

RESEARCH ON SELECTING SYMBIOTIC MICROORGANISMS AS STARTER CULTURE SOURCES FOR FERMENTATION OF KOMBUCHA TEA

Ha Thi Quyen*, Chu Duc Ha

VNU University of Engineering and Technology

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	29/5/2025	This study aims to select symbiotic microorganisms capable of fermenting sweet tea. From isolated microorganisms, QS1, QS6, and QS7 strains exhibited the best sugar fermentation capability. QA1, QA4, and QA5 strains grew and reduced pH the fastest in culture medium containing a high alcohol concentration. QL2, QL3, and QL5 strains grew and reduced pH the fastest in culture medium. Symbiotic microorganisms consisting of 3 strains belonging to the three above-mentioned groups were created randomly to ferment sweet tea. The results showed that the microorganisms consisting of QS7+QA1+QL3 had the fastest ability to reduce pH and Brix in sweet tea, and the fermented tea water had the highest microbial density even when the pH in the tea water was very low. Strain QS7 was identified as belonging to <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , strain QA1 belonging to <i>Komagataeibacter xylinus</i> and strain QL3 belonging to <i>Lactobacillus acidophilus</i> . These strains were stored for developing a starter culture to be easy for fermentation of Kombucha.
Revised:	30/10/2025	
Published:	31/10/2025	
KEYWORDS		
Kombucha		
Fermented tea		
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		
<i>Komagataeibacter xylinus</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN HỆ VI SINH VẬT CỘNG SINH LÀM NGUỒN GIỐNG KHỞI ĐỘNG TRONG LÊN MEN TRÀ KOMBUCHA

Hà Thị Quyen*, Chu Đức Hà

Trường Đại học Công nghệ - ĐH Quốc gia Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO		TÓM TẮT
Ngày nhận bài:	29/5/2025	Nghiên cứu này nhằm tuyển chọn hệ vi sinh vật gồm nấm men, vi khuẩn acetic và vi khuẩn lactic có khả năng cộng sinh lên men trà kombucha. Từ các chủng vi sinh vật phân lập được, xác định chủng QS1, QS6 và QS7 có khả năng lên men đường tốt nhất; chủng QA1, QA4 và QA5 có khả năng sinh trưởng và làm giảm pH nhanh nhất trong môi trường chứa nồng độ ethanol cao; chủng QL2, QL3 và QL5 có khả năng sinh trưởng và làm giảm pH môi trường nhanh nhất. Hệ vi sinh vật ngẫu nhiên được tạo gồm ba chủng thuộc ba nhóm vi sinh vật kể trên để thực hiện lên men nước trà đường. Kết quả cho thấy hệ vi sinh vật gồm QS7+QA1+QL3 có khả năng làm giảm pH, giảm độ Brix trong nước trà đường nhanh nhất, đồng thời nước trà lên men có mật độ vi sinh vật cao nhất ngay cả khi pH trong nước trà giảm rất thấp. Chủng QS7 được xác định thuộc loài <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , chủng QA1 thuộc loài <i>Komagataeibacter xylinus</i> và chủng QL3 thuộc loài <i>Lactobacillus acidophilus</i> . Các chủng này được lưu trữ để phát triển nguồn giống khởi động dễ dàng cho việc lên men trà kombucha.
Ngày hoàn thiện:	30/10/2025	
Ngày đăng:	31/10/2025	
TỪ KHÓA		
Kombucha		
Trà lên men		
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		
<i>Komagataeibacter xylinus</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12917>

* Corresponding author. Email: quyenht@vnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Trà lên men (kombucha) là một loại đồ uống được lên men bởi hệ vi sinh vật cộng sinh gồm nấm men và vi khuẩn [1]. Trong y học cổ truyền Trung Quốc, trà kombucha còn được gọi là “Trà bất tử” hay “Thuốc trường sinh” [2]. Trong thức uống này chứa phổ biến các loại acid hữu cơ gồm acid gluconic, glucuronic, lactic, acetic, malic, tartaric, malonic, citric, oxalic; chứa ethanol; acid amin tan trong nước; vitamin; một số enzyme thủy phân; polyphenol; chất chống oxy hóa khác và các vi sinh vật có lợi [3], [4]. Một số nghiên cứu khoa học đã chứng minh lợi ích về sức khỏe của trà lên men như: Làm giảm cholesterol, tránh xơ vữa động mạch, giảm huyết áp, giải độc gan cũng như thanh lọc độc tố trong cơ thể [5]. Acid glucuronic có trong trà lên men có tác dụng giúp gan thải độc tố, hỗ trợ bài tiết, hỗ trợ hệ miễn dịch giúp tăng cường sức khỏe, đặc biệt giảm nồng độ acid uric trong máu giúp điều trị bệnh Gout [6].

Bí quyết thành công lên men kombucha là nhờ vào các chủng vi sinh vật gồm nấm men và vi khuẩn cộng sinh với nhau [7]. Trong quá trình lên men, hệ vi sinh vật sẽ hình thành nên màng cellulose được gọi là màng SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) [8]. Hệ vi sinh vật trong trà lên men rất đa dạng, có thể kể đến các chủng vi khuẩn sinh acid acetic như: *Acetobacter xylinum* (gọi là *Komagataeibacter xylinus*), *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter potus*, *Komagataeibacter kombuchae*, *Gluconacetobacter sacchari*; một số loài nấm men phổ biến như: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*... [9]; các chủng vi khuẩn lactic thuộc chi *Lactobacillus*, *Pediococcus*,... cũng góp phần làm đa dạng số lượng các chủng vi sinh có trong trà lên men [10].

Nấm men chuyển hóa đường trong nước trà đường thành ethanol và CO₂; vi khuẩn acid acetic oxy hóa ethanol thành acid acetic. Ngoài ra còn sự tham gia của vi khuẩn lactic tạo nên hương vị độc đáo và mang lại lợi ích cho sức khỏe thông qua việc lên men tạo nên acid lactic hoặc nhiều acid hữu cơ khác. Sự hiện diện của vi khuẩn lactic trong quá trình lên men kombucha làm tăng cường sản sinh acid D-saccharic 1,4 lactone (DSL) và acid glucuronic [11]. DSL có đặc tính giải độc và có thể là một yếu tố quan trọng góp phần vào hoạt động bảo vệ gan của kombucha [12].

Sản xuất kombucha có thể sử dụng dịch trà môi (Kombucha start culture/Kombucha primer) và màng SCOBY [13]. Tuy nhiên, trong công nghệ lên men, việc tìm kiếm các chủng giống vi sinh vật làm nguồn giống khởi động nhằm lên men thu nhận sản phẩm ổn định là thao tác rất quan trọng hướng tới áp dụng trong quy mô sản xuất lớn. Vì vậy, trong nghiên cứu này, hệ vi sinh vật cộng sinh gồm nấm men, vi khuẩn acetic và vi khuẩn lactic được nghiên cứu tuyển chọn nhằm cho mục đích tạo nguồn giống khởi động cho lên men trà kombucha.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nguồn mẫu phân lập vi sinh: Nước trà lên men (kombucha) thu thập từ hộ gia đình ở Hà Nội.

Môi trường nuôi cấy vi sinh: Môi trường Hansen cho phân lập và nuôi cấy nấm men; môi trường YPG (Yeast extract – Peptone – Glucose) cho phân lập và nuôi cấy vi khuẩn acid acetic (để phân lập bổ sung 0,5% CaCO₃); môi trường MRS (De Man – Rogosa – Sharpe) cho phân lập và nuôi cấy vi khuẩn lactic (để phân lập bổ sung 0,5% CaCO₃); môi trường PCA (Plate Count Agar) cho mục đích xác định vi khuẩn hiếu khí tổng số.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng vi sinh vật: Đồng nhất 1 ml mẫu nước trà lên men trong 9 ml nước cất khử trùng để pha loãng mẫu (10⁻¹), độ pha loãng từ 10⁻¹ đến 10⁻⁷. Cấy trải 100 µl mẫu pha loãng 10⁻⁶ và 10⁻⁷ trên đĩa thạch chứa môi trường Hansen, YPG + CaCO₃, MRS + CaCO₃ đã vô trùng. Ủ các đĩa ở 30°C trong ít nhất 72 giờ (môi trường Hansen) và 48 giờ (môi trường YPG và MRS) đến khi xuất hiện các khuẩn lạc. Trên môi trường Hansen, chọn các khuẩn lạc lớn trung bình màu trắng đục, hình tròn, nhô cao, mép trơn nhẵn, bề mặt khô; trên môi trường YPG, chọn các khuẩn lạc nhỏ,

trắng đục, lồi, bờ viền đều, có vòng phân giải CaCO_3 xung quanh khuẩn lạc; trên môi trường MRS, chọn các khuẩn lạc nhỏ, trắng ngà, bờ láng, lồi, có vòng phân giải CaCO_3 . Tách riêng rẽ các khuẩn lạc đã lựa chọn sang môi trường tương ứng để tiến hành phân loại sơ bộ.

Xác định khả năng lên men đường tạo CO_2 của nấm men: Chuyển 1 ml dịch huyền phù các chủng nghi ngờ là nấm men vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch đường saccharose 2% có ống Durham úp ngược đã khử trùng ở 115°C trong 10 phút, ủ ở 30°C trong 3 ngày. Dựa vào chiều cao cột khí sinh ra trong ống Durham úp ngược để đánh giá khả năng lên men đường tạo CO_2 của chủng vi sinh [14].

Xác định khả năng sinh catalase [15]: Nhỏ vài giọt H_2O_2 3% lên khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn đang phát triển trên bề mặt thạch. Nếu bọt khí xuất hiện thì chủng đó có catalase dương tính (nghi ngờ là vi khuẩn acetic), ngược lại nếu không có bọt khí xuất hiện thì chủng vi khuẩn có catalase âm tính (nghi ngờ là vi khuẩn lactic).

Xác định khả năng sinh trưởng và sinh acid trong môi trường nuôi cấy: Các chủng nghi ngờ là vi khuẩn acetic được nuôi cấy trong môi trường YPG dịch thể có nồng độ ethanol 10%; các chủng nghi ngờ là vi khuẩn lactic được nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể. Tỷ lệ cấy giống 10%, lắc 150 vòng/phút ở 30°C trong 5 ngày. Sử dụng máy đo pH để xác định khả năng sinh acid mỗi ngày và xác định số lượng khuẩn lạc vi sinh vật sau 5 ngày nuôi cấy.

Xác định số lượng vi sinh vật: Số lượng vi sinh vật (CFU) trong 1 ml mẫu trà lên men hoặc dịch huyền phù nuôi cấy vi sinh vật được xác định theo phương pháp pha loãng tới hạn và đếm khuẩn lạc. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Lên men trà kombucha từ các hệ vi sinh vật nấm men và vi khuẩn: Các chủng được nuôi trên các môi trường tương ứng để thu sinh khối bằng ly tâm. Rửa sinh khối bằng nước cất vô trùng 2 lần, hòa lại sinh khối bằng nước cất vô trùng để đạt mật độ vi sinh vật 10^6 CFU/ml. Phối trộn hệ vi sinh vật gồm ba chủng theo tỷ lệ 1:1:1 để thử nghiệm lên men trà kombucha.

Dịch trà đen được chiết trong nước nóng 15 – 20 phút (5g trà đen/1 lít nước đun sôi) bổ sung 10% đường saccharose, lọc bỏ cặn trà và để nguội dịch trà. Bổ sung các hệ vi sinh vật giống đã chuẩn bị theo tỷ lệ 5%. Lên men tĩnh trong 5 ngày ở điều kiện nhiệt độ $30 - 35^\circ\text{C}$. Kiểm tra pH, độ Brix của mẫu trà lên men theo từng ngày và xác định số lượng vi sinh vật hiếu khí tổng số. Mỗi hệ vi sinh vật lên men trà được lặp lại 3 lần.

Định danh loài các chủng vi sinh vật: Chủng nghi ngờ là nấm men được đọc trình tự gen 18S rRNA; chủng nghi ngờ là vi khuẩn acetic và vi khuẩn lactic được đọc trình tự 16S rRNA và so sánh với các trình tự tương đồng trên Ngân hàng gen. Phần mềm MEGA12 được sử dụng để so sánh và xây dựng cây phát sinh chủng loại định danh đến loài các chủng vi sinh vật.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và Irristat 5.0.

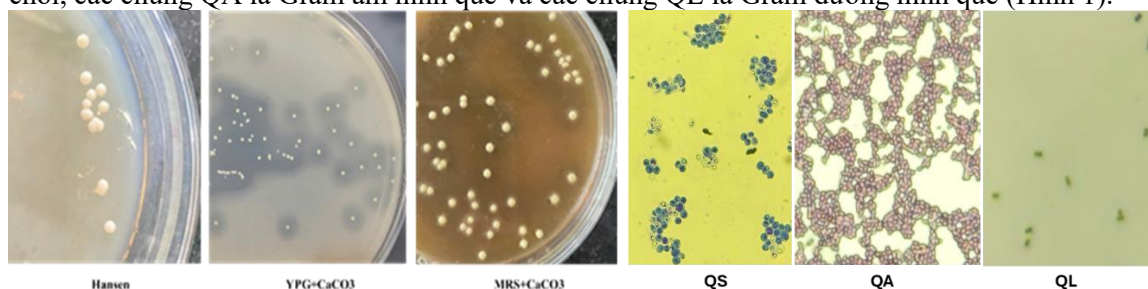
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập các chủng vi sinh vật

Để phân lập và tìm kiếm các chủng vi sinh vật nhằm mục đích sàng lọc, lựa chọn được hệ vi sinh vật cộng sinh tạo bộ giống khởi động ứng dụng trong sản xuất trà lên men thì nguồn mẫu lựa chọn tốt nhất chính là các mẫu trà đã lên men. Trên môi trường Hansen, chọn 7 chủng có kích thước khuẩn lạc lớn, màu trắng đục, ký hiệu từ QS1 đến QS7. Trên môi trường YPG, lựa chọn 5 chủng có khả năng phân giải CaCO_3 tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc, ký hiệu từ QA1 đến QA5. Trên môi trường MRS, lựa chọn 5 chủng có khả năng phân giải CaCO_3 tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc, ký hiệu từ QL1 đến QL5. Các chủng lựa chọn được cấy riêng rẽ trên các môi trường tương ứng để tạo chủng thuần.

Quan sát trên môi trường nuôi cấy Hansen, các chủng QS đều có khuẩn lạc lớn trung bình, màu trắng đến trắng đục, bề mặt khô, mô cao. Quan sát khuẩn lạc các chủng QA trên môi trường YPG, khuẩn lạc có kích thước nhỏ, màu trắng đục, viền đều, có khả năng phân giải CaCO_3 tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc. Các khuẩn lạc QL trên môi trường MRS cũng có kích thước nhỏ, trắng ngà,

bờ láng, lõi, có khả năng phân giải CaCO_3 . Hình thái tế bào các chủng QS đều có hình cầu và nảy chồi, các chủng QA là Gram âm hình que và các chủng QL là Gram dương hình que (Hình 1).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào các chủng QS, QA và QL

3.2. Khả năng lên men đường tạo CO_2 của các chủng QS

Trong quá trình lên men tạo trà kombucha, nhiều chỉ vi khuẩn acetic ưu tiên sử dụng ethanol để chuyển hóa thành acid acetic hơn là sử dụng glucose hay saccharose [16]. Trong khi đó, việc tạo ethanol trong lên men trà chủ yếu là do nấm men đảm nhận. Đường saccharose sử dụng cho thí nghiệm này bởi vì đây là loại đường thường được sử dụng trong lên men trà kombucha, nấm men chuyển hóa saccharose thành fructose và glucose, tiếp đó chuyển hóa fructose thành ethanol và CO_2 , còn glucose có thể được vi khuẩn acetic chuyển hóa thành acid gluconic và glucuronic [17]. Độ cao cột khí CO_2 được tạo ra trong ống Durham là dấu hiệu để xác định sơ bộ chủng nấm men và đồng thời xác định xem chủng nào có khả năng sinh CO_2 mạnh nhất (có khả năng lên men đường tốt nhất). Kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng sinh CO_2 khi lên men đường saccharose của các chủng QS

Tên chủng	Chiều cao cột khí trong ống Durham (cm)		
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
QS1	$0,30 \pm 0,08^a$	$1,10 \pm 0,22^b$	$3,00 \pm 0,00^a$
QS2	0	$1,20 \pm 0,08^b$	$1,30 \pm 0,08^c$
QS3	0	0	$0,30 \pm 0,08^d$
QS4	0	$1,10 \pm 0,16^b$	$2,50 \pm 0,08^b$
QS5	0	$0,60 \pm 0,08^c$	$2,50 \pm 0,08^b$
QS6	$0,50 \pm 0,08^a$	$2,50 \pm 0,08^a$	$3,00 \pm 0,00^a$
QS7	$0,40 \pm 0,01^a$	$2,50 \pm 0,08^a$	$2,80 \pm 0,08^b$
LSD5%	0,72	0,20	0,12

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau đi theo giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p\text{-value} < 0,05$

Bảng 1 cho thấy 7 chủng QS đều sinh khí CO_2 khi lên men nước đường saccharose. Trong đó, các chủng QS1, QS6 và QS7 có chiều cao cột khí đạt hết hoặc gần hết chiều cao ống Durham (3 cm) sau 3 ngày, trong đó chủng QS6 có chiều cao cột khí đạt hết ống Durham sớm nhất.

3.3. Khả năng sinh trưởng trên môi trường có nồng độ ethanol cao của các chủng QA

Cả hai nhóm vi khuẩn acetic và vi khuẩn lactic đều có khả năng sinh acid, tuy nhiên để phân biệt chúng, có thể dựa vào đặc điểm catalase dương tính của vi khuẩn acetic [18] và âm tính của vi khuẩn lactic [19]. Sự có mặt của catalase được xác định nhờ vào khả năng tạo bọt khí khi nhỏ H_2O_2 3% lên khuẩn lạc vi khuẩn đang được nuôi trên đĩa thạch (có thể quan sát được bằng mắt thường) [15], [20]. Toàn bộ 5 chủng QA đều thể hiện catalase dương tính và các chủng này được tiến hành xác định khả năng sinh trưởng trên môi trường YPG chứa 10% ethanol thông qua khả năng sinh acid làm giảm pH của môi trường nuôi cấy.

Bảng 2 cho thấy 5 chủng QA đều có khả năng làm giảm pH môi trường ban đầu (5,36) xuống còn 2,80 – 2,86 sau 3 ngày nuôi cấy. Độ pH giảm nhanh chứng tỏ các chủng QA có khả năng sinh

trường tốt trong điều kiện nồng độ cồn cao để sinh ra acid. Trong đó, chủng QA4 làm giảm pH khá mạnh, từ 3,48 sau ngày thứ nhất đến 2,80 sau ngày thứ ba, tiếp đến là các chủng QA5 làm giảm pH từ 3,57 sau ngày thứ nhất đến 2,81 sau ngày thứ ba; chủng QA1 có pH giảm từ 3,55 đến 2,82 sau 3 ngày nuôi cấy. Số lượng khuẩn lạc của các chủng QA1, QA4 và QA5 cũng đạt cao nhất, lần lượt là $4,48 \times 10^9$; $3,84 \times 10^9$ và $3,56 \times 10^9$ CFU/ml, nên ba chủng này được lưu trữ và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Khả năng sinh acid của các chủng QA trong môi trường chứa nồng độ ethanol cao

Tên chủng	pH môi trường sau các ngày nuôi cấy			Số lượng khuẩn lạc (CFU/ml)
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	
QA1	$3,55 \pm 0,04^a$	$3,08 \pm 0,01^a$	$2,82 \pm 0,03^a$	$4,48 \times 10^9$
QA2	$3,58 \pm 0,01^a$	$3,11 \pm 0,04^a$	$2,84 \pm 0,03^a$	$3,07 \times 10^9$
QA3	$3,49 \pm 0,06^a$	$3,14 \pm 0,01^a$	$2,84 \pm 0,02^a$	$2,87 \times 10^9$
QA4	$3,48 \pm 0,08^a$	$3,06 \pm 0,02^a$	$2,80 \pm 0,03^a$	$3,84 \times 10^9$
QA5	$3,57 \pm 0,04^a$	$3,09 \pm 0,02^a$	$2,81 \pm 0,04^a$	$3,56 \times 10^9$
LSD5%	0,63	0,58	0,59	

Trong lên men trà kombucha, ethanol do nấm men sinh ra được vi khuẩn acetic chuyển hóa để tạo ra acid acetic, do đó làm giảm hàm lượng ethanol trong kombucha và nồng độ ethanol thấp tạo điều kiện cho sự hình thành màng cellulose bởi vi khuẩn acetic – đây là một đặc trưng của lên men trà kombucha [16]. Như vậy, chủng vi khuẩn acetic sử dụng trong lên men trà kombucha cần có đặc tính sinh trưởng tốt trong môi trường chứa nồng độ ethanol cao, điều này giúp cho quá trình lên men trà được thuận lợi và hiệu quả hơn.

3.4. Khả năng sinh acid của các chủng QL

Cả 5 chủng QL tách ra từ môi trường MRS đều cho thấy có đặc điểm catalase âm tính khi thử với H_2O_2 3%. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh acid của các chủng này thể hiện ở bảng 3. Các chủng QL sinh trưởng trên môi trường MRS dịch thể đều có khả năng sinh acid thể hiện ở độ pH giảm so với pH môi trường ban đầu (5,99). Sau 4 ngày nuôi cấy, các chủng làm giảm độ pH của môi trường nuôi cấy xuống còn 3,75 - 3,97. Các chủng QL đều có khả năng sinh acid tương đương nhau. Tuy nhiên, chủng QL2, QL3 và QL5 có tốc độ giảm pH tương đối nhanh và số lượng khuẩn lạc cũng đạt cao hơn các chủng còn lại nên các chủng này được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3. Khả năng sinh acid của các chủng QL

Tên chủng	pH môi trường sau các ngày nuôi cấy				Số lượng khuẩn lạc (CFU/ml)
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	
QL1	$5,90 \pm 0,02^a$	$5,32 \pm 0,02^a$	$4,68 \pm 0,02^a$	$3,97 \pm 0,02^a$	$3,54 \times 10^9$
QL2	$5,82 \pm 0,06^a$	$4,92 \pm 0,06^a$	$4,08 \pm 0,01^a$	$3,77 \pm 0,02^a$	$4,05 \times 10^9$
QL3	$5,85 \pm 0,04^a$	$4,95 \pm 0,02^a$	$4,10 \pm 0,02^a$	$3,77 \pm 0,02^a$	$4,87 \times 10^9$
QL4	$5,85 \pm 0,02^a$	$4,95 \pm 0,01^a$	$4,11 \pm 0,02^a$	$3,79 \pm 0,02^a$	$3,57 \times 10^9$
QL5	$5,77 \pm 0,02^a$	$4,90 \pm 0,02^a$	$4,07 \pm 0,09^a$	$3,75 \pm 0,04^a$	$3,99 \times 10^9$
LSD5%	0,52	0,51	0,84	0,42	

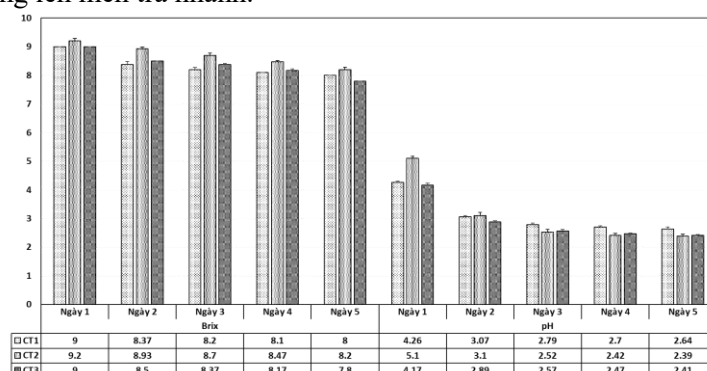
Vi khuẩn lactic được cho là không cần thiết cho quá trình sản xuất kombucha, nhưng trong một số sản phẩm kombucha, vi khuẩn lactic được báo cáo có thể chiếm tới 30% cộng đồng vi khuẩn có trong sản phẩm này [10], [21]. Việc bổ sung một số chủng vi khuẩn lactic như *Lactocaseibacillus casei* và *Lactiplantibacillus plantarum* làm tăng cường hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn của kombucha và sự hiện diện của vi khuẩn lactic trong quá trình lên men làm tăng sản sinh acid D-saccharic 1,4 lactone (DSL) và acid glucuronic có đặc tính giải độc bảo vệ gan, tăng cường miễn dịch và giảm acid uric [12], [22].

3.5. Lựa chọn hệ vi sinh vật cộng sinh lên men trà kombucha

Từ 3 chủng QS (QS1, QS6 và QS7), 3 chủng QA (QA1, QA4 và QA5) và 3 chủng QL (QL2, QL3 và QL5), tạo ngẫu nhiên 3 hệ vi sinh vật, bao gồm CT1 (QS1 + QA4 + QL2), CT2 (QS6 +

QA5 + QL5) và CT3 (QS7 + QA1 + QL3) để lên men trà kombucha như trình bày trong phần phương pháp. Một số đặc điểm của dịch trà lên men như pH, độ Brix, mật độ vi sinh vật được khảo sát và trình bày trong Hình 2.

Độ pH của môi trường nước trà đường trước khi lên men là 5,54; sau khi lên men bằng các hệ vi sinh vật, pH của trà đều có xu hướng giảm. Sau một ngày lên men, CT3 có pH giảm mạnh nhất đạt 4,17, tiếp theo là đến CT1 có pH giảm còn 4,26 và cuối cùng là CT2 có pH giảm còn 5,10. Sau 2 ngày lên men, pH ở các công thức đã giảm dao động từ 2,89 – 3,10. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tổ hợp xuất hiện trong 2 ngày lên men đầu. Theo một số nghiên cứu trước đây, trà lên men thường có pH dao động từ 3 – 4 là đạt được độ cảm quan cũng như mùi vị của sản phẩm, nếu pH giảm thấp quá có thể dẫn tới độ chua quá không phù hợp hoặc pH lớn hơn 4 có thể dễ gây hỏng sản phẩm [20], [23]. Vì vậy, trong thí nghiệm này, các tổ hợp vi sinh vật có thể làm giảm pH trong khoảng từ 3 - 4 chỉ sau 2 ngày lên men. Điều này cho thấy các tổ hợp vi sinh vật này đều có khả năng lên men trà nhanh.



Hình 2. pH và độ Brix của trà lên men bằng các hệ vi sinh vật

pH giảm đồng nghĩa với độ Brix giảm. Độ Brix của nước trà trước khi lên men là 11°Bx; sau khi lên men, độ Brix của các mẫu trà giảm rõ rệt, giảm mạnh nhất ở CT1 là 8,37°Bx trong ngày lên men thứ 2, sau đó đến CT3 và CT2 lần lượt là 8,50°Bx và 8,93°Bx. Một nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra độ Brix của trà lên men từ giá trị 10,2 ban đầu giảm xuống còn từ 5 - 7,5 sau 3 ngày khi sử dụng các hệ vi sinh vật cộng sinh gồm nấm men + vi khuẩn acetic + vi khuẩn lactic khác nhau [8].

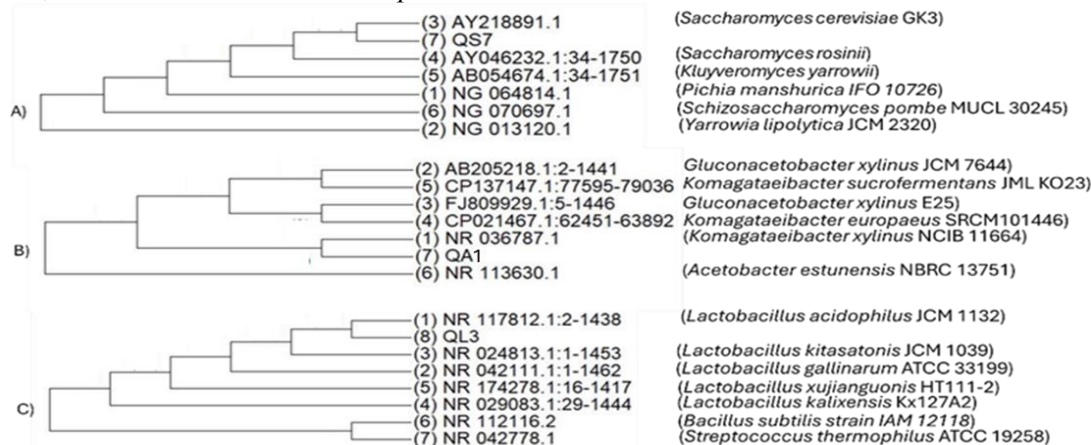
Trong quá trình lên men dịch trà đường bằng ba hệ vi sinh vật đều xuất hiện một lớp màng cellulose dai và dày lên theo các ngày lên men. Đây cũng là một đặc điểm đặc trưng của lên men trà kombucha do hoạt động của vi khuẩn acetic. Vi sinh vật hiếu khí tổng số trong dịch trà lên men từ ba hệ vi sinh vật được xác định trong 5 ngày lên men lần lượt đạt $2,3 \times 10^{11}$; $1,1 \times 10^{11}$ và $7,6 \times 10^{11}$ CFU/ml. Mặc dù pH trong ngày lên men thứ 5 ở CT3 khá thấp (2,41) nhưng mật độ vi sinh vật vẫn cao nhất, điều này chứng tỏ các chủng vi sinh vật ở CT3 có khả năng chịu môi trường acid tốt. Vì vậy, hệ vi sinh vật ở CT3 gồm chủng QS7, QA1 và QL3 sẽ phù hợp cho mục đích làm nguồn giống khởi động.

3.6. Định danh các chủng QS7, QA1 và QL3 đến loài

Chủng QS7 nghi ngờ là nấm men được phân lập gene 18S rRNA; chủng QA1 và QL3 được phân lập gene 16S rRNA. Các trình tự này được so sánh với các trình tự tương đồng trong Ngân hàng gen và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA12 theo phương pháp Neighbor-Joining. Khoảng cách di truyền trên cây phát sinh chủng loại được tính bằng phương pháp p-distance và tính theo đơn vị số lượng khác biệt về base trên mỗi vị trí (Hình 3).

Trình tự gen 18S rRNA chủng QS7 tương đồng 99,59% với trình tự gen 18S rRNA của chủng *S. cerevisiae* GK3, mã số đăng ký AY218891.1; trình tự gen 16S rRNA của chủng QA1 tương đồng 99,31% với trình tự gen 16S rRNA của chủng *K. xylinus* NCIB 11664, mã số đăng ký

NR_036787.1; trình tự gen 16S rRNA của chủng QL3 tương đồng 99,29% với trình tự gen của chủng *L. acidophilus* JCM 1132, mã số đăng ký NR_117812.1. Qua đó có thể xác định chủng QS7 thuộc loài nấm men *S. cerevisiae*, chủng QA1 thuộc loài vi khuẩn acetic *K. xylinus* và chủng QL3 thuộc loài vi khuẩn lactic *L. acidophilus*.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại chủng QS7 (A), QA1 (B) và QL3 (C)

4. Kết luận

Từ các chủng vi sinh vật phân lập được, đã tuyển chọn được hệ vi sinh vật gồm chủng QS7 thuộc loài *S. cerevisiae*, chủng QA1 thuộc loài *K. xylinus* và chủng QL3 thuộc loài *L. acidophilus*, có khả năng lên men nước trà đường tốt nhất thông qua việc làm giảm pH, giảm độ Brix nhanh nhất và có số lượng vi sinh vật hiếu khí tổng số lớn nhất. Điều này cho thấy hệ vi sinh vật này phù hợp cho việc làm nguồn giống khởi động trong lên men trà kombucha.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội theo đề tài mã số CN24.19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] R. Jayabalan, R. V. Malbasa, E. S. Loncar, J. S. Vitas, and M. Sathishkumar, "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] M. Soltani, M. Farshadfar, H. Shirvani, and A. Yaghotipoor, "Evaluation of the antibacterial effect of a beneficial compound based on the probiotic kombucha and honey," *Honeybee Science Journal*, vol. 11, no. 21, 2021, doi: 10.22092/hbsj.2021.125166.
- [3] R. Malbaša, E. Lončar, and M. Djurić, "Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses," *Food Chemistry*, vol. 106, no. 3, pp. 1039-1045, 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.020.
- [4] R. V. Malbaša, E. S. Lončar, J. S. Vitas, and J. M. Čanadanović-Brunet, "Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage," *Food Chemistry*, vol. 127, no. 4, pp. 1727-1731, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.048.
- [5] R. Jayabalan, P. Subathradevi, S. Marimuthu, M. Sathishkumar, and K. Swaminathan, "Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation," *Food Chemistry*, vol. 109, no. 1, pp. 227-234, 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.037.
- [6] I. Vīna, R. Linde, A. Patetko, and P. Semjonovs, "Glucuronic acid from fermented beverages: Biochemical functions in humans and its role in health protection," *International Journal of Recent Research and Applied Studies*, vol. 14, pp. 217-230, 2013.

- [7] Z. Trivunović, J. Vitas, V. Puškaš, I. Zahović, M. Zeljko, R. Malbaša, and J. Dodić, "Herbal kombucha vinegar: Biotechnological perspective, biological potential and sensory evaluation," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 101, 2025, Art. no. 03955, doi: 10.1016/j.ifset.2025.103955.
- [8] B. Vohra¹, S. Fazry, F. Sairi, and B. A. Othman, "Effects of Medium Variation and Fermentation Time Towards the pH Level and Ethanol Content of Kombucha," *AIP Conference Proceedings*, vol. 2111, 2019, Art. no. 040008, doi: 10.1063/1.5111247.
- [9] B. Wang, K. Rutherford-Markwick, X. -X. Zhang, and A. N. Mutukumira, "Isolation and characterisation of dominant acetic acid bacteria and yeast isolated from Kombucha samples at point of sale in New Zealand," *Current Research in Food Science*, vol. 5, pp. 835–844, 2022.
- [10] N. K. Nguyen, N. T. Dong, H. T. Nguyen, and P. H. Le, "Lactic acid bacteria: Promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha," *Springerplus*, vol. 4, 2015, Art. no. 91.
- [11] Z. Yang, F. Zhou, B. Ji, B. Li, Y. Luo, L. Yang, and T. Li, "Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 160, pp. 446–455, 2010.
- [12] Y. Wang, B. Ji, W. Wu, R. Wang, Z. Yang, D. Zhang, and W. Tian, "Hepatoprotective effects of kombucha tea: Identification of functional strains and quantification of functional components," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 94, pp. 265–272, 2014.
- [13] S. Chakravorty, S. Bhattacharya, A. Chatzinotas, W. Chakraborty, D. Bhattacharya, and R. Gachhui, "Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 220, pp. 63–72, 2016.
- [14] T. P. D. Ngo, P. Thanonkeo, and X. P. Huynh, "Screening useful isolated yeasts for ethanol fermentation at high temperature," *International Journal of Applied Science and Technology*, vol. 2, no. 4, pp. 65–71, 2012.
- [15] K. Reiner, *Catalase Test Protocol*, American Society for Microbiology, 2010.
- [16] D. Laureys, S. J. Britton, and J. De Clippeleer, "Kombucha tea fermentation: A review," *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 78, pp. 165–174, 2020.
- [17] S. A. Villarreal-Soto, S. Beaufort, J. Bouajila, J. P. Souchard, and P. Taillandier, "Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review," *Journal of Food Science*, vol. 83, pp. 580–588, 2018.
- [18] Y. Yamada and P. Yukphan, "Genera and species in acetic acid bacteria," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125, no. 1, pp. 15–24, 2008, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077.
- [19] M. P. Mokoena, C. A. Omatola, and A. O. Olaniran, "Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens," *Molecules*, vol. 26, no. 22, 2021, Art. no. 7055, doi: 10.3390/molecules26227055.
- [20] T. K. N. Tran and T. H. Nguyen, "Optimizing fermentation conditions for Kombucha tea rich in glucuronic acid from artichokes," (in Vietnamese), *HCMUE Journal of Science*, vol. 14, no. 6, pp. 193–200, 2017.
- [21] C. F. Diguta, G. D. Nitoi, F. Matei, G. Luta, and C. P. Cornea, "The Biotechnological Potential of *Pediococcus* spp. Isolated from Kombucha Microbial Consortium," *Foods*, vol. 9, 2020, Art. no. 1780.
- [22] Z. Yang, F. Zhou, B. Ji, B. Li, Y. Luo, L. Yang, and T. Li, "Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 160, pp. 446–455, 2010.
- [23] T. P. Nguyen and T. H. Nguyen, "Isolation and selection of symbiotic system between yeast and bacteria in fermented kombucha tea to increase glucuronic acid content," (in Vietnamese), *CTU Journal of Science*, vol. 54, no. 1B, pp. 13–19, 2018.