

Ảnh hưởng của nấm men và enzyme trong lên men kỵ khí đến chất lượng cà phê chè (*Coffea arabica*) đặc sản

Trần Thị Mai Sen, Vũ Kim Dung, Lê Hồng Liên,
Phạm Thị Hạnh, Phạm Thị Quỳnh, Phạm Minh Toại*
Trường Đại học Lâm nghiệp

Influence of yeast and enzymes on the quality of specialty coffee (*Coffea arabica*) processed by anaerobic fermentation

Tran Thi Mai Sen, Vu Kim Dung, Le Hong Lien,
Pham Thi Hanh, Pham Thi Quynh, Pham Minh Toai*
Vietnam National University of Forestry
*Corresponding author: toaipm@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.15.6.2026.013-022>

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung nấm men và hỗn hợp enzyme trong quá trình lên men kỵ khí đến chất lượng cà phê chè đặc sản Sơn La. Thí nghiệm bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh gồm 5 công thức, 3 lần lặp (10 kg/lần). Các nghiệm thức gồm lên men tự nhiên (đối chứng), bổ sung nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (5 hoặc 10 g/kg quả) và kết hợp enzyme pectinase–cellulase (1:1, 0,05 g/kg quả) với nấm men ở hai mức tương ứng. Kết quả cho thấy việc bổ sung nấm men và enzyme làm thay đổi đáng kể thành phần hóa học của cà phê sau lên men. Hàm lượng protein dao động 15,60–19,07% SKK, lipid 10,19–11,48% SKK, trong khi carbohydrate giảm từ 52,74% ở đối chứng xuống 32,37–38,52% ở các công thức xử lý. Hàm lượng polyphenol tổng số và flavonoid tổng số đạt cao nhất ở công thức AAN-S4 với giá trị tương ứng 73,35 mg GAE/g CC và 31,41 mg QE/g CC. Axit chlorogenic đạt cao nhất ở công thức AAN-S1 (0,8225%), trong khi hàm lượng caffeine giảm còn 0,88–1,17% SKK so với đối chứng (1,56% SKK). Kết quả thử nếm cho thấy tất cả các mẫu đều đạt tiêu chuẩn cà phê đặc sản (>80 điểm SCA), trong đó công thức AAN-S1 đạt điểm cảm quan cao nhất (84,42 điểm). Nghiên cứu khẳng định việc bổ sung nấm men và enzyme trong lên men kỵ khí có khả năng cải thiện chất lượng hóa học và cảm quan của cà phê chè đặc sản, trong đó công thức AAN-S1 bổ sung nấm men 5 g/kg quả cho hiệu quả tổng thể tốt nhất.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of yeast and enzyme supplementation during anaerobic fermentation on the quality of specialty Arabica coffee from Son La, Vietnam. The experiment was arranged in a randomized complete block design with five treatments and three replications (10 kg of coffee cherries per replication). Treatments included natural fermentation (control), inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* at 5 or 10 g/kg cherries, and co-application of a pectinase–cellulase enzyme mixture (1:1, 0.05 g/kg cherries) with yeast at the corresponding rates. The results showed that the addition of yeast and enzymes significantly altered the chemical composition of fermented coffee beans. Protein and lipid contents ranged from 15.60–19.07% and 10.19–11.48% dry matter (DM), respectively, while carbohydrate content decreased from 52.74% in the control to 32.37–38.52% in the treated samples. The highest total polyphenol and total flavonoid contents were recorded in treatment AAN-S4, reaching 73.35 mg GAE/g extract and 31.41 mg QE/g extract, respectively. Chlorogenic acid content was highest in AAN-S1 (0.8225%), whereas caffeine content decreased to 0.88–1.17% DM compared with 1.56% DM in the control. Sensory evaluation indicated that all samples achieved specialty coffee status (>82 SCA points), with AAN-S1 obtaining the highest score (84.42 points).

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 07/06/2026

Ngày phản biện: 10/07/2026

Ngày quyết định đăng: 03/08/2026

Từ khóa:

Cà phê chè đặc sản,
chất lượng cà phê chè,
kỵ khí, lên men, nấm men.

Keywords:

Anaerobic, Arabica coffee
quality, fermentation,
specialty arabica coffee, yeast.

These findings demonstrate that yeast and enzyme supplementation during anaerobic fermentation can improve both the chemical and sensory quality of specialty Arabica coffee, with the application of yeast at 5 g/kg (AAN-S1) fresh coffee cherries showing the most favorable overall performance.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong bối cảnh thị trường cà phê toàn cầu đang chuyển dịch mạnh từ sản lượng sang chất lượng, phân khúc cà phê đặc sản (*Specialty Coffee*) ghi nhận tốc độ tăng trưởng ổn định, với yêu cầu ngày càng khắt khe về truy xuất nguồn gốc, độ sạch vi sinh và đặc biệt là sự độc đáo của hồ sơ hương vị. Đối với cà phê chè (*Coffea arabica*), giá trị thương mại không chỉ phụ thuộc vào điều kiện sinh thái và giống mà còn chịu tác động sâu sắc từ kỹ thuật chế biến sau thu hoạch [1].

Cà phê chè đặc sản là sản phẩm cà phê đạt chất lượng cảm quan cao (≥ 80 điểm theo thang đánh giá của Hiệp hội Cà phê Đặc sản - SCA), có hương vị đặc trưng và khả năng truy xuất nguồn gốc rõ ràng. Nghiên cứu các giải pháp lên men có kiểm soát nhằm nâng cao chất lượng cảm quan, gia tăng giá trị sản phẩm và phát triển cà phê chè đặc sản là cần thiết, góp phần nâng cao năng lực cạnh tranh và thu nhập cho người sản xuất.

Quá trình lên men quả cà phê trong chế biến được xem là giai đoạn then chốt quyết định sự hình thành tiền chất hương (Aroma precursors), thông qua các biến đổi sinh hóa phức tạp liên quan đến carbohydrate, protein và pectin [2]. Tuy nhiên, tại nhiều vùng sản xuất hiện nay, quá trình lên men chủ yếu dựa vào hệ vi sinh vật tự nhiên, thiếu kiểm soát về chủng loài, mật độ và điều kiện môi trường. Điều này thường dẫn đến (i) Biến động lớn về chất lượng giữa các mẻ chế biến; (ii) Nguy cơ phát sinh acid bay hơi cao (acetic acid), mùi lồi (over-fermentation) và (iii) Thiếu ổn định về điểm cảm quan theo thang đánh giá của Hiệp hội Cà phê Đặc sản [1, 3].

Trong khi đó, các xu hướng chế biến mới như lên men kỵ khí có kiểm soát đang được áp dụng rộng rãi tại các quốc gia sản xuất cà phê chất lượng cao [4-5]. Các nghiên cứu quốc tế cho thấy việc bổ sung enzyme phân giải pectin và sử dụng chủng nấm men chọn

lọc có thể (i) Tăng tốc độ phân giải lớp nhày và gia tăng hàm lượng axit amin tự do [6-9]; (ii) Kiểm soát quần thể vi sinh vật cạnh tranh [2]; (iii) Tăng hàm lượng ester và hợp chất bay hơi có lợi [10]; (iii) Cải thiện độ phức hợp (complexity) và độ cân bằng (balance) của sản phẩm [11-12].

Tuy nhiên tại Việt Nam, đặc biệt đối với cà phê chè đặc sản, các nghiên cứu mang tính hệ thống về tác động đồng thời của enzyme và nấm men trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí còn hạn chế. Do đó nghiên cứu từ bài báo đã đánh giá đầy đủ các biến đổi hóa sinh trong quá trình lên men cà phê chè đặc sản bằng phương pháp kỵ khí không chỉ có ý nghĩa về mặt khoa học mà còn góp phần nâng cao giá trị gia tăng và khả năng cạnh tranh của cà phê chè đặc sản.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Quả cà phê chè với độ chín $\geq 95\%$ được thu hái tại các khu vực sản xuất cà phê chè đặc sản tại Sơn La. Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (mật độ 10^9 CFU/g) được cung cấp bởi Angel Yeast. Enzyme sử dụng là hỗn hợp pectinase và cellulase (tỷ lệ 1:1, hoạt độ enzyme pectinase 25.000 U/g và cellulase 740 U/g) dạng chế phẩm Pectinex® Ultra SP-L, cellulase từ Novozym.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của enzyme và nấm men đến quá trình lên men kỵ khí: thí nghiệm bố trí theo khối ngẫu nhiên, 3 lần lặp (10 kg/lần); enzyme sử dụng là hỗn hợp pectinase và cellulase (tỷ lệ 1:1); nấm men *Saccharomyces cerevisiae*; gồm 5 công thức để lên men cà phê: (1) Đối chứng: AAN-ĐC - Lên men tự nhiên (không phun enzyme và nấm men); (2) AAN-S1: nấm men nồng độ 5 g/kg quả; (3) AAN-S2: nấm men nồng độ 10 g/kg quả; (4) AAN-S3: enzyme 0,05 g/kg quả + nấm men 5 g/kg quả; (5) AAN-S4: enzyme 0,05 g/kg quả và nấm men 10 g/kg quả.

Thí nghiệm được tiến hành theo dõi trong thời gian 1 tháng, thời gian lên men là 96 giờ. Quả được làm khô trong điều kiện phòng đến khi độ ẩm hạt đạt 12 – 12,5%. Chỉ tiêu thu thập là hàm lượng protein; carbohydrat; lipid tổng số; polyphenol tổng số; flavonoid tổng số; caffeine; acid hữu cơ tổng số và axit chlorogenic.

Hàm lượng protein: xác định theo phương pháp Lowry (1951) có một số cải tiến dựa trên sự kết hợp của phản ứng biure và phản ứng Folin – Ciocalteu [13]. Độ hấp thụ của mẫu được đo tại bước sóng 660 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis. Hàm lượng protein được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0018x - 0,0063$, $R^2 = 0,9902$ (x: $\mu\text{g/mL}$; y: OD660).

Hàm lượng carbohydrate: xác định theo phương pháp DNSA của Sarkar và cộng sự (2024) [14] có cải tiến. Mẫu được thủy phân bằng HCl 2,5M ở 100°C trong 30 phút, trung hoà bằng NaOH 5M đến pH = 7-8. Ly tâm lấy dịch và phản ứng với DNSA 1%. Đo độ hấp thụ quang bằng máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 540 nm. Hàm lượng carbohydrate có dải nồng độ (0,5-2,5 mg/mL) có phương trình hồi quy tuyến tính $y = 3,0253x - 1,316$, $R^2 = 0,9934$ (trong đó x: hàm lượng glucose (mg/mL), y: giá trị OD540). Kết quả biểu thị bằng % sinh khối khô (SKK).

Hàm lượng lipid tổng số: xác định theo phương pháp của Bligh và Dyer (1959) [15] có một số cải tiến. Lấy 0,2 gram sinh khối khô, nghiền với cát thủy tinh, ngâm qua đêm trong chloroform: methanol (2:1, v/v), lọc bằng giấy Whatman GF/C để loại bỏ bã, sau đó tách pha bằng dung dịch NaCl 0,9% (theo tỷ lệ 1:15, w/v). Thu hồi chloroform ở dưới để bay hơi ở 70°C, hoà tan lại bằng n-hexan, lọc và bay hơi lần nữa. Hàm lượng lipid (%) = (khối lượng lipid/khối lượng mẫu) $\times$ 100.

Hàm lượng polyphenol tổng số: xác định theo mô tả của Prior và cộng sự (2005) [16]. Hàm lượng polyphenol tổng số được tính dựa trên đường chuẩn axit gallic (10-200 $\mu\text{g/mL}$) với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0055x - 0,0264$ ($R^2 = 0,9901$). Kết quả được biểu thị bằng mg axit gallic đương lượng

(GAE)/g cao chiết (CC) theo công thức:

$$P = a \times V / m$$

Trong đó:

P: hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g cao chiết);

a: giá trị x từ đường chuẩn với axit gallic ($\mu\text{g/mL}$);

V: thể tích dung dịch cao chiết (mL);

m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (g).

Hàm lượng flavonoid tổng số: xác định theo mô tả của Zhishen và cộng sự (1999) [17]. Hàm lượng flavonoid tổng số với quercetin có dải nồng độ 10-200 $\mu\text{g/mL}$ có phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,001x + 0,0029$ ($R^2 = 0,9987$). Kết quả được biểu thị bằng mg quercetin đương lượng (QE)/g CC theo công thức:

$$P = (a \times V / m) \times k$$

Trong đó:

P: hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g CC);

a: giá trị x từ đường chuẩn quercetin ($\mu\text{g/mL}$);

V: thể tích dung dịch chiết (mL);

m: khối lượng cao chiết có trong thể tích V(g);

k: hệ số pha loãng.

Hàm lượng caffeine: xác định theo tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 9723:2013 ISO 20481:2008 Cà phê và sản phẩm cà phê-Xác định hàm lượng cafein bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Hàm lượng axit hữu cơ tổng số: xác định dựa theo phương pháp của Belay và cộng sự (2008) [18] có cải biến. Cân chính xác 0,5 gram bột cà phê vào bình tam giác, tiến hành bổ sung 50 mL nước cất, chiết bằng phương pháp đun ở 60°C trong 30 phút. Mẫu để nguội và lọc qua giấy lọc Whatman No.1, thu được dung dịch có màu vàng. Dịch mẫu đổ vào phễu chiết, bổ sung 5-10 mL dung môi dichloromethane giúp tách lớp dưới, thu lớp trên, lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn caffeine có bước sóng 273 nm gần với axit hữu cơ tổng số 325 nm (chiếm phần lớn là axit chlorogenic - CGA). Cuối cùng, mẫu được pha loãng sao cho giá trị Abs nằm trong khoảng tuyến tính của đường chuẩn $y = 0,0191x + 0,0015$, $R^2 = 0,9994$. Đo độ hấp thụ (Abs) của các mẫu tại bước sóng 325 nm. Nồng độ C ($\mu\text{g/mL}$) của axit hữu cơ trong dung dịch đo được xác định từ phương trình đường chuẩn. Hàm lượng axit

hữu cơ tổng số trong mẫu (%) được tính theo công thức:

$$P=(a \times V/m) \times f$$

Trong đó:

a: Nồng độ tính từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$);

V: Thể tích dịch chiết ban đầu (mL);

f: Hệ số pha loãng;

m: Khối lượng mẫu cân (g).

Hàm lượng axit chlorogenic: định lượng bằng hệ thống sắc ký lỏng (HPLC) 1260 Agilent (Agilent Technologies, USA) dựa theo mô tả Koskinakis và cộng sự (2025) [19]. Mẫu cà phê sau khi được đồng nhất và cô quay đuối dung môi, được định mức lên 250 mL bằng dung môi EtOH 70%. Trước khi phân tích, mẫu được lọc bằng màng lọc có kích thước lỗ 0,22 μm để loại bỏ chất rắn. Sau đó, mẫu được phân tích trên cột sắc ký pha đảo Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm) –CUD-3. Quy trình phân tích pha động sử dụng hệ dung môi bao gồm, acetonitrile (ACN) và nước cất (H₂O) được axit hoá bằng 0,2 % axit formic (Fa) với tỷ lệ thể tích 6 – 94 (v/v). Hệ thống phân tích được duy trì ổn định với điều kiện như sau: Tốc độ dòng 1,0 mL/min; thể tích tiêm mẫu (Injection volume) là 10 μL ; nhiệt độ được kiểm soát ở 30°C và áp suất hệ thống (pressure) là 104 bar. Hợp chất cần phân tích trong mẫu cà phê được phát hiện bởi đầu dò thông qua việc quét phổ UV tại các bước sóng đặc trưng là 245 nm và 324 nm, với tổng thời gian phân tích là 16 phút. Hàm lượng axit chlorogenic được theo công thức:

$$P=(a \times V_x n/m)$$

Trong đó:

a: Hàm lượng chất chuẩn tính theo đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$);

V: Thể tích dung môi định mức (mL);

n: Hệ số pha loãng;

m: Khối lượng mẫu cân (g).

Thử nếm cà phê: Theo phương pháp của Hiệp hội Cà phê đặc sản (SCA Cupping Protocol 2018)

Phân tích thống kê: Số liệu được xử lý bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 26.0. Các giá trị được biểu thị dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SD). Sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm được đánh giá bằng phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA), kết hợp phép thử Tukey HSD ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hàm lượng Protein, Lipid và Carbonhydrat trong cà phê nhân

Protein: Hàm lượng protein ở các mẫu dao động từ $15,60 \pm 0,05\%$ đến $19,07 \pm 0,05\%$ SKK, đạt giá trị cao nhất tại AAN-S3 và thấp nhất AAN-S1 (Bảng 1). Các giá trị tại các công thức từ AAN-S1 đến AAN-S4 cao hơn so với công bố của M. Degefa và cộng sự (2022) khi các tác giả chỉ ra hàm lượng protein thô của cà phê vùng Ethiopia chỉ dao động từ 6,96% SKK đến 10,14% SKK [20]. Đặc biệt, hàm lượng protein của mẫu AAN-S3 đạt $19,07 \pm 0,05\%$ SKK không chỉ cao hơn các dòng cà phê xanh thông thường mà còn có phần cao hơn so với nghiên cứu của Franca và cộng sự (2005) [21], lần lượt 17,71% SKK (cà phê nhân) và 15,09% SKK (hạt cà phê rang). Từ những so sánh trên cho thấy sự khác biệt của hàm lượng protein có thể phụ thuộc vào giống cà phê, điều kiện trồng, điều kiện lên men hoặc phương pháp xử lý khác nhau.

Bảng 1. Hàm lượng Protein, Lipid và Carbonhydrat trong các mẫu thử

Công thức	Protein (% SKK)		Lipid (% SKK)		Carbonhydrat (% SKK)	
	Giá trị	$\pm\text{SD}$	Giá trị	$\pm\text{SD}$	Giá trị	$\pm\text{SD}$
AAN-ĐC	16,76	0,14	11,48	0,20	52,74	0,07
AAN-S1	15,60	0,05	10,39	0,19	32,37	0,07
AAN-S2	18,15	0,07	10,41	0,20	32,76	0,22
AAN-S3	19,07	0,05	10,19	0,13	34,08	0,13
AAN-S4	16,78	0,07	10,53	0,05	38,52	0,07

Ghi chú: AAN-ĐC - Lên men tự nhiên (không phun enzyme và nấm men); AAN-S1: nấm men nồng độ 5 g/kg quả; AAN-S2: nấm men nồng độ 10 g/kg quả; AAN-S3: enzyme 0,05 g/kg quả + nấm men 5 g/kg quả; AAN-S4: enzyme 0,05 g/kg quả và nấm men 10 g/kg quả.

Lipid tổng số: Dao động từ 10,39 – 11,48% SKK. Trong đó, AAN-ĐC có hàm lượng cao nhất và mẫu AAN-S3 thấp nhất, các kết quả cho thấy hàm lượng lipid giảm dần ở các công thức nghiên cứu (Bảng 1). Kết quả trên cũng cho thấy hàm lượng lipid ở các mẫu khảo sát có giá trị tương đương so với các công bố trước đây như trong nghiên cứu của Caporaso và cộng sự (2018), hàm lượng chất béo có trong cà phê nhân Arabica và Robusta lần lượt đạt 15 – 17% SKK và 7 – 10% SKK [22]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Zhu và cộng sự (2021) [23], hàm lượng lipid có trong cà phê nhân Arabica ở Trung Quốc, Indonesia, Brazil, Colombia... đạt từ 12,88 – 16,29% SKK, cao hơn các mẫu trong thử nghiệm này. Từ những sự khác biệt trên, chứng minh sự khác nhau về địa điểm thu mẫu, phương pháp lên men từ cà phê nhân Arabica dẫn đến sự khác biệt trong hàm lượng lipid tổng.

Carbohydrate: Hàm lượng carbohydrate có giá trị lần lượt là $52,74 \pm 0,07$; $32,37 \pm 0,07$; $32,76 \pm 0,22$; $34,08 \pm 0,13$ và $38,52 \pm 0,06$ % SKK. Mẫu AAN-ĐC đạt giá trị cao nhất ($52,74 \pm 0,07$) và mẫu AAN-S1 đạt giá trị thấp nhất ($32,37 \pm 0,07$), cho thấy hàm lượng carbohydrate có xu hướng giảm ở các công thức lên men có bổ sung enzym/nấm men so với đối chứng.

Hàm lượng carbohydrate trong nghiên cứu dao động từ 32,37–52,74% SKK, cao hơn hàm lượng carbohydrate trong nghiên cứu của Farah (2012), giá trị nghiên cứu khoảng 30–40% SKK [24] và thấp hơn so với nghiên cứu của Saud và cộng sự (2021) khi hàm lượng carbohydrate trong nghiên cứu chiếm 60% SKK [25]. Những sự khác biệt này có thể xuất phát từ sự khác nhau về giống cà phê, nguồn gốc, vị trí địa lý và thay đổi về điều kiện lên men hạt cà phê.

3.2. Hàm lượng Polyphenol tổng số, Flavonoid tổng số và Caffeine

Polyphenol tổng số (TPC): Hàm lượng TPC của các dao động từ $60,80 \pm 0,46$ đến $73,35 \pm 0,28$ mg GAE/g cao chiết (CC) (Bảng 2), đạt giá trị cao nhất là $73,35 \pm 0,28$ mg GAE/g CC (AAN-S4), và thấp nhất đạt $60,80 \pm 0,46$ mg GAE/g CC (AAN-S3). Kết quả nghiên cứu cũng tương đồng với giá trị được công bố của Kwak và cộng sự (2018) [26] khi hàm lượng TPC của cà phê nhân Arabica tại Ethiopia lên men với *S. cerevisiae* đạt 11 đến 355 mg GAE/g CC. Ngoài ra, nghiên cứu của Islam và cộng sự (2023) chỉ ra rằng, các mẫu hạt cà phê lên men có sự khác biệt so với mẫu không lên men khi hàm lượng TPC trong hạt cà phê Arabica, Ấn Độ (không lên men) có giá trị $42,42 \pm 0,01$ mg GAE/g CC, thấp hơn so với mẫu cà phê lên men có bổ sung enzym/nấm men [27].

Bảng 2. Hàm lượng TPC, TFC và caffeine trong các mẫu thử

Công thức	TPC (mg GAE/g CC)		TFC (mg QE/g CC)		Caffeine (% SKK)	
	Giá trị	±SD	Giá trị	±SD	Giá trị	±SD
AAN-ĐC	70,89	0,28	28,38	1,42	1,56	0,043
AAN-S1	67,80	0,28	28,21	1,21	0,94	0,014
AAN-S2	67,35	0,28	31,28	1,10	0,98	0,006
AAN-S3	60,80	0,46	22,94	2,47	1,17	0,012
AAN-S4	73,35	0,28	31,41	1,34	0,88	0,010

Flavonoid tổng số (TFC): Dao động từ $22,94 \pm 2,47$ (AAN-S3) đến $31,41 \pm 1,34$ mg QE/g CC. (AAN-S2), giữa các công thức cho kết quả lớn nhất và nhỏ nhất có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học ($p < 0,05$). Tuy nhiên, giá trị TFC của các mẫu còn lại không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sinh học ($p > 0,05$). Theo

nghiên cứu của Aisyah và cộng sự (2025), hàm lượng flavonoid tổng số của cà phê Robusta được lên men bằng vi khuẩn lactic đạt giá trị $46,91 \pm 6,35$ mg QE/g CC [28], tương đương với TFC của mẫu AAE-S4 ($48,44 \pm 1,33$ mg QE/g CC). Tương tự, nghiên cứu của Insanu và cộng sự (2021) cho thấy giá trị TFC của hạt cà

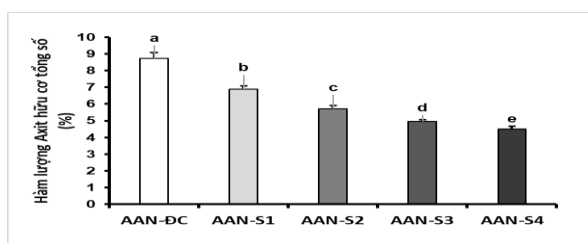
phê loài *Coffea liberica* ở các vùng và điều kiện chiết xuất khác nhau trong khoảng 25,5 - 49,3 QE/g CC [29], phù hợp với TFC của các mẫu cà phê trong nghiên cứu.

Caffeine: Hàm lượng caffeine ghi nhận trong thí nghiệm dao động từ 0,88 - 1,56% SKK và có sự giảm nhẹ về hàm lượng (1,17%) ở các công thức bổ sung enzyme và nấm men so với đối chứng (1,56%). Giá trị này nhìn chung thấp hơn nghiên cứu của Eticha và cộng sự (2023). Cụ thể, hàm lượng caffeine trong các mẫu cà phê Arabica thu hoạch ở Ethiopia đạt đến 1,322 - 2,052% SKK [30]. Sự khác biệt này đến từ mẫu cà phê và dung môi được sử dụng trong quá trình chiết lỏng - lỏng: dichloromethane sử dụng trong nghiên cứu của tác giả có hiệu quả tách chiết caffeine lên đến 98-99%, lớn hơn con số 94,53% của Chloroform. Nghiên cứu của Belay và cộng sự (2008) cũng sử dụng dichloromethane trên đối tượng hạt Arabica ở Ethiopia cho kết quả hàm lượng caffeine dao động khoảng 1,01 - 1,19% SKK [18]. Như vậy, phương pháp đo cũng ảnh hưởng tới kết quả xác định hàm lượng caffeine.

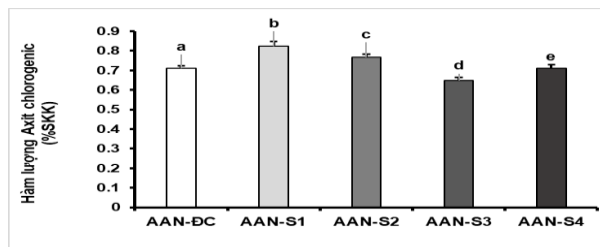
3.3. Hàm lượng axit hữu cơ tổng số và axit chlorogenic

Hàm lượng axit hữu cơ tổng số: Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra trong cà phê nhân, axit hữu cơ bao gồm axit chlorogenic, citric, malic, quinic, oxalic, tartaric, succinic, lactic, acetic và axit phenolic [31]. Tuy nhiên, axit chlorogenic (CGA) chiếm tỷ trọng lớn trong hàm lượng axit hữu cơ tổng số của hạt cà phê và có hoạt tính sinh học cao [32]. Dựa trên cơ sở đó, trong thí nghiệm này, hàm lượng axit hữu cơ tổng số của các công thức được xác định thông qua phương trình đường chuẩn axit chlorogenic (Hình 1A).

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng axit hữu cơ tổng số có sự sai khác giữa các công thức khảo sát với $p < 0,05$. Hàm lượng dao động từ $4,50 \pm 0,13\%$ đến $8,72 \pm 1,21\%$. Trong đó, mẫu đối chứng AAN-ĐC có hàm lượng axit hữu cơ tổng số đạt giá trị cao nhất đạt $8,72 \pm 1,21\%$. Ở các công thức thử nghiệm còn lại, khi bổ sung nấm men và enzyme trong quá trình lên men kỵ khí, hàm lượng axit hữu cơ tổng số có xu hướng giảm dần.



(A)

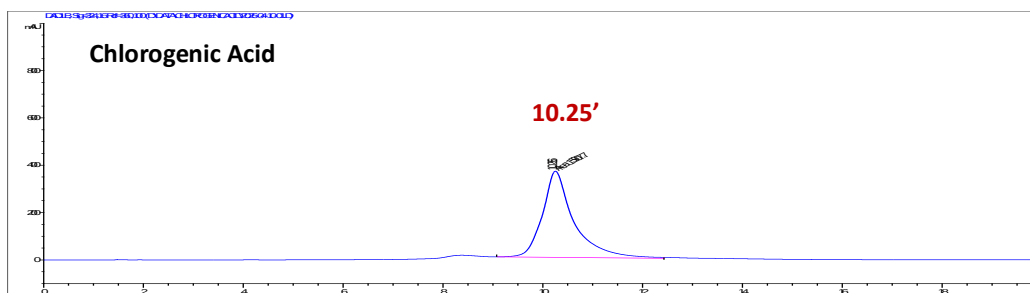


(B)

Hình 1. Hàm lượng axit hữu cơ tổng số (A) và axit chlorogenic (B) của các mẫu cà phê
(a, b, c, d, e là các giá trị có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các công thức)

Axit chlorogenic: Được xác định dựa vào các dữ liệu phổ phân tích chất chuẩn axit

chlorogenic ở Hình 2.

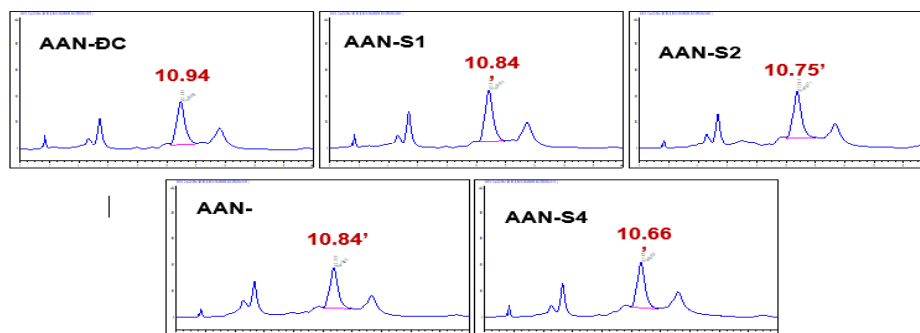


Hình 2. Sắc kí đồ HPLC của chất chuẩn axit chlorogenic

Dựa trên kết quả phân tích sắc ký đồ HPLC các mẫu cà phê ở Hình 3 chỉ ra hàm lượng axit chlorogenic (CGA) duy trì ở mức ổn định, dao động từ 0,6479% đến 0,8225%. Trong đó, mẫu AAN-S1 đạt giá trị cao nhất là 0,8225% và mẫu AAN-S3 có hàm lượng thấp nhất là 0,6479%. Sự chênh lệch giữa các mẫu không quá lớn cho thấy quy trình chiết xuất dịch mẫu đạt độ đồng nhất.

So với các nghiên cứu trước đây, theo Belay và cộng sự (2009) cho thấy hàm lượng CGA chiếm phần lớn trong axit hữu cơ tổng số có trong cà phê nhân và hạt cà phê rang, dao động từ $6,06 \pm 0,17\%$ đến $6,25 \pm 0,32\%$ [33],

kết quả này tương đồng với giá trị nghiên cứu. Jeona và cộng sự (2017) đã báo cáo axit chlorogenic trong cà phê Ethiopia chứa 359,3 mg/100 g trọng lượng khô, cà phê Colombia chứa 335,1 mg/100 g trọng lượng khô và cà phê Sumatra chỉ chứa 290,0 mg/100 g trọng lượng khô [34]. Từ kết quả trên cho thấy, hàm lượng của các mẫu trên thấp hơn so với kết quả thử nghiệm của nghiên cứu này. Nhóm tác giả cũng nhấn mạnh sự khác biệt có thể do mẫu cà phê được thu thập ở các vùng khác nhau, điều kiện khí hậu trồng khác nhau dẫn đến sự thay đổi về hàm lượng CGA ảnh hưởng tới hàm lượng axit hữu cơ tổng số [35].



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC phân tích hàm lượng CGA từ các mẫu cà phê

Khi xác định mối tương quan giữa hàm lượng CGA trong các mẫu cà phê chè của Brazil với các đặc trưng nước pha, Amorim và cộng sự (1975) đã kết luận: các mẫu cà phê chè có chất lượng tách vượt trội (superior beverage quality) là các mẫu có hàm lượng CGAs thấp hơn. Từ kết quả này các tác giả đã khuyến nghị sử dụng CGAs làm yếu tố dự báo và xác định chất lượng nước pha cà phê – hàm lượng CGAs càng thấp chất lượng cà phê tách càng tốt [36].

3.4. Đánh giá cảm quan cà phê sau lên men kỵ khí

Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy việc bổ sung nấm men và enzyme trong quá trình lên men kỵ khí đã ảnh hưởng đáng kể đến chất lượng cảm quan của cà phê chè đặc sản. Tổng điểm cảm quan của các mẫu dao động từ 82,08 - 84,42 điểm, tương ứng với mức chất lượng tốt theo thang đánh giá cà phê đặc sản của SCA Cupping Protocol 2018 (Bảng 3).

Bảng 3. Điểm đánh giá cảm quan các CT thí nghiệm theo phương pháp thử nếm

TT	Fragrance /Aroma	Flavor	Aftertaste	Acidity	Body	Balance	Uniformity	Clean cup	Sweet	Overall	Score
AAN-ĐC	7,58	7,42	7,42	7,42	7,33	7,50	10,0	10,0	10,0	7,50	82,17
AAN-S1	7,92	7,75	7,67	7,92	7,67	7,67	10,0	10,0	10,0	7,83	84,42
AAN-S2	7,58	7,42	7,58	7,50	7,33	7,50	10,0	10,0	10,0	7,50	82,42
AAN-S3	7,75	7,67	7,58	7,58	7,42	7,50	10,0	10,0	10,0	7,42	82,92
AAN-S4	7,50	7,42	7,42	7,50	7,33	7,42	10,0	10,0	10,0	7,50	82,08

Ghi chú: Kết quả là điểm trung bình của các chuyên gia thử nếm; điểm càng cao thể hiện chất lượng cảm quan càng tốt.

Kết quả thử nếm cho thấy tất cả các mẫu thí nghiệm đều đạt trên 82 điểm, đáp ứng tiêu chuẩn cà phê đặc sản theo thang đánh giá của SCA. Trong đó, công thức AAN-S1 đạt tổng điểm cao nhất (84,42 điểm), nổi bật ở các chỉ tiêu hương thơm, vị, hậu vị và độ chua với mùi hương trái cây, hương các loại hạt, hương đường nâu/caramel và hương trái cây nhiệt đới. Kết quả này có thể liên quan đến hàm lượng axit chlorogenic cao nhất (0,8225%) và sự giảm hàm lượng carbohydrate xuống 32,37% SKK, cho thấy quá trình chuyển hóa đường diễn ra hiệu quả, tạo điều kiện hình thành các tiền chất hương vị và các hợp chất thơm trong quá trình lên men. Theo Lee và cộng sự (2015), hoạt động của nấm men trong lên men cà phê có vai trò quan trọng trong việc tạo thành các hợp chất ester, alcohol và acid hữu cơ góp phần nâng cao độ phức hợp và cân bằng hương vị cà phê [7].

Các công thức AAN-S2 và AAN-S3 cũng cho điểm cảm quan cao hơn đối chứng, phù hợp với xu hướng gia tăng hàm lượng protein, flavonoid và các hợp chất hoạt tính sinh học được ghi nhận trong nghiên cứu. Đặc biệt, AAN-S3 đạt hàm lượng protein cao nhất (19,07% SKK), có thể góp phần gia tăng nguồn tiền chất cho các phản ứng Maillard trong quá trình rang, từ đó cải thiện chất lượng cảm quan của sản phẩm [21].

Mặc dù AAN-S4 đạt hàm lượng polyphenol tổng số (73,35 mg GAE/g CC) và flavonoid tổng số (31,41 mg QE/g CC) cao nhất, tổng điểm cảm quan chỉ đạt 82,08 điểm. Điều này cho thấy việc gia tăng các hợp chất hoạt tính sinh học chưa đồng nghĩa với cải thiện chất lượng cảm quan, do nồng độ nấm men và enzyme cao có thể làm thay đổi cân bằng chuyển hóa trong quá trình lên men, ảnh hưởng đến sự hình thành các hợp chất hương mong muốn. Kết quả này phù hợp với nhận định của Ribeiro và cộng sự (2019) rằng hiệu quả của lên men kỵ khí phụ thuộc chặt chẽ vào chủng vi sinh vật và điều kiện lên men, trong đó mức

độ xử lý quá mạnh có thể không mang lại lợi ích cảm quan tương ứng [4].

Theo giải nghĩa của SCAA, thể chất (body) là cảm nhận về độ nhờn (do lipid) và độ sánh (do chất xơ và chất đậm trong nước pha) quyết định. Đối chiếu kết quả tại Bảng 1 và Bảng 3 cho thấy không có mối tương quan hàm lượng các hợp chất protein, lipid và carbohydrate đến điểm thể chất của tách cà phê. Điều này có thể được lý giải rằng: hàm lượng các hợp chất trong cà phê nhân (sống) ít liên quan đến mùi vị cà phê tách do quá trình xử lý nhiệt (rang để thử nếm) làm biến đổi nhiều tiền tố mùi vị và CGAs có thể mất 60-80% khối lượng.

Nhìn chung, công thức thí nghiệm AAN-S1 (bổ sung nấm men ở mức 5 g/kg quả) cho hiệu quả tốt nhất về chất lượng cảm quan, đồng thời duy trì hàm lượng các hợp chất sinh học quan trọng, cho thấy đây là công thức có tiềm năng ứng dụng trong chế biến cà phê chè đặc sản lên men kỵ khí.

4. KẾT LUẬN

Bổ sung nấm men và enzyme trong quá trình lên men kỵ khí đã ảnh hưởng rõ rệt đến chất lượng cà phê chè đặc sản Sơn La. Các công thức xử lý giúp giảm hàm lượng carbohydrate và caffeine, đồng thời gia tăng hoặc duy trì hàm lượng các hợp chất hoạt tính sinh học như polyphenol, flavonoid và axit chlorogenic. Đặc biệt, công thức bổ sung nấm men 5 g/kg quả (AAN-S1) cho chất lượng cảm quan tốt nhất với 84,42 điểm SCA, trong khi công thức enzyme 0,05 g/kg kết hợp nấm men 10 g/kg quả (AAN-S4) đạt hàm lượng polyphenol và flavonoid cao nhất. Kết quả cho thấy việc ứng dụng nấm men và enzyme trong lên men kỵ khí là giải pháp tiềm năng nhằm nâng cao chất lượng hóa học và cảm quan, góp phần gia tăng giá trị cho cà phê chè đặc sản.

Mặc dù lên men kỵ khí có thể cải thiện chất lượng cảm quan, phương pháp này cũng tiềm ẩn rủi ro nếu không kiểm soát chặt chẽ điều kiện lên men. Thời gian lên men quá dài có thể dẫn đến nhiễm tạp, xuất hiện các mùi vị không

mong muốn như mùi thối, mùi hành (oniony) hoặc vị lên men quá mức (over-fermented), làm giảm chất lượng cảm quan. Ngoài ra, lên men kéo dài còn có thể làm hao hụt vật chất khô của hạt và ảnh hưởng bất lợi đến khả năng bảo quản cà phê sau chế biến.

Lời cảm ơn

Nội dung bài báo là một phần kết quả nghiên cứu của đề tài “Ứng dụng khoa học và công nghệ xây dựng mô hình liên kết sản xuất và tiêu thụ cà phê chè đặc sản phục vụ xây dựng nông thôn mới vùng Tây Bắc”, thuộc Chương trình Khoa học và Công nghệ phục vụ xây dựng nông thôn mới giai đoạn 2021–2025 do Trường Đại học Lâm nghiệp chủ trì thực hiện. Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn Chủ nhiệm Đề tài đã tạo điều kiện, hỗ trợ kinh phí thực hiện và cho phép sử dụng các kết quả thí nghiệm để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Mai Sao Dam, Thanh Ba Nguyen, László Baranyai & Lien Le Phuong Nguyen (2025). Review of Factors Affecting Development of Sensory Attributes of Coffee. *Journal of Sensory Studies*. 40:e70098: 1-16. DOI: 10.1111/joss.70098

[2]. F. De Bruyn, Zhang, S. J., Pothakos, V., Torres, J., Lambot, C., Moroni, A. V., Callanan, M., Sybesma, W., & De Vuyst, L. (2017). Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean production. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(1). e02398-16. DOI: 10.1128/AEM.02398-16

[3]. Nguyễn Việt Tấn (2008). Một số yếu tố ảnh hưởng đến kết quả xử lý vỏ và thịt quả cà phê theo phương pháp ướt. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. Truy cập từ: <https://tapchicongthuong.vn/mot-so-yeu-to-anhhuong-den-ket-qua-xu-ly-vo-va-thit-qua-ca-phe-theo-phuong-phap-uo-7904.htm>.

[4]. L. S. Ribeiro, Miguel, M. G. C. P., Evangelista, S. R., Martins, P. M. M., & Schwan, R. F. (2019). Self-induced anaerobic fermentation for specialty coffee processing: Impact on microbial community, chemical composition and sensory quality. *Food Research International*. 121: 429-438. DOI: 10.1016/j.fm.2021.103962

[5]. Becquer Frauberth, Camayo-Lapa, Quispe-Solano, Miguel Ángel, Álvarez-Bernuy de Veliz, Silvia Marina, Camayo-Vivas, Adrian Becquer, Canales-

Yaranga, Kempia Toribia, Asto Hinojosa & Roberto César (2024). Impact of Aerobic and Anaerobic Fermenters on the Sensory Profile of Coffee in Villa Rica, Peru. *Evolutionary Studies in Imaginative Culture*. 2071-2085.

[6]. S. Avallone, Guyot, B., Brillouet, J. M., Olguin, E., & Guiraud, J. P. (2001). Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*. 42(4): 252-256. DOI: 10.1007/s002840110213

[7]. L. W. Lee, Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q (2015). Coffee fermentation and flavor – An intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*. 185: 182-191. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.124

[8]. Nguyễn Văn Thường (2012). Báo cáo tổng kết đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu ứng dụng enzyme để tách lớp nhớt của hạt cà phê thóc trong công nghệ chế biến ướt”, thuộc Chương trình khoa học công nghệ KC06.

[9]. Phan Thanh Bình Phạm Văn Thao & Nguyễn Thị Thoa (2021). Nghiên cứu ứng dụng enzyme có hoạt lực cao để sản xuất cà phê với chất lượng cao trong phương pháp chế biến ướt. Truy cập từ: <http://wasi.org.vn/nguyen-cuu-ung-dung-enzyme-co-hoat-luc-cao-de-san-xuat-ca-phe-voi-chat-luong-cao-trong-phuong-phap-che-bien-uo-7/>.

[10]. A. P. P. Bressani, Martinez, S. J., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2018). Characteristics of fermented coffee inoculated with yeast starter cultures using different inoculation methods. *Food Science and Technology*. 92(2012): 212-219. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.02.029

[11]. H. Elhalis, Cox, J., Frank, D. & Zhao, J. (2021). Microbiological and chemical characteristics of wet coffee fermentation inoculated with *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kudriavzevii* and their impact on coffee sensory quality. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2021.713969

[12]. L. W. Lee, Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q (2016). Modulation of coffee aroma via the fermentation of green coffee beans with *Rhizopus oligosporus*: I. Green coffee. *Food Chemistry*. 211: 916-924. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.076

[13]. O. H. Lowry, Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biology Chemistry*. 193: 265-275.

[14]. M. Sarkar, Sah, A., Agarwal, P., Joshi, S. & Hait, S. (2024). Quatification Tests for Carbohydrate Detection. *Practical Biochemistry*. 32-54.

[15]. E. G. Bligh & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(8): 911-917.

- [16]. R. L. Prior, Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and polyphenols in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(10): 4290-4302.
- [17]. J. Zhishen, Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999) (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64(4): 555-559.
- [18]. A. Belay, Ture, K., Redi, M., & Asfaw, A. (2008). Determination of caffeine in coffee samples by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Violet-Visible Spectrophotometry methods from Wollega, Ethiopia. *Ethiopian Journal of Education and Sciences*. 4(1): 11-101.
- [19]. S. E. Koskinakis, Stergiopoulos, C., Vasileiou, C., & Krokida, M (2025). Sustainable valorization of coffee silverskin waste: Pressurized liquid extraction of bioactive compounds. *Foods*. 14(4): 615.
- [20]. S. Alamerew M. Degafa, A. Mohammed & A. Gemechu (2022). Biochemical Composition Variation among Southern Ethiopian Arabica Coffee (*Coffea Arabica* L.) Genotypes. *International Journal of Agronomy*. 22: 1-10.
- [21]. A.S.; Mendonça Franca, J.C.F. & Oliveira, S.D (2005). Composition of Green and Roasted Coffees of Different Cup Qualities. *LWT-Food Sci. Technol*. 38: 709-715.
- [22]. N. Caporaso, Whitworth, M. B., Grebb, S., & Fisk, I. D. (2018). Rapid prediction of single green coffee bean moisture and lipid content by hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*. 227: 18-29.
- [23]. M. Zhu, Long, Y., Ma, Y., Chen, Y., Yu, Q., Xie, J., Li, B., & Tian, J (2021). Comparison of chemical and fatty acid composition of green coffee bean (*Coffea arabica* L.) from different geographical origins. *Food Science and Technology*. 147: 110802. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110802.
- [24]. A. Farah (2012). Coffee constituents. In Y. F. Chu (Ed.), *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. Wiley-Blackwell. 21-58.
- [25]. Saud, S. & Salamatullah, A.M (2021). Relationship between the Chemical Composition and the Biological Functions of Coffee. *Molecules*. 26 (7634). DOI: 10.3390/molecules26247634.
- [26]. H. S. Kwak, Jeong, Y., & Kim, M (2018). Effect of yeast fermentation of green coffee beans on antioxidant activity and consumer acceptability. *Journal of Food Quality*. 2018: 1-8. DOI: 10.1155/2018/5967130
- [27]. M. Islam, Huang, Y., & Jain, P (2023). Enzymatic hydrolysis of soy protein to high moisture textured meat analogue with emphasis on antioxidant effects: As a tool to improve techno-functional property. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 50: 102700. DOI: 10.1016/j.bcab.2023.102700
- [28]. N. Aisyah, Sunarti, TC, & Meryandini, A (2025). Antioxidant activity, total phenolic, flavonoid, and caffeine contents of robusta coffee (*Coffea canephora*) fermented with lactic acid bacteria. *Menara Perkebunan*. 93 (1): 21 - 30. DOI: 10.22302/iribb.jur.mp.v93i1.604
- [29]. M. Insanu, Fidrianny, I., Imtihan, N. H. H., & Kusmardiyani, S (2021). Liberica coffee (*Coffea liberica* L.) from three different regions: In vitro antioxidant activities. *Biointerface Res. Appl. Chem*. 11(5): 13031-13041. DOI: 10.33263/BRIAC115.1303113041
- [30]. S. Eticha, & Eskezia, M. (2023). Determination of caffeine in coffee samples by High Performance Liquid Chromatography method from selected woredas of Western Hararge, Ethiopia. *International Journal of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology*. 5: 8-17. DOI: 10.11648/j.ijbbmb.20200501.12.
- [31]. W. D. Santiago, Teixeira, A. R., Santiago, J. A., Lopes, A. C. A., & Bragança, R. M (2020). Development and validation of chromatographic methods to quantify organic compounds in green coffee (*Coffea arabica*) beans. *Australian Journal of Crop Science*. 14(8): 1275-1282.
- [32]. F.; Borompichaichartkul Kulapichitr, C.; Fang, M.; Suppavorasatit, I. & Cadwallader, K.R (2022). Effect of post-harvest drying process on chlorogenic acids, antioxidant activities and CIE-Lab color of Thai Arabica green coffee beans. *Food Chem*. 366. 130504.
- [33]. A. Belay, & Gholap, A. V. (2009). Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 3(11): 234-240.
- [34]. J.-S.; Kima Jeona, H.-T.; Jeonga, I.-H.; Honga, S.-R.; Oha, M.-S.; Parka, K.-H.; Shimb, J.-H. & Abd El-Aty, A.M (2017). Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. *J. Chromatogr. B*. 1064: 115-123.
- [35]. Ponder, A., Krakówko, K., Kruk, M., Kuliński, S., Magoń, R., Ziółkowski, D., Jarién, E., & Hallmann, E. (2025). Organic and conventional coffee beans, infusions, and grounds as a rich sources of phenolic compounds in coffees from different origins. *Molecules*. 30(6): 1290.
- [36]. Henrique V. Amorim, Antonio A. Teixeira, M. Melo, V. F. Cruz & Eurípedes Malavolta (1975), cited in Clark, R.J. & Macrae, R. (1988). *Coffee: Chemistry*, Vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York. 197.