



XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN LÊN MEN VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA CỦA NƯỚC LÊN MEN TRÁI TRÂM (*Syzygium cumini* L.)

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm*, Đào Thanh Tâm, Nguyễn Thị Minh Trâm, Văn Thị Hồng Huệ, Dương Thị Mai Thảo và Nguyễn Đức Độ

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm (email: hnttam@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

This study is aimed to determine conditions effecting fermentation process of *Syzygium cumini* L. using *Saccharomyces cerevisiae* TN4 strain. Design Expert 7.0 was used determine optimal factors including pH, °Brix and yeast cell density. The results indicated that, with pH 4.2, 24°Brix and 6×10^6 cells/mL, the highest alcohol content reached 10.78% v/v. After 3 days of fermentation, the fermented product reached an alcohol content of 5.20% v/v, consistent with fermented juice product. Simultaneously, 11 herbal compounds have been identified through spectroscopic methods, including steroids, triterpenoids, phenols, tannins, flavonoids, quinones, saponins, antocyanins, glucose, carotenoids and alkaloids from initial juice and fermented juice product. The quantitative change of these compounds before and after fermentation is negligible. The total polyphenol content of *Syzygium cumini* juice is higher than fermented product, particularly 57.0 mgGAE/L and 55.0 mgGAE/L respectively. After fermentation, the reduction peroxide capacity of fermented juice reached an IC₅₀ value at 8.56 μL/mL, which is higher than the *Syzygium cumini* juice (IC₅₀ value at 12.23 μL/mL), shows that the fermented product has better antioxidant resistance than the original *Syzygium cumini* juice.

TÓM TẮT

Nghiên cứu xác định các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men dịch trái trâm (*Syzygium cumini* L.) sử dụng dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* TN4. Sử dụng phần mềm Design Expert 7.0 để xác định các thông số tối ưu bao gồm pH, độ Brix và mật số nấm men ban đầu. Kết quả cho thấy với pH 4,2, 24°Brix và mật số nấm men ban đầu là 6×10^6 tế bào/mL sẽ cho độ cồn cao nhất đạt 10,78 % v/v. Ở thời điểm lên men 3 ngày, sản phẩm sau lên men đã đạt độ cồn 5,20% v/v, phù hợp với sản phẩm nước lên men trái trâm. Xác định được 11 hợp chất thực vật từ dịch và sản phẩm nước lên men trái trâm thông qua phương pháp quang phổ bao gồm steroid, triterpenoid, phenol, tannin, flavonoid, quinone, saponin, antocyanin, glucose, carotenoid và alkaloid. Hàm lượng polyphenol tổng của dịch trái trâm cao hơn của nước lên men trái trâm, cụ thể là 57,0 mg GAE/L và 55,0 mg GAE/L. Sau quá trình lên men, khả năng khử gốc peroxide của nước lên men đạt giá trị IC₅₀ là 8,56 μL/mL, tăng so với dịch trái trâm ban đầu với giá trị IC₅₀ là 12,23 μL/mL, cho thấy sản phẩm nước lên men trái trâm có khả năng kháng oxy hóa tốt hơn dịch trái trâm ban đầu.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/03/2020

Ngày nhận bài sửa: 06/04/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

Determination of fermentation conditions and antioxidant activity of *Syzygium cumini* L. fermented juice

Từ khóa:

Hoạt tính kháng oxy hóa, nấm men, nước lên men, *Saccharomyces cerevisiae*, trái trâm

Keywords:

Antioxidant activity, fermented juice, *Saccharomyces cerevisiae*, *Syzygium cumini* L., yeast

Trích dẫn: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Đào Thanh Tâm, Nguyễn Thị Minh Trâm, Văn Thị Hồng Huệ, Dương Thị Mai Thảo và Nguyễn Đức Độ, 2020. Xác định điều kiện lên men và hoạt tính kháng oxy hóa của nước lên men trái trâm (*Syzygium cumini* L.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên)(2): 72-79.

1 GIỚI THIỆU

Trái trám (*Syzygium cumini* L.) thuộc chi *Syzygium*, là một trong những chi của họ Myrtaceae, phát triển tự nhiên trên đất sét nâu ở các vùng nhiệt đới cũng như các vùng cận nhiệt đới. Chi này bao gồm khoảng 100 loài, và có một phạm vi bản địa kéo dài từ châu Phi và Madagascar qua phía nam châu Á qua Thái Bình Dương (Ayyanar and Subash-Babu, 2012). Hầu hết các bộ phận của cây trám bao gồm lá, hạt, trái, thân cây đều có những hợp chất quý và góp phần trong việc điều trị bệnh cũng như cải thiện sức khỏe con người. Trái trám chứa nhiều anthocyanin, glucoside, ellagic acid, isoquercetin, kaemferol và myrecetin. Trong khi đó hạt trám lại chứa nhiều alkaloid, jambosine và glycoside hoặc antimellin, có khả năng làm dừng quá trình chuyển hóa tinh bột thành đường. Hàng loạt nghiên cứu trên thế giới cũng được tiến hành để đánh giá khả năng kháng khuẩn và hoạt tính chống oxy hóa các bộ phận khác nhau của cây trám (Reynertson *et al.*, 2005).

Tại Việt Nam, *Syzygium cumini* L. được xem như một loài cây hoang dại, không có giá trị trong kinh tế và y học. Người dân sử dụng trái trám để ăn hoặc dùng lá trám như một loại thuốc dân gian. Với mong muốn làm tăng giá trị kinh tế cho cây trám, và có những bước đầu nghiên cứu về cây trám tại Việt Nam, đề tài tiến hành lên men dịch trám tạo ra sản phẩm nước lên men ở độ cồn khoảng 5% (tương tự như các sản phẩm nước lên men trên thị trường như Strongbow, Hoshi Sparkling nước mơ,... có độ cồn chỉ khoảng 4,5-5,0%) và tìm ra những điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men. Đồng thời, việc xác định các hợp chất thực vật cũng như đánh giá các

hoạt tính kháng oxy hóa có trong dịch trái trám và sản phẩm sau lên men sẽ tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo để khai thác giá trị kinh tế và giá trị y học của loài thực vật này.

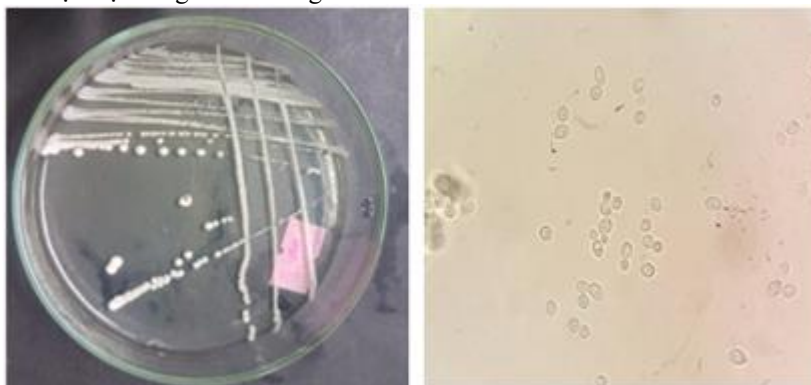
2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu và hóa chất

Vật liệu: Mẫu trái trám được thu tại ba tỉnh: An Giang (huyện Thoại Sơn), Đồng Tháp (huyện Lai Vung, Thành phố Sa Đéc) và Vĩnh Long (huyện Bình Tân). Mẫu được thu thập và đóng gói, bảo quản trong bao PE (polyetylen), mẫu được trữ lạnh trong các thùng, hộp chứa mẫu, tránh ánh sáng mặt trời trực tiếp.

Hóa chất: NaHSO₃, ethanol, NaOH, H₂SO₄, HCl, Na₂CO₃.H₂O₂, gallic acid, ascorbic acid (vitamin C), Na₂HPO₄.2H₂O, NaH₂PO₄.12H₂O, methanol, tri-n-butyl phosphate (TBP), K₂Cr₂O₇, thuốc thử Folin-Ciocalteu. Tất cả các hóa chất được sản xuất từ Trung Quốc ngoại trừ ethanol (Việt Nam) và Folin-Ciocalteu (Đức).

Nguồn giống nấm men: Dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* TN4 (Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và *ctv.*, 2019) được phân lập từ trái trám (*Syzygium cumini* L.) thu tại quận Thốt Nốt, Thành phố Cần Thơ, được lưu trữ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Dòng nấm men *S. cerevisiae* TN4 có khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, có mô, bìa nguyên, bề mặt trơn láng, kích thước dao động từ 2-3 mm. Tế bào hình oval lớn, nảy chồi theo nhiều hướng, có 1-4 bào tử nang (Hình 1), có khả năng phân giải glucose, phân giải sucrose và không có khả năng phân giải urea.



Hình 1: Khuẩn lạc và hình dạng tế bào dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* TN4 được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X

2.2 Xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men dịch trái trám

2.2.1 Sự ảnh hưởng của độ Brix, pH và mật số nấm men ban đầu đến quá trình lên men dịch trái trám

Nghiên cứu nhằm mục tiêu xác định sự ảnh hưởng của các nhân tố độ Brix, pH và mật số nấm men (MSNM) của dịch quả ban đầu đến quá trình lên men dịch trái trám. Từ đó chọn ra giá trị tối ưu của từng thông số để quá trình lên men đạt hiệu quả và chất lượng cao. Thí nghiệm được bố trí gồm 3 nhân tố theo thể thức Box-Behnken, phần mềm Design Expert 7.0. Nhân tố của thí nghiệm gồm có: Độ Brix (min 20, max 30), pH dịch trái trám (min 4,5, max 5,5) và MSNM (tế bào/mL) (min 10³, max 10⁷). Bố trí thí nghiệm với các thông số được mô tả ở Bảng 1.

Bảng 1: Bố trí thí nghiệm theo thể thức Box-Behnken của phần mềm Design Expert 7.0

Nghiệm thức	pH	°Brix	Mật số nấm men (tế bào/mL)
1	4,0	20	5x10 ⁶
2	4,5	25	5x10 ⁶
3	5,0	30	5x10 ⁶
4	4,0	30	5x10 ⁶
5	4,5	20	10 ⁷
6	4,5	20	10 ³
7	4,0	25	10 ⁷
8	5,0	25	10 ⁷
9	4,5	30	10 ⁷
10	5,0	25	10 ³
11	4,5	25	5x10 ⁶
12	4,5	30	10 ³
13	5,0	20	5x10 ⁶
14	4,5	25	5x10 ⁶
15	4,0	25	10 ³

Chuẩn bị dịch nấm men và kiểm tra mật số tế bào nấm men bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu để có mật số nấm men là 10³ tế bào/mL, 5x10⁶ tế bào/mL, 10⁷ tế bào/mL. Trái trám được ép để lấy nước và thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L) trong 2 giờ để tiêu diệt vi sinh vật có trong dịch trái. Tiếp theo là điều chỉnh các thông số về độ Brix (20, 25, 30), pH (4, 4,5, 5) của mỗi dịch phối chế. Sau đó, cho 1 mL dịch nấm men ở các mật số khác nhau vào 99 mL mỗi dịch phối chế đã chuẩn bị sẵn trong bình tam giác, lắc đều bình tam giác để tế bào nấm men phân bố đều trong dịch trái trám. Các bình lên men được gắn waterblock và ủ lắc ở nhiệt độ phòng. Sau thời gian 10 ngày, tiến

hành chung cất để thu cồn, độ cồn thu hồi được xác định bằng cồn kế. Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá bao gồm pH, độ Brix, và nồng độ ethanol.

2.2.2 Sự ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình lên men dịch trái trám

Thí nghiệm được tiến hành để xác định được thời gian lên men dịch trái trám sao cho độ cồn thu hồi đạt khoảng 5% v/v. Thí nghiệm 1 nhân tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên ở các thời gian lên men khác nhau (3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày) và được thực hiện với 3 lần lặp lại. Dịch trái trám được thu và thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L trong 2 giờ) và điều chỉnh các yếu tố pH, độ Brix và mật số nấm men theo kết quả tối ưu. Cho 99 mL dịch trái trám và 1 mL dịch nấm men vào bình tam giác. Sau đó, ủ ở nhiệt độ phòng và tiến hành đo hàm lượng ethanol bằng phương pháp quang phổ sử dụng tri-n-butyl phosphate (TBP) được mô tả bởi Miah *et al.* (2017) ở các mốc thời gian 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày và 6 ngày. Xác định thời gian thích hợp để sản phẩm cho độ cồn khoảng 5% v/v.

2.3 Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của dịch trái trám và sản phẩm sau lên men

Tất cả các thí nghiệm trong mục 2.3 đều được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, một nhân tố với 2 nghiệm thức là dịch trái trám ban đầu và sản phẩm nước trái trám lên men.

2.3.1 Định tính các hợp chất thực vật

Mục tiêu nhằm xác định sự hiện diện của 11 hợp chất thực vật là steroid, triterpenoid, quinone, phenol, tannin, flavonoid, glucose, carotenoid, anthocyanin, saponin, alkaloid trong dịch trái trám ban đầu và sản phẩm nước trái trám lên men.

Sử dụng phương pháp quang phổ UV-VIS theo mô tả của Harbone (1973). Mỗi nghiệm thức sẽ được pha loãng ở nồng độ 10 µg/mL với dung môi ethanol 96% và đo độ hấp thụ với tia UV-VIS của máy đo quang phổ ở dãy bước sóng từ 215 nm đến 550 nm với đối chứng là ethanol 96%.

2.3.2 Khảo sát hàm lượng polyphenol tổng

Mục tiêu nhằm xác định hàm lượng polyphenol tổng có trong dịch trái và nước lên men trái trám. Hàm lượng polyphenol tổng được xác định dựa trên phương pháp Folin – Ciolateau được mô tả bởi Hossain *et al.* (2013) có hiệu chỉnh bằng cách sử dụng gallic acid làm hợp chất polyphenol chuẩn, dung môi là methanol. Sự hấp thụ của dung dịch màu xanh được ghi nhận thông qua kết quả đo OD ở bước sóng λ = 765 nm. Hàm lượng polyphenol tổng được xác định theo công thức sau:

$$P = \frac{a \times V}{m}$$

Trong đó: P: Hàm lượng polyphenols (mg gallic acid/mL dịch trích).a: Giá trị x từ đường chuẩn với gallic acid (µg/mL), V: Thể tích dung dịch dịch quả (mL), m: Khối lượng có trong thể tích (g).

2.3.3 Khảo sát khả năng kháng sự oxy hóa

Mục tiêu nhằm xác định khả năng khử gốc peroxide của dịch trái và nước lên men trái trà. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài, tiến hành đánh giá khả năng kháng oxy hóa của dịch trái trà và nước lên men trái trà thông qua khả năng ức chế gốc peroxide (H₂O₂). Sử dụng giá trị IC₅₀ để so sánh khả năng ức chế gốc H₂O₂ của dịch trái và nước lên men trái trà. IC₅₀ là nồng độ của mẫu mà tại giá trị đó có thể ức chế 50% gốc tự do H₂O₂.

Khả năng khử gốc peroxide được tiến hành theo mô tả của Keser *et al.* (2012), có hiệu chỉnh. Chi tiêu đánh giá: Khả năng khử gốc peroxide bằng H₂O₂ được thể hiện qua giá trị phần trăm ức chế:

$$\text{Phần trăm ức chế (\%)} = \frac{A_o - A}{A_o}$$

Bảng 2: Giá trị pH, Độ Brix và độ cồn trung bình sau lên men

Nghiệm thức	pH-°Brix- MSNM	pH sau lên men	°Brix sau lên men	Độ cồn 20°C (% v/v)
1	4,5-25-5x10 ⁶	4,07	11,33	11,04 ± 0,25 ^A
2	4,5-25-5x10 ⁶	3,81	11,67	10,94 ± 0,31 ^A
3	4,5-25-5x10 ⁶	3,77	11,50	10,82 ± 0,60 ^{AB}
4	4,0-20-5x10 ⁶	3,73	7,50	10,09 ± 0,09 ^{BC}
5	5,0-20-5-5x10 ⁶	4,07	8,33	9,47 ± 0,59 ^{CD}
6	4-25-10 ⁷	3,40	12,17	9,34 ± 0,29 ^{CDE}
7	4,5-20-10 ³	4,96	7,33	8,96 ± 0,51 ^{DEF}
8	4,5-30-10 ³	4,04	18,17	8,88 ± 0,46 ^{DEF}
9	4,5-20-10 ⁷	3,75	7,67	8,75 ± 0,98 ^{DEF}
10	5-25-10 ⁷	4,32	12,67	8,67 ± 0,51 ^{DEF}
11	4-25-10 ³	3,63	12,83	8,67 ± 0,60 ^{DEF}
12	5-30-5x10 ⁶	4,05	18,75	8,58 ± 0,60 ^{EF}
13	5-25-10 ³	4,23	12,17	8,58 ± 0,60 ^{EF}
14	4,5-30-10 ⁷	3,79	18,33	8,53 ± 0,14 ^F
15	4-30-5x10 ⁶	3,74	18,50	8,45 ± 0,14 ^F

Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang số mũ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê ở mức 5% (P<0,05)

Kết quả cho thấy ở nghiệm thức 1, 2, 3 (4,5-25-5x10⁶) cho hàm lượng ethanol cao nhất trong 15 nghiệm thức với độ cồn trung bình ở 20 °C lần lượt là 11,04%, 10,94%, 10,82% v/v khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Để xác định điều kiện lên men tối ưu từ các thông số pH, °Brix và mật số nấm men, độ cồn sau lên men được phân tích bằng chương trình Design

Trong đó: A₀ là độ hấp thụ của mẫu trắng, A là độ hấp thụ của mẫu có sự hiện diện của H₂O₂.

Xây dựng đường chuẩn với phần trăm ức chế H₂O₂ thu được ở các nồng độ khác nhau. Từ đó, tính toán giá trị IC₅₀ (nồng độ mẫu hay vitamin C mà tại đó ức chế 50% H₂O₂).

2.4 Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft excel 2013. Bố trí thí nghiệm và xác định các thông số tối ưu theo phần mềm Design Expert 7.0. Phần mềm Statgraphics Centurion XV.I được sử dụng để phân tích thống kê và kiểm định LSD các trung bình nghiệm thức.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men dịch trái trà

3.1.1 Sự ảnh hưởng của độ Brix, pH và mật số nấm men ban đầu

Kết quả khảo sát các nhân tố độ Brix, pH và mật số nấm men ban đầu đến quá trình lên men dịch trái trà được thể hiện ở Bảng 2.

Expert 7.0 với độ tin cậy 95%, thu được phương trình hồi quy như sau:

$$\text{Ethanol} = - 67,31 + 27,32 \cdot A + 1,29 \cdot B + 7,44E-007 \cdot C + 0,098 \cdot A \cdot B - 4,44E-008 \cdot A \cdot C - 1,44E - 009 \cdot B \cdot C - 3,31 \cdot A^2 - 0,04 \cdot B^2 (1)$$

Trong đó A, B, C lần lượt là giá trị pH, độ Brix và mật số nấm men.

Tuy nhiên, việc lựa chọn điều kiện lên men phù hợp với dòng nấm men *S. cerevisiae* TN4 sao cho độ cồn thu hồi đạt giá trị cao nhất cần căn cứ vào 30 nghiệm thức tối ưu mà phần mềm Design Expert 7.0

đưa ra kết hợp với phương trình (1). Lựa chọn ra 3 nghiệm thức cho nồng độ cồn cao nhất trong 30 nghiệm thức, tiến hành lên men thực tế để so sánh với độ cồn lý thuyết mà phần mềm đưa ra (Bảng 3).

Bảng 3: So sánh độ cồn thực tế và độ cồn lý thuyết từ phần mềm Design Expert 7.0

Nghiệm thức	pH-Brix-MSNM	pH	°Brix	Độ cồn thực tế (% v/v)	Độ cồn lý thuyết (% v/v)
1	4,44-25,12-5x10 ⁶	3,87	12,17	10,27 ± 0,469 ^A	10,91 ^A
2	4,67-23,42-4x10 ⁶	4,04	11,50	10,15 ± 0,555 ^A	10,76 ^A
3	4,22-24,41-6x10 ⁶	3,68	11,83	10,78 ± 0,427 ^A	10,75 ^A

Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang số mũ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê, ở mức 5% (P<0,05)

Bảng 3 cho thấy độ cồn thực tế thu được tương đương với độ cồn theo thuật toán đưa ra từ phần mềm Design Expert 7.0. Điều này chứng tỏ sự tính toán của mô hình và thực nghiệm tương đối thống nhất với độ tin cậy là 95%. Độ cồn thực tế của cả 3 nghiệm thức dao động từ 10,75% v/v đến 10,91% v/v, khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Tuy nhiên, nghiệm thức với pH = 4,22, độ Brix = 24,41 và mật số nấm men 6 x 10⁶ tế bào/mL được lựa chọn là nghiệm thức tối ưu vì cho độ cồn thực tế cao nhất và đạt giá trị pH sau lên men thấp có thể giúp kéo dài thời gian bảo quản sản phẩm. Đồng thời đây là nghiệm thức cho độ cồn thực tế gần với độ cồn lý thuyết nhất trong ba nghiệm thức (độ cồn thực tế là 10,78 ± 0,427% v/v và độ cồn lý thuyết là 10,75% v/v).

Theo Jackisch (1985), khả năng cho hàm lượng rượu khác nhau từ quá trình lên men có thể thay đổi theo nguồn nguyên liệu lên men, dòng nấm men và môi trường lên men. Do đó điều kiện tối ưu cho lên men rượu trái cây giống nấm men *S. cerevisiae* TN4 cho kết quả khá phù hợp với nghiên cứu của Huỳnh Phan Phương Trang (2016) (pH 4,0; 22 °Brix) và có sự khác biệt với nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và ctvl. (2018) trên dịch trái cà na (pH 3,88; 24,01°Brix và mật số nấm men là 1x10⁷ tb/mL). Nghiệm thức được chọn là pH 4,22; 24,6 °Brix và mật số nấm men 5,7x10⁶ tb/mL với nồng độ ethanol theo thực tế là đạt được là 10,8% v/v.

3.1.2 Sự ảnh hưởng của thời gian lên men

Sử dụng kết quả các điều kiện tối ưu của mục 3.1.1, tiến hành khảo sát thời gian lên men thích hợp để sản phẩm lên men dịch trái cây đạt độ cồn thu hồi ở khoảng 5% v/v. Thực hiện lên men với điều kiện pH=4,22, độ Brix = 24,41 và MSNM = 6 x 10⁶ tế bào/mL.

Kết quả xác định độ cồn thu hồi của dịch trái cây lên men ở thời gian 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày được ghi nhận tại Bảng 4 cho thấy độ cồn thu hồi tăng dần theo thời gian, độ Brix và pH đều giảm do nấm men đã sử dụng lượng đường có trong dịch quả và lượng đường bổ sung để chuyển hóa thành rượu, đồng thời sinh ra một số acid hữu cơ làm giảm pH của môi trường. Độ cồn ở ngày lên men thứ 3 đã đạt 5,20 % v/v như mong muốn của sản phẩm dịch trái cây lên men. Nếu tiếp tục để lên men ở những ngày tiếp theo, độ cồn sẽ tiếp tục tăng và đạt độ cồn thu hồi 8,06% v/v ở ngày lên men thứ 6, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Theo Huỳnh Phan Phương Trang (2016), ở giai đoạn này, lượng oxy có trong bình lên men đã được sử dụng hết làm môi trường trở nên yếm khí tạo điều kiện thuận lợi thúc đẩy mạnh quá trình chuyển hóa đường thành rượu. Tuy nhiên, ở ngày thứ 5 và 6 hàm lượng ethanol không tăng cao, vì ở giai đoạn này, nguồn dinh dưỡng không còn nhiều, nấm men chuyển đường thành rượu, ức chế quá trình phát triển của nấm men. Khi lượng rượu trong môi trường đạt 1% , tỉ lệ nấm men này chồi giảm còn 83%, khi nồng độ rượu trong môi trường còn 2% thì sự sinh sản của nấm men chậm dần (Hà Thanh Toàn và Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, 2017). Kết quả nghiên cứu có sự khác biệt đối với nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và ctv. (2018) trong lên men cà na ở ngày thứ 6 độ cồn là 6,05% v/v, ngày thứ 8 là 7,09% v/v. Theo nghiên cứu của Jackisch (1985), khả năng đạt được hàm lượng rượu khác nhau từ quá trình lên men có thể thay đổi theo nguồn nguyên liệu lên men, dòng nấm men và môi trường lên men. Thời gian lên men được chọn là 3 ngày, cho độ cồn 5,2% v/v, là thời gian lên men cho sản phẩm nước lên men trái cây mứt.

Bảng 4: Giá trị pH, độ Brix và độ cồn trung bình qua các mốc thời gian lên men khác nhau

Thời gian (ngày)	pH	°Brix	Độ cồn ở 20°C
3	4,09	15,17	5,20 ± 0,06 ^D
4	3,90	14,67	7,38 ± 0,19 ^C
5	3,87	14,43	7,62 ± 0,10 ^B
6	3,79	14,80	6 ± 0,05 ^A

Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang số mũ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$)

Bảng 5: Giá trị đo OD của dịch trái trái và nước lên men trái trái

STT	Bước sóng (nm)	Hợp chất tự nhiên	Dịch trái trái	Nước lên men
1	215	Steroid	0,450 ± 0,000 ^A	0,296 ± 0,000 ^B
2	230	Triterpenoid	0,935 ± 0,005 ^A	0,941 ± 0,003 ^A
3	255	Phenolic	0,395 ± 0,013 ^A	0,384 ± 0,014 ^A
4	260	Quinone	0,374 ± 0,004 ^A	0,382 ± 0,012 ^A
5	265	Tannin	0,396 ± 0,002 ^A	0,391 ± 0,088 ^A
6	300	Flavonoid	0,321 ± 0,006 ^A	0,279 ± 0,014 ^B
7	412	Glucose	0,029 ± 0,006 ^A	0,011 ± 0,004 ^B
8	450	Carotenoid	0,009 ± 0,000 ^B	0,022 ± 0,000 ^A
9	543	Anthocyanin	0,013 ± 0,04 ^B	0,026 ± 0,002 ^A
10	545	Saponin	0,012 ± 0,001 ^B	0,025 ± 0,002 ^A
11	550	Alkaloid	0,009 ± 0,002 ^B	0,025 ± 0,006 ^A

Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một hàng các số có mang số mũ giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$)

Bảng 5 cho thấy, có sự hiện diện của 11 hợp chất thực vật trong dịch trái và nước lên men trái trái, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Gevariya *et al.* (2015) đã định tính sơ bộ và chỉ ra sự hiện diện của alkaloids, các acid amin, flavanoid, glycosides, phenol, saponin, steroid, tannin, triterpenoid có trong dịch trái trái. Mặt khác, carotenoid, anthocyanin, saponin, alkaloid có giá trị OD tăng sau quá trình lên men 3 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Hợp chất carotenoid tăng lên làm cho nước lên men trái trái có màu sắc đỏ tươi.

3.2.2 Hàm lượng polyphenol tổng

Kết quả thu được hàm lượng polyphenol tổng của 2 nghiệm thức dịch trái và nước lên men trái trái khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong đó, nghiệm thức dịch trái có hàm lượng polyphenol tổng cao hơn nước lên men trái trái với giá trị lần lượt là 57,0 0 ± 0,64 mg GAE/mL và 55,0 ± 0,95 mg GAE/mL. Điều này cho thấy hàm lượng polyphenol tổng của dịch trái đã giảm 2 mg GAE/mL sau 3 ngày lên men, vì trong quá trình lên men, nấm men đã sử dụng một lượng nhỏ các hợp chất này cho quá trình sinh trưởng và phát triển. Kết quả này cũng tương đối phù hợp với kết quả định tính phenolic, tannin, quinone và flavonoid ở thí nghiệm trên. Theo nghiên

3.2 Hoạt tính kháng oxy hóa của dịch trái trái và sản phẩm sau lên men

3.2.1 Các hợp chất thực vật

Các hợp chất thực vật được xác định bằng phương pháp quang phổ với các bước sóng khảo sát có độ hấp thụ cực đại tương ứng với từng hợp chất. Ở mỗi bước sóng, giá trị hấp thụ càng cao, sự hiện diện của hợp chất thực vật càng nhiều. Kết quả định tính các hợp chất thực vật có trong dịch trái trái và nước lên men trái trái được thể hiện qua Bảng 5.

cứ của Migliato *et al.* (2009), trái trái mốc (*Syzygium cumini* L.) rất giàu tannin, flavonoid, tinh dầu, anthocyanin và các thành phần polyphenol khác. Từ kết quả trên cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng có trong dịch trái trái và nước lên men trái trái cao hơn hàm lượng polyphenol tổng có trong vỏ cây trái trái trong nghiên cứu của Santos *et al.* (2013) (49,1 mg GAE/g), tuy nhiên thấp hơn dịch cà na (60,098 mg GAE/mL) và cao hơn rượu vang cà na (29,001 mg GAE/mL) trong nghiên cứu Nguyễn Quốc Hào (2018). Hàm lượng polyphenol tổng có trong dịch trái trái và nước lên men trái trái thấp hơn trong lá trái trái trong nghiên cứu của Ruan *et al.* (2008), có giá trị là 610,32 ± 9,03 mg/g, trong đó flavonoid chiếm 451,50 ± 9,85 mg/g.

Các hợp chất polyphenol là một trong những hợp chất lớn và phổ biến nhất của nhóm chuyển hóa thứ cấp thực vật. Polyphenol có tính kháng oxy hóa, chống ung thư, kháng viêm, bảo vệ tim mạch và ức chế các hoạt động gia tăng tế bào. Chất chống oxy hóa tự nhiên chủ yếu ở dạng hợp chất phenolic như flavonoid, phenolic acid, tocopherol,... (Yadava and Munin, 2011).

3.2.3 Khả năng kháng sự oxy hóa

Giá trị IC₅₀ càng thấp thì chứng tỏ hoạt tính ức chế gốc peroxide càng cao. Kết quả giá trị IC₅₀ của dịch trái trám và nước lên men trái trám được thể hiện qua Bảng 6.

Bảng 6: Giá trị IC₅₀ của vitamin C, dịch và nước lên men trái trám

Nghiệm thức	Giá trị IC ₅₀ (µL/mL)
Vitamin C	122,505 ± 0,715 ^A
Dịch trái trám	8,56 ± 0,07 ^C
Nước lên men trái trám	12,23 ± 0,06 ^B

Ghi chú: Giá trị IC₅₀ là giá trị trung bình của ba lần lặp lại. Các giá trị có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (P<0,05)

Giá trị IC₅₀ của vitamin C cao hơn 10 lần giá trị IC₅₀ của dịch trái trám và cao gấp 14 lần giá trị IC₅₀ của nước lên men trái trám. Điều này cho thấy nước lên men trái trám và dịch trám có khả năng kháng oxy hóa tốt hơn vitamin C, đặc biệt sản phẩm sau lên men có khả năng khử gốc peroxide cao hơn dịch trái ban đầu gần 1,5 lần, số liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Sau 3 ngày lên men, nước lên men trái trám có khả năng kháng oxy hóa yếu hơn dịch trái, điều này cũng phù hợp với kết quả trong nghiên cứu của Chowdhury and Ray (2007), sau 6 ngày lên men dịch trám, hàm lượng anthocyanin giảm từ 0,85-0,60 mg/mL, và hàm lượng tannin giảm từ 1,70-1,40 mg/100 mL.

Phần lớn hợp chất kháng oxy hóa của trái cây hoặc rau quả là phenol, tannin, alkaloid, saponin, steroid, flavonoid, isoflavone, flavon, anthocyanin, catechin và isocatechin (Karadeniz *et al.*, 2005). Nhiều hợp chất phytochemical có thể giúp bảo vệ tế bào, chống lại sự oxy hóa gây ra bởi các gốc tự do. Ngoài ra, trong nghiên cứu của Hajdu *et al.* (2007) cũng chỉ ra rằng phenolic, flavonoid, triterpenoid, tannin, là thành phần hóa học chính chịu trách nhiệm cho việc khử gốc peroxide.

Kết quả định tính đã khẳng định trong hai nghiệm thức trên tồn tại các hợp chất thực vật như: phenol và tannin, alkaloid, saponin, steroid, flavonoid và triterpenoid. Kết quả này nói lên sự ảnh hưởng của nhiều hợp chất thực vật đến khả năng kháng oxy hóa của dịch trái và nước lên men trái trám. Tuy nhiên, khả năng kháng oxy hóa của dịch trái và nước lên men trái trám thấp hơn dịch cà na và rượu vang cà na (IC₅₀ lần lượt là 4,47 và 6,24 µL/mL) trong nghiên cứu của Nguyễn Quốc Hào (2018).

4 KẾT LUẬN

Với các điều kiện ban đầu là pH 4,2, 24°Brix và mật số nấm men 6 x 10⁶ tế bào/mL, dịch lên men trái trám sẽ đạt độ cồn thu hồi cao nhất 10,78 ± 0,427% v/v sau 10 ngày lên men. Sản phẩm nước lên men trái trám được lên men với các điều kiện thích hợp trong 3 ngày, độ cồn thu hồi đạt 5,20% v/v. Có 11 hợp chất thực vật được xác định trong dịch trái trám trước và sau lên men bao gồm steroid, triterpenoid, phenol, tannin, flavonoid, quinone, saponin, anthocyanin, glucose, carotenoid và alkaloid. Hàm lượng polyphenol tổng không thay đổi nhiều trong quá trình lên men, đạt giá trị 57,0 mg GAE/L của dịch trái trám và 55,0 mg GAE/L của sản phẩm sau lên men. Trong thí nghiệm xác định khả năng khử gốc peroxide H₂O₂, giá trị IC₅₀ của dịch trái trám và nước lên men trái trám lần lượt là 12,23µL/mL và 8,56 µL/mL, chứng tỏ nước lên men trái trám có khả năng kháng oxy hóa tốt hơn dịch trái trám.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ayyanar, M. and Subash-Babu, P., 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(3): 240–246.
- Chowdhury, P. and Ray, R.C., 2007. Fermentation of Jamun (*Syzygium cumini* L.) Fruits to Form Red Wine. Asean Food Journal. 14(1): 15-23.
- Gevariya S. N., Gajera, H. P., Savaliya D. D. and Golakiya B. A., 2015. Phytochemical screening and antioxidant activity of *Syzygium cumini* L. Fruit Extracts. Indian Journal of Agricultural Biochemistry. 28(1): 65-69.
- Hà Thanh Toàn và Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, 2017. Giáo trình Nấm học 1 (Nấm men). NXB Đại học Cần Thơ, 378 trang.
- Hajdu, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M. and Zupko, I., 2007. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnuscastus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. Phytotherapy Research. 21(4):391-394.
- Harbone, J. B., 1973. Phytochemical Methods. Chapman & Hall, 304 pages.
- Hossain, S. J., Basar, M. H., Rokeya, B., Arif, K. M. T., Sultana, M. S. and Rahman M. H. 2013. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antibacterial activities of the fruit of *Sonneratia apetala* (Buch.-Ham.). Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 13: 95-102.
- Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Đào Thanh Tâm, Nguyễn Thị Minh Trâm, Văn Thị Hồng Huệ và Dương Thị Mai Thảo, 2019. Phân lập và tuyển chọn dòng nấm men (*Saccharomyces* sp.) lên men

- rượu vang trái trám (*Syzygium cumini*). Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 18: 59-66.
- Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Nguyễn Thị Niềm, Nguyễn Thị Minh Trâm và Nguyễn Đức Độ, 2018. Phân lập, tuyển chọn nấm men và xác định điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu cà na (*Canarium album*). Tạp chí Khoa học & Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm – Đại học Huế. 2(2): 741-750.
- Huỳnh Phan Phương Trang, 2016. Nghiên cứu quá trình lên men rượu trái cây chanh dây và dâu tằm sử dụng tế bào nấm men cố định trên bã mía. Tạp chí Khoa Học Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM, trang 74-82.
- Jackisch, P., 1985. Modern Winemaking. Cornell University Press, pp. 288.
- Karadeniz, F., Burdurlu, H. S., Koca, N. and Ankara, Y. S., 2005. Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. Food Engineering, pp. 297-303. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 29(4): 297-303
- Miah, R., Siddiqua, A., Tuli, J. F., *et al.*, 2017. Inexpensive procedure for measurement of ethanol: Application to bioethanol production process. Advances in Microbiology. 7(11): 743-748.
- Migliato, K. F., de Carvalho, E. S., do Sacramento, L. V. S., de Mello, J. C. P., Baby, A. R., Velasco, M. V. R. and Salgado, H. R. N., 2009. Total polyphenols from *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruit extract. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 45(1):122-126.
- Nguyễn Quốc Hào, 2018. Khảo sát hoạt tính sinh học của trái cà na (*Canarium album*) và sản phẩm rượu vang cà na. Luận văn Đại học ngành Công nghệ Sinh học Trường Đại học Cần Thơ, 78 trang.
- Reynertson, K. A., Basile, M. J. and Kennelly, E. J., 2005. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. Ethnobotany Research and Application. 3: 25-35.
- Ruan, Z. P., Zhang, L. L., Lin, Y. M., 2008. Evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaves. Molecules. 13(10): 2545-2556.
- Santos, D. T., Cavalcanti, R. N., Rostagno, M. A., Queiroga, C. L., Eberlin, M. N. and Meireles, M. A. A., 2013. Extraction of polyphenols and anthocyanins from the jambul (*Syzygium cumini*) fruit peels. Food and Public Health. 3(1): 12-20.
- Yadava R. N. S. and Munin, A., 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of Phytology. 3(12):10-14.