

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH LÊN MEN CHÈ ĐEN BẰNG VI KHUẨN LACTIC

OPTIMIZATION OF BLACK TEA FERMENTATION BY LACTIC ACID BACTERIA

*Nguyễn Việt Tấn**
Nguyễn Duy Lâm†

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 03/06/2021

Ngày nhận kết quả phản biện đánh giá: 02/12/2021

Ngày bài báo được duyệt đăng: 27/12/2021

Tóm tắt: Nghiên cứu này đã xác định được các điều kiện tối ưu để lên men tạo chè đen từ chè Phúc Vân Tiên được thu hoạch trong tháng 9/2021 như sau: tỷ lệ giống vi khuẩn lactic khởi động là 2 - 4%, thời gian lên men là 6-8 giờ, nhiệt độ lên men là 25 – 27°C. Ở điều kiện này, hàm lượng GABA trong chè đen đạt trên 203 mg/100g, các chỉ tiêu cảm quan như mùi hương và vị chè đạt chất lượng tốt nhất và hài hòa nhất.

Từ khóa: Chè đen, GABA, lên men yếm khí, chỉ tiêu cảm quan chất lượng chè.

Abstract: This study has determined the optimal conditions for fermenting black tea from Phuc Van Tien tea harvested in September 2021 as follows: concentration of lactic bacteria is 2-4%, fermentation time is 6-8 hours, fermentation temperature is 25-27°C. Under this condition, the GABA content in black tea reached over 203 mg/100g, the sensory criteria of tea quality including aroma and taste were the best and most harmonious.

Keywords: Black tea, GABA, anaerobic fermentation, sensory quality criteria of tea quality.

I. Đặt vấn đề

Chè là nguyên liệu chế biến uống không còn được tiêu thụ rộng rãi nhất trên thế giới. Các nghiên cứu gần đây cho thấy rằng chè không chỉ góp phần giảm nguy cơ tim mạch bệnh tật và một số dạng ung thư mà còn mang lại những lợi ích như vệ sinh răng miệng, giảm cao huyết áp, giảm cân, kháng khuẩn, kháng virus [1,

2]. Trong những năm gần đây, con người ngày càng có nhu cầu nhiều hơn về các sản phẩm chăm sóc sức khỏe có nguồn gốc từ thiên nhiên, chè giàu GABA thu hút sự quan tâm của người tiêu dùng do có nhiều tác dụng tốt, bao gồm giảm huyết áp, giảm hàm lượng đường trong máu, chống lại các bệnh ung thư, giảm căng thẳng thần kinh và chống lại sự mệt mỏi [3, 4].

* Vụ Khoa học và Công nghệ, Bộ Công Thương

† Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu làm giàu GABA trong sản phẩm chè được thực hiện dựa trên các kỹ thuật lên men với các chủng xạ khuẩn *S. bacillaris*, *S. cinereus* [5] hoặc *Lactobacillus plantarum* subsp., *Streptococcus thermophilus* (*Streptococcus thermophilus*), *Lactobacillus brevis* (*L. Lactobacillus brevis*) [6]. Nghiên cứu này được thực hiện tiếp theo nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả về việc sử dụng vi khuẩn lactic để lên men chè với mục đích xác định các điều kiện tối ưu của quá trình lên men, bao gồm lượng giống vi khuẩn, nhiệt độ lên men và thời gian lên men từ đó có căn cứ xây dựng quy trình sản xuất chè có hàm lượng cao của GABA.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

- Chè Phúc Vân Tiên trồng tại Viện Khoa học Kỹ thuật Nông lâm miền núi phía Bắc, thu hoạch vào tháng 9/2021.

- Chủng giống vi khuẩn lactic: Bộ chủng giống của Bảo tàng giống chuẩn Việt nam, Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chế biến chè đen truyền thống của Việt Nam [7]

2.2.2. Phương pháp đánh giá cảm quan chè theo TCVN 3218:2012 [8]

2.2.3. Phương pháp tối ưu hoá các điều kiện lên men chè đen [9]

Quá trình tối ưu hóa sẽ thực hiện qua 3 bước với 3 thông số: lượng giống vi khuẩn khởi động, nhiệt độ lên men và thời gian lên men

Bước 1: Xác định các điều kiện để lượng GABA >203 mg/100g

a- Xác định ma trận thực nghiệm theo 3 yếu tố. Mỗi yếu tố thực hiện thí nghiệm ở 3 mức: mức dưới, mức cơ bản và mức trên. Tổng số thí nghiệm là 27.

b- Phân tích hàm lượng GABA ở 27 thí nghiệm chọn ra những thí nghiệm có hàm lượng GABA > 203 mg/100g

Bước 2. Xác định các điều kiện của thí nghiệm mà tại đó tổng giá trị của 3 mục tiêu bài toán (hàm lượng GABA, chỉ tiêu hương và vị của sản phẩm) đạt tốt nhất

a- Lặp lại các thí nghiệm đã lựa chọn được ở nội dung b bước 1, phân tích các chỉ tiêu cần tối ưu:

y_1 : hàm lượng GABA mg/100g

y_2 : điểm số về hương, không có thứ nguyên

y_3 : điểm số về vị, không có thứ nguyên.

b- Từ ma trận thực nghiệm ở bước 1:

- Xác định được giá trị lớn nhất và bé nhất của y_1 .

Từ kết quả thực nghiệm ở điểm a' của bước 2, xác định được:

- Xác định được giá trị lớn nhất và bé nhất của y_2 và y_3 .

- Chọn hệ số quan trọng của các mục tiêu:

$$d(y_1) = 1,3$$

$$d(y_2) = 1,0$$

$$d(y_3) = 1,0$$

- Tính tổng điểm của 3 mục tiêu.

- Lựa chọn thí nghiệm có tổng điểm cao nhất, xem là phương án tốt nhất.

Bước 3: Lập lại thí nghiệm với các giá trị của các yếu tố ở vùng lân cận để xác định điều kiện mà tại đó các chỉ tiêu cần tối ưu tiệm cận gần nhất đến khu vực tối ưu (tối ưu có điều kiện).

2.3. Phương pháp xác định hàm lượng GABA trong chè đen bằng phương pháp sắc ký HPLC

Cân chính xác 0,02g (\pm 0,001g) chè lên men, nghiền nhỏ và rây qua rây bột cho vào ống eppendorf rồi cho thêm 1mL methanol (MeOH) 50%. Mẫu được lắc vortex trong vòng 10 phút rồi ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút, thu dịch.

Hút 0,5mL dịch mẫu và bổ sung thêm 0,5mL 2- hydroxynaphthaldehyde 0,5%, 0,5mL đệm borat pH 8.0. Sau khi đun cách thủy ở 80°C trong 10 phút, hỗn hợp được để nguội trong bóng tối rồi ly tâm với tốc độ 1.2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C.

Dịch thí nghiệm được phân tích trên hệ thống HPLC, phân tích lặp lại 2 lần.

Các dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1074; 0,052; 0,026; 0,013 và 0,0065 mg/mL.

III. Kết quả nghiên cứu

3.1. Xác định giá trị các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men yếm khí tạo hàm lượng GABA cao trong sản phẩm.

- Lượng giống khởi động x_1 với các tỷ lệ bổ sung là:

$$x_1^- = 2\%, x_1^0 = 4\%, x_1^+ = 6\%$$

- Nhiệt độ lên men x_2 với các ngưỡng nhiệt độ là:

$$x_2^- = 23^\circ\text{C}, x_2^0 = 25^\circ\text{C}, x_2^+ = 27^\circ\text{C}$$

- Thời gian lên men x_3 với các khoảng thời gian lên men là:

$$x_3^- = 8 \text{ giờ}, x_3^0 = 10 \text{ giờ}, x_3^+ = 12 \text{ giờ}$$

Với 3 thông số tỷ lệ giống khởi động, nhiệt độ, thời gian lên men theo các ngưỡng nêu trên chúng tôi lập được ma trận thực nghiệm trực giao với 27 thí nghiệm, hàm lượng GABA của các thí nghiệm được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân tích hàm lượng GABA (mg/100g) của 27 mẫu thí nghiệm

STT	Điều kiện thí nghiệm	Lượng GABA (mg/100g)	STT	Điều kiện thí nghiệm	Lượng GABA (mg/100g)
1	$\bar{x}_1, \bar{x}_2, \bar{x}_3$:	198	15	x_1^0, x_2^+, x_3^0 :	228
2	x_1, x_2^0, x_3 :	201	16	x_1^+, \bar{x}_2, x_3^0 :	201
3	$\bar{x}_1, x_2^+, \bar{x}_3$:	205	17	x_1^+, x_2^0, x_3^0 :	205
4	$x_1^0, \bar{x}_2, \bar{x}_3$:	219	18	x_1^+, x_2^+, x_3^0 :	267
5	x_1, x_2^0, x_3 :	245	19	$\bar{x}_1, \bar{x}_2, x_3^+$:	211
6	x_1^0, x_2^+, \bar{x}_3 :	256	20	\bar{x}_1, x_2^0, x_3^+ :	208
7	$x_1^+, \bar{x}_2, \bar{x}_3$:	200	21	\bar{x}_1, x_2^+, x_3^+ :	216
8	x_1^+, x_2^0, \bar{x}_3 :	206	22	x_1^0, \bar{x}_2, x_3^+ :	226
9	x_1^+, x_2^+, x_3^+ :	257	23	x_1^0, x_2^+, x_3^+ :	213
10	$\bar{x}_1, \bar{x}_2, x_3^0$:	200	24	x_1^0, x_2^+, x_3^+ :	237
11	\bar{x}_1, x_2^0, x_3^0 :	204	25	x_1^+, x_2^-, x_3^+ :	260
12	\bar{x}_1, x_2^+, x_3^0 :	209	26	x_1^+, x_2^0, x_3^+ :	266

STT	Điều kiện thí nghiệm	Lượng GABA (mg/100g)	STT	Điều kiện thí nghiệm	Lượng GABA (mg/100g)
13	x^0_1, \bar{x}_2, x^0_3 :	213	27	x^+_1, x^+_2, x^+_3 :	282
14	$14/x^0_1, x^+_2, x^0_3$:	226			

Qua số liệu bảng 1, ta xác định được 22/27 thí nghiệm có hàm lượng GABA cao hơn 203 mg/100g, các thí nghiệm đó là: Số 3, số 4, số 5, số 6, số 8, số 9, số 11, số 12, số 13, số 14, số 15, số 17, số 18, số 19, số 20, số 21, số 22, số 23, số 24, số 25, số 26 và số 27. Loại bỏ những thí nghiệm mà tại đó, hàm lượng GABA chênh lệch so với mẫu đối chứng (203 mg/100g) quá ít, không có ý nghĩa nhiều về mặt công nghệ. Những mẫu đó là = 1, 2, 3, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21 và 23. Số mẫu còn lại (12 mẫu) tiếp tục được tiến hành khảo sát để tìm ra phương án tốt nhất, xét theo mối liên quan của cả 3 thông số tỷ lệ giống khởi động, nhiệt độ, thời gian lên men.

3.2. Xác định điều kiện lên men tối ưu để tạo sản phẩm chè đen có chất lượng tốt

3.2.1. Lựa chọn các mẫu vượt trội trong 12 mẫu được chọn

Mười hai (12) mẫu có hàm lượng GABA đạt yêu cầu được tiến hành phân tích cảm quan với 3 chỉ số chất lượng, cụ thể như sau:

y_1 : hàm lượng GABA, mg/100g.

y_2 : điểm cảm quan về hương, không có thứ nguyên

y_3 : điểm cảm quan về vị, không có thứ nguyên.

Đối với sản phẩm chè, tầm quan trọng của hương và vị được đánh giá ngang nhau, vì vậy chúng tôi chọn hệ số quan trọng $k = 1$; Hàm lượng GABA trong chè đen được xem là mục tiêu hướng tới của nghiên cứu, cho nên chỉ số này, được đánh giá về hệ số quan trọng $k = 1,4$. Kết quả phân tích 12 mẫu được thể hiện trên bảng 2.

Bảng 2: Kết quả phân tích các chỉ số chất lượng của 12 mẫu chè lựa chọn

Tên mẫu chè	Mô tả sản phẩm	Hương (y_2)	Vị (y_3)	GABA mg/100g (y_1)	Tổng điểm cảm quan
4	Hương dịu, vị dịu	4,50	4,50	219	9,00
5	Hương nhẹ, vị đậm	4,50	4,75	245	9,25
6	Hương dịu, vị dịu	4,50	4,50	256	9,00
9	Hương dịu, vị gắt	4,00	4,00	257	8,00
14	Hương dịu, vị dịu	4,50	4,50	226	9,00
15	Hương dịu, vị đậm	3,75	4,25	228	8,00
18	Hương nhẹ, vị hơi chua	3,75	4,25	267	8,00
22	Hương dịu, vị hơi gắt	4,25	4,25	226	8,50
24	Hương dịu, vị hơi gắt	4,25	4,25	237	8,50
25	Hương hơi nồng, vị hơi chua	4,00	4,00	260	8,00
26	Hương nồng, vị hơi gắt	3,75	4,25	266	8,00
27	Hương nồng, vị gắt	3,75	3,75	282	7,50

3.2.2 Xây dựng thang điểm và sử dụng hệ số quan trọng của các chỉ tiêu chất lượng để cô lập vùng gần tối ưu của các biến ảnh hưởng

Xây dựng thang điểm cho chỉ tiêu y_2 (huơng của chè): Trên cột giá trị của

Giá trị thật của y_2	3,75	3,83	3,92	4,00	4,08	4,16	4,25	4,33	4,41	4,5
Giá trị quy đổi của y_2	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10

Theo cách tương tự, ta lập được mục tiêu thang điểm cho y_1 và y_3

Giá trị thật của y_1	219	226	233	240	247	254	261	268	275	282
Giá trị quy đổi của y_1	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10

Giá trị thật của y_3	3,75	3,86	3,97	4,08	4,19	4,30	4,41	4,52	4,63	4,75
Giá trị quy đổi của y_3	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10

Tổng hợp đánh giá toàn diện 3 chỉ tiêu chất lượng (y_1, y_2, y_3) của sản phẩm được thực hiện dựa trên các thang điểm và sử dụng hệ số quan trọng của các chỉ tiêu chất lượng ($k_1 = 1,4; k_2 = 1; k_3 = 1$) ta lập được bảng tổng hợp về tổng số điểm quy ước của 3 mục tiêu đồng thời một lúc.

Khi tính điểm quy đổi cho các giá trị của mục tiêu ta làm tròn số theo quy định như sau:

huơng ở bảng 2, ta thấy $y_{2max} = 4,5, y_{2min} = 3,75$; Hiệu số $y_{max} - y_{min} = 0,75$, chọn thang điểm là 10, từ đây ta xây dựng được các mốc điểm cho y_2 như sau:

Nếu > 5 thì làm tròn số phía trên;
 Nếu ≤ 5 thì làm tròn số phía dưới;
 Ví dụ: 3,067 làm tròn số là 3,07
 0,324 làm tròn số là 0,32.

Bảng tổng điểm của các chỉ tiêu chất lượng của chè đen được thể hiện trên bảng 3 (trang sau).

Bảng 3: Điểm tổng hợp của 3 chỉ tiêu chất lượng chè

Thí nghiệm số	Y1				Y2				Y3				Tổng điểm quy đổi Y1+Y2+Y3
	Số đo thật	Hệ số	Điểm trên thang	Điểm quy đổi	Số đo thật	Hệ số	Điểm trên thang	Điểm quy đổi	Số đo thật	Hệ số	Điểm trên thang	Điểm quy đổi	
4	219	1,3	1,0	1,3	4,50	1,0	10	10,0	4,50	1,0	8,0	8,0	19,3
5	245	1,3	4,5	4,8	4,50	1,0	10	10,0	4,75	1,0	10,0	10,0	24,8
6	256	1,3	6,0	7,8	4,50	1,0	10	10,0	4,50	1,0	8,0	8,0	25,8
9	257	1,3	6,0	7,8	4,00	1,0	4,0	4,0	4,00	1,0	4,0	4,0	15,8
14	226	1,3	2,0	2,6	4,50	1,0	10	10,0	4,50	1,0	8,0	8,0	20,6
15	228	1,3	2,0	2,6	3,75	1,0	1,0	1,0	4,25	1,0	6,0	6,0	9,6
18	267	1,3	8,0	10,4	3,75	1,0	1,0	1,0	4,25	1,0	6,0	6,0	17,4
22	226	1,3	2,0	2,6	4,25	1,0	7,0	7,0	4,25	1,0	6,0	6,0	15,6
24	237	1,3	4,0	5,2	4,25	1,0	7,0	7,0	4,25	1,0	6,0	6,0	18,2
25	260	1,3	7,0	9,1	4,00	1,0	4,0	4,0	4,00	1,0	5,0	5,0	18,1
26	266	1,3	8,0	10,4	3,75	1,0	1,0	1,0	4,25	1,0	6,0	6,0	17,4
27	282	1,3	10,0	13,0	3,75	1,0	1,0	1,0	3,75	1,0	1,0	1,0	15,0

Từ kết quả tính toán trình bày ở bảng 3 cho phép ta rút ra một số kết luận:

- 3 mẫu thí nghiệm số 5, số 6 và số 14 có tổng điểm quy đổi của 3 chỉ tiêu chất lượng cao nhất.

- Có những thí nghiệm hàm lượng GABA trong chè rất cao nhưng các chỉ tiêu chất lượng (hương và vị) của chè lại rất thấp vì vậy tổng điểm quy đổi thấp, không phù hợp với mục tiêu của nghiên cứu này. Điều này cho ta thấy là việc lựa chọn hệ số quan trọng của y_1 , y_2 , y_3 là tương đối phù hợp.

- Vùng thích hợp nhất, tại đó tổng điểm quy đổi của cả 3 chỉ tiêu chất lượng đạt trị số gần tối ưu, ứng với điều kiện của các yếu tố ảnh hưởng là:

* Lượng vi khuẩn giống khởi động ($OD_{600} = 2,6$), $x_1 \in [2-4\%]$

* Nhiệt độ lên men $x_2 \in [25-27^\circ\text{C}]$

* Thời gian lên men $x_3 \in [6-8 \text{ giờ}]$.

Ứng với các điều kiện trên đây, tổng điểm quy đổi của $y_1 + y_2 + y_3$ dao động ở khoảng lớn nhất từ 20,6 ÷ 25,8. Đây là vùng gần tối ưu mà nhiệm vụ của nghiên cứu phải giải đáp.

IV. Thực nghiệm các thông số của bài toán tối ưu

Thực nghiệm kiểm định được tiến hành với các mức thí nghiệm của các biến ảnh hưởng:

$$x_1 = 3\%$$

$$x_2 = 26^\circ\text{C}$$

$$x_3 = 7 \text{ giờ.}$$

Mẫu thực nghiệm được phân tích các chỉ số: Cảm quan về hương, cảm quan về vị và hàm lượng của GABA (mg/100g) của mẫu chè thu được như sau:

Cảm quan về hương : 4,50

Cảm quan về vị : 4,75

Hàm lượng GABA (mg/100g): 2,54

V. Kết luận

Từ những kết quả thu được bằng con đường thực nghiệm cho phép kết luận như sau

1- Việc bổ sung thêm công đoạn lên men yếm khí trong công nghệ truyền thống sản xuất chè đen sẽ làm tăng hàm lượng GABA trong sản phẩm.

2- Sử dụng vi khuẩn lactic trong giai đoạn lên men yếm khí, sẽ làm tăng hàm lượng GABA, còn chất lượng cảm quan của sản phẩm có thể tiệm cận được với các mẫu đối chứng và mẫu so sánh (mẫu có lên men yếm khí nhưng không sử dụng vi sinh vật).

3- Với các điều kiện tối ưu của quá trình lên men chè đen tạo hàm lượng cao GABA (trên 203 mg/100g) và các chỉ tiêu hương và vị của chè hài hòa nhất là: lượng vi khuẩn khởi động từ 2-4% so với lượng chè lên men, nhiệt độ lên men 26°C , thời gian lên men 7 giờ.

Các kết quả thu được là cơ sở để thực hiện các nghiên cứu hoàn thiện quy trình lên men chè đen có chất lượng cao.

Tài liệu tham khảo:

[1]. Wang H, Wen Y, Du Y, Yan X, Guo H, Rycroft JA, Boon N, Kovacs EM, Mela DJ. Effects of catechin enriched green tea on body composition. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Apr; 18(4):773-9.;

[2]. Basu A, Du M, Sanchez K, Leyva MJ, Betts NM, Blevins S, Wu M, Aston CE, Lyons T. Green tea minimally affects biomarkers of inflammation in obese subjects with

metabolic syndrome. *J Nutrition*. 2011 Feb; 27(2):206-13.

[3]. Teng J, Zhou W, Zeng Z, Zhao W, Huang Y, Zhang X. Quality components and antidepressant-like effects of GABA green tea. *Food Funct*. 2017 Sep 20; 8(9):3311-3318.

[4]. Alcázar A, Ballesteros O, Jurado JM, Pablos F, Martín MJ, Vilches JL, Navalón A. Differentiation of green, white, black, Oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content. *J Agric Food Chem*. 2007 Jul 25; 55(15):5960-5.

[5]. Kee-Ching Jeng I, Chin-Shuh Chen, Yu-Pun Fang, Rolis Chien-Wei Hou, Yuh-Shuen Chen. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-Erh tea. *J Agric Food Chem*. 2007 Oct 17; 55(21):8787-92).

[6]. Ishizuchi-kurocha and Awa-bancha Masanori Horie, Hiroaki Sato, Atsumi Tada, Sayaka Nakamura, Sakiko Sugino, Yosuke

Tabei, Miyuki Katoh and Takahito Toyotome. Regional characteristics of *Lactobacillus plantarum* group strains isolated from two kinds of Japanese post-fermented teas, *Biosci Microbiota Food Health*. 2019; 38(1): 11–22

[7]. Nguyễn Việt Tấn, Báo cáo tổng kết đề tài “Nghiên cứu công nghệ sản xuất chè giàu Gamma Aminobutyric Axit (GABA) bằng công nghệ lên men từ một số giống chè tại Việt Nam”, Đề tài R&D cấp Bộ, Bộ Công Thương năm 2019.

[8]. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 3218:2012 chè - xác định các chỉ tiêu cảm quan bằng phương pháp cho điểm

[9]. Hoàng Đình Hòa, Mô hình hóa và tối ưu hóa quá trình lên men trong sản xuất Bia. Luận án PTS, Plovdiv, Bulgari 1984.

**Địa chỉ tác giả: Vụ Khoa học và Công nghệ,
Bộ Công Thương**

Email:tanvn.fic@gmail.com

