



TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN TRÀ KOMBUCHA GIÀU ACID GLUCURONIC TỪ ATISO

Trần Thị Kim Nhung*, Nguyễn Thúy Hương

Bộ môn Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Bách khoa – ĐHQG TP HCM

Ngày Tòa soạn nhận được bài: 24-3-2017; ngày phản biện đánh giá: 29-4-2017; ngày chấp nhận đăng: 19-6-2017

TÓM TẮT

Bài báo này, nghiên cứu khảo sát các yếu tố lên men, sàng lọc bằng ma trận Blackett – Burman và thiết kế tối ưu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt với thiết kế tâm xoay (RSM-CCD) thu được kết quả như sau: Dịch trà atiso có đường sucrose 110,4g/L lên men 8,5 ngày ở nhiệt độ 31,6°C giàu hoạt tính sinh học như: đường kính vòng kháng khuẩn trên đại diện vi khuẩn Gram (-): 15,6 mm và Gram (+): 9,6 mm; hoạt tính kháng oxy hóa: 83,8% và giá trị acid glucuronic cực đại lên men thực tế là 277,15 mg/L.

Từ khóa: atiso, acid glucuronic, Burman, kombucha, RSM-CCD.

ABSTRACT

Optimizing affecting factors to glucuronic acid production in Artichoke fermentation

This article, A Blackett – Burman matrix was designed to study the factors that affect glucuronic acid formation. After screening, three factors included temperature, sucrose concentration and time that have strongly contributed to glucuronic acid formation was selected to design a matrix for modeling optimal point. The result of Response surface methodology (RSM) with Central composite design (CCD) showed the maximum value of glucuronic acid concentration 277.15 mg/L, evaluation the antibacterial activity: Gram (-): 15.6mm, Gram (+): 9.6mm, evaluation the antioxidant activities 83.8% at 110.4 g/L sucrose, incubation at 31.6 ° C in 8.5 days.

Keywords: artichoke, glucuronic acid, Burman, kombucha, RSM-CCD.

1. Giới thiệu

Kombucha là loại thức uống được lên men bởi hệ cộng sinh vi khuẩn và nấm men [1]. Trong thức uống kombucha gồm các loại đường: acid gluconic, glucuronic, lactic, acetic, malic, tartaric, malonic, citric, oxalic, ethanol, acid amin tan trong nước, vitamin và một số enzym thủy phân [2]. Nhiều nghiên cứu khoa học đã chứng minh lợi ích về sức khỏe của trà kombucha như: Làm giảm cholesterol, tránh xơ vữa động mạch, giảm huyết áp cũng như thanh lọc độc tố trong cơ thể [3]. Đặc trưng cho thành phần hóa học chính của trà kombucha là sự có mặt của acid glucuronic đóng vai trò trọng yếu giúp gan thải loại độc tố, hỗ trợ bài tiết, tham gia cấu tạo cơ thể, hỗ trợ hệ miễn dịch giúp tăng cường sức khỏe. Đặc biệt acid glucuronic có tác dụng giảm nồng độ acid uric trong máu giúp điều trị

* Email: kimnhungtran2001@gmail.com

bệnh Gout – một trong những căn bệnh của thời đại hiện nay [4]. Bên cạnh đó, trong các loại thảo dược, cây atiso được xem là loại thảo dược được sử dụng phổ biến hiện nay vì chất chiết từ atiso cho thấy hoạt tính chống viêm gan, chống ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn, bài tiết mật cũng như khả năng ức chế sự sinh tổng hợp cholesterol, hạn chế sự hình thành các điều kiện bệnh lí liên quan đến stress [5]. Trong các nghiên cứu trước của nhóm chúng tôi, Nguyễn Khôi Nguyên và cộng sự, qua các năm 2014, 2015, 2016 [6]-[8], các chủng vi khuẩn *Gluconacetobacter intermedius* và nấm men *Dekkera bruxellensis* đã được phân lập, định danh và tiếp nối trong đề tài “**Tối ưu hóa điều kiện lên men tạo trà kombucha giàu acid glucuronic từ atiso**” sử dụng các chủng vi sinh vật này làm giống lên men bằng mô hình Placket – Burman và RSM – CCD nhằm thu được thức uống lên men giàu hoạt tính sinh học với hàm mục tiêu acid glucuronic tối ưu.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Giống vi sinh vật

Hai chủng vi khuẩn *Gluconacetobacter intermedius* và nấm men *Dekkera bruxellensis* sử dụng trong lên men trà kombucha được giữ bằng phương pháp đông sâu - 80°C [6]-[8].

Hai chủng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 8739 và *Bacillus cereus* ATCC 11778 được sử dụng kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của trà kombucha cung cấp bởi Công ty Microbiologist USA.

2.2. Môi trường

- Trà túi lọc atiso của Công ty Ngọc Duy, TP Đà Lạt.
- Môi trường lên men được chuẩn bị 1 lít gồm 10g/L trà atiso (theo hướng dẫn của nhà sản xuất) được ủ trong nước sôi 15 phút và bổ sung đường sucrose với hàm lượng theo các khoảng khảo sát. Hỗn hợp trà đường được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.
- Lên men theo mẻ kết hợp khuấy đảo 100 vòng/phút. Lên men lặp lại 3 lần.

2.3. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm

2.3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid glucuronic trong trà kombucha lên men từ atiso

Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid glucuronic trong trà kombucha gồm nhiệt độ lên men, hàm lượng đường, tỉ lệ giống, thời gian lên men. Tất cả 4 yếu tố này được khảo sát lần lượt theo thứ tự trong điều kiện lên men tĩnh. Kết quả yếu tố khảo sát trước là tiền đề cho thí nghiệm khảo sát yếu tố sau và cũng là tâm thí nghiệm đưa vào quy trình sàng lọc và quy hoạch thực nghiệm. Phạm vi khảo sát được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Phạm vi các yếu tố khảo sát khả năng sinh acid glucuronic trong lên men trà kombucha từ atiso

Yếu tố khảo sát	Nhiệt độ lên men (°C)	Hàm lượng đường (g/L)	Tỉ lệ giống (%)	Thời gian lên men (ngày)
Phạm vi khảo sát	25	80	3	3
	30	90	5	5
	35	100	7	7
	40	110	9	9
		120	11	11

2.3.2. Sàng lọc các yếu tố bằng ma trận sàng lọc Plakett – Burman

Ma trận sàng lọc Plakett – Burman được xây dựng nhằm loại bỏ các yếu tố ít ảnh hưởng hoặc không ảnh hưởng đến khả năng sinh acid glucuronic. Ma trận này được xây dựng với 2 mức độ thấp nhất (-1) và cao nhất (+1) tương ứng với phạm vi khảo sát được thực hiện trong thí nghiệm khảo sát các đơn yếu tố (Bảng 1) bao gồm 12 thí nghiệm để sàng lọc ra các yếu tố có ảnh hưởng chính đến khả năng sinh acid glucuronic. Các yếu tố có độ tin cậy cao ($p < 0,05$) sẽ được đưa vào mô hình tối ưu hóa cho phương pháp đáp ứng bề mặt theo cấu trúc có tâm (RSM – CCD).

2.3.3. Tối ưu hóa bằng phương pháp thực nghiệm RSM – CCD

Mô hình RSM – CCD được sử dụng là mô hình mô phỏng hàm lượng acid glucuronic được sinh ra trong quá trình lên men trà kombucha từ atiso, sau khi loại bỏ biến có ít ảnh hưởng. Từ đó có thể tiến hành tiếp các thí nghiệm phức tạp hơn với các biến đã được giữ lại nhằm khảo sát quá trình một cách chi tiết hơn. Từ kết quả phân tích sẽ xác định điểm tối ưu các yếu tố cho hàm mục tiêu acid glucuronic tối ưu.

2.3.4. Phương pháp định lượng acid glucuronic

D - glucuronic acid được định lượng bằng kit K – Uronic của hãng Megazyme ở bước sóng 340 nm bằng máy quang phổ UV-Vis spectro 6000.

2.3.5. Phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa

Thí nghiệm xác định hoạt tính kháng oxy hóa sử dụng DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) được xác định ở bước sóng hấp thụ bằng máy quang phổ [9]. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 517nm và phần trăm ức chế được tính theo công thức:

$$x\% = 100 - \left[\frac{(Abs \text{ mẫu} - Abs \text{ blank})}{Abs \text{ đối chứng}} \times 100 \right]$$

2.3.6. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp đục giếng [10]. Mức độ nhạy cảm của vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram (-)) và *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gram (+)) với dịch trà lên men được thể hiện bằng đường

kính vòng kháng khuẩn quanh giếng sau khi ủ 24 giờ ở 37°C. Hoạt tính kháng khuẩn thể hiện thông qua đường kính vòng kháng khuẩn, tính bằng trung bình cộng giá trị đường kính vòng kháng khuẩn của 3 lần lặp lại bằng công thức:

$$\text{Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)} = D - d$$

trong đó: D là đường kính vòng lớn (mm), d là đường kính giếng (mm)

Với các mức đánh giá:

Đường kính vòng kháng khuẩn < 5mm: Hoạt tính kháng khuẩn yếu;

Đường kính vòng kháng khuẩn từ 5-10 mm: Hoạt tính kháng khuẩn tốt;

Đường kính vòng kháng khuẩn >10 mm: Hoạt tính kháng khuẩn rất cao.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid glucuronic trong lên men trà kombucha từ atiso

Quá trình lên men trà kombucha giàu acid glucuronic từ atiso chịu ảnh hưởng trực tiếp của các yếu tố khách quan: nhiệt độ lên men, hàm lượng đường sucrose, tỉ lệ giống, thời gian lên men đóng vai trò quan trọng để hệ lên men có thể tổng hợp acid glucuronic. Kết quả nghiệm thức cho thấy, nhiệt độ lên men 30°C cho lượng acid glucuronic 267,86 mg/L và khi lên ở nghiệm thức hàm lượng đường 100g/L kết quả thu được 267,803 mg/L. Hàm lượng acid glucuronic (267,66 mg/L) khi lên men ở tỉ lệ giống là 7%. Hàm lượng acid glucuronic có tăng nhẹ (267,913 mg/L) ứng với thời gian lên men là 7 ngày.

Vậy sau các thí nghiệm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men trà kombucha từ atiso thì nhiệt độ 30°C, hàm lượng đường 100g/L, tỉ lệ giống 7% với mô hình tỉ lệ cộng sinh vi khuẩn: nấm men là 3:2 và thời gian lên men 7 ngày được chọn là giá trị phù hợp trong lên men cho mục tiêu đạt hàm lượng acid glucuronic cao và là tiền đề cho bài toán tối ưu hóa.

3.2. Ma trận Plackett – Burman sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid glucuronic

Sau khi thực hiện các thí nghiệm theo phương pháp lên men cổ điển, tiến hành thiết kế thí nghiệm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men trà kombucha từ atiso theo thiết kế của Plackett – Burman được thực hiện bằng phần mềm Minitab 17 cho 4 yếu tố: nhiệt độ, hàm lượng đường, tỉ lệ giống, thời gian lên men.

Bảng 2. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố ảnh hưởng

Tên yếu tố	Mức độ ảnh hưởng	Độ tin cậy (p)
Nhiệt độ lên men (°C)	12,84	0,009
Thời gian lên men (ngày)	12,16	0,010
Hàm lượng đường sucrose (g/L)	6,95	0,034
Tỉ lệ giống (%)	2,23	0,179

Căn cứ vào hệ số ảnh hưởng của 3 yếu tố ảnh hưởng lớn (Bảng 2), cho thấy nhiệt độ có tác động mạnh nhất đến hàm mục tiêu acid glucuronic (12,84). Kết quả phân tích phương sai cho thấy có 3 yếu tố có độ tin cậy $p \leq 0,05$ là nhiệt độ lên men, thời gian lên men và hàm lượng đường sucrose thực sự có ảnh hưởng mạnh đến khả năng sinh ra acid glucuronic. Vì thế 3 yếu tố này sẽ được đưa vào quá trình tối ưu hóa RSM – CCD với hàm mục tiêu acid glucuronic tổng hợp sau khi lên men trà kombucha từ atiso.

3.3. Mô hình RSM – CCD tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid glucuronic

Mô hình RSM – CCD được xây dựng để mô phỏng quá trình sinh tổng hợp hàm mục tiêu acid glucuronic sinh ra trong quá trình lên men trà kombucha từ atiso với x_1, x_2, x_3 lần lượt là nhiệt độ lên men, hàm lượng đường, thời gian lên men. Từ mô hình này có thể xác định điểm tối ưu cho hàm acid glucuronic đạt cực đại. Kết quả thực nghiệm RSM – CCD gồm 20 nghiệm thức.

Trong bảng kết quả phân tích phương sai của thí nghiệm bề mặt chỉ tiêu cho hàm acid glucuronic, mức độ phù hợp Lack of Fit của mô hình hồi quy bậc 2 đầy đủ có giá trị p -value = 0,300 lớn hơn so với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Điều này có ý nghĩa mô hình này khớp với dữ liệu. Có 9 trường hợp đạt độ tin cậy $p \leq 0,05$ (Bảng 3). Vì vậy phương trình hồi quy như sau:

$$Y = 267,254 + 13,078 x_1 + 8,189 x_2 + 15,967 x_3 - 29,041 x_1^2 - 7,568 x_2^2 - 18,302 x_3^2 + 3,734 x_1 \cdot x_2 + 1,546 x_1 \cdot x_3 + 8,759 x_2 \cdot x_3$$

Với Y là hàm lượng acid glucuronic (mg/L).

x_1, x_2, x_3 lần lượt là 3 yếu tố nhiệt độ, hàm lượng đường, thời gian lên men.

Phương trình hồi quy cho thấy 3 yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh acid glucuronic là nhiệt độ, hàm lượng đường, thời gian lên men.

Từ mô hình này có thể xác định điểm tối ưu cho hàm acid glucuronic đạt cực đại (Hình 1).

Bảng 3. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố

Tên yếu tố	Mức độ ảnh hưởng	Độ tin cậy (p)
x_1	13,078	0,000
x_2	8,189	0,000
x_3	15,967	0,000
$x_1 * x_1$	-29,041	0,000
$x_2 * x_2$	-7,568	0,000
$x_3 * x_3$	-18,302	0,000
$x_1 * x_2$	3,734	0,000
$x_1 * x_3$	1,546	0,004
$x_2 * x_3$	8,759	0,000

Bảng thông tin mô hình hồi quy của thí nghiệm bề mặt chỉ tiêu cho hàm acid glucuronic (Bảng 4), hệ số hồi quy R^2 là 99,69% thể hiện rằng số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu suy đoán từ mô hình. Theo Castillo (2007), $R^2 > 0,75$ thì mô hình tương thích với thực nghiệm nên điều này cho thấy sự tương quan giữa các yếu tố thí nghiệm với hàm lượng acid glucuronic sinh ra là chặt chẽ [11].

Bảng 4. Thông tin mô hình hồi quy của thí nghiệm bề mặt chỉ tiêu cho hàm acid glucuronic

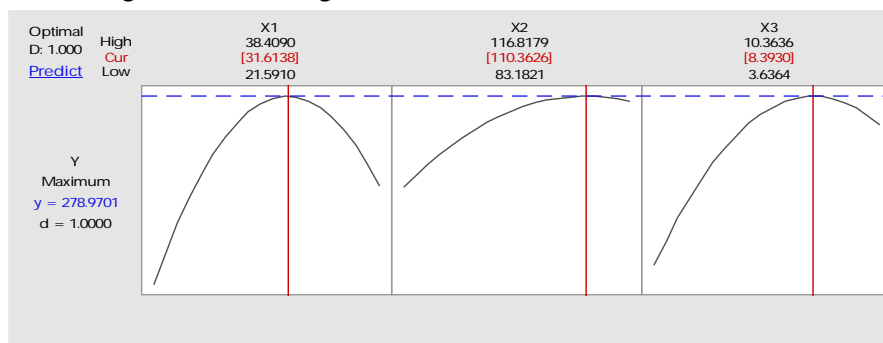
Coded Coefficients

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		267,254	0,473	565,38	0,000	
Nhiệt độ	26,155	13,078	0,314	41,70	0,000	1,00
Hàm lượng đường	16,379	8,189	0,314	26,11	0,000	1,00
Thời gian	31,934	15,967	0,314	50,91	0,000	1,00
Nhiệt độ*Nhiệt độ	-58,082	-29,041	0,305	-95,12	0,000	1,02
Hàm lượng đường*Hàm lượng đường	-15,136	-7,568	0,305	-24,79	0,000	1,02
Thời gian*Thời gian	-36,603	-18,302	0,305	-59,95	0,000	1,02
Nhiệt độ*Hàm lượng đường	7,467	3,734	0,410	9,11	0,000	1,00
Nhiệt độ*Thời gian	3,092	1,546	0,410	3,77	0,004	1,00
Hàm lượng đường*Thời gian	17,517	8,759	0,410	21,37	0,000	1,00

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,15901	99,94%	99,89%	99,69%

Khi áp dụng thực nghiệm, đề tài sử dụng các kết quả tối ưu theo mô hình được làm tròn số cho phù hợp với quá trình làm thực nghiệm. Để đánh giá mức độ tương thích giữa lý thuyết và thực nghiệm, các thí nghiệm kiểm định được tiến hành tại các điểm tối ưu và so sánh giá trị cực đại của hàm mục tiêu suy ra từ mô hình (Hình 1) đạt 278,97 mg/L với giá trị thực nghiệm 277,15 mg/L.



Hình 1. Các giá trị tối ưu theo mô hình

Độ tương đồng giữa hàm lượng acid glucuronic lý thuyết và thực nghiệm:

$$\text{Độ tương đồng} = 277,15 / 278,97 \times 100 = 99,3\%.$$

Từ kết quả này chứng tỏ việc tối ưu các yếu tố trên đạt độ tin cậy cao và có ý nghĩa rất lớn trong sản xuất.

Trà kombucha lên men từ atiso trên hệ thống fermenter được lọc, đóng chai, thanh trùng và bảo quản ở 5°C trong 4 tuần. Bước đầu đánh giá chất lượng, sản phẩm có màu

vàng nâu, dung dịch trong, vị chua nhẹ, ngọt, hương thơm của atiso giúp cho mặt cảm quan của kombucha khác với hương vị truyền thống. Hàm lượng acid glucuronic đạt 277,15 mg/L cao hơn so với trà kombucha từ nghiên cứu tiền đề của nhóm Nguyễn Khôi Nguyên và cộng sự năm 2015 [8] đã công bố hàm lượng acid glucuronic chưa qua quá trình tối ưu hóa đạt 175,8 mg/L. Bên cạnh đó, kết quả kiểm tra hoạt tính kháng oxy hóa của trà kombucha cao (83,8%), có thể do sử dụng atiso (tỉ lệ 10g/L) chứa chất cynarin và các chất chống oxy hóa như acid acetic, hợp chất phenolic... do vi khuẩn lên men đường tạo thành.

Hoạt tính kháng khuẩn được xác định trên 2 vi khuẩn đại diện vi khuẩn Gram (-), Gram (+) thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn (mm) sau:

- Đường kính vòng kháng khuẩn đối với *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram -): 15,6 mm.
 - Đường kính vòng kháng khuẩn đối với *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gram +): 9,6 mm.
- Vậy, hoạt tính kháng khuẩn của trà kombucha từ atiso cao.

4. Kết luận

Việc sử dụng công nghệ vi sinh lên men sản phẩm trà kombucha từ atiso trên hệ thống fermenter tạo ra một loại thức uống đảm bảo an toàn thực phẩm có hoạt tính sinh học được sinh tổng hợp cao hơn so với trà lên men truyền thống. Quá trình tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM – CCD) thu được kết quả tại các điểm tối ưu như: nhiệt độ lên men 31,6°C, hàm lượng đường sucrose 110,4 g/L, thời gian lên men 8,5 ngày, trà kombucha có hàm lượng acid glucuronic đạt 277,15 mg/L, hoạt tính kháng khuẩn khảo sát vi khuẩn Gram (-) (+) với đường kính vòng kháng khuẩn là 15,6 mm và 9,6 mm; hoạt tính kháng oxy hóa đạt 83,8%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Jayabalan R., Malbasa R. V., Loncar E. S., Vitas J. S., Sathishkumar M., “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.
- [2] Chu S.C., Chen C., “Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha,” *Food Chemistry* 98, pp. 502, 2006.
- [3] Dufresne C., Farnworth E., “Tea, Kombucha, and health: a review,” *Food research international* 33, pp. 409-421, 2000.
- [4] Ilmara Vina, Raimonds Linde, Arturs Patetko & Pavels Semjonovs, “Glucuronic acid from fermented beverages: Biochemical functions in humans and its role in health protection,” *Institute of Microbiology and Biotechnology*, University of Latvia, Kronvalda blvd. 4, LV-1586, Riga, Latvia, 2013.
- [5] Ceccarelli N., Curadi M., Picciarelli P., Martelloni L., Sbrana C., Giovannetti M., “Globe artichoke as a functional food,” *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, pp. 197-201, 2010.

- [6] Nguyen Khoi Nguyen, et al, “Kombucha: an industrial development potential in Vietnam,” *Meeting the needs through research innovation in Biotechnology*, pp. 75 – 82, 2014.
- [7] Nguyen N. K., et al., “Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid,” *LWT – Food Science and Technology*, 64, pp. 1149-1155, 2015.
- [8] Nguyen Khoi Nguyen, et al., “Effects of *Lactobacillus casei* and Alterations in Fermentation Conditions on Biosynthesis of Glucuronic Acid by a *Dekkera bruxellensis* - *Gluconacetobacter intermedius* Kombucha Symbiosis Model System,” *Food Biotechnology*, 29, pp. 356-370, 2015.
- [9] Nurgun K., Aysegul G., Nilufer T.N., Ahmet A., “Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous extract from *Raohanus Rapphanistrum* L,” *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 93-100, 2012.
- [10] Saba I., Maryum M., Farzana P., “In-vitro Antibacterial activities of three medicinal plant using agar well diffusion method,” *Research Journal of Biology*, pp. 1-8, 2012.
- [11] Castillo E Del, “Process Optimization AStatistical Approach,” *Springer Science*, pp.118-122 2007.

CÁC SỐ TẠP CHÍ KHOA HỌC SẮP TỚI:

- Tập 14, Số 7 (2017): *Khoa học giáo dục*
- Tập 14, Số 8 (2017): *Khoa học xã hội và nhân văn*
- Tập 14, Số 9 (2017): *Khoa học tự nhiên và công nghệ*.

Ban biên tập Tạp chí Khoa học rất mong nhận được sự trao đổi thông tin của các đơn vị bạn và được bạn đọc thường xuyên cộng tác bài vở, góp ý xây dựng.