

Phân lập và tuyển chọn các chủng *Bacillus* từ hệ sinh thái cà phê ứng dụng cho lên men quả cà phê tươi Robusta

Lê Sỹ Phan Anh^{1,2}, Hà Trung Dũng³, Nguyễn Đình Hiếu³, Nguyễn Thanh Hoà^{2*}

¹Trung tâm Kiểm nghiệm Kiểm chứng và Dịch vụ Chất lượng RETAQ,
Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Môi trường,
xã Bát Tràng, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Kỹ thuật Sinh học, Trường Hóa và Khoa học sự sống,
Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Kỹ thuật thực phẩm, Trường Hóa và Khoa học sự sống,
Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/3/2026; ngày chuyển phản biện 13/3/2026; ngày nhận phản biện
29/3/2026; ngày chấp nhận đăng 8/4/2026

Tóm tắt:

Nghiên cứu tập trung phân lập và đánh giá các chủng *Bacillus* bản địa từ hệ sinh thái cà phê Robusta có khả năng tổng hợp enzyme phân giải polysaccharide (pectinase), nhằm thúc đẩy quá trình biến đổi sinh hóa của quả cà phê trong lên men. Nghiên cứu đã phân lập, xác định và định danh được 3 chủng vi khuẩn, gồm *Bacillus siamensis* (I), *Bacillus velezensis* (II) và *Bacillus aryabhattai* (III), có khả năng tổng hợp pectinase với vòng phân giải pectin khá lớn 13-15 mm, giúp cải thiện các chỉ tiêu hóa sinh thúc đẩy quá trình axit hóa trong lên men quả cà phê, làm giảm pH xuống 4,2-4,8 và giảm hàm lượng đường khử xuống dưới 1,0 g/l, trong điều kiện lên men với tỷ lệ rắn/lỏng 2:1 ở 37°C sau 48 giờ lên men. Hạt cà phê sau lên men có tổng hàm lượng polyphenol đạt 120-125 mg/g và hoạt tính chống oxy hóa đạt $IC_{50} \approx 0,28-0,32$ mg/ml. Trên cơ sở đó, hệ chủng kết hợp đã thể hiện hiệu quả vượt trội, đặc biệt tổ hợp II+III, với khả năng tăng cường chuyển hóa cơ chất và nâng cao hàm lượng polyphenol (135-137 mg/g chất khô) cùng hoạt tính chống oxy hóa ($IC_{50} \sim 0,25$ mg/ml). Kết quả cho thấy, lên men có kiểm soát bằng hệ chủng *Bacillus* bản địa là hướng tiếp cận tiềm năng giúp cải thiện chất lượng cà phê Robusta Việt Nam theo hướng giá trị cao.

Từ khóa: *Bacillus*, cà phê Robusta, chống oxy hóa, lên men cà phê, pectinase, polyphenol.

Chỉ số phân loại: 2.8, 2.10

*Tác giả liên hệ: Email: hoa.nguyenthanh@hust.edu.vn

Isolation and selection of *Bacillus* strains from coffee ecosystem for fresh Robusta coffee cherry fermentation**Sy Phan Anh Le^{1, 2}, Trung Dung Ha³, Dinh Hieu Nguyen³, Thanh Hoa Nguyen^{2*}**¹RETAQ Quality Verification and Service Center, Bat Trang Ward, Hanoi, Vietnam²Department of Bioengineering, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology, No. 1, Dai Co Viet Street, Bach Mai Ward, Hanoi, Vietnam³Department of Food Engineering/Food Technology, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology, No. 1 Dai Co Viet Road, Bach Mai Ward, Hanoi, Vietnam

Received 12 March 2026; revised 29 March 2026; accepted 8 April 2026

Abstract:

This study aimed to isolate and evaluate indigenous *Bacillus* strains from the Robusta coffee ecosystem with the ability to produce polysaccharide-degrading enzymes (particularly pectinase), thereby promoting biochemical transformations during coffee fermentation. Three bacterial strains were successfully isolated, identified, and characterised, namely *Bacillus siamensis* (I), *Bacillus velezensis* (II), and *Bacillus aryabhatai* (III), all of which exhibited significant pectinase activity, with clear pectin hydrolysis zones ranging from 13 to 15 mm. These strains contributed to the improvement of key biochemical parameters during fermentation, notably accelerating acidification, reducing pH 4.2-4.8, and decreasing reducing sugar content to below 1.0 g/l under fermentation conditions of a solid-to-liquid ratio of 2:1 at 37°C for 48 hours. Fermented coffee beans showed total polyphenol contents of 120-125 mg/g and antioxidant activity with IC₅₀ values of approximately 0.28-0.32 mg/ml. Furthermore, the combined starter culture demonstrated superior performance, particularly the consortium of strains II and III, which enhanced substrate conversion efficiency and increased total polyphenol content (135-137 mg/g dry weight) along with improved antioxidant activity (IC₅₀≈0.25 mg/ml). Overall, the results indicate that controlled fermentation using indigenous *Bacillus* consortia represents a promising approach for improving the quality of Vietnamese Robusta coffee toward higher value products.

Keywords: antioxidant activity, *Bacillus*, coffee fermentation, pectinase, polyphenols, Robusta coffee.

Classification numbers: 2.8, 2.10

1. Đặt vấn đề

Cà phê Robusta (*Coffea canephora*) là một trong những cây công nghiệp chiến lược, đặc biệt tại Việt Nam - quốc gia giữ vị trí hàng đầu thế giới về sản lượng xuất khẩu Robusta, chiếm khoảng 40% sản lượng toàn cầu [1]. Tuy nhiên, so với Arabica, chất lượng cảm quan của Robusta thường bị đánh giá thấp hơn, chủ yếu do hàm lượng caffeine và axit chlorogenic (CGA) cao, góp phần tạo nên vị đắng gắt và hậu vị kém êm dịu [2]. Bên cạnh đó, lớp nhầy (mucilage) giàu polysaccharide, đặc biệt là pectin, bao quanh hạt cà phê đóng vai trò quan trọng trong quá trình chế biến sau thu hoạch; việc loại bỏ lớp này là một bước thiết yếu trong xử lý cà phê và có ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành hương vị của sản phẩm cuối cùng [3].

Trong tự nhiên, cà phê Kopi Luwak - sản phẩm đi qua hệ tiêu hóa của chồn hương châu Á (*Paradoxurus hermaphroditus*) - được ghi nhận có đặc tính cảm quan mềm mại và khác biệt. Các phân tích hệ vi sinh vật đường ruột của loài này cho thấy sự chiếm ưu thế của các vi khuẩn có khả năng chuyển hóa carbohydrate, tái cấu trúc hợp chất phenolic và điều chỉnh tiền chất hương [4]. Tuy nhiên, mô hình sản xuất truyền thống dựa trên động vật đặt ra nhiều vấn đề về phúc lợi động vật, tính bền vững và an toàn sinh học, làm hạn chế khả năng ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Trong bối cảnh đó, công nghệ lên men sử dụng chủng khởi động bản địa nổi lên như một chiến lược thay thế có kiểm soát. Đặc biệt, các loài thuộc chi *Bacillus* thu hút sự quan tâm nhờ khả năng sinh tổng hợp hệ enzyme ngoại bào phong phú, bao gồm pectinase, cellulase và protease [5, 6].

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng, hệ enzyme của *Bacillus* spp. tác động kép lên hệ thống hợp chất phenolic, bề gãy một phần các polyphenol gây đắng gắt như CGA thành các dẫn xuất có cấu trúc nhỏ hơn, góp phần làm giảm vị đắng gắt và cải thiện cảm quan thông qua biến đổi tiền chất hương [2]. Mặt khác, sự phối hợp giữa enzyme pectinolytic và cellulolytic giúp phá vỡ ma trận polysaccharide, giải phóng các phân tử phenolic vốn tồn tại ở dạng liên kết trong vách tế bào thực vật thành dạng tự do. Quá trình giải phóng này làm gia tăng tổng hàm lượng polyphenol tự do (TPC) và cải thiện mạnh mẽ hoạt tính chống oxy hóa trong nhiều nền nguyên liệu như bã cà phê [7]. Tuy nhiên, cho đến nay, các dữ liệu về quá trình lên men sử dụng *Bacillus* phân lập trực tiếp từ hệ sinh thái cà phê, cũng như tác động hiệp đồng giữa các chủng trong việc điều chỉnh, biến đổi polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa trên nền cà phê Robusta Việt Nam vẫn còn hạn chế.

Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập, tuyển chọn và ứng dụng các vi sinh vật bản địa nhằm nâng cao chất lượng cà phê Robusta. Cụ thể, nghiên cứu tập trung tìm kiếm các chủng *Bacillus* từ hệ sinh thái cà phê có khả năng lên men chuyển hóa tốt cơ chất và tổng hợp enzyme pectinase, đồng thời đánh giá vai trò của các vi sinh vật tuyển chọn trong cải thiện hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của cà phê lên men.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là các mẫu lá cà phê, quả cà phê tươi và đất vùng rẫy, thu thập tại các vùng trồng cà phê thuộc xã Ea Ning, Tân An (Đắk Lắk), xã Chư Păh và xã Biển Hồ (Gia Lai), mẫu cà phê chồn thô (Kopi Luwak) thu nhận từ cơ sở sản xuất tại xã Biển Hồ (Gia Lai). Nguyên liệu sử dụng cho thí nghiệm lên men là quả cà phê Robusta tươi, chín mọng đỏ, đồng đều về kích thước, thu hoạch tại vườn thuộc xã Biển Hồ, Gia Lai, trong giai đoạn chính vụ (tháng 12/2025). Sau thu hoạch, mẫu được bảo quản lạnh về phòng thí nghiệm trong vòng 48 giờ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng *Bacillus*

25 gram mẫu (quả, lá, đất, cà phê chồn thô) được xử lý và đồng nhất trong 225 ml nước cất vô trùng. Hỗn hợp được xử lý nhiệt ở 80-85°C trong 10 phút nhằm tiêu diệt phần lớn vi khuẩn sinh dưỡng và làm giàu vi khuẩn sinh nội bào tử thuộc chi *Bacillus*. Sau xử lý nhiệt, mẫu được pha loãng ở ba nồng độ liên tiếp (10^{-1} đến 10^{-3}) và cấy trải 100 μ l lên đĩa thạch môi trường NA, ủ ở 37°C trong 20-24 giờ.

Các khuẩn lạc nghi ngờ *Bacillus* được tinh sạch, kiểm tra đặc điểm hình thái, nhuộm Gram, thử catalase, quan sát nội bào tử theo phương pháp nhuộm bào tử bằng xanh Malachite [8] và định danh đến loài bằng hệ thống MALDI-TOF MS (Vitek MS) [9]. Định danh phân tử được thực hiện thông qua giải trình tự gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi phổ biến 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') theo phương pháp PCR tiêu chuẩn [10]. Trình tự 16S rRNA của các chủng phân lập được so sánh với dữ liệu NCBI bằng BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood (MEGA X) với mô hình Tamura-Nei, và độ tin cậy được đánh giá bằng bootstrap 500 lần lặp.

Các chủng *Bacillus* được đánh giá hoạt tính pectinase theo các bước:

a) Chuẩn bị dịch nổi không chứa tế bào (CFS) các chủng *Bacillus*: Nuôi cấy các chủng *Bacillus* spp. trong môi trường Minimal Broth chứa 0,5% pectin ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, sau đó ly tâm, lọc qua màng lọc 0,22 μ M và bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng.

b) Xác định hoạt tính pectinase: Nhỏ 100 μ l CFS của từng chủng đơn lẻ và tổ hợp các chủng (I+II, I+III, II+III) vào các lỗ giếng của môi trường Minimal Broth với 1,5% agar trong các đĩa petri và ủ ở 37°C trong 24-48 giờ. Hoạt tính pectinase của các chủng *Bacillus* được đánh giá bằng đường kính vùng quang thủy phân pectin nhờ dung dịch Lugol 1%.

2.2.2. Lên men cà phê sử dụng các chủng *Bacillus* phân lập

Ba chủng *Bacillus* phân lập ký hiệu I, II, III và một chủng thương mại *Bacillus subtilis* var. *Natto Takahashi* (ký hiệu là Natto) được sử dụng làm các giống khởi động cho lên men cà phê và được hoạt hóa trong môi trường Nutrient Broth (NB) ở 37°C trong 18-24 giờ để đạt mật độ xấp xỉ 10^9 CFU/ml trước khi đưa vào lên men.

2.2.3. Lên men cà phê sử dụng đơn chủng *Bacillus*

Quả cà phê tươi sau khi xát vỏ được giữ lại lớp nhầy và tiến hành lên men với hai tỷ lệ rắn/lỏng (1:1 và 2:1), sử dụng môi trường Modified Nutrient Broth (Modified NB) hoặc nước cất làm dịch lên men. Sinh khối các chủng *Bacillus* được bổ sung với tỷ lệ 10% (v/v), tương ứng mật độ ban đầu khoảng 10^8 CFU/ml. Thí nghiệm được bố trí với 4 công thức lên men đơn chủng ở 37°C trong 48 giờ trong điều kiện hiếu khí tĩnh và 02 công thức đối chứng sử dụng Modified NB và nước cất. Trong quá trình lên men, các chỉ tiêu pH, hàm lượng acid tổng và đường khử được theo dõi, đánh giá tại các thời điểm 0, 24 và 48 giờ, trong đó pH dịch lên men được đo bằng pH meter đã hiệu chuẩn; tổng axit được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,1N và được tính theo (mmol H^+ /ml dịch lên men) [11]; Hàm lượng đường khử trong dịch lên men được xác định theo phương pháp với thuốc thử DNS [12].

Hạt cà phê sau lên men được phân tích tổng hàm lượng polyphenol (TPC), hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp cụ thể như sau:

Chuẩn bị dịch trích ly cà phê [13]: Hạt cà phê sau lên men được làm sạch, sấy khô, loại bỏ vỏ trấu và vỏ lụa để thu cà phê nhân. Mẫu được nghiền mịn, rây qua lưới 60 mesh, sau đó tiến hành trích ly bằng dung môi methanol 70% ở nhiệt độ 55-60°C. Dịch trích được ly tâm thu phần dịch nổi, định mức và bảo quản lạnh.

Xác định tổng hàm lượng polyphenol (TPC) của cà phê nhân theo phương pháp Folin-Ciocalteu: Dịch trích được phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu và dung dịch Na_2CO_3 , sau đó ủ trong điều kiện tối và đo tại bước sóng 750 nm, hàm lượng polyphenol được tính toán dựa trên đường chuẩn axit gallic và biểu thị bằng mg GAE/g chất khô.

Xác định hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp phản ứng với DPPH [14]: Dịch trích ly được phản ứng với dung dịch DPPH trong methanol và ủ trong tối trong 30 phút. Độ hấp thụ được đo tại 517 nm. Khả năng khử gốc tự do được biểu diễn thông qua phần trăm ức chế và giá trị IC_{50} , xác định từ phương trình hồi quy giữa nồng độ mẫu và mức độ ức chế. Phần trăm ức chế được tính theo công thức:

$$\%I = \frac{[(A_0 - A_1)] \times 100}{A_0}$$

trong đó: A_0 là giá trị hấp phụ quang phổ tại bước sóng 517 nm của mẫu kiểm chứng; A_1 là giá trị hấp phụ quang phổ tại bước sóng 517 nm của mẫu thí nghiệm; Giá trị IC_{50} được xác định từ phương trình hồi quy giữa %I và nồng độ mẫu, trong đó IC_{50} thể hiện lượng mẫu cần thiết để oxy hóa 50% lượng DPPH ban đầu [15].

Lên men cà phê sử dụng kết tổ hợp các chủng Bacillus: Thí nghiệm lên men cà phê sử dụng tổ hợp các chủng *Bacillus* được triển khai với 5 công thức, gồm 3 công thức sử dụng tổ hợp các chủng (I+II, I+III và II+III) và 2 công thức đối chứng sử dụng Modified NB và nước cất. Tỷ lệ cấy giống là 10% (v/v) sinh khối các chủng vi sinh vật, với mật độ ban đầu xấp xỉ 10^8 CFU/ml và các điều kiện lên men (nhiệt độ, chế độ cấp khí) được thực hiện như lên men cà phê sử dụng đơn chủng *Bacillus*. Theo dõi và đánh giá các chỉ tiêu pH, acid tổng, đường khử trong quá trình lên men, tổng hàm lượng polyphenol (TPC) và hoạt tính chống oxy hóa của hạt cà phê sau lên men theo các phương pháp được mô tả ở trên.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại tối thiểu 3 lần. Số liệu được xử lý bằng Excel và phân tích phương sai. Kiểm định Tukey HSD được sử dụng để so sánh các giá trị trung bình ($p < 0,05$), với các ký tự khác nhau (a, b, c) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa trong cùng một nhóm. Mối tương quan giữa hàm lượng polyphenol tổng (TPC) và hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá bằng hệ số tương quan Pearson (r), với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Kết quả được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

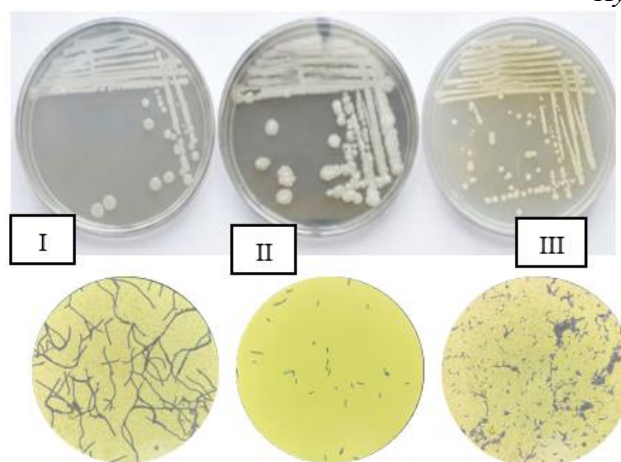
3. Kết quả

3.1. Phân lập, định danh chủng *Bacillus* spp. bản địa

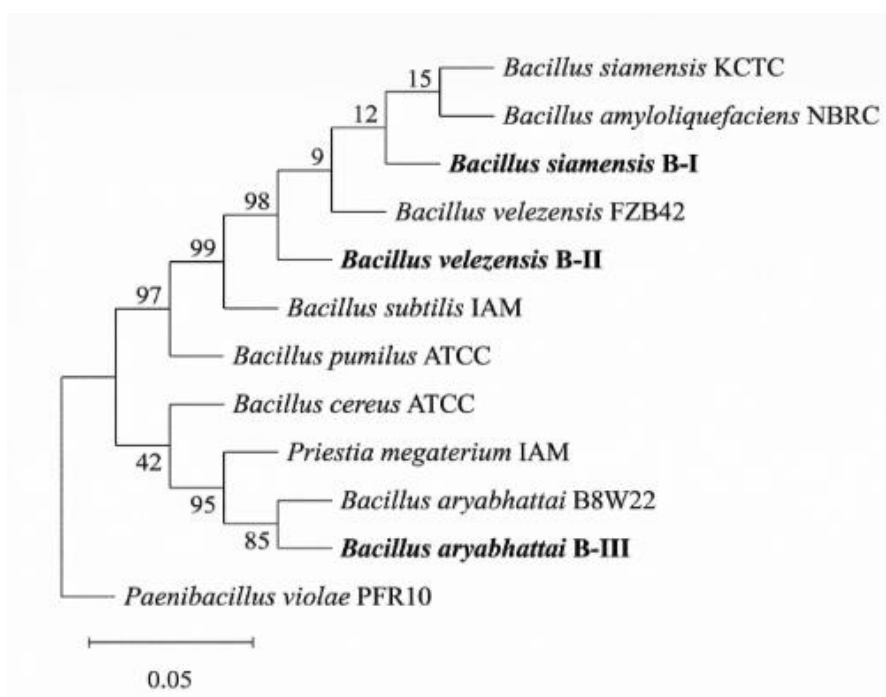
Từ các mẫu lá cà phê, đất vùng rễ, quả cà phê tươi và cà phê chồn đã phân lập được 42 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc hình tròn đến không đều, màu trắng đến trắng ngà.

Sau khi sàng lọc sơ bộ dựa trên đặc điểm hình thái và sinh hóa, 11 chủng có đặc trưng điển hình của *Bacillus* (Gram dương, hình que, sinh nội bào tử, catalase dương tính) đã được lựa chọn để định danh bằng hệ thống MALDI-TOF MS (Vitek MSV) và xác định tất cả đều thuộc chi *Bacillus* với độ tin cậy cao.

Kết quả định danh phân tử thông qua giải trình tự gen 16S rRNA xác định 3 chủng phân lập, gồm 2 chủng được phân lập từ cà phê chồn thô (ký hiệu I và II) và 1 chủng phân lập từ lá cà phê (ký hiệu III) đều thuộc chi *Bacillus*, phù hợp với kết quả định danh sơ bộ bằng MALDI-TOF MS, cụ thể, chủng B-I phân nhóm gần với *Bacillus siamensis*, với giá trị bootstrap cao, chủng B-II nằm trong cùng clade với *Bacillus velezensis* và chủng B-III có quan hệ gần với *Bacillus aryabhattai*. Kết quả được thể hiện ở hình 1 và hình 2. Đối chiếu với các loài đã được công nhận an toàn (GRAS - Generally Recognized As Safe), 3 chủng *Bacillus* tuyển chọn đáp ứng tiêu chí an toàn sinh học và được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

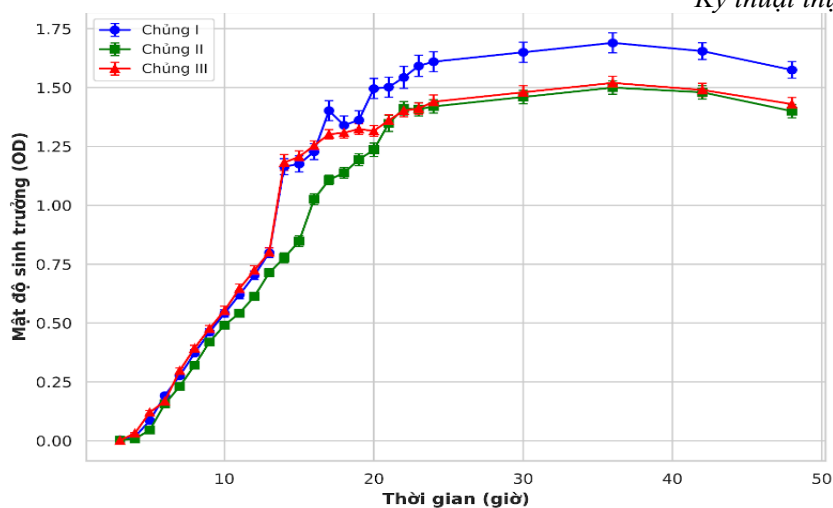


Hình 1. Ảnh khuẩn lạc và tế bào các chủng *Bacillus* I, II, III.



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen 16S rRNA của các chủng *Bacillus* phân lập, được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood.

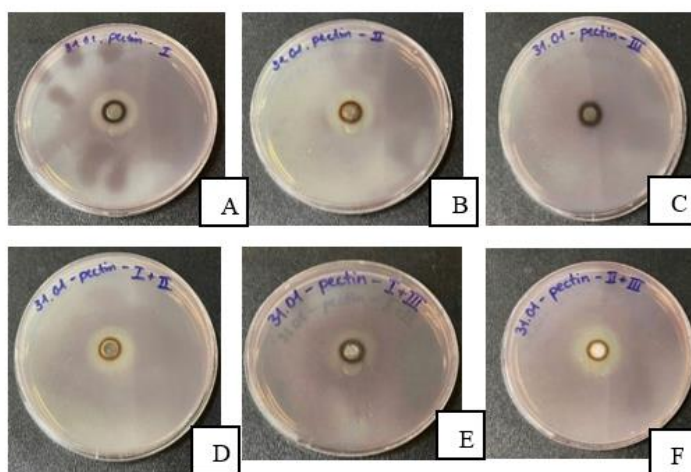
Kết quả xây dựng đường cong tăng trưởng của 3 chủng *Bacillus* tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường NB, ở 37°C, trên máy lắc tốc độ 150 vòng/phút (hình 3) cho thấy cả ba chủng đều có pha thích nghi ngắn trước khi nhanh chóng bước vào pha sinh trưởng lũy thừa. Dữ liệu OD₆₀₀ thể hiện trên đường cong tăng trưởng và khi trang cấy ghi nhận mật độ tế bào đạt trên 10⁹ CFU/ml sau khoảng 18 giờ nuôi cấy. Kết quả này phản ánh tiềm năng tăng sinh nhanh trong điều kiện dinh dưỡng thuận lợi, đồng thời cung cấp cơ sở cho việc xác định thời điểm cấy giống phù hợp. Cụ thể, mốc 18-20 giờ được xem là giai đoạn tối ưu để thu nhận sinh khối ở trạng thái sinh trưởng mạnh, đảm bảo khả năng khởi động hiệu quả của quá trình lên men cà phê sau này.



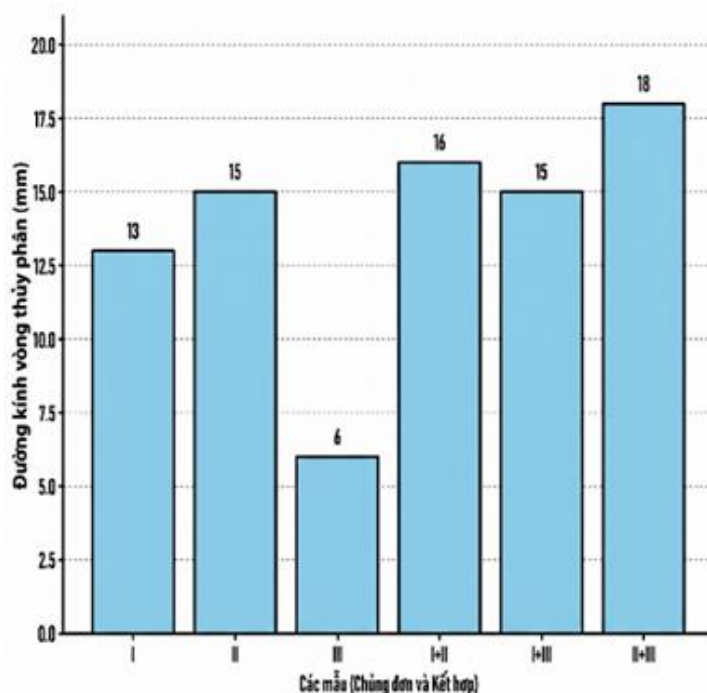
Hình 3. Đường cong sinh trưởng của các chủng *Bacillus* trong môi trường Nutrient Broth.

3.2. Hoạt tính pectinase các chủng *Bacillus* phân lập

Hoạt tính pectinase các chủng *Bacillus* trong điều kiện nuôi cấy riêng lẻ và kết hợp được thể hiện ở các hình 4 và hình 5.



Hình 4. Hoạt tính pectinase các chủng riêng rẽ I, II, III và kết hợp I+II, I+III và II+III tương ứng với ảnh A, B, C, D, E, F.



Hình 5. Đường kính vòng thủy phân pectin của các chủng *Bacillus*.

Kết quả cho thấy, sự khác biệt rõ rệt về khả năng sinh tổng hợp pectinase giữa các chủng vi khuẩn phân lập. Hai chủng *Bacillus* I và II, được phân lập từ hệ sinh thái cà phê chồn, tạo vòng thủy phân pectin với đường kính lớn, phản ánh hoạt tính enzyme ngoại bào cao; trong đó, chủng II thể hiện hoạt lực cao hơn chủng I. Chủng III có vòng thủy phân khá nhỏ, cho thấy khả năng tổng hợp pectinase hạn chế. Sự khác biệt này có thể liên quan đến nguồn gốc sinh thái của các chủng, khi các chủng I và II đã trải qua quá trình thích nghi trong môi trường tiêu hóa của động vật, nơi hệ enzyme phân giải polysaccharide, đặc biệt là pectin, thường phát triển mạnh nhằm hỗ trợ quá trình chuyển hóa cơ chất phức tạp [16].

Quá trình lên men cà phê thực tế diễn ra trong một hệ vi sinh vật phức tạp và có tính tương tác cao do đó, việc khảo sát các hệ đồng nuôi cấy là cần thiết nhằm đánh giá ảnh hưởng của tương tác vi sinh vật đến hiệu suất phân giải pectin. Kết quả cho thấy, hoạt tính pectinase trong tất cả các hệ phối hợp đều cao hơn so với các mẫu nuôi cấy đơn chủng. Đáng chú ý, tổ hợp II+III có giá trị hoạt tính cao nhất, đạt 18 mm vượt qua hoạt lực của chủng II khi nuôi cấy độc lập. Các tổ hợp I+II và I+III cũng ghi nhận mức gia tăng so với từng chủng đơn.

Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây khi xác định các hệ vi sinh vật cộng sinh thường sở hữu phổ enzyme rộng hơn và hiệu suất chuyển hóa cao hơn so với các chủng đơn lẻ, nhờ sự phân công chức năng trong chuyển hóa [17]. Trong bối cảnh lên men cà phê Robusta, hoạt tính pectinase đóng vai trò then chốt trong quá trình phân giải lớp nhầy giàu pectin bao quanh nhân cà phê, góp phần rút ngắn thời gian xử lý và thúc đẩy các biến đổi sinh hóa liên quan đến sự hình thành hương vị của sản phẩm

[18]. Do đó, hiệu ứng hiệp đồng của tổ hợp các tổ hợp là cơ sở khoa học cho việc lựa chọn và thiết kế hệ chủng khởi động tối ưu cho quá trình lên men cà phê trong các nghiên cứu tiếp theo

3.3. Hiệu quả lên men quả cà phê Robusta khi sử dụng các chủng *Bacillus* riêng lẻ

3.3.1. Biến động pH, độ axit và đường khử của dịch lên men cà phê

Kết quả theo dõi sự biến động của pH, hàm lượng đường khử và tổng axit của dịch lên men tại thời điểm 0, 24 và 48 giờ sau lên men thể hiện tại bảng 1 cho thấy, giá trị pH ban đầu của các mẫu dao động quanh ~6,0 và giảm nhanh xuống khoảng 4,1-4,7 sau 24 giờ lên men, sau đó duy trì ổn định đến thời điểm 48 giờ.

Bảng 1. Biến đổi pH, hàm lượng axit và đường khử trong quá trình lên men cà phê Robusta sử dụng các chủng *Bacillus* phân lập.

Chủng <i>Bacillus</i> sử dụng	Tỷ lệ rắn /lồng	Thời gian (h)	pH	Axit (mmol H ⁺ /ml)	Đường khử (g/l)
I	1:1	0	5,96±0,04 ^a	0,100±0,003 ^c	4,71±0,16 ^a
	1:1	24	4,65±0,04 ^b	0,200±0,007 ^b	1,23±0,04 ^b
	1:1	48	4,53±0,04 ^c	0,340±0,012 ^a	0,41±0,02 ^c
	2:1	0	5,75±0,04 ^a	0,100±0,004 ^c	4,89±0,17 ^a
	2:1	24	4,16±0,04 ^c	0,450±0,018 ^a	1,42±0,04 ^b
	2:1	48	4,34±0,04 ^b	0,400±0,016 ^b	0,59±0,02 ^c
II	1:1	0	5,92±0,04 ^a	0,100±0,003 ^c	4,85±0,17 ^a
	1:1	24	4,71±0,04 ^b	0,200±0,007 ^b	1,27±0,04 ^b
	1:1	48	4,69±0,04 ^b	0,340±0,013 ^a	0,44±0,02 ^c
	2:1	0	5,33±0,03 ^a	0,100±0,003 ^c	5,10±0,17 ^a
	2:1	24	4,17±0,04 ^c	0,400±0,014 ^b	1,50±0,04 ^b
	2:1	48	4,24±0,04 ^b	0,470±0,020 ^a	0,64±0,02 ^c
III	1:1	0	6,23±0,04 ^a	0,100±0,004 ^c	4,98±0,17 ^a
	1:1	24	4,70±0,04 ^c	0,200±0,006 ^b	1,31±0,04 ^b
	1:1	48	4,89±0,04 ^b	0,300±0,011 ^a	0,46±0,02 ^c
	2:1	0	5,41±0,04 ^a	0,100±0,003 ^b	5,23±0,18 ^a
	2:1	24	4,17±0,04 ^b	0,450±0,018 ^a	1,56±0,04 ^b
	2:1	48	4,23±0,03 ^b	0,400±0,014 ^a	0,68±0,02 ^c
Natto	1:1	0	6,06±0,04 ^a	0,100±0,004 ^c	4,51±0,14 ^a
	1:1	24	4,56±0,04 ^b	0,250±0,011 ^b	1,12±0,04 ^b
	1:1	48	4,52±0,04 ^b	0,340±0,012 ^a	0,42±0,02 ^c
	2:1	0	5,42±0,04 ^a	0,100±0,003 ^c	4,62±0,15 ^a
	2:1	24	4,12±0,03 ^c	0,500±0,022 ^a	0,94±0,04 ^b
	2:1	48	4,24±0,04 ^b	0,400±0,016 ^b	0,26±0,02 ^c
Nutrient Broth	1:1	0	5,31±0,04 ^a	0,100±0,004 ^b	4,50±0,14 ^a

	1:1	24	4,29±0,04 ^c	0,250±0,011 ^a	1,14±0,04 ^b
	1:1	48	4,54±0,04 ^b	0,240±0,011 ^a	0,35±0,02 ^c
	2:1	0	5,14±0,03 ^a	0,100±0,003 ^c	4,55±0,15 ^a
	2:1	24	4,41±0,03 ^b	0,450±0,018 ^a	1,21±0,04 ^b
	2:1	48	4,35±0,03 ^b	0,350±0,019 ^b	0,59±0,02 ^c
	1:1	0	5,25±0,04 ^a	0,100±0,003 ^b	4,35±0,13 ^a
H₂O	1:1	24	4,63±0,03 ^b	0,250±0,012 ^a	1,57±0,04 ^b
	1:1	48	4,52±0,04 ^b	0,220±0,011 ^a	0,62±0,14 ^c
	2:1	0	5,23±0,03 ^a	0,100±0,003 ^c	4,54±0,13 ^a
	2:1	24	4,54±0,03 ^b	0,350±0,018 ^a	1,73±0,03 ^b
	2:1	48	4,38±0,04 ^c	0,320±0,002 ^a	0,67±0,14 ^c

Chú thích: Các giá trị trong cùng một nhóm (cùng chủng và cùng tỷ lệ rắn/lỏng) mang chữ cái khác nhau (a, b, c) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mốc thời gian ($p < 0,05$) theo kiểm định Tukey HSD.

Ở các mẫu có bổ sung chủng *Bacillus*, quá trình axit hóa diễn ra rõ rệt hơn so với đối chứng, đặc biệt với tỷ lệ rắn/lỏng 2:1, nơi pH giảm sâu trong 24 giờ đầu và sau đó duy trì ổn định đến 48 giờ (pH từ 4,23-4,34), với 2 mẫu đối chứng là NB và H₂O có pH là 4,35-4,38. Xu hướng này cho thấy, khi nồng độ cơ chất cao hơn, hoạt động chuyển hóa của vi sinh vật được tăng cường, dẫn đến hiệu suất sinh acid cao hơn.

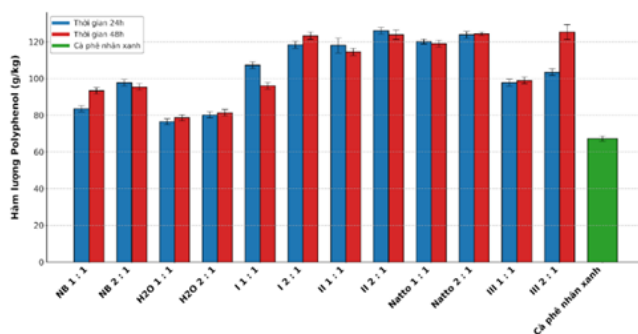
Hàm lượng đường khử các mẫu có tỷ lệ rắn/lỏng 2:1 ban đầu có hàm lượng đường cao hơn, nhưng lại giảm nhanh hơn trong quá trình lên men, ban đầu nằm trong khoảng 4,54-5,1 g/l, giảm nhanh sau 24 giờ và tiếp tục giảm xuống còn 0,26-0,68 g/l tại thời điểm 48 giờ. Mức độ giảm đường khử các mẫu có bổ sung chủng *Bacillus* (giảm 87- >90%) nhiều hơn mẫu đối chứng H₂O (sau 24 giảm 62% và sau 48 giờ giảm 85%).

Tổng thể, sự biến đổi đồng thời của pH, hàm lượng acid và đường khử cho thấy quá trình lên men với các mẫu có bổ sung chủng *Bacillus* diễn ra triệt để và hiệu quả hơn so với mẫu đối chứng, trong đó sự axit hóa môi trường và hoạt động enzyme của các chủng bổ sung đóng vai trò quan trọng trong việc biến đổi cấu trúc nguyên liệu. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy tỷ lệ rắn/lỏng là 2:1 cho hiệu quả tốt hơn so với tỷ lệ 1/1 và được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

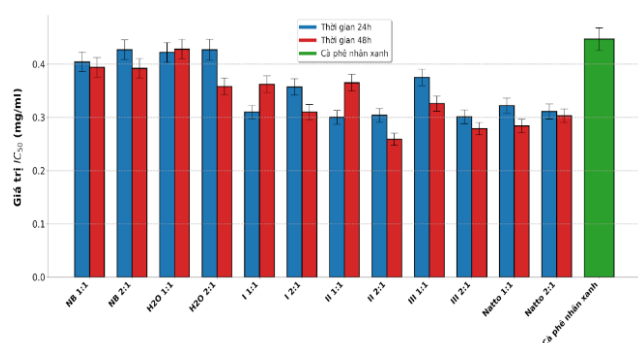
3.3.2. Tổng hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của cà phê nhân sau lên men

Các hợp chất polyphenol đóng vai trò như các tiền chất quan trọng, tham gia vào các phản ứng biến đổi nhiệt trong quá trình rang, từ đó hình thành các hợp chất góp phần vào hương vị, độ đắng và đặc tính cảm quan của cà phê [19]. Nhiều nghiên cứu cho thấy hoạt lực enzyme pectinase các chủng *Bacillus* cải thiện khá rõ rệt hàm lượng và thành phần polyphenol của nhân cà phê [7]. Kết quả đánh giá tổng hàm lượng polyphenol

(TPC) và khả năng chống oxy hóa các mẫu cà phê nhân sau lên men 24 và 48 giờ thể hiện ở hình 6 và 7.



Hình 6. Tổng hàm lượng polyphenol các mẫu cà phê sau lên men đơn chủng.



Hình 7. Khả năng chống oxy hóa các mẫu cà phê nhân sau lên men.

Kết quả cho thấy, so với mẫu đối chứng là cà phê nhân xanh không lên men (TPC xấp xỉ 67 mg/g chất khô), tất cả các mẫu lên men - bao gồm cả các mẫu không bổ sung vi sinh vật (lên men tự nhiên như KC nước cất và NB) và các mẫu bổ sung chủng *Bacillus* đều ghi nhận sự gia tăng rõ rệt hàm lượng TPC ngay sau 24 giờ và đạt giá trị cực đại ở 48 giờ. Hiệu quả gia tăng TPC thể hiện rõ nhất ở tỷ lệ rắn/lỏng 2:1, trong đó các chủng II và III có giá trị TPC cao nhất đạt 120-125 mg/g, chủng I đạt xấp xỉ 120 mg/g. Mức tăng gần gấp đôi so với đối chứng, đồng thời vượt đáng kể so với các mẫu lên men không bổ sung chủng (khoảng 80 mg/g), cho thấy vai trò nổi bật của các chủng *Bacillus* trong việc thúc đẩy quá trình giải phóng các hợp chất phenolic. Song song với xu hướng gia tăng TPC, hoạt tính chống oxy hóa cũng được cải thiện rõ rệt, thể hiện qua sự giảm giá trị IC_{50} từ 0,45 mg/ml (đối chứng) xuống còn 0,28-0,32 mg/ml ở các mẫu II và III, các kết quả có hệ số tương quan (r) mang giá trị âm và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Về mặt cơ chế, hiệu quả quan sát được nhiều khả năng bắt nguồn từ sự kết hợp giữa hoạt động của hệ enzyme ngoại bào và sự thay đổi vi môi trường trong quá trình lên men. Với tỷ lệ rắn/lỏng cao (2:1), sự hạn chế của pha lỏng có thể làm tăng nồng độ enzyme cục bộ tại bề mặt cơ chất, qua đó nâng cao hiệu quả tiếp xúc giữa enzyme và nền polysaccharide. Các chủng *Bacillus* được biết đến với khả năng tiết đa dạng enzyme

thủy phân như cellulase, pectinase và protease góp phần phá vỡ cấu trúc lớp nhầy và thành tế bào thực vật dẫn đến sự phân cắt các liên kết ester và glycoside liên kết các hợp chất phenolic với ma trận polysaccharide, từ đó giải phóng các dạng phenolic tự do có khả năng hòa tan và hoạt tính sinh học cao hơn [20].

3.4. Hiệu quả lên men quả cà phê Robusta khi sử dụng tổ hợp các chủng *Bacillus*

3.4.1. Biến động pH, độ axit và đường khử của dịch lên men cà phê

Kết quả theo dõi biến động pH, hàm lượng đường khử và tổng hàm lượng acid của dịch lên men cà phê bổ sung tổ hợp các chủng *Bacillus* phân lập tại các thời điểm 0, 24 và 48 giờ được tổng hợp trong bảng 2.

Bảng 2. Biến động pH, hàm lượng axit và đường khử trong quá trình lên men cà phê Robusta sử dụng tổ hợp các chủng *Bacillus*.

Chủng <i>Bacillus</i> sử dụng	Tỷ lệ rắn / lỏng	Thời gian (h)	pH	Axit (mmol H ⁺ /ml)	Đường khử (g/l)
I+III	2:1	0	5,66±0,04 ^a	0,100±0,004 ^b	5,41±0,19 ^a
	2:1	24	4,24±0,04 ^c	0,400±0,014 ^a	1,70±0,04 ^b
	2:1	48	4,37±0,04 ^b	0,400±0,016 ^a	0,78±0,02 ^c
II+III	2:1	0	5,38±0,04 ^a	0,100±0,003 ^c	5,53±0,19 ^a
	2:1	24	4,17±0,04 ^c	0,500±0,024 ^a	1,78±0,04 ^b
	2:1	48	4,30±0,04 ^b	0,400±0,014 ^b	0,84±0,02 ^c
I+II	2:1	0	5,62±0,03 ^a	0,100±0,004 ^c	5,32±0,18 ^a
	2:1	24	4,16±0,03 ^c	0,450±0,019 ^a	1,63±0,04 ^b
	2:1	48	4,28±0,04 ^b	0,400±0,014 ^b	0,73±0,02 ^c

Các giá trị trong cùng một nhóm chủng có chữ cái (a, b, c) khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mốc thời gian ($p < 0,05$) theo kiểm định Tukey HSD.

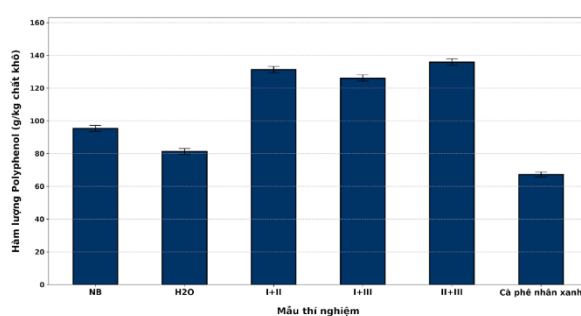
Kết quả bảng 2 cho thấy, giá trị pH ban đầu của dịch lên men sử dụng tổ hợp chủng dao động trong khoảng 5,6-5,7 và giảm nhanh xuống mức 4,1-4,5 sau 24 giờ, sau đó duy trì tương đối ổn định đến thời điểm 48 giờ, tuy nhiên, tốc độ và mức độ axit hóa ở các tổ hợp chủng thể hiện rõ rệt hơn so với đơn chủng, đặc biệt ở các tổ hợp II+III và I+II đạt pH 4,16-4,17, tương ứng hàm lượng axit là khoảng 0,50 g/l sau 24 giờ).

Hàm lượng đường khử giảm từ mức ban đầu 5,4-5,5 g/l xuống còn 1,6-1,8 g/l sau 24 giờ và tiếp tục giảm xuống còn 0,73-0,84 g/l tại thời điểm 48 giờ sau lên men có mức độ giảm nhiều hơn so với các chủng đơn từ mức ban đầu (5,4-5,5 g/l) xuống khoảng 1,6-1,8 g/l sau 24 giờ và tiếp tục giảm xuống mức tối thiểu (khoảng 0,73-0,84 g/l) tại thời điểm 48 giờ. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi sự đa dạng về hệ enzyme ngoại bào trong các hệ đồng nuôi cấy, cho phép phân giải hiệu quả hơn các

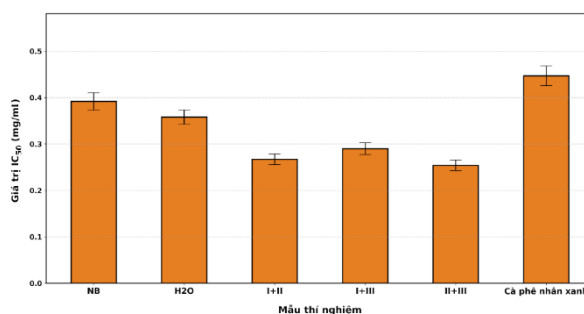
polysaccharide trong lớp nhầy cà phê thành các hợp chất đơn giản, từ đó cung cấp nguồn cơ chất cho quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp acid của hệ vi sinh vật [21].

3.4.2. Tổng hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa của cà phê nhân sau lên men

Kết quả thể hiện trong hình 8 và 9 cho thấy, việc sử dụng tổ hợp các chủng *Bacillus* đã làm gia tăng đáng kể hiệu quả giải phóng các hợp chất phenolic và cải thiện khả năng chống oxy hóa của hạt cà phê sau lên men so với sử dụng đơn chủng. Sau 48 giờ lên men, tất cả các công thức sử dụng tổ hợp các chủng đều đạt giá trị TPC cao hơn rõ rệt so với cà phê nhân xanh không lên men và các mẫu cà phê lên men sử dụng đơn chủng. Tổ hợp II+III có giá trị cao nhất TPC cao nhất, đạt 136 mg/g.



Hình 8. Tổng hàm lượng polyphenol các mẫu cà phê sau lên men.



Hình 9. Khả năng chống oxy hóa các mẫu cà phê nhân sau lên men.

Cùng với sự gia tăng TPC, hoạt tính chống oxy hóa của cà phê nhân sau lên men cũng được cải thiện khi sử dụng tổ hợp các chủng *Bacillus*. Giá trị IC₅₀ của các công thức sử dụng tổ hợp giảm xuống còn 0,25-0,30 mg/ml, thấp hơn rõ rệt so với các công thức sử dụng đơn chủng. Đáng chú ý, tổ hợp II+III tiếp tục thể hiện hiệu quả nổi bật với giá trị IC₅₀ thấp nhất, đạt 0,25 mg/ml và tương quan nghịch có ý nghĩa thống kê với hàm lượng TPC (Hệ số tương quan Pearson: $r < 0$, $p < 0,05$).

Hiệu quả vượt trội của các công thức sử dụng tổ hợp các chủng *Bacillus* nhiều khả năng liên quan đến sự hỗ trợ chức năng giữa các hệ enzyme ngoại bào và tương tác trao đổi chất giữa các chủng. Mỗi chủng *Bacillus* có thể sở hữu một phổ enzyme đặc trưng, bao gồm cellulase, pectinase và protease. Khi được phối hợp, các hệ enzyme này

có thể mở rộng phạm vi cơ chất bị thủy phân trong ma trận thành tế bào thực vật phức tạp của hạt cà phê. Kết quả này khá phù hợp với các nghiên cứu về hệ vi sinh vật trong lên men cà phê của F.D. Bruyn và cs (2017) [22].

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu xác định 3 chủng *Bacillus* phân lập từ hệ sinh thái cà phê gồm 2 chủng *Bacillus* từ cà phê chồn và 1 chủng từ lá cà phê thuộc loài *Bacillus siamensis* (chủng I), *Bacillus velezensis* (chủng II) và *Bacillus aryabhattai* (chủng III) có hoạt tính pectinase đạt vòng thủy phân 13-15 mm. Sử dụng đơn chủng *Bacillus* bản địa cho lên men cà phê Robusta với tỷ lệ rắn/lỏng là 2/1 ở 37°C trong 48 giờ đã thúc đẩy mạnh các biến đổi sinh hóa của dịch lên men, trong đó nổi trội nhất là chủng II đã giảm pH từ 5,23 xuống còn 4,24, hàm lượng đường khử giảm từ 5,10 xuống còn 0,64 g/l sau 48 giờ lên men, gia tăng tổng lượng polyphenol trong hạt cà phê sau lên men từ 67 mg/g lên thành 120 mg/g và cải thiện hoạt tính chống oxy hóa so với đối chứng.

Cà phê lên men sử dụng tổ hợp các chủng *Bacillus* phân lập có hiệu quả cao hơn so với sử dụng đơn chủng đơn. Tổ hợp các chủng II+III làm giảm pH của dịch lên men từ 5,38 xuống còn 4,3, hàm lượng đường khử giảm từ 5,53 g/l xuống còn 0,84 g/l sau 48 giờ lên men, gia tăng tổng lượng polyphenol trong hạt cà phê sau lên men từ 67 mg/g lên thành 136 mg/g và giảm IC₅₀ từ 0,45 xuống 0,25 mg/ml. Kết quả nghiên cứu đã mở ra hướng tiếp cận mới và thực tiễn trong nâng cao chất lượng cà phê cà phê Robusta Việt Nam thông qua quá trình lên men sử dụng các chủng *Bacillus* bản địa có kiểm soát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.M. Tran (2022), “Taxonomic and functional profiles of *Coffea canephora* endophytic microbiome in the Central Highlands region, Vietnam, revealed by analysis of 16S rRNA metagenomics sequence data”, *Data in Brief*, **43**, DOI: 10.1016/j.dib.2022.108372.
- [2] L.X. Ran, X.Y. Wei, E.F. Ren, et al. (2025), “Application of microbial fermentation in caffeine degradation and flavor modulation of coffee beans”, *Foods*, **14**(15), DOI: 10.3390/foods14152606.
- [3] L.W. Lee, M.W. Cheong, P. Curran, et al. (2015), “Coffee fermentation and flavor - An intricate and delicate relationship”, *Food Chemistry*, **185**, pp.182-191, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.124.
- [4] H. Watanabe, C.H. Ng, V. Limviphuvadh, et al. (2020), “Gluconobacter dominates the gut microbiome of the Asian palm civet *Paradoxurus hermaphroditus* that produces kopi luwak”, *PeerJ*, **8**, DOI: 10.7717/peerj.9579.
- [5] A.E. Im, D. Bharti, G. Lim, et al. (2025), “Low-grade green coffee with *Bacillus amyloliquefaciens* NY124 protease: Extraction, purification, and functional

synergy of chlorogenic acid and trigonelline”, *AMB Express*, **15(1)**, DOI: 10.1186/s13568-025-01920-7.

[6] S. Haile, A. Ayele (2022), “Pectinase from microorganisms and its industrial applications”, *The Scientific World Journal*, DOI: 10.1155/2022/1881305.

[7] J.J.R. Medina, K. Ramírez, J.G.R. Peraza, et al. (2018), “Increase of content and bioactivity of total phenolic compounds from spent coffee grounds through solid state fermentation by *Bacillus clausii*”, *Journal of Food Science and Technology*, **55(3)**, pp.915-923, DOI: 10.1007/s13197-017-2998-5.

[8] T.D. Nguyen (2000), *Microbiology Practical Manual*, Education Publishing House, 206pp (in Vietnamese).

[9] K.V. Starostin, E.A. Demidov, A.V. Bryanskaya, et al. (2015), “Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach”, *Scientific Reports*, **5**, DOI: 10.1038/srep16989.

[10] J.S. Ki, W. Zhang, P.Y. Qian (2009), “Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification”, *Journal of Microbiological Methods*, **77(1)**, pp.48-57, DOI: 10.1016/j.mimet.2009.01.004.

[11] AOAC International (2019), *Official Methods of Analysis* (21st ed.), Rockville, MD, USA.

[12] T. Widjaja, N. Hendrianie, E.O. Ningrum, et al. (2019), “Production of reducing sugar from coffee pulp waste using mixture of microorganisms, enzymes, and surfactants”, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **543(1)**, DOI: 10.1088/1757-899X/543/1/012003.

[13] N.T. Nho, L.T.A. Dao, N.T.K. Chi, et al. (2021), “Molecular absorption spectrophotometric method for determining total polyphenol content in roasted ground coffee products”, *TNU Journal of Science and Technology*, **226(16)**, pp.124-132 (in Vietnamese).

[14] J. Hudáková, D. Marcinčáková, J. Legáth (2016), “Study of antioxidant effects of selected types of coffee”, *Folia Veterinaria*, **60(3)**, pp.34-38, DOI: 10.1515/FV-2016-0026.

[15] T. Anggraini, Neswati, R.F. Nanda, et al. (2021), “Effect of processing on green and black tea DPPH radical scavenging activity, IC₅₀ value, total polyphenols, catechin and epigallocatechin gallate content”, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **709(1)**, DOI: 10.1088/1755-1315/709/1/012017.

[16] W. Masoud, L. Jespersen (2006), “Pectin degrading enzyme in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa”, *International Journal of Food Microbiology*, **110(3)**, pp.291-296, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.030.

[17] X. Shen, Q. Wang, H. Wang, et al. (2024), “Microbial characteristics and functions in coffee fermentation: A review”, *Fermentation*, **11(1)**, DOI: 10.3390/fermentation11010005.

[18] M. Haile, W.H. Kang (2019), “The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality”, *Journal of Food Quality*, DOI: 10.1155/2019/4836709.

[19] A. Farah (2012), “Coffee constituents”, *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*, John Wiley & Sons, pp.21-58.

[20] S.J. Hur, S.Y. Lee, Y.C. Kim, et al. (2014), “Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods”, *Food Chemistry*, **160**, pp.346-356, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.112.

[21] C.F. Silva, R.F. Schwan, E.S. Dias, et al. (2000), “Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil”, *International Journal of Food Microbiology*, **60**, pp.251-260, DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00315-9.

[22] F.D. Bruyn, S.J. Zhang, V. Pothakos, et al. (2017), “Exploring the impacts of post-harvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production”, *Applied and Environmental Microbiology*, **83(1)**, DOI: 10.1128/AEM.02398-16.