

NGHIÊN CỨU XÁC LẬP ĐIỀU KIỆN LÊN MEN TẠO ĐỒ UỐNG TỪ DỊCH THỦY PHÂN BÃ ĐẬU NÀNH

Mai Thị Vân Anh^{1,*}, Đặng Đình Triển², Nguyễn Thanh Hằng³

TÓM TẮT

Dịch thủy phân bã đậu nành dưới tác dụng của các chế phẩm enzyme đã được xác nhận có sự gia tăng đáng kể lượng chất hòa tan, thuận lợi cho chuyển hóa của vi sinh vật. Kết quả nghiên cứu đã xác lập được các điều kiện nhiệt độ, tỷ lệ tiếp giống, hàm lượng đường và thời gian lên men dịch thủy phân bã khi sử dụng đồng thời 2 chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 và *Saccharomyces cerevisiae* 7012 nhằm tạo đồ uống lên men có chứa nấm men probiotic. Kết quả cho thấy, 30°C là nhiệt độ phù hợp trong điều kiện lên men kết hợp 2 chủng nấm men; hàm lượng saccharose bổ sung 1,5%; tỷ lệ tiếp giống ban đầu của probiotic *S. boulardii* CNCM I-745 là 6 log CFU/ml và tỷ lệ tiếp giống của *S. cerevisiae* 7012 không quá 5 log CFU/ml; thời gian lên men 24 giờ. Với điều kiện này, dịch sau lên men đã đạt được các thành phần mong muốn như mật độ nấm men probiotic sau lên men đạt 7,7 log CFU/ml; độ cồn không quá 1,2% v/v; chứa một số thành phần bay hơi có tác dụng tạo mùi thơm cho sản phẩm trong đó 2-phenylethanol được tạo ra đáng kể, chiếm 40% trong tổng lượng chất dễ bay hơi của dịch lên men.

Từ khóa: Dịch thủy phân bã đậu nành, nấm men, đồ uống lên men, probiotic.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bã đậu nành, một phụ phẩm của ngành sản xuất sữa đậu nành và đậu phụ, chứa đa dạng các chất dinh dưỡng tốt có thể khai thác. Bã đậu nành tươi có một số aldehyde tạo ra mùi đậu đặc trưng như hexanal, 2- hexenal, (2E)-2-octenal và (2E)-2-decenal, một số axit được phát hiện gồm axit hexanoic, axit acetic và axit 2-amino-5-methylbenzoic, trong đó axit acetic có mùi hăng sẽ ảnh hưởng đến mùi của các thực phẩm từ bã đậu nành [1]. Dịch thủy phân bã bằng một số enzyme đã được xác nhận có sự gia tăng đáng kể lượng chất hòa tan, thuận lợi cho chuyển hóa của vi sinh vật. Chuyển đổi sinh học bã đậu nành dưới tác dụng của nấm men là một trong những chiến lược để thay đổi mùi của phụ phẩm này. Các lipid trong bã có thể được chuyển hóa để tạo ra methyl ketone, rượu bậc hai, ester, alkane và các lactone [2]. Các aldehyde không mong muốn có thể bị chuyển hóa thành axit béo hoặc rượu, sau đó tạo

ester. Protein có thể bị proteinase và peptidase chuyển hóa, các amino axit tự do sau đó có thể được phân hủy tiếp qua con đường Ehrlich của nấm men để tạo rượu bậc cao và ester [3].

Gần đây, một số nghiên cứu không chỉ tập trung vào khả năng lên men của nấm men trên bã đậu nành mà còn quan tâm đến việc lên men kết hợp nấm men với các probiotic trên cơ chất bã [4], [5]. *S. boulardii* CNCM-I745 là chủng nấm men probiotic có hiệu quả trong hỗ trợ điều trị các bệnh đường tiêu hóa cấp tính như tiêu chảy hoặc các bệnh mãn tính như viêm ruột [6]. Thành tế bào *S. boulardii* dày hơn so với các loại nấm men khác [7]. Ngoài ra, *S. boulardii* có thể tồn tại trong điều kiện nhiệt độ cơ thể 37°C, chịu được axit dạ dày và mật, bám dính tốt vào thành dạ dày nên có khả năng tồn tại cao, có thể đạt mật độ rất cao trong đường tiêu hóa trong một thời gian rất ngắn [8]. Các nghiên cứu cho thấy, glucan không tan của polysaccharide thành tế bào *S. boulardii* có khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư đại trực tràng [9]. *S. boulardii* khác biệt với *S. cerevisiae* ở đặc điểm không ưu tiên sử dụng galactose làm nguồn dinh dưỡng [10]. Hiện nay, *S. boulardii* còn

¹ Trường Đại học Kinh tế - Kỹ thuật Công nghiệp

² Công ty cổ phần đầu tư liên doanh Việt Anh

³ Đại học Bách Khoa Hà Nội

* Email: mtvanh@uneti.edu.vn

được coi là tác nhân quan trọng để tạo ra các chất có hoạt tính sinh học thông qua quá trình lên men. *S. boulardii* tác động đến quá trình tổng hợp isoflavone [11] và polyphenol [12], do đó làm tăng khả năng chống oxy hóa cho sản phẩm, ngoài ra còn có thể tăng khả dụng sinh học của các khoáng chất và vitamin thiết yếu, giảm nồng độ các chất kháng dinh dưỡng như phytate [13]. *S. boulardii* đã được lên men kết hợp với *S. cerevisiae* để sản xuất bia thủ công có nhiều lợi ích cho sức khỏe. Sự kết hợp không những không ảnh hưởng tiêu cực đến mùi thơm của bia mà còn làm tăng hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng polyphenol trong sản phẩm [14].

Hiện tại, nghiên cứu về sự lên men kết hợp giữa *S. cerevisiae* với *S. boulardii* trên cơ chất bã đậu là hướng nghiên cứu mới có tính khả thi cao. Kết quả nghiên cứu của Mai Thị Vân Anh và cs (2023) [15] cho thấy, chủng nấm men *S. cerevisiae* 7012 có khả năng lên men và sinh hương tốt để kết hợp với nấm men có đặc tính probiotic *S. boulardii* CNCM I-745. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện để xác lập các điều kiện nhiệt độ, tỷ lệ tiếp giống, hàm lượng đường và thời gian lên men dịch thủy phân bã bởi phức hợp 2 chủng nhằm định hướng tạo đồ uống lên men từ dịch thủy phân bã đậu nành, có chứa nấm men probiotic ở mật độ $> 7 \log \text{CFU/ml}$. Đa số nấm men *S. cerevisiae* lên men thích hợp ở 28 - 32°C còn *S. boulardii* có thể sinh trưởng, phát triển ở cả điều kiện 37°C. Do vậy, khoảng nhiệt độ từ 25 - 37°C được lựa chọn để thực hiện nghiên cứu lên men kết hợp. Theo quy định 1169/2011 của EU, đồ uống có chứa $> 1,2\%$ cồn theo thể tích được gọi là đồ uống có cồn [16]. Để phù hợp với nhiều đối tượng sử dụng, độ cồn của sản phẩm cuối cùng được định hướng trong nghiên cứu này không quá 1,2% v/v.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hai chủng nấm men: *S. boulardii* CNCM I-745 hoạt hóa từ chế phẩm men vi sinh Bioflora (Biocodex, Pháp); *S. cerevisiae* 7012 từ bộ sưu tập của Trường hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội, được ký hiệu tương ứng là I-745 và 7012.

Bã đậu nành: Thu nhận từ Nhà máy Sữa đậu nành Vinasoy Bắc Ninh (độ ẩm $85,32 \pm 0,02\%$, protein $3,05 \pm 0,02\%$, xơ tổng $10,25 \pm 0,16\%$). Dịch thủy phân bã dùng trong nghiên cứu (DBNC) thực hiện như sau: mỗi mẫu bã đã tiền xử lý hấp diệt trùng, được bổ sung nước để đạt 5% chất khô, chỉnh pH về 7,0 và thủy phân bằng Alcalase® 2.4 L trong 1 giờ; chỉnh tiếp về pH 4,5 thủy phân trong 3 giờ bằng Viscozyme®L và Pectinex®Ultra SP-L [17], sau đó bổ sung saccharose vào dịch (hàm lượng sẽ thay đổi theo các điều kiện nghiên cứu cụ thể). Dịch được đun sôi cách thủy 15 phút và làm nguội xuống 30°C trước khi cấy nấm men.

Môi trường nhân giống cấp 1 là dịch chiết malt đại mạch 10°Bx hấp diệt trùng 121°C trong 15 phút; môi trường cấp 2 là dịch bã đã chuẩn bị ở trên, ly tâm thu dịch trong và hấp diệt trùng 121°C trong 15 phút. Môi trường nuôi cấy nấm men: Sử dụng YGC (Yeast Glucose Chloramphenicol Agar) để định lượng cả 2 loại nấm men [18] và YPGal (Yeast Peptone Galactose Agar) để định lượng riêng chủng *S. cerevisiae* 7012 do *S. boulardii* không ưu tiên sử dụng galactose làm nguồn cơ chất [10].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên men

Nấm men từ thạch nghiêng được nhân giống trong các ống nghiệm chứa 10 ml môi trường cấp 1 ở 30°C trong 24 giờ. 1 ml giống cấp 1 được hút vào 9 ml môi trường cấp 2 nhân giống tiếp trong 24 giờ ở 30°C. 10 ml dịch giống cấp 2 của mỗi chủng được chuyển vào bình lên men chứa 90 ml dịch bã (DBNC), 2% saccharose bổ sung, mật độ tiếp giống ban đầu của mỗi chủng khoảng $6 \log \text{CFU/ml}$. Tiến hành lên men ở 25, 30, 35, 37°C trong 48 giờ. Phân tích các chỉ tiêu trước và sau lên men ở các điều kiện gồm: Mật độ vi sinh, axit tổng, đường tổng, hàm lượng ethanol.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose bổ sung

Lượng saccharose bổ sung vào dịch trước lên men tác động đến độ cồn của sản phẩm. Các mẫu thử nghiệm và phân tích kết quả được tiến hành tương tự 2.2.1 ở nhiệt độ lên men đã chọn tại 2.2.1, tỷ lệ saccharose bổ sung khảo sát ở các mức 0, 1, 1,5, 2, 2,5%.

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống giữa hai chủng đến quá trình lên men kết hợp

Trong đồ uống lên men, *S. boulardii* CNCM I-745 đóng vai trò probiotic còn chủng 7012 đóng vai trò chủng lên men chính, giúp tạo hương và cồn cho sản phẩm. Các mẫu thử nghiệm và phân tích kết quả được tiến hành tương tự 2.2.1, thực hiện ở nhiệt độ lên men đã chọn ở 2.2.1, tỷ lệ saccharose bổ sung chọn ở 2.2.2. Tỷ lệ tiếp giống của *S. boulardii* CNCM I - 745 giữ cố định 6 log CFU/ml thay đổi tỷ lệ *S. cerevisiae* 7012 trong khoảng từ 2 log CFU/ml đến 6 log CFU/ml.

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian lên men

Các mẫu thử nghiệm và phân tích kết quả được tiến hành tương tự như 2.2.1 thực hiện ở nhiệt độ lên men đã chọn ở mục 2.2.1, tỷ lệ đường saccharose bổ sung chọn ở 2.2.2. Tỷ lệ tiếp giống của *S. boulardii* CNCM I-745 giữ cố định 6 log CFU/ml, tỷ lệ *S. cerevisiae* 7012 được chọn ở 2.2.3. Thời gian lên men khảo sát ở các mốc 12, 24, 36, 48, 60, 72 giờ.

2.2.5. Đánh giá chất lượng dịch sau lên men ở điều kiện đã chọn

Dịch lên men ở điều kiện đã chọn được tại 2.2.4 được phân tích hàm lượng một số thành phần đường đơn, axit hữu cơ, ethanol và glycerol, hàm lượng chất có hoạt tính chống oxy hóa, tỷ lệ của một số thành phần dễ bay hơi.

2.3. Phương pháp phân tích

2.3.1. Xác định hàm lượng đường khử tổng

Dịch phân tích được thủy phân hoàn toàn trong 2 giờ bằng HCl 25%, sau đó trung hòa về pH 7,0 bằng NaOH 10%, định mức đến thể tích xác định và ly tâm thu dịch trong phân tích. Hàm lượng đường khử trong dịch được xác định bằng phương pháp DNS thông qua độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm của sản phẩm cuối cùng với thuốc thử DNS sử dụng đường chuẩn D-glucose [19].

2.3.2. Xác định hàm lượng axit tổng

Dịch phân tích được ly tâm thu dịch trong. Hàm lượng axit tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,1 N chỉ thị phenolphthalein [20]. Hàm lượng axit tổng trong 100 ml dịch được

xác định thông qua số ml NaOH 0,1 N dùng trung hòa 100 ml dịch phân tích và quy đổi tương đương về mg axit acetic/100 ml dịch phân tích.

2.3.3. Xác định mật độ tế bào nấm men

Xác định bằng cách đếm khuẩn lạc nấm men nuôi ở 30°C trên môi trường thạch YGC [18] và YPGal [10].

2.3.4. Đánh giá khả năng lên men

Xác định thông qua lượng CO₂ thoát ra trong quá trình lên men.

2.3.5. Xác định hàm lượng axit amin và peptide mạch ngắn

Dịch phân tích được tủa với axit tricloacetic (TCA) 20% (w/w) tỷ lệ 1: 1. Phần dịch trong không bị kết tủa bởi TCA gồm các peptide có khối lượng phân tử thấp (từ 330 - 380 dalton) và các axit amin [21] được ly tâm tách riêng khỏi phần protein kết tủa và được đưa đi xác định hàm lượng bằng thuốc thử Folin theo phương pháp Lowry [22].

2.3.6. Xác định hàm lượng polyphenol

Dịch phân tích được tủa với ethanol tuyệt đối tỷ lệ 1: 1 để loại protein, thu dịch trong đem đi phân tích. Hàm lượng polyphenol trong dịch thủy phân được xác định bằng phương pháp Folin - Ciocalteu. Nguyên tắc của phương pháp dựa vào phản ứng màu giữa các polyphenol trong dịch phân tích với thuốc thử Folin-Ciocalteu ở bước sóng 765 nm [23]. Hàm lượng polyphenol trong mẫu được xác định dựa theo đường chuẩn axit gallic.

2.3.7. Xác định khả năng chống oxy hóa

Dịch phân tích được tủa với methanol tuyệt đối để loại protein, thu dịch trong để thực hiện các phản ứng với DPPH (2,2 - Diphenyl - 1 - picrylhydrazyl). Hàm lượng chất chống oxy hóa trong dịch được quy về hàm lượng tương đương vitamin C (mg AAE)/ 100 ml [17].

2.3.8. Xác định hàm lượng monosaccharide, axit hữu cơ, glycerol và ethanol trong dịch phân tích

Xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, sử dụng hệ thống HPLC của Agilent Technologies 1200 series (Đức) với cột phân tích Biorad 87H, detector RID.

2.3.9. Xác định thành phần các chất dễ bay hơi

Các chất dễ bay hơi trong mẫu phân tích được chiết bằng etylaxetat tỷ lệ 1: 1, rồi được ly tâm tách dịch trong. Dịch này tiếp tục được lọc qua màng

0,2 μm và đem phân tích bằng phương pháp GC-MS, sử dụng máy sắc ký khí khối phổ SCION 456-GC [15].

2.3.10. Phương pháp phân tích thống kê

Kiểm tra ý nghĩa đối với dữ liệu thí nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng phân tích phương sai một yếu tố (One - Way ANOVA) và kiểm định Turkey sử dụng SPSS® 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

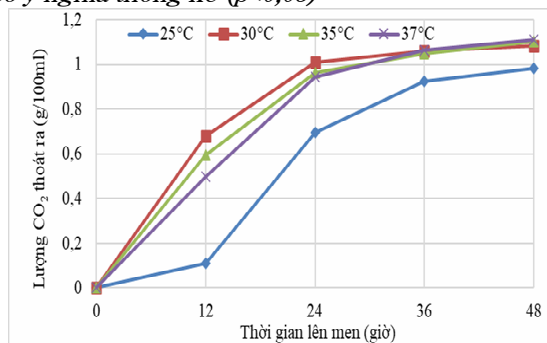
3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ lên men

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình lên men kết hợp hai chủng được thể hiện trong bảng 1 và hình 1. Bảng 1 cho thấy, mẫu lên men ở 25 và 30°C đều có mật độ nấm men probiotic sau lên men $> 7 \log \text{CFU/ml}$. Axit tổng sau lên men của mẫu 25 và 30°C thấp hơn mẫu 35 và 37°C cho thấy, nhiệt độ lên men tăng cao quá sẽ ảnh hưởng đến axit tổng của dịch.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến chất lượng dịch thu được sau 48 giờ lên men

Chỉ tiêu	Trước lên men	Nhiệt độ lên men (°C)			
		25	30	35	37
Mật độ 7012, log CFU/ml	$5,93^a \pm 0,08$	$7,37^c \pm 0,09$	$7,16^c \pm 0,06$	$6,70^b \pm 0,37$	$6,44^b \pm 0,26$
Mật độ I-745, log CFU/ml	$5,97^a \pm 0,10$	$7,51^c \pm 0,10$	$7,51^c \pm 0,17$	$6,92^b \pm 0,36$	$6,48^b \pm 0,19$
Axit tổng, mg acetic/100 ml	$255,0^b \pm 3,5$	$241,7^a \pm 1,9$	$240,0^a \pm 2,7$	$255,0^b \pm 10,4$	$264,0^b \pm 4,9$
Đường khử tổng, g/100 ml	$4,53^d \pm 0,07$	$2,26^c \pm 0,03$	$2,01^b \pm 0,02$	$2,05^b \pm 0,01$	$1,92^a \pm 0,05$
Ethanol, % v/v	-	$1,25^{ab} \pm 0,01$	$1,37^c \pm 0,01$	$1,33^{bc} \pm 0,01$	$1,23^a \pm 0,04$

Ghi chú: “-”: Không xác định; các số liệu trong cùng một hàng, các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến tốc độ lên men (biểu diễn bằng lượng CO₂ thoát ra)

Hình 1 cho thấy, nhiệt độ lên men thay đổi có ảnh hưởng đến tốc độ lên men và các chỉ tiêu của dịch sau lên men. Ở 30°C, tốc độ lên men kết hợp 2 chủng đạt cao nhất, lượng CO₂ giải phóng từ giờ thứ 12 đã vượt so với lượng CO₂ giải phóng tại các điều kiện nhiệt độ còn lại. Như vậy, lên men ở 30°C vừa tạo mật độ nấm men probiotic cao nhất, vừa có tốc độ lên men nhanh nhất và thích hợp với cả 2 chủng nấm men nên nhiệt độ 30°C được chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

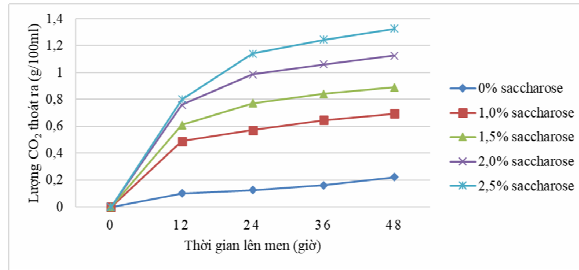
3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose bổ sung

Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose bổ sung đến chất lượng dịch thu được sau 48 giờ lên men

Chỉ tiêu	Trước lên men (0% saccharose)	Hàm lượng saccharose bổ sung (%)				
		0	1,0	1,5	2,0	2,5
Mật độ 7012, log CFU/ml	$6,00^a \pm 0,03$	$6,40^b \pm 0,20$	$6,89^c \pm 0,06$	$6,7^{bc} \pm 0,22$	$6,80^c \pm 0,01$	$6,95^c \pm 0,08$
Mật độ I-745, log CFU/ml	$6,03^a \pm 0,10$	$6,82^b \pm 0,03$	$7,22^{bc} \pm 0,20$	$7,21^{bc} \pm 0,06$	$7,32^c \pm 0,21$	$7,36^c \pm 0,14$
Axit tổng, mg acetic/100 ml	$230,1^a \pm 5,5$	$245,7^a \pm 5,5$	$241,8^a \pm 2,4$	$245,3^a \pm 4,9$	$241,8^a \pm 1,23$	$241,4^a \pm 0,6$
Đường khử tổng, g/100 ml	$2,58^f \pm 0,01$	$2,06^a \pm 0,01$	$2,09^b \pm 0,01$	$2,19^c \pm 0,02$	$2,22^d \pm 0,01$	$2,26^e \pm 0,02$
Ethanol, % v/v	-	$0,35^a \pm 0,04$	$0,89^b \pm 0,07$	$1,15^c \pm 0,05$	$1,39^d \pm 0,04$	$1,62^a \pm 0,06$

Ghi chú: “-”: Không xác định; các số liệu trong cùng một hàng, các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Ảnh hưởng của lượng saccharose bổ sung đến tốc độ lên men và thành phần của dịch sau lên men thể hiện trong bảng 2 và hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ saccharose bổ sung đến tốc độ lên men

Bảng 2 cho thấy, mật độ 2 chủng nấm men đều thay đổi có ý nghĩa khi bổ sung thêm saccharose vào dịch trước lên men. Từ 1% đường bổ sung đã cho thấy, mật độ probiotic đạt > 7 log CFU/ml sau 48 giờ lên men. Cùng điều kiện lên men, thay đổi hàm lượng saccharose tác động đáng kể đến độ cồn, đường sót và lượng CO₂ giải phóng theo thời gian so với mẫu lên men không bổ sung đường (Hình 2). Tuy nhiên, thay đổi hàm

lượng saccharose bổ sung không ảnh hưởng nhiều đến axit tổng của dịch sau lên men.

Với lượng đường bổ sung không quá 1,5%, lượng cồn đạt được không quá 1,2% là đảm bảo tiêu chí độ cồn của sản phẩm, mật độ *S. boulardii* 7,2 log CFU/ml cũng đảm bảo tiêu chí về mật độ probiotic. Do vậy, tỷ lệ saccharose bổ sung là 1,5% được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống giữa 2 chủng

Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống 7012 đến tốc độ lên men và các chỉ tiêu hóa lý của dịch lên men được thể hiện trong bảng 3 và hình 3. Khi tiếp giống, mật độ I-745 được giữ cố định 6 log CFU/ml chỉ thay đổi mật độ của *S. cerevisiae* 7012 cho phù hợp vì vai trò chính của chủng này là tạo cồn và sinh hương. Nếu *S. cerevisiae* 7012 nhiều quá sẽ dẫn đến sự cạnh tranh dinh dưỡng với probiotic, tạo độ cồn quá cao và khi tự phân có thể ảnh hưởng đến mùi vị của sản phẩm.

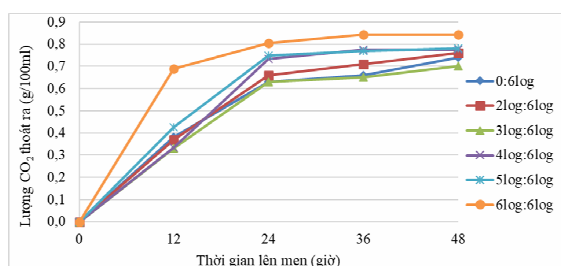
Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống giữa 2 chủng tới chất lượng dịch lên men sau 48 giờ

Tỷ lệ 7012: I-745	0: 6 log	2 log: 6 log	3 log: 6 log	4 log: 6 log	5 log: 6 log	6 log: 6 log
Mật độ 7012, log CFU/ml	-	4,98 ^a ± 0,03	5,98 ^{ab} ± 0,01	6,55 ^{bc} ± 0,49	7,17 ^c ± 0,42	7,33 ^c ± 0,08
Mật độ I-745, log CFU/ml	7,69 ^b ± 0,09	7,54 ^b ± 0,11	7,62 ^b ± 0,01	7,79 ^b ± 0,07	7,66 ^b ± 0,05	7,16 ^a ± 0,19
Axit tổng, mg acetic/100 ml	261,7 ^b ± 3,5	263,3 ^b ± 5,7	259,2 ^b ± 11,5	247,1 ^b ± 5,9	240,5 ^b ± 8,95	207,6 ^a ± 7,1
Đường khử tổng, g/100 ml	2,32 ^{cd} ± 0,05	2,39 ^d ± 0,05	2,28 ^c ± 0,03	2,26 ^{bc} ± 0,01	2,19 ^{ab} ± 0,02	2,14 ^a ± 0,01
Ethanol, % v/v	0,88 ^a ± 0,04	0,85 ^a ± 0,04	0,97 ^a ± 0,04	0,99 ^{ab} ± 0,06	1,15 ^{bc} ± 0,05	1,17 ^c ± 0,04

Ghi chú: “-”: Không xác định; các số liệu trong cùng một hàng, các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả cho thấy, ở tỷ lệ tiếp giống của *S. cerevisiae* 7012 là 6 log CFU/ml, tốc độ lên men cao hơn đáng kể so với tốc độ lên men ở các tỷ lệ tiếp giống còn lại chứng tỏ *S. cerevisiae* 7012 có ảnh hưởng lớn đến tốc độ lên men kết hợp. Tuy nhiên, với tỷ lệ tiếp giống này thì mật độ probiotic sau lên men thấp hơn so với các tỷ lệ tiếp giống còn lại, sự khác nhau này có ý nghĩa thống kê. Như vậy, khi tỷ lệ tiếp giống của *S. cerevisiae* 7012

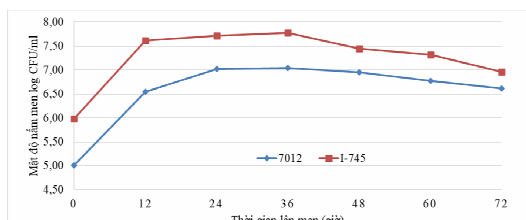
quá cao có thể ảnh hưởng tới mật độ probiotic trong dịch sau lên men do sự cạnh tranh dinh dưỡng nhưng *S. cerevisiae* 7012 cũng cần đạt mật độ đủ lớn để tạo hương cho sản phẩm. Trong các tỷ lệ tiếp giống còn lại, có thể thấy mật độ *S. cerevisiae* 7012 là 5 log CFU/ml vừa có tốc độ lên men cao nhất vừa có mật độ probiotic đạt tối đa, chênh lệch không đáng kể so với mẫu lên men độc lập.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống giữa 2 chủng đến lượng CO₂ giải phóng theo thời gian khi lên men kết hợp chủng

Khi tăng mật độ *S. cerevisiae* 7012 từ 4 - 6 log CFU/ml bắt đầu nhận thấy sự giảm axit tổng sau lên men. Điều này chứng tỏ chủng 7012 còn có vai trò quan trọng trong việc làm giảm axit tổng của dịch lên men. Càng tăng mật độ chủng 7012 hàm lượng đường sót trong dịch sau 48 giờ lên men càng thấp, điều này là hợp lý do tăng mật độ chủng 7012 thì lượng cơ chất trong môi trường sẽ được nấm men sử dụng triệt để hơn trong quá trình lên men. Độ cồn của tất cả các mẫu lên men đều thấp hơn 1,2% v/v đảm bảo tiêu chí để ra cho sản phẩm đồ uống.

3.4. Nghiên cứu lựa chọn thời gian lên men

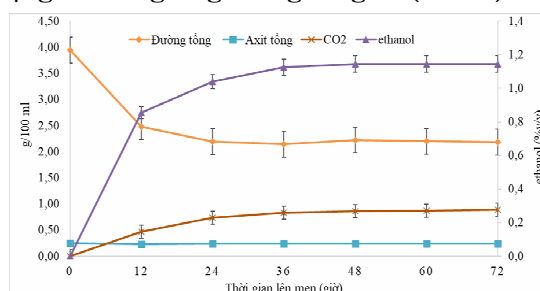


Hình 4. Sự biến thiên mật độ 2 chủng 7012 và I-745 theo thời gian lên men

Hình 4 cho thấy, khi kéo dài thời gian lên men từ 12 - 72 giờ, mật độ chủng I-745 đã đạt cực đại từ giờ thứ 12 khoảng 7,6 log CFU/ml và mật độ của *S. cerevisiae* 7012 cũng đã rất cao tại thời điểm này (khoảng 6,5 log CFU/ml). Mật độ chủng 7012 đạt

cực đại ở 24 giờ và cả 2 chủng duy trì mật độ cực đại đến hết 36 giờ, sau đó bắt đầu có xu hướng giảm từ sau thời điểm 36 giờ.

Axit tổng của dịch lên men thay đổi không nhiều khi kéo dài thời gian lên men. Lượng đường tổng của dịch giảm dần trong thời gian lên men từ 0 - 12 giờ và 24 giờ. Sau 24 giờ, lượng đường thay đổi không đáng kể. Tương ứng với chỉ tiêu này, lượng cồn cũng tăng từ 12 - 24 giờ, sau 24 giờ lượng cồn cũng tăng không đáng kể (Hình 5).



Hình 5. Động thái quá trình lên men khi kết hợp 2 chủng 7012/ I-745

Lượng CO₂ thay đổi cũng tương ứng với sự thay đổi đường và cồn trong dịch lên men. Từ 24 giờ, lượng này gần như không đổi giữa các mẫu (các chênh lệch không có ý nghĩa thống kê). Do quá trình tạo đồ uống còn có giai đoạn bảo quản lạnh sau lên men nên quá trình lên men dừng ở 24 giờ là phù hợp.

3.5. Đánh giá chất lượng dịch sau lên men ở điều kiện đã chọn

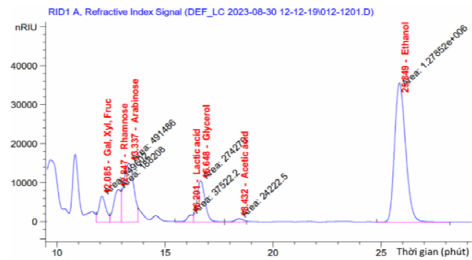
Bảng 4 và hình 6 cho thấy, trong dịch sau lên men 24 giờ, một số đường như glucose, galactose, fructose đã bị nấm men sử dụng, lượng đường sót còn lại có thể do sự có mặt của xylose. Một số đường khác như rhamnose, arabinose... cũng không biến đổi nhiều sau lên men là do nấm men không sử dụng được các loại đường này.

Bảng 4. Một số chỉ tiêu của dịch ở điều kiện đã chọn

STT	Chỉ tiêu	Trước lên men	Sau 24 giờ lên men
1	Glucose (mg/100 ml)	571,00	KPH
2	Galactose, Fructose & Xylose (mg/100 ml)	870,61	43,37
3	Rhamnose (mg/100 ml)	77,80	60,40
4	Arabinose (mg/100 ml)	148,28	134,41

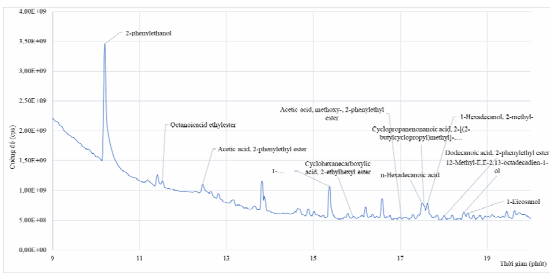
5	Lactic axit (mg/100 ml)	11,81	17,40
6	Axit acetic (mg/100 ml)	52,57	24,59
7	Glycerol (mg/100 ml)	48,66	79,77
8	Ethanol (% v/v)	KPH	1,01
9	Chất chống oxy hóa (mg AAE/100 ml)	0,75	1,81
10	Axit amin và peptide mạch ngắn (mg/100 ml)	563,96	406,20
11	Polyphenol (mg GAE/100 ml)	32,83	30,63

Ghi chú: KPH: không phát hiện



Hình 6. Sắc ký đồ HPLC phân tích thành phần một số hợp chất hòa tan trong dịch sau 24 giờ lên men

Sau quá trình lên men có sự giảm rõ rệt hàm lượng axit acetic và tăng lượng glycerol trong dịch. Sự có mặt của axit acetic trong dịch trước lên men có thể do đã có sẵn một lượng nhất định từ nguyên liệu. Kết quả này phù hợp với công bố của Yuanxin Qiu và cs (2023) [1], axit acetic là một trong 2 axit có sẵn trong bã đậu nành. Việc xuất hiện acetic axit 2-phenylethyl ester (Hình 7) có thể là nguyên nhân làm giảm lượng axit acetic trong dịch lên men.



Hình 7. Sắc ký đồ GC-MS phân tích thành phần một số hợp chất dễ bay hơi trong dịch sau 24 giờ lên men

Sau 24 giờ lên men, hàm lượng polyphenol có giảm chút ít so với trước lên men. Theo Vong và cs (2019) [5], trong số các hợp chất polyphenol có một vài thành phần được chuyển hóa trong quá trình lên men bã đậu nành nên bị giảm đi và cũng

có thể có những thành phần được tạo thêm trong quá trình lên men. Do vậy lượng này thay đổi không có quy luật cụ thể và cũng cần nghiên cứu thêm, tuy nhiên lượng giảm là không nhiều, sau quá trình lên men trong dịch vẫn còn một lượng polyphenol nhất định.

Quá trình lên men làm tăng lượng chất chống oxy hóa trong dịch, có thể được giải thích như sau: Trước khi tiến hành quá trình lên men, dịch đã có sẵn một lượng chất chống oxy hóa như các peptide mạch ngắn, polyphenol, một số hợp chất isoflavone, thành phần chất xơ có thể chứa các oligosaccharide có hoạt tính chống oxy hóa [17]. Theo Santos và cs (2018) [24], quá trình lên men của nấm men trên bã đậu nành có thể đã thúc đẩy chuyển đổi sinh học của các isoflavone β -D-glucoside thành các aglycone. Sau lên men, nấm men nói chung và *S. cerevisiae* nói riêng có khả năng tổng hợp một số hợp chất có hoạt tính sinh học đóng vai trò chất chống oxy hóa như glutathion [25], coenzym Q hoặc ubiquinone [26], carotenoid... [27]. Một số sản phẩm chuyển hóa bởi nấm men sau quá trình lên men, một số chất trong thành phần tế bào như protein hòa tan, axit amin chứa lưu huỳnh, β -glucan thành tế bào nấm men... cũng góp phần tạo ra khả năng chống oxy hóa của dịch lên men [27]. Ngoài ra sự tăng thêm có thể là do bản thân tế bào nấm men cũng đã được công nhận là một nguồn chất chống oxy hóa.

Hình 7 cho thấy, trong dịch lên men sau 24 giờ có sự xuất hiện của một số rượu cao phân tử, ester và axit hữu cơ. Trong đó 2-phenylethanol được tạo ra đáng kể, chiếm 40% trong tổng lượng chất dễ bay hơi của dịch lên men, lượng này có thể dao động tùy thời điểm lên men, thường chỉ tiêu này bắt đầu ổn định từ 24 giờ lên men. Hiện nay 2-phenylethanol cho là rất có giá trị và đang có xu

hương được khai thác thông qua con đường sinh tổng hợp nhờ quá trình lên men của nấm men. Nhiều loại nấm men, đặc biệt là *S. cerevisiae* có khả năng sinh tổng hợp thành phần này bằng cách sử dụng L-phenylalanine làm tiền chất [28]. Một số rượu cao phân tử khác cũng xuất hiện từ mẫu lên men 12 giờ và tăng dần, ổn định từ 24 giờ. Sau lên men nhận thấy có sự xuất hiện của nhiều ester như octanoic axit ethyl ester; acetic acid 2-phenylethyl ester; cyclohexanecarboxylic axit 2-ethylhexyl ester...

Như vậy, ngoài các tiêu chí đặt ra cho quá trình lên men từ dịch thủy phân bã đậu nành, dịch sau lên men vẫn chứa một số chất có hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe và một số thành phần hương tạo mùi vị dễ chịu cho sản phẩm đồ uống lên men.

4. KẾT LUẬN

Nhiệt độ 30°C là phù hợp trong điều kiện lên men kết hợp 2 chủng nấm men; hàm lượng saccharose bổ sung phù hợp là 1,5%; tỷ lệ tiếp giống ban đầu của nấm men probiotic *S. boulardii* CNCM I-745 là 6 log CFU/ml và tỷ lệ tiếp giống của *S. cerevisiae* 7012 không quá 5 log CFU/ml; thời gian lên men là 24 giờ. Với điều kiện lên men như vậy, dịch sau lên men đã đạt được các thành phần mong muốn như mật độ probiotic sau lên men đạt tối đa 7,7 log CFU/ml, độ cồn không quá 1,2% v/v, chứa một số thành phần bay hơi có tác dụng tạo mùi thơm cho sản phẩm trong đó 2-phenylethanol được tạo ra đáng kể, chiếm 40% trong tổng lượng chất dễ bay hơi của dịch lên men. Như vậy nghiên cứu đã xác lập được điều kiện lên men thích hợp khi sử dụng đồng thời hai chủng nấm men *S. boulardii* CNCM I-745 và *S. cerevisiae* 7012 nhằm định hướng tạo đồ uống lên men probiotic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yuanxin Qiu, Cungang Li, Min Xia, Hao Dong, Hairu Yuan, Shuangling Ye, Qun Wang (2023). Exploring a new technology for producing better-flavored HongJun Tofu, a traditional Neurospora-type okara food. *LWT*. 180, 114700, DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114700.
2. Yvonne F. Collins, Paul L. H. McSweeney, Martin G. Wilkinson (2003). Lipolysis and free

fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 13(11), 841 - 866, DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00109-2.

3. Louise Marie Sørensen, Klaus Gori, Mikael Agerlin Petersen, Lene Jespersen, Nils Arneborg (2011). Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *International Dairy Journal*. 21(12), 970 - 978, DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.06.005.

4. Hui Shi, Min Zhang, Weiqin Wang, Sakamon Devahastin (2020). Solid-state fermentation with probiotics and mixed yeast on properties of okara. *Food Bioscience*, 36: 100610.

5. Weng Chan Vong, Shao Quan Liu (2019). The effects of carbohydrase, probiotic *Lactobacillus paracasei* and yeast *Lindnera saturnus* on the composition of a novel okara (soybean residue) functional beverage. *LWT*. 100, 196 - 204, DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.059.

6. Pedro Pais, Vanda Almeida, Melike Yilmaz, Miguel C Teixeira (2020). *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic?. *Journal of Fungi*, 6(2): 78.

7. Lauren E. Hudson, Courtney D. McDermott, Taryn P. Stewart, William H. Hudson, Daniel Rios, Milo B. Fasken, Anita H. Corbett, Tracey J. Lamb (2016). Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PloS one*. 11(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0153351.

8. Joaquín Mulero-Cerezo, Álvaro Briz-Redón, Ángel Serrano-Aroca (2019). *Saccharomyces cerevisiae* Var. *boulardii*. Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production. *Applied Sciences*. 9(16), 3250, DOI: 10.3390/app9163250.

9. Olivier Fortin, Blanca Aguilar-Uscanga, Khanh Dang Vu, Stephane Salmieri, Monique Lacroix (2018). Cancer chemopreventive, antiproliferative and superoxide anion scavenging properties of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* cell wall components. *Nutrition and cancer*, 70(1): 83 - 96.

10. Marcin Łukaszewicz (2012). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* - Probiotic Yeast, in *Probiotics*. IntechOpen.

11. C. R. Rekha, G. Vijayalakshmi (2010). Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast. *Journal of applied microbiology*. 109(4), 1198 - 1208, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04745.x.
12. Nurcan Değirmencioglu, Ozan Gurbuz, Yasemin Şahan (2016). The monitoring, via an *in vitro* digestion system, of the bioactive content of vegetable juice fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Journal of Food Processing and Preservation*. 40(4), 798-811, DOI: 10.1111/jfpp.12704.
13. SC Chandrasekar Rajendran, Bhawani Chamlagain, Susanna Kariluoto, Vieno Piironen, PEJ Saris (2017). Biofortification of riboflavin and folate in idli batter, based on fermented cereal and pulse, by *Lactococcus lactis* N8 and *Saccharomyces boulardii* SAA655. *Journal of Applied Microbiology*. 122(6), 1663 - 1671, DOI: 10.1111/jam.13453.
14. Angela Capece, Rossana Romaniello, Angela Pietrafesa, Gabriella Siesto, Rocchina Pietrafesa, Marianna Zambuto, Patrizia Romano (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International journal of food microbiology*. 284, 22 - 30, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028.
15. Thi Van Anh Mai, Kim Loan Nguyen, Dinh Trien Dang, Thi Xuan Sam Nguyen, Thanh Hang Nguyen (2023). Assessment of growth and fermentation of some yeasts on soybean residue hydrolysate. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 65(3): 91 - 96.
16. European Parliament, Council (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. *Off. J. Eur. Union*, 304: 18 - 63.
17. Mai Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Xuân Sâm, Nguyễn Kim Loan, Nguyễn Thanh Hằng (2022). Nghiên cứu ứng dụng Viscozyme® L và pectinex® Ultra SP-L nhằm gia tăng hiệu quả chuyển hóa bã đậu nành. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 438: 41 - 48.
18. Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng, Lê Thị Lan Chi (2009). *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, tr. 331.
19. Gail Lorenz Miller (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31(3), 426-428, DOI: 10.1021/ac60147a030.
20. Catrin Tyl, George D. Sadler (2017). pH and titratable acidity. *Food analysis*. 389 - 406.
21. Norman A Greenberg, WF Shipe (1979). Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. *Journal of Food Science*, 44(3): 735 - 737.
22. Jakob H Waterborg (2009). The Lowry method for protein quantitation, in *The protein protocols handbook*, J. M. Walker, Editor. Springer. 7 - 10.
23. Andrew L. Waterhouse (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*. 6(1), I1.1.1-I1.1.8, DOI: 10.1002/0471142913.fai0101s06.
24. Vidianny A. Queiroz Santos, Camila G. Nascimento, Carla A. P. Schmidt, Daniel Mantovani, Robert F. H. Dekker, Mário Antônio A. da Cunha (2018). Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. *LWT*. 92, 509-515, DOI: 10.1016/j.lwt.2018.02.067.
25. Duncan W. S. Stephen, Derek J. Jamieson (1996). Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 141(2-3): 207 - 212.
26. Isabel González-Mariscal, Elena García-Testón, Sergio Padilla, Alejandro Martín-Montalvo, Teresa Pomares Viciano, Luis Vazquez-Fonseca, Pablo Gandolfo Domínguez, Carlos Santos-Ocaña (2014). The regulation of coenzyme Q

biosynthesis in eukaryotic cells: all that yeast can tell us. *Molecular Syndromology*. 5(3-4), 107 - 118, DOI: 10.1159/000362897.

27. Amparo Querol, Graham H Fleet (2006). *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 285 - 291.

28. Sara Mitri, Mohamed Koubaa, Richard G. Maroun, Tristan Rossignol, Jean-Marc Nicaud, Nicolas Louka (2022). Bioproduction of 2-Phenylethanol through Yeast Fermentation on Synthetic Media and on Agro-Industrial Waste and By-Products: A Review. *Foods*. 11(1), DOI: 10.3390/foods11010109.

INVESTIGATING SOME FACTORS AFFECTING ON THE FERMENTATION PROCESS OF CREATING BEVERAGE FROM SOYBEAN CURD RESIDUE HYDROLYSATE

Mai Thi Van Anh¹, Dang Dinh Trien², Nguyen Thanh Hang³

¹University of Economics-Technology for Industries

²Viet Anh Joint Venture Investment Join Stock Company

³Hanoi University of Science and Technology

Summary

The study explored some factors affecting the fermentation process of soybean hydrolysate when using simultaneously two yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 and *Saccharomyces cerevisiae* 7012 to create a fermented beverage containing probiotic yeast. As a result, 30°C was chosen as the appropriate temperature in fermentation conditions combining two yeast strains; The appropriate added sucrose content is 1.5%; The initial seeding rate of probiotic *S. boulardii* CNCM I-745 is 6 log CFU/ml and the seeding rate of *S. cerevisiae* 7012 is not more than 5 log CFU/ml; fermentation time 24 hours. With such fermentation conditions, the post-fermentation liquid has achieved the desired ingredients such as post-fermentation probiotic density reaching a maximum of 7.7 log CFU/ml, alcohol content not exceeding 1.2% v/v, contains a number of volatile components that create aroma for the product, of which 2-phenylethanol is significantly produced, accounting for about 40% of the total volatile matter of the fermentation liquid.

Keywords: Soy bean curd residue hydrolysate, yeast, fermentation beverage, probiotic.

Người phản biện: PGS.TS. Phí Quyết Tiến

Ngày nhận bài: 29/3/2024

Ngày thông qua phản biện: 23/4/2024

Ngày duyệt đăng: 10/5/2024