổ sung, giá trị pH cũng như nhiệt độ lên men, thí nghiệm này được bố trí để khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men kombucha F2 (3 - 13 ngày). Kết quả theo dõi ở các chỉ tiêu ở các thời điểm lên men được tổng hợp ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả các chỉ tiêu của kombucha sau lên men bổ sung thanh long ruột đỏ ở các mốc thời gian khác nhau

Thời gian (ngày)	TSS (°Brix)	pH	Hàm lượng đường khử (g/100 mL)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng vitamin C (mg/L)	Hàm lượng flavonoid (mg/L)	Tổng điểm trung bình có trọng lượng
3	16,60 ^a	3,46 ^a	12,97 ^a	2,66 ^e	2,88 ^d	35,93 ^e	772,13 ^e	12,93
5	16,17 ^a	3,43 ^{ab}	11,53 ^b	2,87 ^d	3,08 ^{cd}	40,33 ^d	855,88 ^c	14,64
7	15,67 ^{ab}	3,38 ^{bc}	10,80 ^c	2,98 ^c	3,32 ^c	46,93 ^c	904,63 ^b	19,64
9	15,00 ^{bc}	3,34 ^c	9,34 ^d	3,13 ^b	3,58 ^b	54,27 ^b	952,13 ^a	19,16
11	14,50 ^{cd}	3,28 ^d	9,02 ^d	3,17 ^{ab}	3,88 ^a	57,20 ^{ab}	885,88 ^b	17,53
13	13,83 ^d	3,25 ^d	8,11 ^e	3,22 ^a	4,10 ^a	60,87 ^a	809,63 ^d	16,58

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. 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 độ tin cậy 95%.

Theo thời gian lên men, giá trị pH và TSS đều có sự giảm dần. Cụ thể là, giá trị TSS sau 3 ngày lên men giảm còn 16,60 °Brix và đến ngày 13 còn 13,83 °Brix. Riêng giá trị pH giảm từ 3,46 xuống 3,25, tương ứng từ ngày 3 đến ngày 13 sau lên men. Kết quả cho thấy quá trình lên men đã xảy ra với sự hoạt động của các chủng vi sinh trong dịch trà kombucha F1. Việc bổ sung thanh long đã cung cấp thêm nguồn dinh dưỡng để các vi sinh vật này có thể tiếp tục sinh trưởng và phát triển. Dẫn đến sự tiêu thụ hàm lượng chất khô hòa tan, chuyển hóa thành các sản phẩm lên men, bao gồm các acid hữu cơ, là nguyên nhân chính làm giảm pH của dịch sau lên men [23]. Tương tự, hàm lượng đường khử có xu hướng giảm và tỉ lệ thuận với hàm lượng TSS (Brix). Hàm lượng đường khử giảm dần theo thời gian lên men, từ 12,97 g/100 mL (ở ngày 3) xuống mức 8,11 g/100 mL (ở ngày 13).

Xét về hàm lượng ethanol, sản phẩm kombucha có lượng ethanol tăng dần trong quá trình lên men. Hàm lượng ethanol ở ngày lên men ở ngày thứ 3 là 2,66% và giá trị này tăng lên 3,22% (v/v) khi kết thúc lên men vào ngày 13. Nguyên nhân do trong điều kiện kỵ khí nấm men sẽ thực hiện quá trình lên men để hình thành ethanol và CO₂. Nấm men là vi sinh vật có thể phát triển cả trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Trong điều kiện hiếu khí, nấm men thực hiện hô hấp hiếu khí để sản xuất năng lượng hiệu quả và phát triển nhanh chóng. Trong khi ở điều kiện kỵ khí, nấm men chuyển sang quá trình lên men để tạo ra ethanol và CO₂, mặc dù hiệu quả năng lượng thấp hơn [24]. Có một số loại nấm men chỉ có thể thực hiện quá trình lên men bắt buộc (*Rhodotorula glutinis*), trong khi những loại khác hô hấp bắt buộc (*Kluyveromyces lactis* và *Yarrowia lipolytica*). *Saccharomyces cerevisiae* và *Dekkera bruxellensis* là những loài lên men tùy ý và có khả năng thực hiện cả quá trình lên men và hô hấp để sản xuất năng lượng. Tuy nhiên, các loài *Saccharomyces cerevisiae* và *Brettanomyces* chỉ hô hấp khi có oxy. Một số nấm men sẽ tiếp tục lên men trong điều kiện hiếu khí miễn là nấm men trong môi trường có đủ lượng đường để tiêu thụ (được gọi là hiệu ứng “Crab-tree”) [25].

Tương tự, lượng acid tổng trong kombucha cũng có khuynh hướng tăng theo thời gian lên men, hàm lượng acid tổng dao động 2,88 - 4,10 g/L từ ngày 3 đến ngày 13 của quá trình lên men. Điều này có thể giải thích là do sự hoạt động của 2 nhóm vi khuẩn hiện diện trong con giống SCOBY là nhóm vi khuẩn acetic và lactic. Đầu tiên, vi khuẩn acetic là vi khuẩn hiếu khí bắt buộc, tuy nhiên loại vi khuẩn này vẫn có thể tồn tại trong thời gian dài hơn ở điều kiện lượng oxy thấp như trong chai rượu vang hoặc trong quá trình lên men hạt ca cao [26]. Do đó, trong quá trình lên men F2 kéo dài khoảng 10 ngày thì vi khuẩn acetic vẫn có thể tồn tại để phát triển và chuyển hóa thành acid acetic, acid gluconic, acid glucuronic v.v [3]. Nguyên nhân thứ hai là do trong điều kiện kỵ khí, quá trình lên men và sinh acid lactic vẫn được thực hiện bởi nhóm vi khuẩn lactic [27].

Hàm lượng vitamin C cũng được theo dõi trong quá trình lên men theo thời gian. Kết quả cho thấy vitamin C trong kombucha tăng dần theo thời gian và đạt cao nhất ở ngày 13 với 60,87 mg/L. Các nghiên cứu trước đây cho thấy thời gian lên men càng dài thì lượng vitamin C càng nhiều. Nghiên cứu của Malbaša et al. cho thấy giống khởi động chứa nhiều vi sinh vật khác nhau tạo ra lượng vitamin C cao hơn so với giống khởi động chỉ có một loại vi khuẩn cùng một loại nấm men và khi theo dõi quá trình lên men thì kết quả cho thấy hàm lượng vitamin C tăng khoảng 6 lần sau 10 ngày lên men [28]. Mặt khác, thanh long ruột đỏ cũng là loại trái cây giàu vitamin C (202,59 mg/100 g) [29] nên việc bổ sung vào trà kombucha cũng góp phần làm tăng hàm lượng vitamin C. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Torre et al. trong việc cải thiện tính chất chống oxy hóa và hàm lượng vitamin C và B12 trong kombucha bằng cách bổ sung bột táo tàu (*Ziziphus jujuba* Mill.) [30].

Trong trà rất giàu polyphenol tan trong nước, những thành phần này tạo nên mùi thơm và vị của trà. Các hợp chất này có thể chiếm tới 30% trọng lượng khô của lá trà. Hàm lượng flavonoid cũng như mùi vị sản phẩm kombucha tùy thuộc vào hàm lượng cũng như loại trà bổ sung [31]. Do đó, hàm lượng flavonoid trong kombucha cũng được phân tích và cho thấy có sự thay đổi theo thời gian. Ở giai đoạn đầu, hàm lượng flavonoid có sự tăng dần từ ngày 3 đến ngày 9, tương ứng với 772,13 mg/L và 952,13 mg/L và sau đó lại giảm còn 809,63 mg/L ở ngày 13. Nghiên cứu của Jayabalan et al. cho thấy nồng độ polyphenol trong trà tăng lên trong quá trình lên men [32]. Tuy nhiên, sự tương tác giữa vi khuẩn hay sự chuyển hóa của các thành phần có trong trà là một quá trình phức tạp có thể làm tăng hoặc giảm theo thời gian [33].

Bên cạnh việc xác định các chỉ tiêu hóa lý, sản phẩm cũng được đánh giá cảm quan để chọn ra thời gian lên men F2 phù hợp. Kết quả đánh giá cảm quan của các thành viên cho thấy sản phẩm ở ngày 3 và ngày 5 có độ trong khá tốt do các vi sinh vật chưa phát triển quá nhiều và chưa tạo ra quá nhiều chất rắn lơ lửng, tuy nhiên màu sắc và hương vị của thanh long ruột đỏ chưa hoàn toàn hòa quyện vào sản phẩm, có màu hồng nhạt chưa đặc trưng cho sản phẩm. Lúc này, quá trình lên men vẫn đang diễn ra nên chỉ đạt 12,93 ở ngày thứ 3 và 14,64 điểm ở ngày thứ 5. Sản phẩm từ ngày 7 đến ngày 13 không có sự khác biệt lớn về độ trong và màu sắc đồng thời hương từ trái cây đã hoàn toàn hòa hợp vào sản phẩm. Kombucha có màu đỏ hồng đặc trưng từ betacyanin có trong thanh long. Tuy nhiên, về mùi và vị thì sản phẩm ở ngày 11 và ngày 13 có hàm lượng acid tổng và ethanol khá cao nên cảm nhận được mùi giấm rõ rệt hơn. Ngoài ra, vị chua cũng tăng lên và vị ngọt cũng giảm đi do quá trình chuyển hóa đường và sự tích tụ của các acid hữu cơ. Điều này đã làm thay đổi lớn đến mùi vị và cảm quan của sản phẩm. Thời gian lên men càng lâu đã làm cho sản phẩm càng có vị đắng, nồng và không được yêu thích. Sản phẩm lên men ở ngày thứ 7 nhận được điểm đánh giá cảm quan khá cao, có vị chua và ngọt hài hòa, màu sắc đặc trưng, hương thơm nhẹ của thanh long. Do đó, sản phẩm trà kombucha lên men trong 7 ngày được xác định là thời gian phù hợp.

4. KẾT LUẬN

Quá trình lên men kombucha F2 từ trà xanh bổ sung thanh long ruột đỏ đã được nghiên cứu để xác định các giá trị tối ưu cho các nhân tố nhằm tạo được sản phẩm kombucha đặc trưng với màu sắc đỏ đẹp từ thanh long ruột đỏ. Kết quả cho thấy kombucha sau lên men F1 được bổ sung 15% (w/v) thanh long ruột đỏ ở dạng cắt hạt lựu, pH 3,52, lên men kỵ khí ở 29 °C trong 7 ngày, sản phẩm có chất lượng và được đánh giá cảm quan cao nhất. Nghiên cứu đã tạo ra một sản phẩm tiềm năng không chỉ nâng cao giá trị dinh dưỡng của sản phẩm mà còn tạo ra hương vị và màu sắc hấp dẫn, thu hút những khách hàng yêu thích những thức uống lên men. Tuy nhiên, cần thực hiện các nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm ra các điều kiện thích hợp để bảo quản mà vẫn đảm bảo chất lượng của sản phẩm cũng như đánh giá sự tham gia và ảnh hưởng của hệ vi sinh vật trong quá trình lên men.

Tuyên bố về đóng góp của các tác giả

Lưu Minh Châu: Lên ý tưởng và thiết kế phương pháp nghiên cứu, tổng hợp kết quả, viết bản thảo, chỉnh sửa bài viết; Lê Thị Trúc Đào: Bố trí thí nghiệm, tổng hợp kết quả, xử lý số liệu, viết bản thảo; Nguyễn Phạm Thiên Trang: Tổng hợp kết quả, xử lý số liệu, phân tích dữ liệu; Nguyễn Ngọc Thanh: Lên ý tưởng và thiết kế phương pháp nghiên cứu, xử lý số liệu, phân tích dữ liệu; Huỳnh Xuân Phong: Thiết kế phương pháp nghiên cứu, phân tích dữ liệu, chỉnh sửa và hoàn thiện bản thảo.

Tuyên bố về xung đột lợi ích

Các tác giả tuyên bố không có xung đột lợi ích liên quan đến việc thực hiện nghiên cứu và công bố bài báo này.

Tuyên bố về sử dụng trí tuệ nhân tạo (AI)

Trong quá trình thực hiện nghiên cứu và chuẩn bị bản thảo, các tác giả không sử dụng công cụ trí tuệ nhân tạo (AI) tạo sinh. Các tác giả hoàn toàn chịu trách nhiệm về tính chính xác, tính toàn vẹn và nội dung khoa học của bài báo.

Lời cảm ơn và thông tin tài trợ

Các tác giả xin cảm ơn Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ về trang thiết bị và cơ sở vật chất trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

ORCIDiDs:

Lưu Minh Châu: <https://orcid.org/0009-0002-8411-2562>

Nguyễn Phạm Thiên Trang: <https://orcid.org/0009-0009-4099-9086>

Nguyễn Ngọc Thanh: <https://orcid.org/0000-0002-3079-1259>

Huỳnh Xuân Phong: <https://orcid.org/0000-0003-0220-2979>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. M. Nyhan *et al.*, “Advances in kombucha tea fermentation: a review”, *Applied Microbiology*, vol. 2, no. 1, pp. 73-103, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010005>
- [2] P. V. de Oliveira *et al.*, “Kombucha benefits, risks and regulatory frameworks: A review”, *Food Chemistry Advances*, vol. 2, p. 100288, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100288>
- [3] N. Yavari *et al.*, “Response surface methodology for optimization of glucuronic acid production using kombucha layer on sour cherry juice”, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 4, no. 8, pp. 3250-3256, 2010, doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- [4] L. Ayed *et al.*, “Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium”, *Annals of Microbiology*, vol. 67, pp. 111-121, 2017, doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2>
- [5] N. Yavari *et al.*, “Glucuronic acid rich kombucha-fermented pomegranate juice”, *Journal of Food Research*, vol. 7, no. 1, pp. 61-69, 2018, doi: <https://doi.org/10.5539/jfr.v7n1p61>
- [6] W. C. Tan *et al.*, “Influence of storage conditions on the quality, metabolites, and biological activity of sour sop (*Annona muricata* L.) kombucha”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, p. 603481, 2020, doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603481>
- [7] N. L. Y. Nhi *et al.*, “Nghiên cứu quá trình lên men phụ F2 trà kombucha Oolong nhân”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, vol. 21, no. 3, pp. 231-236, 2021.
- [8] T. Perween *et al.*, “Dragon fruit: An exotic super future fruit of India”, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 7, no. 2, pp. 1022-1026, 2018.
- [9] S. Singh and S. Kumar, “A review on nutritional, medicinal and bio-active compound of dragon fruit *Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose”, *International Journal of Biochemistry Research & Review*, vol. 32, no. 5, pp. 57-67, 2023, doi: <https://doi.org/10.9734/ijbcr/2023/v32i5817>
- [10] N. T. Khôi, *Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men kombucha trà xanh*. Luận văn tốt nghiệp ngành Công nghệ sinh học. Trường Đại học Cần Thơ, 2023.
- [11] L. Nguyen and E. S. Hwang, “Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt supplemented with aronia (*Aronia melanocarpa*) juice”, *Preventive Nutrition and Food Science*, vol. 21, no. 4, pp. 330-337, 2016, doi: <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.330>
- [12] M. Sriariyanun *et al.*, “A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of ethanol in fermentation products”, *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 35, no. 2, pp. 744-750, 2019, doi: <https://dx.doi.org/10.13005/ojc/350234>
- [13] C. Gonçalves *et al.*, “Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates”, *Analytical Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 2046-2048, 2010, doi: <https://doi.org/10.1039/C0AY00525H>

- [14] D. O. Kim *et al.*, “Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums”, *Food Chemistry*, vol. 81, no. 3, pp. 321-326, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
- [15] P. V. Sở và B. T. N. Thuận, *Kiểm nghiệm lương thực, thực phẩm*, Hà Nội, Việt Nam: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1991.
- [16] Bộ Khoa học và Công nghệ, *Tiêu chuẩn Việt Nam: (TCVN) 12828:2019. Nước giải khát*, 2019.
- [17] Bộ Khoa học và Công nghệ, *Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 3215:1979. Sản phẩm thực phẩm - Phân tích cảm quan*, 1979.
- [18] R. Jayabalan *et al.*, “A review on kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 13, no. 4, pp. 538-550, 2014, doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- [19] J. M. Guillamón and A. Mas, “Acetic acid bacteria”, in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, H. König, G. Unden, J. Fröhlich, König, H., Unden, G., Eeds. Cham, Switzerland: Springer, 2017, pp. 43-64, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_2
- [20] K. Jalgaonkar *et al.*, “Postharvest profile, processing and waste utilization of dragon fruit (*Hylocereus* spp.): A review”, *Food Reviews International*, vol. 38, no. 4, pp. 733-759, 2022, doi: <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1742152>
- [21] J. I. Umeh *et al.*, “Optimization of process conditions for alcoholic wine production from pineapple using RSM”, *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Engineering*, vol. 6, no. 3, pp. 23-30, 2015.
- [22] R. H. Myers *et al.*, *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2016.
- [23] T. B. Ngoc *et al.*, “Influences of fermentation conditions on the chemical composition of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) wine”, *Beverages*, vol. 10, no. 3, p. 61, 2024, doi: <https://doi.org/10.3390/beverages10030061>
- [24] F. Rodrigues *et al.*, “Sugar metabolism in yeasts: An overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism”, in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, G. Péter and C. Rosa (Eds). Berlin, Germany: Springer, 2006, pp. 101-121, doi: https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_6
- [25] C. Boulton and D. Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2013.
- [26] D. Mamlouk and M. Gullo, “Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation”, *Indian Journal of Microbiology*, vol. 53, pp. 377-384, 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>
- [27] N. K. Nguyen *et al.*, “Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha”, *Springerplus*, vol. 4, p. 91, 2015, doi: <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0872-3>
- [28] R. V. Malbaša *et al.*, “Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage”, *Food Chemistry*, vol. 127, no. 4, pp. 1727-1731, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.02.048>
- [29] L. Anggraini *et al.*, “Vitamin C levels in skin and flesh of red dragon fruit (*Hylocereus lemairei* (Hook) Britton & Rose) by UV-Vis spectrophotometry”, *International Journal of Research Publication and Reviews*, vol. 3, no. 6, pp. 769-772, 2022.
- [30] La Torre *et al.*, “Improved antioxidant properties and vitamin C and B12 content from enrichment of kombucha with Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) powder”, *Fermentation*, vol. 10, no. 6, p. 295, 2024, doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation10060295>
- [31] H. Özyurt, “Changes in the content of total polyphenols and the antioxidant activity of different beverages obtained by kombucha ‘Tea fungus’”, *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, vol. 4, no. 3, pp. 255-261, 2020, doi: <https://doi.org/10.31015/jaefs.2020.3.3>

- [32] R. Jayabalan *et al.*, “Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation”, *Food Chemistry*, vol. 102, no. 1, pp. 392-398, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
- [33] S. C. Chu and C. Chen, “Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha”, *Food Chemistry*, vol. 98, no. 3, pp. 502-507, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>

ABSTRACT

OPTIMIZE KOMBUCHA SECONDARY FERMENTATION CONDITIONS FROM GREEN TEA SUPPLEMENTED WITH RED DRAGON FRUIT

Luu Minh Chau, Le Thi Truc Dao, Nguyen Pham Thien Trang,

Nguyen Ngoc Thanh, Huynh Xuan Phong*

Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

*Email: hxphong@ctu.edu.vn

The study was conducted to perfect the fermentation process of kombucha F2 from green tea supplemented with red dragon fruit by determining the optimal conditions to produce a product with the best quality and sensory characteristics. The study investigated the conditions affecting the fermentation process such as the treatment method of red dragon fruit (1x1 cm diced; juice), the content of added fruit (5 - 15% w/v), pH (3.0 - 4.0), temperature (25 - 35 °C), and fermentation time of F2 (3 - 13 days). The results showed that red-fleshed dragon fruit was diced (1 x 1 cm) and supplemented with a content of 15% (w/v), pH 3.52 and fermented at 29 °C for 7 days to obtain a product with ethanol content (2.98% v/v), total acid (3.32 g/L), reducing sugar (10.80 g/100 mL), vitamin C (46.93 mg/L), and flavonoid (904.63 mg/L). The product also received high sensory scores for clarity and color, aroma, and taste. Therefore, the kombucha product from green tea supplemented with red dragon fruit is a potential product with attractive color and flavor for those who love fermented drinks in general and kombucha in particular.

Keywords: Kombucha, secondary fermentation, red dragon fruit, optimization, green tea.