



TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH LÊN MEN GIẤM VANG KHOAI LANG TÍM (*Ipomoea batatas* L.) VÀ ỔN ĐỊNH ANTHOCYANIN, HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HOÁ TRONG QUÁ TRÌNH TỒN TRỮ

Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, Lê Ngọc Vinh, Ngô Văn Tài và Nguyễn Minh Thủy

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 24/10/2016

Title:

Optimization of parameters during vinegar alcohol fermentation stage and its storage stability

Từ khóa:

Acetobacter aceti, giấm vang, khoai lang tím, lên men, tối ưu hóa

Keywords:

Acetobacter aceti, wine vinegar, purple sweet potato, fermentation, optimization

ABSTRACT

The study was conducted to optimize the parameters for acetic fermentation from purple sweet potato with the presence of *Acetobacter aceti*. Different parameters for acetic acid production including ethanol concentration ($3 \pm 7\%$ v/v), sugar concentration (25 ± 75 g/L) and bacterial density ($10^4 \pm 10^6$ cell/mL) in the must were optimized using a Box-Behnken design. The stability of anthocyanin and antioxidant activity of wine vinegar which was further supplemented with ascorbic acid and citric acid at the concentration ranging from 0.25 to 0.75 mg/L, was evaluated during storage at ambient temperature. The optimum conditions that resulted in the highest acetic acid concentration (4.275%) were found to be ethanol concentration of 5.5% (v/v), sugar concentration of 56.5 (g/L), and bacterial density of 10^5 cell/mL. The vinegar fermentation was conducted under optimum conditions to verify the obtained model. The experimental value was in agreement with the predicted value, thus indicating suitability of the model to estimate the parameters for acetic fermentation from purple sweet potato wine. With the time of storage, a decrease in anthocyanin content and antioxidant activity was observed. Citric acid supplementation of 0.05% could improve the stability of anthocyanin content and antioxidant activity during storage.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tối ưu hóa các thông số cho quá trình lên men acid acetic từ khoai lang tím với sự hiện diện của vi khuẩn *Acetobacter aceti*. Các thông số của quá trình lên men bao gồm nồng độ ethanol (3 - 7% v/v), nồng độ đường (25 - 75 g/L) và mật số vi khuẩn (10^4 - 10^6 tế bào/mL) trong dịch lên men được tối ưu hóa bằng phương pháp bố trí thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken. Sự ổn định của anthocyanin và hoạt tính chống oxy hóa của giấm vang có bổ sung acid ascorbic và acid citric (nồng độ 0,25 - 0,75 mg/L) và được tồn trữ ở nhiệt độ phòng được đánh giá trong thời gian tồn trữ. Các điều kiện lên men tối ưu cho nồng độ acid acetic cao nhất (4,275%) được xác định với nồng độ ethanol 5,5% v/v, nồng độ đường 56,5 (g/L) và mật độ vi khuẩn 10^5 tế bào/mL. Quá trình lên men cũng đã được tiến hành trong điều kiện tối ưu nhằm kiểm định mô hình. Các giá trị thực nghiệm tương đồng với giá trị dự đoán đã cho thấy sự phù hợp của mô hình để dự đoán các thông số cho quá trình lên men acid acetic từ rượu vang khoai lang tím. Trong thời gian tồn trữ, hàm lượng anthocyanin và hoạt tính chống oxy hóa của giấm vang giảm. Việc bổ sung acid citric 0,05% đã giúp ổn định được hàm lượng anthocyanin và hoạt tính chống oxy hóa trong thời gian tồn trữ.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, Lê Ngọc Vinh, Ngô Văn Tài và Nguyễn Minh Thủy, 2016. Tối ưu hóa quá trình lên men giấm vang khoai lang tím (*Ipomoea batatas* L.) và ổn định anthocyanin, hoạt tính chống oxy hóa trong quá trình tồn trữ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 1): 33-42.

1 GIỚI THIỆU

Khoai lang là một trong năm loại lương thực quan trọng nhất đối với các nước đang phát triển và góp phần đảm bảo an ninh lương thực (Oke và Workneh, 2013). Khoai lang tím cung cấp nhiều chất dinh dưỡng tốt cho cơ thể như tinh bột, protein, các acid amin, vitamin A, B, C, E và hơn 10 loại nguyên tố vi lượng cần thiết khác như calci, kẽm, sắt, magiê, kali, natri, phosphor, ... Đặc biệt, khoai lang tím còn chứa nhiều hợp chất chống oxy hóa mạnh như phenol, anthocyanin, anthocyanidin, ... giúp bảo vệ các lipoprotein tỷ trọng thấp khỏi các quá trình oxy hóa, loại bỏ gốc tự do, ngăn ngừa ung thư, cải thiện chức năng thị giác, ức chế kết tụ tiểu cầu và nhiều chức năng sinh lý khác (Kano *et al.*, 2005).

Việc chế biến sản phẩm giấm vang từ khoai lang tím nhằm đa dạng hóa sản phẩm, tăng giá trị sử dụng nguồn nguyên liệu dồi dào ở Đồng bằng sông Cửu Long và cũng là một trong những giải pháp nâng cao thu nhập cho người trồng khoai lang tím. Bên cạnh đó, giấm có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa, trị bệnh tiểu đường, điều trị khối u, chống béo phì, phòng chống các bệnh về tim mạch, giảm huyết áp, giảm cholesterol (Budak *et al.*, 2014). Trong quá trình chế biến sản phẩm giấm vang khoai lang tím, giai đoạn lên men giấm đóng vai trò đặc biệt quan trọng và phụ thuộc vào nhiều yếu tố như hàm lượng ethanol, hàm lượng đường ban đầu và mật số vi khuẩn hiện diện trong dịch lên men, nhiệt độ lên men... (Qiu *et al.*, 2015). Đồng thời, hợp chất anthocyanin trong sản phẩm giấm vang rất dễ bị oxy hóa trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau như nhiệt độ, ánh sáng, độ pH của sản phẩm (Lê Ngọc Tú và *ctv.*, 2003), dẫn đến chất lượng sản phẩm giấm vang dễ bị biến đổi trong thời gian tồn trữ. Một số nghiên cứu đã được thực hiện nhằm cải thiện độ bền của anthocyanins trên sản phẩm từ rau quả thông qua bổ sung các phụ gia khác nhau như acid, muối, đường, chất nhũ hóa và các hợp chất phenol khác (Rein and Heinonen, 2004; Brenes *et al.*, 2005). Tuy nhiên, những nghiên cứu về các tác chất có khả năng ổn định anthocyanins trong sản phẩm giấm vang khoai lang tím vẫn chưa được thực hiện. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu tối ưu hóa các thông số của tiến trình lên men giấm vang khoai lang tím, sử dụng mô hình bề mặt đáp ứng, chọn lựa tác nhân thích hợp bảo vệ anthocyanin và duy trì hoạt tính sinh học sản phẩm giấm vang khoai lang tím.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Giống khoai lang tím Nhật (Nhật tím HL491) thu hoạch tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long được làm sạch và tồn trữ trong kho mát với nhiệt độ khoảng 18°C. Giống nấm men: dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* phân lập từ rượu vang khóm (Nguyễn Văn Thành và *ctv.*, 2013). Môi trường tăng sinh nấm men được sử dụng là môi trường PG (Potato Glucose) có bổ sung khoáng (khoai tây 200 g, glucose 20 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, KH₂PO₄ 1 g, nước cất vừa đủ 1000 mL (Lương Đức Phẩm, 2005). Giống vi khuẩn sử dụng cho quá trình lên men giấm vang là vi khuẩn *Acetobacter aceti* (ATCC, Mỹ) và được tăng sinh trong môi trường (Glucose–Yeast extract–Calcium carbonate).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị dịch rượu vang khoai lang tím

Khoai lang tím được phân tích chất lượng ban đầu (hàm lượng ẩm, anthocyanin, tinh bột). Khoai được hấp chín, sau đó xay nhuyễn với tỷ lệ nước bổ sung và khoai là 2:1. Sử dụng chế phẩm enzyme α -amylase (Novozyme, 132,5 U/g) cho quá trình dịch hóa với nồng độ 0,05%, nhiệt độ dịch hóa 80°C trong 40 phút. Thực hiện quá trình đường hóa bằng enzyme glucoamylase (Novozyme, Amyloglucosidase 296,5 U/g) với nồng độ 0,1%, nhiệt độ kiểm soát là 60°C trong 120 phút (Huỳnh Văn Vũ và Nguyễn Minh Thủy, 2014). Sau đó, hỗn hợp sau khi thủy phân được lọc và thu nhận dịch đường. Dịch khoai lang được điều chỉnh bằng acid citric đến pH 4,5 và sử dụng đường saccharose để nâng °Brix lên 22% nhằm tạo điều kiện tốt cho nấm men hoạt động trong giai đoạn lên men rượu. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được hoạt hóa và bổ sung vào dịch đường ở mật số 10⁶ tế bào/mL (Nguyễn Văn Thành và *ctv.*, 2013). Quá trình lên men rượu kết thúc sau khoảng 10 ngày (nồng độ rượu khoảng 10% v/v). Sau thời gian lên men rượu dịch lên men được chiết rút, loại bỏ cặn bã (tế bào nấm men) và chuẩn bị cho quá trình lên men giấm tiếp theo.

2.2.2 Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa quá trình lên men giấm vang khoai lang tím

Rượu sau khi lên men được pha loãng thành các nồng độ khác nhau, sau đó bổ sung vào dịch lên men hàm lượng đường và mật số vi khuẩn như bố trí thí nghiệm để thực hiện quá trình oxy hóa ethanol thành acid acetic.

Quá trình lên men giấm vang khoai lang tím từ dịch rượu được thực hiện ở nhiệt độ phòng. Thí nghiệm được thực hiện với 3 nhân tố bao gồm: hàm lượng ethanol trong dịch rượu lên men (X₁),

hàm lượng đường saccharose bổ sung (X₂) và mật số vi khuẩn *A.aceti* (X₃). Mỗi nhân tố được thực hiện với 3 mức độ (Bảng 1).

Bảng 1: Các nhân tố và mức độ khảo sát trong thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken

Ký hiệu	Nhân tố	Đơn vị	Mức độ		
			-1	0	1
X ₁	Hàm lượng ethanol	% v/v	3	5	7
X ₂	Hàm lượng đường	g/L	25	50	70
X ₃	Mật số vi khuẩn	tế bào/mL	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶

Mô hình Box-Behnken được bố trí để tìm ra điểm tối ưu với 6 điểm trung tâm (Bảng 2). Tổng số thí nghiệm được thực hiện gồm có 18 thí nghiệm (trong đó có 6 điểm trung tâm). Các thông số của quá trình lên men giấm vang tím được tối ưu hóa dựa trên chỉ tiêu nồng độ acid acetic tạo ra trong sản phẩm giấm vang. Sản phẩm giấm vang khoai lang tím cũng được phân tích hàm lượng anthocyanins, khả năng khử gốc tự do DPPH.

Bảng 2: Bố trí thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken

STT	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	0	0
2	1	0	1
3	1	-1	0
4	-1	0	-1
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	1	-1
8	0	0	0
9	1	1	0
10	0	0	1
11	0	0	0
12	-1	0	1
13	-1	1	0
14	0	1	1
15	0	0	0
16	0	-1	-1
17	1	0	-1
18	0	0	0

2.2.3 Khảo sát khả năng ổn định hợp chất anthocyanins và khả năng khử gốc tự do DPPH của giấm vang khoai lang tím trong quá trình tồn trữ

Giấm vang thu nhận sau quá trình lên men được bổ sung các tác nhân bảo quản là acid citric, acid ascorbic với các liều lượng thay đổi (0,025 - 0,075% w/v) và mẫu đối chứng (không bổ sung tác chất). Sau đó, giấm vang được rót chai và thanh trùng ở nhiệt độ 85°C trong 1 phút (Joshi, 2016). Sản phẩm được bảo quản trong chai thủy tinh ở điều kiện nhiệt độ môi trường (28 - 30°C).

2.3 Các phương pháp phân tích

2.3.1 Phân tích hàm lượng acid tổng số (tính theo acid acetic)

Hàm lượng acid tổng số được phân tích bằng phương pháp chuẩn độ với dung dịch NaOH 0,1N. Độ acid toàn phần theo phần trăm được tính theo công thức: $X\% = K.n.100/V$ (với n là số mL NaOH 0,1 N dùng chuẩn độ V mL dịch thử, V là thể tích mẫu thử (mL), K là hệ số tương ứng với từng loại acid, K của acid acetic là 0,006).

2.3.2 Phân tích hàm lượng anthocyanin (phương pháp pH vi sai)

Hàm lượng acid tổng số được phân tích bằng phương pháp pH vi sai (Huỳnh Thị Kim Cúc và ctv., 2005). Mẫu được pha loãng trong hai dung dịch đệm: đệm kali clorua 0,025 M (pH=1.0) và đệm natri acetate 0,4M (pH=4.5). Mẫu đo độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ được thực hiện ở bước sóng 520 nm và 700 nm.

Lượng anthocyanin được tính theo công thức: $a = \frac{A.M.K.V}{\epsilon.l}$ (g).

Trong đó: $A = (A_{520nm,pH=1} - A_{700nm,pH=1}) - (A_{520nm,pH=4,5} - A_{700nm,pH=4,5})$ (với A_{520nm} , A_{700nm} : Độ hấp thụ tại bước sóng 520 và 700 nm, ở pH=1 và pH=4,5); a: lượng anthocyanin (g); M: khối lượng phân tử của anthocyanin, được biểu diễn qua cyanidin 3- glucoside (449,2 g/mol); l: chiều dày cuvet (1 cm); K: độ pha loãng; V: thể tích dịch chiết (L); ϵ : hệ số hấp thụ phân tử, (25,740 mol⁻¹ cm⁻¹ tại $\lambda = 520$ nm).

Hàm lượng anthocyanin (%) = $a \times 100\% / [m \times (100-w) \times 10^{-2}]$

Trong đó, a: lượng anthocyanin (g); m: khối lượng nguyên liệu ban đầu (g); w: độ ẩm nguyên liệu (%).

2.3.3 Phân tích hoạt tính chống oxy hóa DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm được phân tích dựa trên khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH (Chun et al., 2014). Pha 7,9 mg DPPH trong

200 mL methanol 80% trong bóng tối. Cho 50 µL dịch chiết vào 2,95 mL dung dịch DPPH, lắc đều rồi để yên trong 30 phút. Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 517 nm. Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức: %DPPH = $\frac{A_{control}-A_1}{A_{control}} \cdot 100$. Trong đó: $A_{control}$ là độ hấp thụ quang học của mẫu trắng không chứa dịch chiết và A_1 là độ hấp thụ quang học của mẫu có chứa dịch chiết.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Các dữ liệu thu thập đã được tính toán, phân tích thống kê và sử dụng phương pháp mô hình bề mặt đáp ứng, trên cơ sở xây dựng mô hình toán học bậc hai phù hợp được đề xuất bằng phần mềm STATGRAPHIC Centurion XV.I. Tương quan giữa biến phụ thuộc với các biến độc lập, phương trình hồi quy đa thức được áp dụng. Mô hình toán học bậc hai trong phương trình 1 được đề xuất:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k b_{ij} X_i X_j + e \quad (1)$$

Trong đó: Y là biến phụ thuộc (Brix, hàm lượng đường khử), b_0 là hệ số chặn, b_i ($i = 1, 2, \dots, k$) là hệ số phương trình bậc 1, b_{ii} là hệ số tương tác, b_{ij} là hệ số phương trình bậc 2 của biến X_i và e là sai số ngẫu nhiên.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Thành phần hóa học của khoai lang tím và rượu khoai lang tím

Chất lượng nguồn nguyên liệu ban đầu có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng sản phẩm giấm vang khoai lang tím. Thành phần hóa học của khoai lang tím được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng ẩm trong khoai lang tím khá cao (68,69%). Hàm lượng tinh bột trong phần thịt củ là 20,75% (7,25% là hàm lượng đường khử). Với hàm lượng tinh bột này, một hàm lượng đường lớn có thể tạo ra nhờ vào quá trình thủy phân tinh bột bằng hệ enzyme amylase. Hàm lượng anthocyanin trong khoai lang tím cao chiếm đến 0,06%, là sắc tố tự nhiên rất tốt,

làm tăng giá trị cảm quan cho sản phẩm. Đặc biệt, anthocyanin có khả năng chống oxy hóa cao hơn cả vitamin C và vitamin E (Bagchi *et al.*, 1998) nên lượng anthocyanin này có tác động tích cực đến giá trị dinh dưỡng của sản phẩm.

Bảng 3: Thành phần hóa học (%) của khoai lang tím Nhật thu hoạch tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long

Thành phần	Hàm lượng
Độ ẩm (%)	68,69±0,02*
Tinh bột (%)	20,75±0,63
Đường khử (%)	7,25±0,69
Anthocyanin (mg/100g)	63±10

Ghi chú: * Độ lệch chuẩn (STD) của giá trị trung bình

Rượu vang khoai lang tím có hàm lượng ethanol và đường tương ứng là 10,17% v/v và 11,2 g/L sau thời gian lên men rượu 10 ngày, đây là nguồn cơ chất cho quá trình lên men acid acetic tiếp theo (Bảng 4). Đồng thời, hàm lượng anthocyanin trong rượu cũng tồn tại khá cao (23 mg/100 mL), cho thấy nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất giấm mang cả giá trị về chất lượng và cảm quan.

Bảng 4: Thành phần hóa học của rượu khoai lang tím Nhật sau 10 ngày lên men

Thành phần	Giá trị
Hàm lượng ethanol (%v/v)	10,17±0,72*
Hàm lượng đường (g/L)	11,2±0,6
Hàm lượng anthocyanin (mg/100mL)	23±1

Ghi chú: *Độ lệch chuẩn (STD) của giá trị trung bình

3.2 Tối ưu hóa quy trình chế biến giấm vang khoai lang tím

Các nhân tố hàm lượng ethanol (X_1), hàm lượng đường bổ sung (X_2) và mật số vi khuẩn *A. aceti* (X_3) đều có ảnh hưởng đến hàm lượng acid acetic sinh ra trong quá trình lên men giấm. Kết quả phân tích thống kê thể hiện ở Bảng 5 cho thấy ảnh hưởng của từng biến độc lập riêng lẻ (X_1, X_2, X_3), giá trị bậc hai (X_1^2, X_2^2, X_3^2) và hay tương tác (X_2X_3) đều thể hiện có ý nghĩa ($p < 0,05$) khi tham gia vào mô hình.

Bảng 5: Kết quả phân tích thống kê ANOVA mức độ ý nghĩa của các hệ số hồi quy cho hàm lượng acid acetic

Nguồn	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Giá trị P
X_1	18,037	1	18,037	260,930	0,000
X_2	3,002	1	3,002	43,430	0,000
X_3	3,208	1	3,208	46,400	0,000
X_1^2	53,710	1	53,710	776,980	0,000
X_2^2	14,922	1	14,922	215,860	0,000
X_2X_3	3,101	1	3,101	44,860	0,000
X_3^2	17,235	1	17,235	249,320	0,000

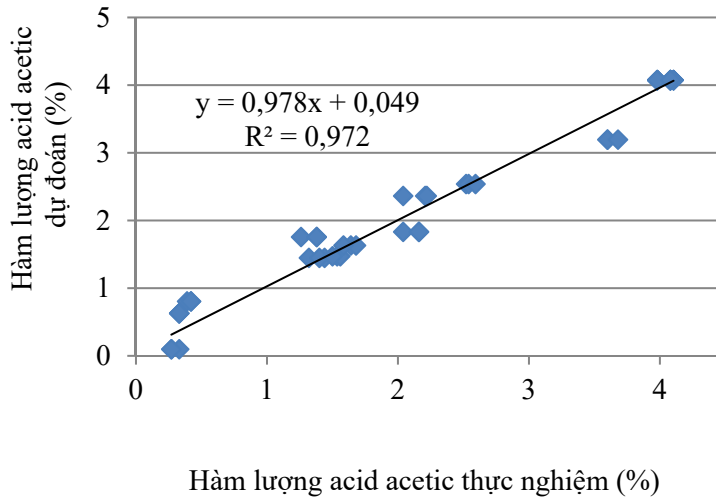
Mô hình tương quan xây dựng từ thí nghiệm đã thỏa điều kiện với thông số R^2 cao ($R^2=97,27\%$) và giá trị Adjusted (Adj.) R^2 đạt 96,85%. Trong đó, khoảng 2,7% tổng số biến không được giải thích bằng mô hình này. Mặt khác, giá trị hệ số xác định tương quan R^2 của mô hình còn thể hiện sự tương thích cao giữa các giá trị thực nghiệm và các giá trị dự đoán. Mô hình tương quan được đánh giá tốt khi hệ số xác định tương quan R^2 lớn hơn 0,8 (Guan và Yao, 2008). Như vậy, mô hình hồi quy đa chiều mô tả mối quan hệ giữa hàm lượng acid acetic sinh ra và các biến độc lập được thiết lập (phương trình 2).

$$\text{Hàm lượng acid acetic (\%)} = -39,2939 + 4,9245 X_1 + 0,0659 X_2 + 10,8231 X_3 - 0,4491 X_1^2 - 0,0015 X_2^2 + 0,0203 X_2 X_3 - 1,1474 X_3^2 \quad (2)$$

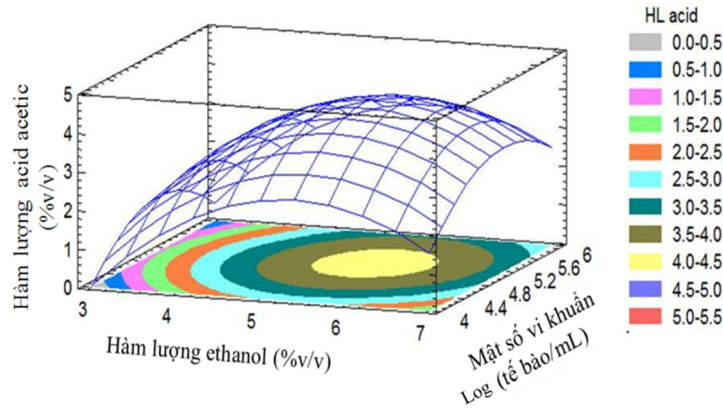
Trong đó: X_1 là hàm lượng ethanol (% v/v), X_2 là hàm lượng đường bổ sung (g/L) và X_3 là số bậc lũy thừa của mật số vi khuẩn *A. aceti* (tế bào/mL).

Mức độ tương thích giữa hàm lượng acid acetic thực nghiệm và dự đoán theo trình hồi quy 1 đã được tìm thấy: $y = 0,978x + 0,049$ với hệ số xác

định tương quan $R^2=0,972$ (Hình 1). Đồ thị bề mặt đáp ứng thể hiện tác động của hàm lượng ethanol, mật số vi khuẩn đối với hàm lượng acid acetic sinh ra khi hàm lượng đường saccharose bổ sung là 50 g/L (Hình 2). Hàm lượng ethanol trong dịch lên men từ 5 - 6% v/v sẽ cho hàm lượng acid acetic tạo thành cao. Trong môi trường đủ ethanol (5 - 13%) thì sản phẩm chủ yếu là acid acetic và nồng độ quá cao hoặc quá thấp đều không có lợi (Luong Đức Phẩm, 2010). Nồng độ rượu thấp sẽ kích thích sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn acetic, nồng độ ethanol cao sẽ ức chế sự phát triển của vi khuẩn acetic và một phần rượu không được oxy hóa thành giấm. Nghiên cứu của Du Toit và Pretorius (2002) đã chỉ ra rằng, vi khuẩn *Acetobacter aceti* có khả năng sống sót tốt trong môi trường có hàm lượng ethanol lên đến khoảng 10 - 14% v/v. Tuy nhiên, còn nhiều yếu tố phụ thuộc khác như nhiệt độ, pH và hàm lượng oxy. Một nghiên cứu khác của Gullo *et al.* (2006) cũng cho thấy, phần lớn các chủng vi khuẩn acetic được phân lập có khả năng sinh trưởng trong môi trường có hàm lượng ethanol là 5% v/v, một số ít có thể phát triển trong môi trường có hàm lượng ethanol là 10% v/v.



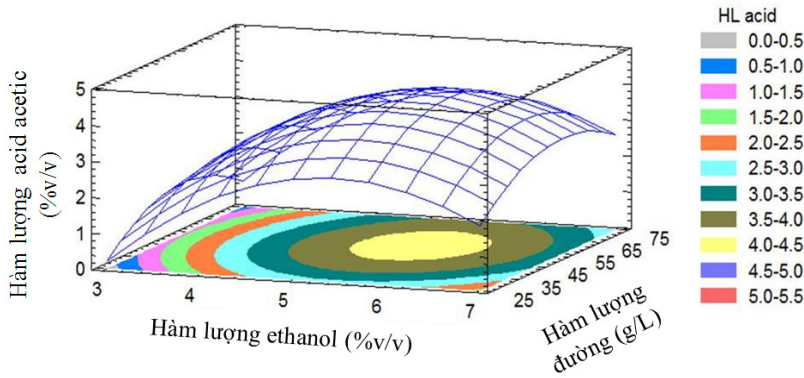
Hình 1: Tương quan giữa hàm lượng acid acetic thực nghiệm và dự đoán theo phương trình 2



Hình 2: Đồ thị tương quan giữa hàm lượng ethanol và mật số vi khuẩn đến hàm lượng acid sinh ra (hàm lượng đường bổ sung 50 g/L)

Bên cạnh đó, mật số vi khuẩn ít hoặc nhiều hơn lượng vi khuẩn cần thiết đều có khuynh hướng cản trở quá trình lên men. Do đó, khi bổ sung mật số vi khuẩn trong khoảng 10^5 (tế bào/mL) sẽ cho hiệu quả lên men tốt hơn hai mức độ bổ trí còn lại.

Mặt khác, đường là nguồn carbon tuyệt vời cho vi khuẩn acid acetic nhưng lại là rào cản đối với sự phát triển của chúng khi nồng độ quá cao (Gullo *et al.*, 2006). Với hàm lượng đường bổ sung từ 50 - 60 g/L, hàm lượng acid acetic sinh ra sẽ đạt mức cao và giảm dần về hai biên của bề mặt đáp ứng (Hình 3).



Hình 3: Đồ thị tương quan giữa hàm lượng ethanol và hàm lượng đường bổ sung đến hàm lượng acid sinh ra (mật số vi khuẩn 10^5 tế bào/mL)

Từ mô hình được xây dựng, các thông số tối ưu của quá trình lên men giấm để hàm lượng acid acetic sinh ra đạt được giá trị cực đại đã được tính toán và thể hiện ở Bảng 6. Đồng thời, các thông số tối ưu được ứng dụng vào quá trình thực nghiệm cho kết quả lên men tốt. Hàm lượng acid acetic sinh ra (thực nghiệm) tương đồng với giá trị ước

tính theo phương trình 2. Sản phẩm giấm vang khoai lang tím có hàm lượng acid acetic khoảng 4,275%, thỏa mãn tiêu chuẩn của sản phẩm giấm của FAO (hàm lượng acid acetic > 4%). Kết quả kiểm định T-test cho thấy không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa giữa hàm lượng acid tối ưu và thực nghiệm.

Bảng 6: Giá trị dự đoán và thực nghiệm của các nhân tố trong giấm vang khoai lang tím

Nhân tố	Giá trị tối ưu	Giá trị thí nghiệm
Hàm lượng ethanol (%v/v)	5,5	5,5
Hàm lượng đường bổ sung (g/L)	56,5	56,5
Mật số vi khuẩn (tế bào/mL)	10^5	10^5
Hàm lượng acid acetic sinh ra (%)	4,275	4,250

3.3 Ảnh hưởng của các tác nhân bổ sung đến sự ổn định hàm lượng anthocyanin và hoạt tính chống oxy hóa của giấm vang khoai lang tím thành phẩm

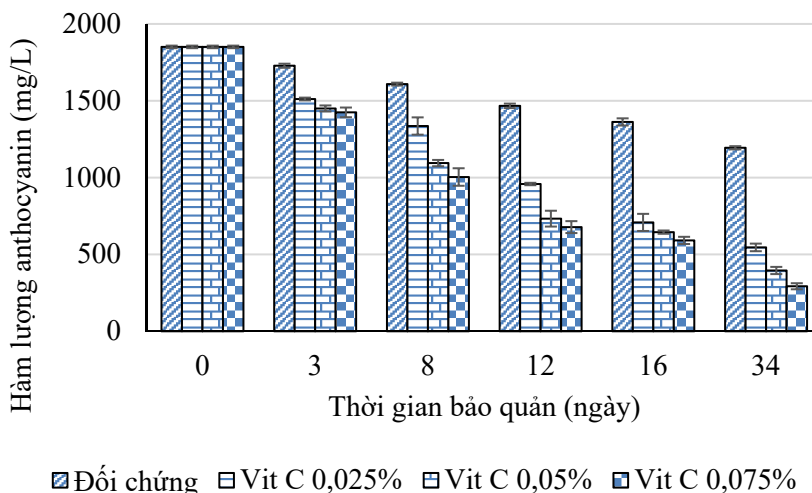
3.3.1 Vitamin C

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của vitamin C đến khả năng duy trì màu sắc giấm vang khoai lang tím được thể hiện ở Hình 4.

Hàm lượng anthocyanin giảm trong thời gian tồn trữ 34 ngày đã được ghi nhận, từ 1850 mg/L giảm xuống còn khoảng 300 - 600 mg/L đối với các mẫu bổ sung vitamin C ở các nồng độ khác nhau. Nồng độ vitamin C sử dụng càng cao thì hàm lượng anthocyanin trong sản phẩm còn lại càng ít và thấp hơn so với mẫu đối chứng (khoảng 1192 mg/L). Đồng thời chúng ta có thể quan sát thấy màu tự nhiên ban đầu của giấm bị biến đổi chuyển thành màu vàng nhẹ hơi nâu. Như vậy vitamin C không thực sự hỗ trợ sự ổn định màu anthocyanin hiện diện trong sản phẩm. Sự suy giảm nhanh hàm lượng anthocyanin trong thời gian bảo quản có thể là do vitamin C làm thoái hóa màu anthocyanin (Marti *et al.*, 2002). Hợp chất anthocyanin có bản chất là polyphenol, khi bị oxy hóa tạo ra các chất o-quinone tương ứng, đây là các chất hoạt động chúng có thể gây ra hàng loạt các phản ứng quan trọng, hoặc tự ngưng tụ với nhau để tạo thành các sản phẩm có màu hoặc không màu, tan hoặc không

tan trong nước. Do tham gia một loạt các phản ứng trên nên các hợp chất polyphenol giảm xuống nhanh chóng kéo theo giảm một lượng đáng kể hàm lượng anthocyanin trong sản phẩm (Lê Ngọc Tú và *ctv.*, 2003).

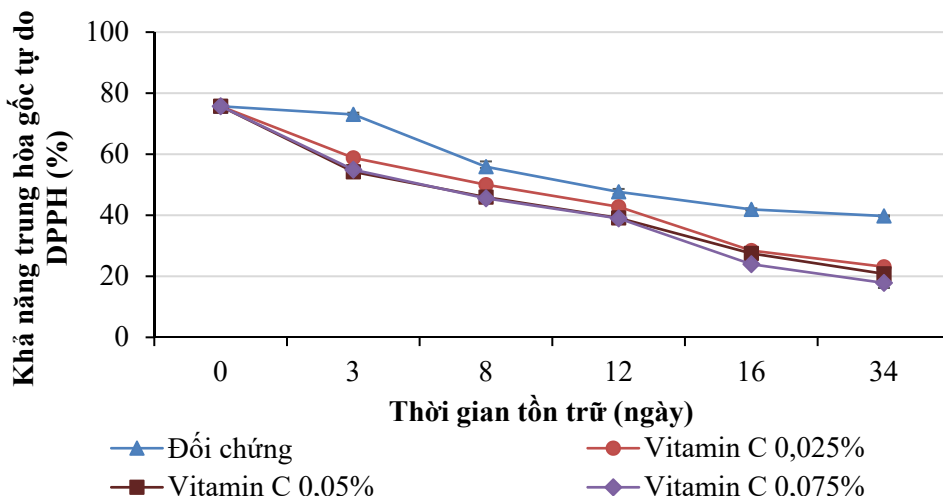
Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng vitamin C đóng vai trò khác nhau đến sự ổn định màu cho thực phẩm (Özkan *et al.*, 2002). Một số nghiên cứu cho rằng vitamin C có đóng vai trò bảo vệ anthocyanins. Sự hiện diện của vitamin C và flavonol có tác dụng ổn định anthocyanins (Shrikhande và Francis, 1974) do vitamin C cạnh tranh với anthocyanins để tham gia các phản ứng ngưng tụ và kết quả cho thấy sự ổn định của acylated anthocyanins tăng với sự hiện diện của vitamin C (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004). Ngoài ra, vitamin C còn được biết là đóng vai trò ức chế sự phân hủy anthocyanins do enzyme (Talcott *et al.*, 2003). Tuy nhiên, các nghiên cứu khác cho thấy rằng acid ascorbic làm giảm tính ổn định của sắc tố anthocyanins (Poei-Langston và Wrolstad, 1981; Duangmal *et al.*, 2004) hoặc tốc độ phân hủy anthocyanins tăng khi có sự hiện diện của vitamin C (Marti *et al.*, 2002). Hơn thế nữa, sự tương tác giữa acid ascorbic và anthocyanins có thể dẫn đến sự hình thành các sản phẩm ngưng tụ và đồng thời làm giảm màu sắc của sản phẩm (Sadilova *et al.*, 2009).



Hình 4: Ảnh hưởng của vitamin C (Vit C) đến khả năng duy trì hàm lượng anthocyanin trong sản phẩm giấm vang khoai lang tím (HL: hàm lượng)

Cùng với sự suy giảm hàm lượng anthocyanin trong sản phẩm thì khả năng quét gốc tự do cũng suy giảm theo thời gian bảo quản (Hình 5). Sau 34 ngày tồn trữ, hoạt tính chống oxy hóa giảm gần 4 lần so với ngày đầu tiên (75,7%). Kết quả cũng cho thấy hợp chất màu anthocyanin đóng vai trò quan

trọng quyết định khả năng quét gốc tự do của sản phẩm. Vì vậy, bổ sung vitamin C với các nồng độ như trên không thể ngăn chặn được sự suy giảm khả năng chống oxy hóa của sản phẩm theo thời gian tồn trữ.

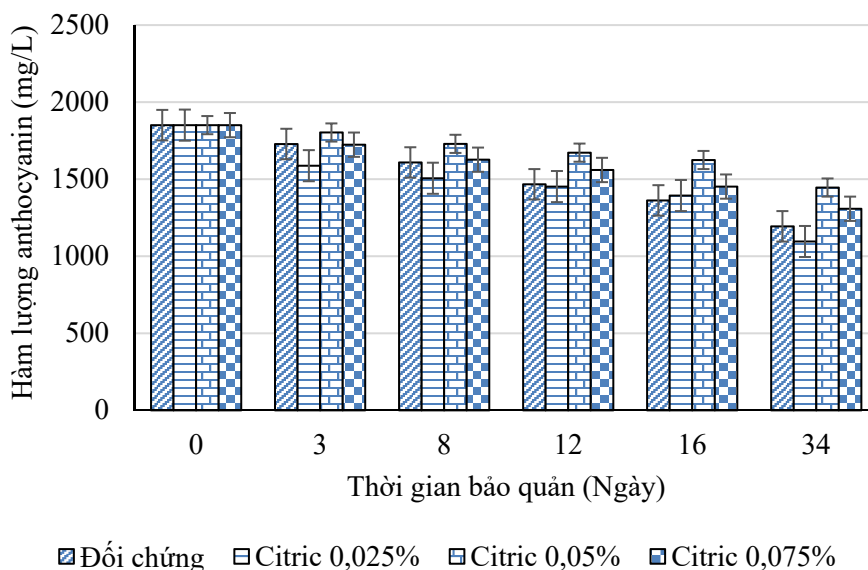


Hình 5: Ảnh hưởng của vitamin C đến khả năng duy trì hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm

3.3.2 Acid citric

Hàm lượng anthocyanin của sản phẩm giảm vang khoai lang tím giảm theo thời gian bảo quản và có sự khác biệt ở các mẫu có sử dụng hóa chất citric so với mẫu đối chứng (Hình 6). Hàm lượng anthocyanins còn lại cao nhất khi mẫu sử dụng nồng độ acid citric là 0,05%. Nghiên cứu của Lee *et al.* (1996) cũng cho thấy acid citric có khả năng ổn định màu anthocyanin chỉ sau acid malic, tartaric và acid succinic. Nồng độ acid citric sử dụng tốt nhất là 0,05%, vừa đảm bảo được tính ổn định của anthocyanin vừa tạo được cảm quan và cả giá trị dinh dưỡng của sản phẩm. Nhiều nghiên cứu

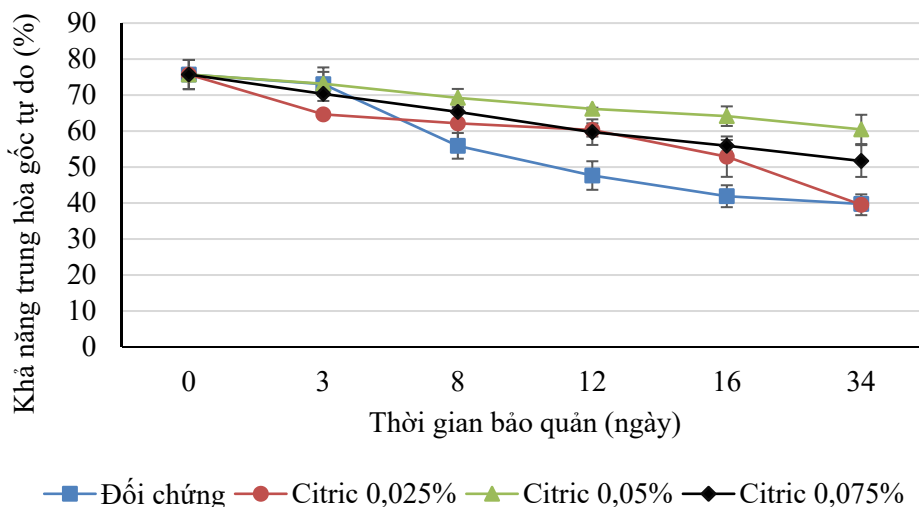
khác cũng cho thấy hợp chất anthocyanin sẽ ổn định khi pH của sản phẩm thấp (Lee *et al.*, 1996; Zhao and Li 2015 và Park *et al.*, 2004). Do sản phẩm giảm vang khoai lang tím có pH trong khoảng $2,96 \pm 0,02$, mà pH tối thích của enzyme phenolase nằm trong khoảng 6 - 7, do vậy khi hạ thấp pH của sản phẩm xuống pH=3 thì hầu như enzyme không còn hoạt động (Nguyễn Minh Thủy, 2010), hàm lượng anthocyanin trong sản phẩm bấy giờ tương đối ổn định. Ngoài ra, acid citric còn có khả năng kết hợp với ion Cu^{2+} (tại vị trí trung tâm hoạt của enzyme polyphenol oxidase) làm vô hoạt enzyme và bảo vệ anthocyanin (Martinez and Whitaker, 1995).



Hình 6: Ảnh hưởng của acid citric đến việc duy trì màu sắc của sản phẩm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của acid citric đến hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm giấm vang khoai lang tím được thể hiện ở Hình 7. Sau 34 ngày bảo quản, khả năng trung hòa gốc tự do của sản phẩm khi sử dụng acid citric ở các nồng độ 0,05 và 0,075% tương ứng là 60,46 và 51,78 %

(khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê) và cao hơn so với mẫu đối chứng (39,75%). Trong khi đó, kết quả nghiên cứu sự ổn định màu sắc của sản phẩm giấm vang khoai lang tím cũng cho thấy, ở nồng độ acid citric sử dụng là 0,05% thì sẽ có khả năng mang lại lợi ích tốt cho quá trình bảo quản.



Hình 7: Ảnh hưởng của acid citric đến khả năng trung hòa gốc tự do của sản phẩm

4 KẾT LUẬN

Tối ưu hóa quy trình chế biến giấm vang khoai lang tím được thiết kế theo mô hình Box-Behnken đã được áp dụng thành công. Hàm lượng acid acetic sinh ra đạt cao nhất là 4,275% khi hàm lượng ethanol của dịch lên men ban đầu 5,5% v/v, hàm lượng đường bổ sung 56,5 g/L và mật số vi khuẩn *A. aceti* được sử dụng là 10^5 (tế bào/mL). Hệ số xác định tương quan $R^2 = 0,97$ thể hiện mức độ tập trung các biến được giải thích bằng mô hình. Các điều kiện tối ưu đã được kiểm định cho thấy hàm lượng acid acetic tối ưu dự đoán và thực nghiệm gần như tương đương nhau. Sản phẩm giấm vang được bảo quản bằng acid citric với nồng độ 0,05% cho hiệu quả tốt hơn các nồng độ khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M., Bagchi, D. J., Balmoori, J., and Stohs, S. J., 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(5): 771-776.

Budak, N.H., Aykin, E., Seydim, A.C., Greene, A.K., and Guzel-Seydim, Z.B., 2014. Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science*, 79(5): 757-764.

Brenes, C.H., Pozo-Insfran, D.D. and Talcott, S.T., 2005. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1): 49-56.

Chun, J.E., Baik, M.Y. and Kim, B.Y., 2014. Manufacture and quality evaluation of purple sweet potato makgeolli vinegar using a 2-stage fermentation. *Food Science Biotechnol*, 23(4): 1145-1149.

Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C.H. and Talcott, S.T., 2004. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), pp.1539-1545.

Du Toit, W.J. and Pretorius, I.S., 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 52: 155-179.

Duangmal, K., Wongsiri, S. and Sueprasarn, S., 2004. Colour appearance of fruit juice affected by vitamin C. *AIC 2004 Color and Paints*, p.121.

Guan X. and Yao H., 2008. Optimization of viscozyme L assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106: 345-351.

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal Food Microbiology*, 106: 209-212.

Huỳnh Văn Vũ và Nguyễn Minh Thủy, 2014. Ảnh hưởng của tỷ lệ nước bổ sung và enzyme a-

- amylase trong thủy phân tinh bột khoai lang tím Nhật. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Chuyên đề Nông nghiệp, tập 1, trang 28-34.
- Joshi, V.K. ed., 2016. Indigenous Fermented Foods of South Asia (Vol. 7). CRC Press.
- Kano, M., Takayanagi, T., Harada K., Makino K., and Ishikawa F., 2005. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 69(5): 979-988.
- Lê Ngọc Tú, Bùi Đức Lợi, Lưu Duẩn, Ngô Hữu Hợp, Đặng Thị Thu và Nguyễn Trọng Căn, 2003. Hoá học thực phẩm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Lee, L.S., Rhim, J.W., Kim, S.J., and Chung, B.C., 1996. Study on the stability of anthocyanin pigment extracted from purple sweet potato. Korean Journal of Food Science Technology, 28: 352-359.
- Lương Đức Phẩm, 2005. Nấm men công nghiệp. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật Hà Nội. 331 trang.
- Lương Đức Phẩm, 2010. Giáo trình Công nghệ lên men. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam. 251 trang.
- Martinez, M.V. and Whitaker, J.R., 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends in Food Science & Technology, 6(6), pp.195-200.
- Marti, N., Perez-Vicente, A., and Garcia-Viguera, C., 2002. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 217-221.
- Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Minh Thủy, Trần Thị Quế và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền. 2013. Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang khóm. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, tập 25, trang 27-35.
- Nguyễn Minh Thủy, 2010. Kỹ thuật sau thu hoạch rau quả. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 160 trang.
- Oke, M. O., and Workneh, T.S., 2013. A review on sweet potato postharvest processing and preservation technology. African Journal of Agricultural Research, 8(40): 4990-5003.
- Özkan, M., 2002. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. Food Chemistry, 78(4), pp.499-504.
- Poei-Langston, M.S. and Wrolstad, R.E., 1981. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. Journal of Food Science, 46(4), pp.1218-1236.
- Park, H.J., Jeon, T.W., Lee, S.H., and Chang, K.S., 2004. Studies on characteristics and stability of anthocyanin pigment extracted from Korean purple - fleshed potatoes. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 33(9):1544-1551.
- Qiu S., Wang Y., Zhou R., Yin A., and Zhou T., 2015. Optimization of cultural conditions for vinegar of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) in liquid state fermentation. Journal of Food and Nutrition Research, 3(10): 641-647.
- Rein M.J. and Heinonen M., 2004. Stability and enhancement of berry juice color. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 3106-3114.
- Shrikhande, A.J. and Francis, F.J., 1974. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. Journal of Food Science, 39(5), pp.904-906.
- Sadilova, E., Stintzing, F.C., Kammerer, D.R. and Carle, R., 2009. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. Food Research International, 42(8), pp.1023-1033.
- Talcott, S.T., Brenes, C.H., Pires, D.M. and Del Pozo-Insfran, D., 2003. Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. Journal of agricultural and food chemistry, 51(4), pp.957-963.
- Zhao, Z. and Li, T., 2015. Extraction and purification of pigment from purple sweet potato wine vinasse. Advance Journal of Food Science and Technology. 298- 301.