

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN NẤM MEN VÀ VI KHUẨN ACID ACETIC THỬ NGHIỆM LÊN MEN TRÀ THỦY SÂM (KOMBUCHA)

Phạm Hồng Quang¹, Nguyễn Văn Sơn² và Lê Thị Mỹ Xuyên²

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Sinh viên ngành Vi sinh vật học K36, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 21/05/2014

Ngày chấp nhận: 30/10/2014

Title:

Isolation, selection of yeast and acetic acid bacteria in fermenting of kombucha

Từ khóa:

Acetobacter aceti, nấm men, *Saccharomyces cerevisiae*, thủy sâm, vi khuẩn acid acetic

Keywords:

Acetobacter aceti, acetic acid bacteria, kombucha, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast

ABSTRACT

Kombucha is fermented beverage with combination of yeasts and acetic acid bacteria. This study aimed to isolate and select yeast and acetic acid bacteria strains with high fermentation capability, and determine suitable fermentation conditions for those microbial isolates. The results showed that 23 yeast isolates and 33 acetic acid bacteria isolates were obtained, in which the isolates performing highest capability in fermentation were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. The fermentation conditions were examined including inoculation level ($10^3 - 10^6$ CFU/mL), sucrose concentration (10 – 25°Bx) and initial pH (4.5 – 6.0), incubation temperature (25°C, 30°C and ambient temperature) and fermentation time (1 – 9 days). It was showed that the two yeast and bacterial isolates could produce ethanol and acid well when the fermentation was carried out at 10^5 CFU/mL of inoculation, 15°Bx, initial pH 5.5, and 30°C during 7 – 9 days.

TÓM TẮT

Trà thủy sâm là thức uống lên men từ sự kết hợp giữa nấm men và vi khuẩn acid acetic. Nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn dòng nấm men và vi khuẩn acid acetic có khả năng lên men tốt từ trà thủy sâm và khảo sát điều kiện lên men thích hợp cho dòng vi sinh phân lập được. Kết quả đã phân lập được 23 dòng nấm men và 33 dòng vi khuẩn acid acetic, trong đó dòng nấm men và vi khuẩn lên men tốt nhất được xác định thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* và *Acetobacter aceti*. Các điều kiện lên men được khảo sát bao gồm mật số giống chủng ($10^3 - 10^6$ tế bào/mL), nồng độ đường (10 – 25°Bx) và pH ban đầu (4,5 – 6,0), nhiệt độ (25°C, 30°C và nhiệt độ môi trường xung quanh) và thời gian lên men (1 – 9 ngày). Kết quả cho thấy hai dòng vi khuẩn và nấm men trên sản xuất lượng ethanol và acid cao nhất khi được chủng với mật số 10^5 tế bào/mL, nồng độ đường 15°Bx, pH ban đầu 5,5, và ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 7 – 9 ngày.

1 GIỚI THIỆU

Trà thủy sâm (kombucha) là dịch trà lên men với nguồn giống là sự kết hợp giữa vi khuẩn acid acetic và nấm men. Những vi sinh vật này có khả năng phát triển trong môi trường nước trà có bổ

sung nguồn carbon, thường là đường sucrose (Aidoo *et al.*, 2006). Nhiều nghiên cứu cho thấy thủy sâm có tác dụng tích cực đối với sức khỏe con người như tăng hiệu quả hoạt động của tuyến nước bọt, dạ dày và đường ruột, hỗ trợ chống xơ cứng

động mạch, thải độc, giảm lo âu và lão hóa (Goh *et al.*, 2012), tác động tích cực đến chứng táo bón, khó tiêu (Erst, 2003), giảm triệu chứng bệnh thấp khớp, gút và bệnh trĩ (Reiss, 1994; Dufresne and Farnworth, 2000).

Vi khuẩn và nấm men trong trà thủy sâm thể hiện mối quan hệ cộng sinh rất chặt chẽ, có thể ngăn chặn sự phát triển của nhiều vi sinh tạp nhiễm. Thành phần vi sinh trong trà thủy sâm thay đổi tùy theo nguồn giống chủng ban đầu, vị trí địa lý, điều kiện khí hậu và sự đa dạng của các dòng nấm men hoang dại ở địa phương (Kurtzman *et al.*, 2001; Sreeramulu *et al.*, 2000). Trong quá trình lên men, nấm men phân giải đường sucrose thành fructose và glucose để sử dụng, sinh ra khí CO₂ và ethanol. Một phần lượng ethanol sinh ra sẽ được oxy hóa bởi vi khuẩn acid acetic, tạo ra sản phẩm chính là acid acetic. Các sản phẩm phụ khác cũng được hình thành, bao gồm gluconic acid, vitamin, phối hợp cùng các hợp chất thơm như aldehyde, ketnes ester, amino acid, cùng các polyphenol có trong trà tạo nên hương vị đặc biệt của trà thủy sâm (Júnior *et al.*, 2009). Ngoài ra, một lượng kháng sinh cũng được tổng hợp trong quá trình lên men, kết hợp với các thành phần trên tạo nên nhiều tác dụng có lợi cho sức khỏe người dùng (Jayabalan *et al.*, 2008).

Ở Việt Nam, phần lớn trà thủy sâm được sản xuất nhỏ lẻ ở quy mô hộ gia đình. Dù đã có nhiều người nuôi và sử dụng thủy sâm, các nghiên cứu chính thống, khoa học ở nước ta về loại thức uống này vẫn còn rất hạn chế. Ngoài ra, việc nhân giống và sản xuất thủy sâm chủ yếu được thực hiện bằng phương pháp thủ công ở quy mô hộ gia đình theo nhiều nguồn hướng dẫn khác nhau, không đảm bảo chất lượng và nguồn giống gốc. Nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh các dòng vi khuẩn acid acetic và nấm men có khả năng lên men trà cao, đồng thời xác định một số điều kiện lên men trà thủy sâm thích hợp từ các dòng vi khuẩn và nấm men này.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thu thập mẫu trà thủy sâm và phân lập nấm men, vi khuẩn acid acetic

Năm mẫu trà thủy sâm được thu thập từ các hộ nuôi trà thủy sâm tại các tỉnh Bến Tre, Hậu Giang và Thành phố Cần Thơ, trong đó 3 mẫu ở Thành phố Cần Thơ được thu thập tại huyện Cờ Đỏ, Phường Trà Nóc và Phường An Thới (Quận Bình Thủy).

Vi khuẩn acid acetic được phân lập như sau: pha loãng dịch trà thủy sâm đến nồng độ thích hợp

trời cấy trên môi trường Yeast extract Peptone Glycerol D-glucose (YPGD: yeast extract 5g/L, peptone 5g/L, glycerol 5g/L và D-glucose 5g/L) có bổ sung 4% v/v ethanol, 2% agar và 0,5% CaCO₃ (Moryadee và Wasu, 2008). Lấy 5 mL mẫu cho vào môi trường, ủ ở 30°C trong 1 – 2 ngày, ủ ở 30°C trong 2 – 3 ngày, cấy chuyển nhiều lần đến khi khuẩn lạc đạt độ thuần nhất. Chọn các khuẩn lạc tạo vòng halo trên môi trường là vi khuẩn acid acetic. Quan sát dưới kính hiển vi để xác định độ đồng nhất của tế bào vi khuẩn. Các dòng thuần được định danh sơ bộ thông qua đặc điểm về hình dạng và một số phản ứng sinh hóa đặc trưng dựa theo tài liệu phân loại Bergey (Holt *et al.*, 1994). Nấm men được phân lập bằng phương pháp tương tự với môi trường Yeast extract Peptone D-glucose Agar (YPDA: yeast extract 1%, peptone 2%, D-glucose 2%, Agar 2%) bổ sung tetracycline 50 mg/L. Cấy chuyển các dòng tạo khuẩn lạc khác biệt, quan sát dưới kính hiển vi quang học ghi nhận độ rộng, đặc điểm hình thái tế bào nấm men.

2.2 Tuyển chọn, định danh dòng vi khuẩn lên men acid acetic mạnh và nấm men lên men ethanol mạnh

Cấy ria các dòng vi khuẩn lên môi trường YPGD có bổ sung 0,5% CaCO₃ và 4% ethanol, ủ ở 30°C trong 24 – 48h, xác định tỉ lệ đường kính vòng halo trên đường kính khuẩn lạc, chọn dòng vi khuẩn có tỉ lệ lớn nhất. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Chung các dòng nấm men đã phân lập vào bình tam giác chứa 100 mL dịch nước trà lipton 1% có bổ sung đường sucrose 20%, với mật số giống chủng 10⁵ tế bào/mL, ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh (28 – 32°C) trong 5 ngày. Chung cất xác định độ rượu sau lên men, chọn dòng nấm men cho độ rượu cao nhất.

Dòng nấm men có đặc tính tốt được định danh dựa vào trình tự ITS1, ITS2 và 5.8S rDNA, khuếch đại bằng cặp mồi ITS1 và ITS4. Đối với vi khuẩn, cặp mồi 518F và 800R được dùng để khuếch đại trình tự 16S rDNA. So sánh các trình tự khuếch đại với ngân hàng gen NCBI trên website www.ncbi.nlm.nih.gov bằng chương trình BLAST, xác định tên vi sinh đến cấp độ loài.

2.3 Khảo sát điều kiện lên men trà thủy sâm

Quy trình lên men trà thủy sâm: Trà Lipton được cho vào nước sôi với nồng độ 1% trong 10 phút, lọc lấy dịch, bổ sung đường sucrose thương mại, cho vào bình tam giác 250 mL, mỗi bình chứa 100 mL dịch trà, điều chỉnh độ pH bằng NaOH

hoặc acid acetic, khử trùng ở 115°C trong 15 phút, để nguội, sau đó chủng giống vi khuẩn acid acetic và nấm men, ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh (28 – 32°C). Các yếu tố mật số giống chủng, nồng độ đường, pH ban đầu, thời gian và nhiệt độ lên men được điều chỉnh phù hợp cho từng thí nghiệm.

Ảnh hưởng mật số giống chủng: Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nhân tố: mật số nấm men và mật số vi khuẩn, mỗi nhân tố có 4 mức độ: 10^3 , 10^4 , 10^5 và 10^6 tế bào/mL. Chuẩn bị dịch trà theo quy trình trên với pH tự nhiên của dịch trà, chủng nấm men và vi khuẩn theo mật số thí nghiệm, ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 7 ngày, xác định nồng độ ethanol và acid acetic lần lượt bằng phương pháp chưng cất và chuẩn độ acid (Lê Thanh Mai và ctv, 2005). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Ảnh hưởng nồng độ đường và pH ban đầu: Thí nghiệm 2 nhân tố: nồng độ đường (15%, 20%, 25%) và pH ban đầu (4,0; 5,0; 6,0). Chuẩn bị dịch trà theo quy trình, nồng độ đường sucrose và pH được điều chỉnh theo thí nghiệm. Chủng giống với mật số thích hợp từ thí nghiệm trên, ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong 7 ngày, xác định hàm lượng acid và ethanol sau quá trình lên men. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ lên men: Thí nghiệm 2 nhân tố: Thời gian (3, 5, 7, 9 ngày) và nhiệt độ ủ (25°C, 30°C và nhiệt độ môi trường xung quanh 28 – 32°C). Chuẩn bị dịch trà với nồng độ đường và pH thích hợp theo kết quả của thí nghiệm trên, chủng các dòng vi khuẩn và nấm men theo mật số thích hợp, ủ ở các nhiệt độ như bố trí thí nghiệm. Xác định hàm lượng acid và ethanol sau 3, 5, 7 và 9 ngày. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.4 Phương pháp phân tích thống kê:

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2010 và thống kê bằng chương trình StatGraphics version 3.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn acid acetic và nấm men

Kết quả phân lập vi khuẩn acid acetic: Quá trình phân lập đã tách ròi được 33 dòng vi khuẩn gồm 9 dòng từ thủy sâm nguồn gốc Bến Tre, ký hiệu là BT; 3 dòng có nguồn gốc từ An Thới (Quận Bình Thủy), ký hiệu là BTh; 11 dòng có nguồn gốc từ Cờ Đỏ, ký hiệu là CD; 4 dòng có nguồn gốc từ Trà Nóc, ký hiệu là TN; và 6 dòng có nguồn gốc từ Hậu Giang, ký hiệu là HG. Các dòng vi khuẩn này

có khả năng tạo vùng sáng trên môi trường YPGD có bổ sung ethanol và CaCO_3 và là vi khuẩn Gram âm, khuẩn lạc tròn đều, bìa nguyên, tạo mô hoặc lồi, đa số có màu trắng đục, một số màu vàng nhạt hoặc vàng đậm, catalase âm tính hoặc dương tính. Kết quả kiểm tra khả năng làm đổi màu môi trường với thuốc thử bromocresol green cho thấy có 26 dòng thuộc giống *Acetobacter* và 7 dòng thuộc giống *Gluconobacter*.

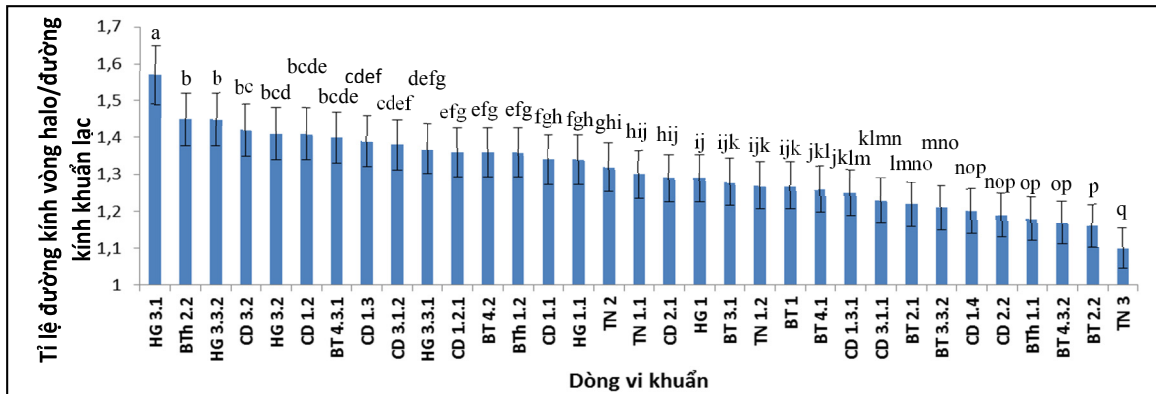
Kết quả phân lập nấm men: 23 dòng nấm men đã được phân lập và tách ròi, gồm 4 dòng từ thủy sâm có nguồn gốc Trà Nóc, ký hiệu là TN; 8 dòng có nguồn gốc từ An Thới (Quận Bình Thủy), ký hiệu là Bth; 3 dòng có nguồn gốc từ Cờ Đỏ, ký hiệu là CD; 6 dòng có nguồn gốc từ Hậu Giang, ký hiệu là HG; và 2 dòng có nguồn gốc từ Bến Tre, ký hiệu là BT. Tế bào các dòng nấm men này có nhiều hình dạng: ovan, cầu, hoặc dài, nảy chồi nhiều hướng hoặc một đầu. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc khá đa dạng với dạng hình tròn hoặc không đều, màu trắng đục, bìa trơn hoặc chia thùy, răng cưa, bề mặt nhẵn, khô, gợn sóng hoặc trơn, nổi mô hoặc nổi hố.

3.2 Tuyển chọn, định danh vi khuẩn acid acetic và nấm men có khả năng lên men mạnh

Tuyển chọn các dòng vi khuẩn sinh acid acetic mạnh

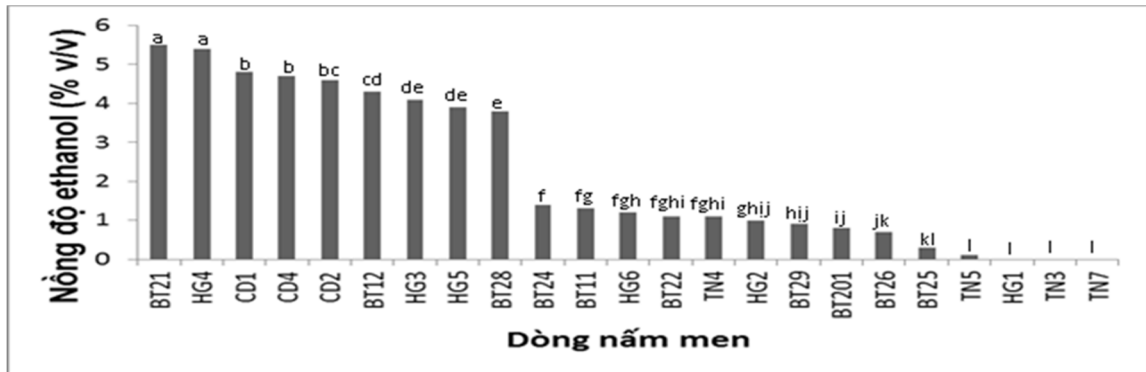
Khả năng sinh acid acetic của các dòng vi khuẩn được đánh giá dựa vào tỉ lệ đường kính vòng sáng trên môi trường YPGD có bổ sung 0,5% CaCO_3 và đường kính khuẩn lạc (Hình 1). Kết quả cho thấy có 8 dòng cho tỉ lệ trên 1,40; trong đó dòng vi khuẩn HG 3.1 có tỉ lệ đường kính vòng halo/đường kính khuẩn lạc lớn nhất, đạt 1,57, khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại. Ngoài ra đây cũng là dòng vi khuẩn có đường kính vòng halo lớn nhất sau 72 giờ ủ (3,2 cm). Do đó dòng vi khuẩn HG 3.1 được chọn cho các thí nghiệm sau.

Khả năng sinh ethanol của các dòng nấm men được đánh giá dựa trên lượng ethanol sinh ra trong dung dịch trà 1%, nồng độ đường sucrose ban đầu 20% với mật số giống chủng 10^5 tế bào/mL sau 5 ngày ủ ở nhiệt độ môi trường xung quanh (28 – 32°C), kết quả được trình bày trong Hình 2. Có 9 dòng nấm men sản xuất ethanol đạt từ 3,5% trở lên, trong đó dòng BT21 và dòng HG4 sinh lượng ethanol nhiều nhất, đạt 5,5% và 5,4%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng nấm men còn lại. Nhằm tuyển chọn dòng nấm men có khả năng lên men cao trong môi trường nước trà, dòng nấm men cho lượng ethanol cao nhất BT21 được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.



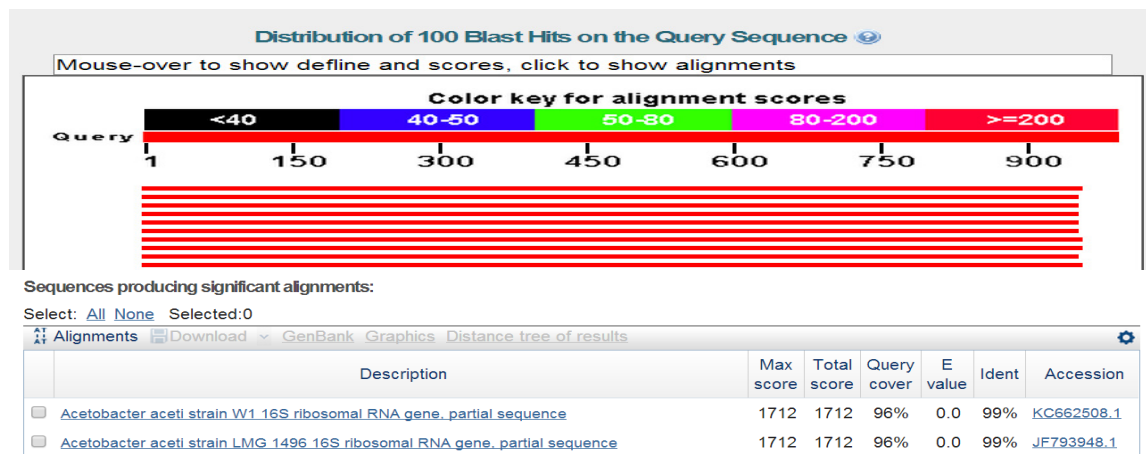
Hình 1: Tỷ lệ đường kính vòng halo/đường kính khuẩn lạc sau 72 giờ ủ ở 30°C

Ghi chú: Số liệu trong hình là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Các giá trị có cùng mẫu tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%

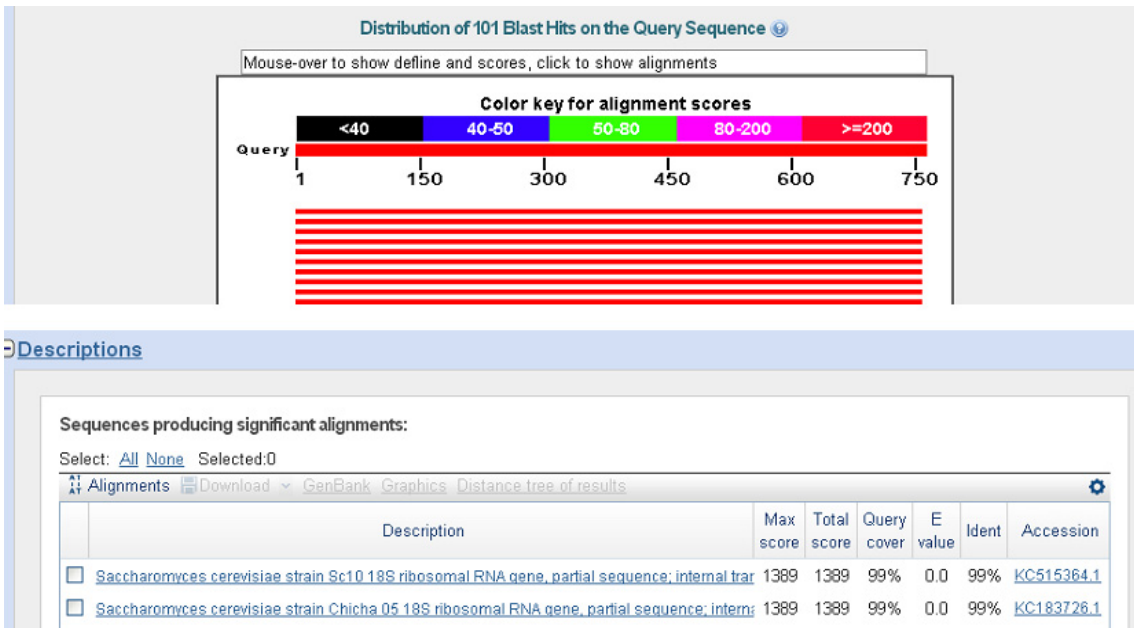


Hình 2: Lượng ethanol trung bình sau 5 ngày lên men ở nhiệt độ môi trường (28 – 32°C) của 23 dòng nấm men

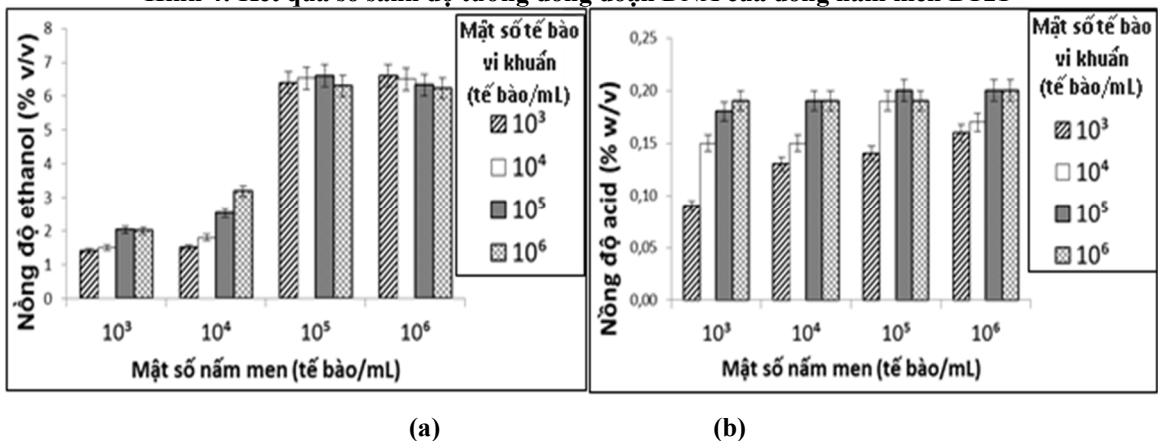
Ghi chú: Số liệu trong hình là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Các giá trị có cùng mẫu tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%



Hình 3: Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn DNA của dòng vi khuẩn HG 3.1 với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI



Hình 4: Kết quả so sánh độ tương đồng đoạn DNA của dòng nấm men BT21



Hình 5: Nồng độ ethanol (a) và acid (b) ở các mật số giống chủng khác nhau sau 7 ngày lên men

Kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử cho thấy đoạn DNA khuếch đại từ dòng vi khuẩn HG 3.1 tương đồng với gen mã hóa 16S ribosomal RNA của loài *Acetobacter aceti*, mã số (Accession number) KC662508.1 với độ tương đồng 99% (Hình 3), và đoạn DNA của dòng nấm men BT21 tương đồng với vùng ITS1, ITS2 và gen mã hóa 5.8S ribosomal RNA của loài *Saccharomyces cerevisiae*, mã số (Accession number) KC515364, mức độ tương đồng 99% (Hình 4). Vì thế dòng vi khuẩn được xác định thuộc loài *Acetobacter aceti*, và dòng nấm men thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*.

3.3 Điều kiện thích hợp lên men thủy sâm

3.3.1 Ảnh hưởng của mật số giống chủng ban đầu

Kết quả xác định hàm lượng ethanol và acid trong mẫu trà thủy sâm sau 7 ngày lên men ở các mật số giống chủng khác nhau được trình bày trong Hình 5. Mật số nấm men càng cao thì lượng ethanol thu được càng lớn, tuy nhiên khi tăng đến mức 10⁵ và 10⁶ tế bào/mL ethanol thu được khác biệt không có ý nghĩa thống kê, đạt giá trị từ 6,2 đến 6,6 %v/v. Khi mật số tế bào nấm men cao, mật số vi khuẩn chủng ban đầu hầu như không ảnh hưởng đến lượng ethanol sinh ra, do nấm men *Saccharomyces* có tính kháng nhất định với sự hiện diện của vi khuẩn *Acetobacter aceti* (Sunday et al., 2010). Ngoài ra, acid acetic sinh ra từ *Acetobacter*

aceti còn có tác dụng kích thích nấm men sản xuất ethanol (Liu *et al.*, 1996).

Kết quả xác định nồng độ acid cho thấy mật số vi khuẩn ban đầu tỉ lệ thuận với lượng acid thu được, tuy nhiên khi mật số vi khuẩn đạt 10^5 và 10^6 tế bào/mL, lượng acid khác biệt không có ý nghĩa thống kê, đạt từ 0,18 đến 0,20%w/v. Mật số nấm men được chủng càng cao, lượng acid thu được càng nhiều, do nấm men cung cấp ethanol như nguồn cơ chất cho vi khuẩn sản xuất acid acetic (Liu *et al.*, 1996).

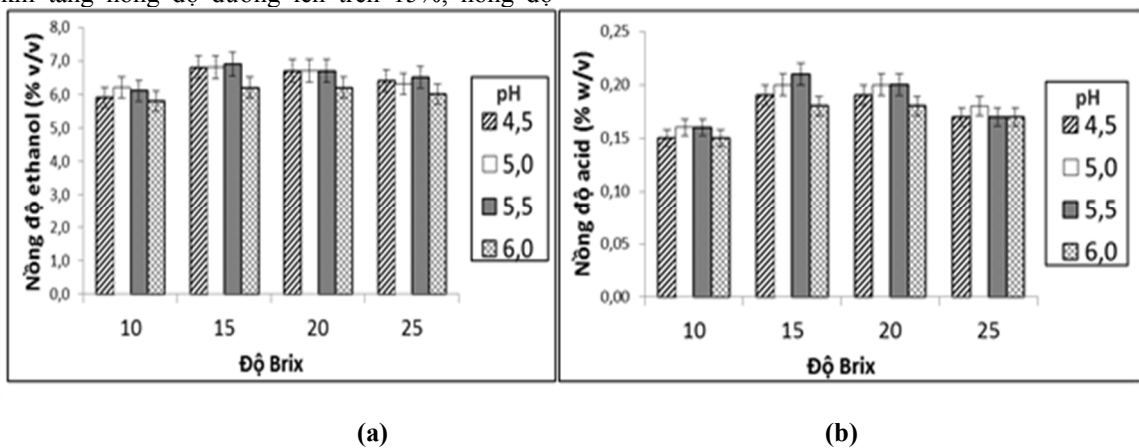
Các kết quả phân tích cho thấy khi mật số nấm men và vi khuẩn đạt $10^5 - 10^6$ tế bào/mL hàm lượng ethanol và acid đạt cao nhất. Để tiết kiệm giống chủng, mật số 10^5 tế bào/mL được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.2 Ảnh hưởng của nồng độ đường và pH ban đầu

Kết quả xác định hàm lượng ethanol ở Hình 6 cho thấy nồng độ đường ban đầu có ảnh hưởng nhất định đến khả năng lên men ethanol của nấm men. Khi nồng độ đường tăng từ 10 đến 15%, nồng độ ethanol tăng tương ứng do nấm men có nhiều cơ chất cho hoạt động lên men tạo ethanol. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ đường lên trên 15%, nồng độ

ethanol lại tăng không đáng kể, thậm chí có xu hướng giảm ở nồng độ 25%, có thể do nồng độ chất tan cao làm tế bào bị co nguyên sinh, và lượng ethanol sinh ra khi đạt giới hạn nhất định đã ức chế hoạt động của nấm men (Bùi Ái, 2003). Tương tự, khoảng pH từ 4,5 đến 5,5 cho lượng ethanol tương đương nhau (6,5 – 6,6%), nhưng khi pH tăng cao đến 6,0 lượng ethanol giảm đến giá trị thấp nhất, trung bình 5,8%, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Các nghiên cứu của Periyasamy *et al.* (2009) và Fakruddin (2013) cũng cho thấy nấm men *Saccharomyces* có khả năng lên men ethanol cao trong khoảng pH 4,0 – 5,5.

Kết quả phân tích hàm lượng acid cho thấy khi tăng pH và nồng độ đường ban đầu, lượng acid thu được giảm. Giá trị acid cao nhất (trung bình 0,19%) được ghi nhận ở nồng độ đường 15 – 20°Bx và pH 5,0 – 5,5, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại. Ở điều kiện này, lượng ethanol sinh ra cũng đạt giá trị cao nhất, chứng tỏ có sự tương hỗ trong sinh trưởng và phát triển giữa nấm men và vi khuẩn. Nấm men cung cấp ethanol cho vi khuẩn oxi hóa tạo thành acid acetic, từ đó kích thích nấm men tiếp tục sản xuất thêm ethanol (Yang, 2010).



Hình 6: Nồng độ ethanol (a) và acid (b) ở các điều kiện pH và độ Brix khác nhau sau 7 ngày lên men

3.3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian lên men

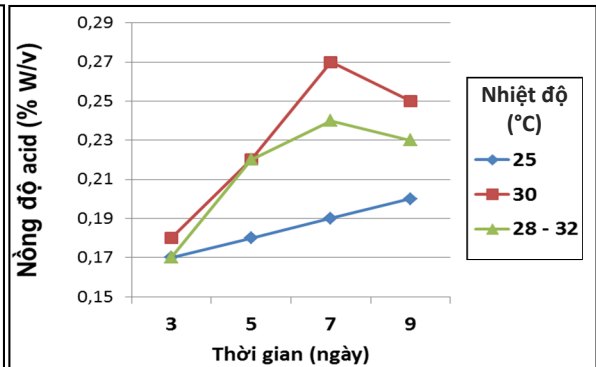
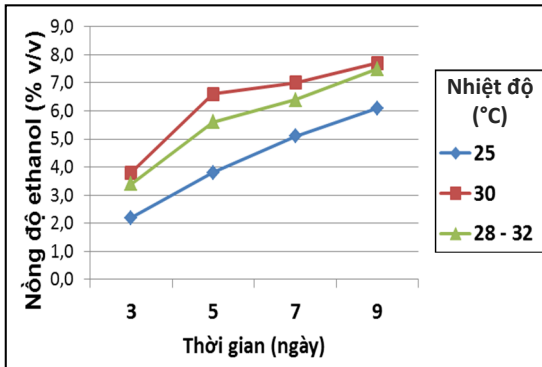
Kết quả phân tích lượng ethanol và acid khi lên men ở các nhiệt độ và thời gian khác nhau được trình bày ở Hình 7. Trong 9 ngày lên men nồng độ ethanol tăng liên tục, và ở nhiệt độ 30°C lượng ethanol luôn đạt giá trị cao hơn các nhiệt độ còn lại, trong khi điều kiện 25°C cho lượng ethanol thấp nhất. Điều này chứng tỏ ở nhiệt độ cao và ổn định, tốc độ lên men xảy ra nhanh hơn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Torija *et al.*

(2003) về sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến nhiều dòng *Saccharomyces cerevisiae*. Sau 9 ngày, nồng độ ethanol tại các điều kiện nhiệt độ 30°C, nhiệt độ môi trường xung quanh và 25°C lần lượt là 7,7%; 7,5% và 6,1%.

Tương tự, lượng acid tại điều kiện nhiệt độ ổn định 30°C cũng đạt giá trị cao nhất so với hai điều kiện nhiệt độ còn lại. Nồng độ acid tăng liên tục trong 7 ngày đầu, đến ngày thứ 9 giảm nhẹ nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê, riêng nghiệm

thức ở 25°C lượng acid tiếp tục tăng trong ngày 9. Mức acid cao nhất (0,27%) được ghi nhận tại ngày 7, nhiệt độ ủ 30°C. Kết quả này phù hợp với nghiên

cứ của Ghosh *et al.* (2012): nhiệt độ tối ưu cho vi khuẩn *Acetobacter aceti* sản xuất acid acetic là 30°C.



(a)

(b)

Hình 7: Nồng độ ethanol (a) và acid (b) theo thời gian lên men ở các nhiệt độ khác nhau

4 KẾT LUẬN

Các mẫu trà thủy sâm trong nghiên cứu này là sản phẩm lên men của nhiều dòng vi khuẩn acid acetic và nấm men khác nhau, các dòng vi sinh này rất đa dạng về đặc điểm hình thái. Trong đó, dòng vi khuẩn và nấm men có khả năng lên men tốt nhất được xác định là loài *Acetobacter aceti* và *Saccharomyces cerevisiae*. Khả năng lên men của hai dòng vi sinh này trong dịch trà có sự tương hỗ lẫn nhau. Dịch trà đạt nồng độ ethanol và acid cao sau 7 – 9 ngày lên men ở mật số giống chủng 10^5 tế bào/mL, nồng độ đường 15°Bx, pH 5,5 và nhiệt độ ủ 30°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aidoo, K. E., M. J. R. Nout and P. K. Sarkar, 2006. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research*. 6(1): 30-39.
2. Bùi Ái, 2003. Công nghệ lên men ứng dụng trong công nghệ thực phẩm. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia. Tp. Hồ Chí Minh. 235 trang.
3. Dufresne, C. and E. Farnworth, 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*. 33: 409-421.
4. Ernst, E. (2003). Kombucha: a systematic review of the clinical evidence. *Forschende Komplementarmedizin und Klassische Naturheilkunde [Research in Complementary and Natural Classical Medicine]*. 10(2): 85-87.
5. Fakruddin, M., M.A. Islam, M.M. Ahmed and N. Chowdhury, 2013. Process optimization of bioethanol production by stress tolerant yeasts isolated from agro-industrial waste. *International Journal of Renewable and Sustainable Energy*. 2(4): 133-139.
6. Ghosh, S., R. Chakraborty, G. Chatterjee and U. Raychaudhuri, 2012. Study on fermentation conditions of palm juice vinegar by response surface methodology and development of a kinetic model. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 29(3): 461-472.
7. Goh, W.N., A. Rosma, B. Kaur, A. Fazilah, A.A. Karim and R. Bhat, 2012. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal* 19(1): 109-117.
8. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley, and S.T. Williams, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed, Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 816 pp.
9. Jayabalan, R., P. Subathradevi, S. Marimuthu, M. Sathiskumar, K. Swaminathan, 2008. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*. 109: 227-234.
10. Júnior, R.J.S., R.A. Batista, S.A. Rodrigues, L.X. Filho, Á.S. Lima, 2009. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with

- Kombucha Colonies. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 1(1): 72-78.
11. Kurtzman C.P., C.J. Robnett, E. Basehoar-Powers, 2001. *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporogenous yeast from “kombucha tea”. *FEMS Yeast Respiration* 1: 133-138.
 12. Lê Thanh Mai (Chủ biên), Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thị Hằng, Lê Lan Chi, 2005. Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. 331 trang.
 13. Liu, C.-H., W.-H. Hsu, F.-L. Lee, and C.-C. Liao, 1996. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*. 13: 407-415.
 14. Periyasamy, S., S. Venkatachalam, S. Ramasamy and V. Srinivasan, 2009. Production of Bio-ethanol from Sugar Molasses Using *Saccharomyces Cerevisiae*. *Modern Applied Science*. 3(8): 32-37.
 15. Reiss, J., 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und –Forschung*. 198: 258-261.
 16. Sreeramulu, G., Y. Zhu, W. Knol, 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2589-2594.
 17. Ukwo, S.P., C.F. Ezeama and N.U. Ndaeyo, 2010. Growth of Different Yeast Strains During Fermentation of Soursop (*Annona muricata*) Juice as Influenced by Acetic acid Bacteria (*Acetobacter aceti*). *Nature and Science*. 8(10): 285-291.
 18. Yang, Z., F. Zhou, B. Ji, B. Li, Y. Luo, L. Yang and T. Li, 2010. Symbiosis between Microorganisms from Kombucha and Kefir: Potential Significance to the Enhancement of Kombucha Function. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 160(2): 446-455.