

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN LÊN MEN TỐI BETACYANIN VÀ POLYPHENOL TỔNG TRÔNG QUÁ TRÌNH LÊN MEN SPARKLING THANH LONG RUỘT ĐỎ (*Hylocereus polyrhizus*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

Lê Thị Thùy Linh^{1*}, Nguyễn Bảo Lộc², Trần Thị Như Hà³, Trần Minh Vũ⁴,
Nguyễn Thị Thu Hằng⁵, Nguyễn Hữu Thanh⁶, Trương Hoàng Phương⁷

EVALUATION OF FERMENTATION FACTORS AFFECTING BETACYANIN AND TOTAL POLYPHENOL CONTENT IN SPARKLING DRAGON FRUIT JUICE PRODUCTION (*Hylocereus polyrhizus*) USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Le Thi Thuy Linh^{1*}, Nguyen Bao Loc², Tran Thi Nhu Ha³, Tran Minh Vu⁴,
Nguyen Thi Thu Hang⁵, Nguyen Huu Thanh⁶, Truong Hoang Phuong⁷

Tóm tắt – Trong nghiên cứu này, phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) và thiết kế Box-Behnken được sử dụng để khảo sát các yếu tố lên men trong quá trình sản xuất sparkling thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*). Ba thông số thí nghiệm gồm mật số *Saccharomyces cerevisiae* ($Lg10$ (CFU/mL)), nồng độ chất khô hòa tan ($^{\circ}$ Brix), nhiệt độ lên men ($^{\circ}$ C) đã được chọn để tối ưu hóa. Hàm lượng betacyanin và hàm lượng polyphenol tổng tối đa lần lượt là 366,65 (mg/L) và 196,68 mgGAE/L, đạt được ở điều kiện mật số nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là 5,6 log10

(CFU/mL) ở 19 $^{\circ}$ Brix ở 23 $^{\circ}$ C trong 4,4 ngày. Mô hình RSM cho thấy sự tương đối phù hợp với dữ liệu thực nghiệm về thời gian lên men, polyphenol và betacyanin với R^2 là 0,91, 0,989 và 0,98.

Từ khóa: betacyanin, bề mặt đáp ứng, Box-Behnken, polyphenol, yếu tố lên men.

Abstract – In this study, response surface methodology (RSM) and Box–Behnken design was used to investigate fermentation factors of sparkling red-fleshed dragon fruit juice production (*Hylocereus polyrhizus*). Three experimental parameters including *saccharomyces cerevisiae* density ($Lg10$ (CFU/mL)); concentration of dry matter ($^{\circ}$ Brix); temperature of fermentation ($^{\circ}$ C) was selected for optimization. The maximum of Betacyanin and total polyphenol content (TPC) was respectively 366.65 (mg/L) and 196.68 mg-GAE/L, achieved at conditions of *Saccharomyces cerevisiae* density of 5.6 log10 (CFU/mL) in 19 $^{\circ}$ Brix at 23 $^{\circ}$ C for 4.4 days. The established RSM model showed relatively good fit with the experimental data regarding the fermentation time, Polyphenol and Betacyanin with R^2 was 0.91, 0.989, 0.98.

Keywords: betacyanin, Box–Behnken, fermentation factors, polyphenol, response surface methodology.

^{1,3,4}Học viên Cao học, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

^{5,6}Viện Giống và Công nghệ nông nghiệp LAVI, Việt Nam

⁷Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài: 01/12/2022; Ngày nhận bài chỉnh sửa: 22/5/2023; Ngày chấp nhận đăng: 23/5/2023

*Tác giả liên hệ: lethuylinh111297@gmail.com

^{1,3,4}Graduate student, Can Tho University, Vietnam

²Can Tho University, Vietnam

^{5,6}LAVI's Institute for Agricultural Science and Plant Breeding, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁷Can Tho City Department of Science and Technology, Vietnam

Received date: 01st December 2022; Revised date: 22nd May 2023; Accepted date: 23rd May 2023

*Corresponding author: lethuylinh111297@gmail.com

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, việc tiêu thụ thanh long ruột đỏ gặp nhiều khó khăn do thanh long chỉ xuất khẩu trái tươi sang thị trường Trung Quốc. Tuy nhiên, thị trường này cũng có nhiều rủi ro về dịch bệnh và cùng thời gian với mùa vụ ở Trung Quốc.

Trước tình trạng khó khăn khi tiêu thụ sản phẩm, một số doanh nghiệp và tổ chức nông dân (hợp tác xã) ở các tỉnh Bình Thuận, Long An, Tiền Giang và Trà Vinh đã bước đầu nghiên cứu và sản xuất đa dạng các sản phẩm thanh long từ nguồn nguyên liệu sẵn có như nước ép thanh long, thanh long sấy khô, thanh long sấy dẻo, rượu vang thanh long, siro thanh long nhằm mở rộng đầu ra cho loại quả này và đa dạng hóa sản phẩm chế biến trên thị trường. Tuy nhiên, các loại sản phẩm này vẫn chưa được phát triển rộng rãi và chưa đáp ứng được yêu cầu thị trường, đặc biệt là các sản phẩm lên men từ thanh long ruột đỏ.

Sparkling là một dạng sản phẩm lên men từ trái cây. Sản phẩm này vừa có cồn vừa có gas và được giới trẻ rất yêu thích. Nghiên cứu sản xuất sản phẩm này từ dịch trích thanh long ruột đỏ không chỉ góp phần tiêu thụ sản phẩm trái thanh long ruột đỏ tươi mà còn góp phần thúc đẩy loại thức uống có nhiều hợp chất có lợi cho cơ thể cho người tiêu dùng Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu thông thường cần bố trí số lượng mẫu nhiều, đòi hỏi một lượng lớn nguyên vật liệu và thời gian hoàn thành. Vấn đề này được khắc phục bằng cách sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng. Việc sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology – RSM) để tối ưu hóa số lượng mẫu là một phương pháp cần thiết và hiệu quả trong việc nghiên cứu [1].

Ngoài việc đảm bảo sản xuất được sản phẩm sparkling thanh long ruột đỏ có giá trị cảm quan cao, nghiên cứu này tập trung vào sự thay đổi các hợp chất có hoạt tính sinh học (betacyanin, polyphenol) bị ảnh hưởng bởi các điều kiện lên men. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá được sự ảnh hưởng của các điều kiện lên men đối với betacyanin và polyphenol, từ đó xác định các thông số thích hợp trong quá trình lên men sparkling thanh long ruột đỏ nhằm hạn chế sự

tổn thất của betacyanin và polyphenol trong sản phẩm.

II. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Thanh long ruột đỏ, còn được gọi là thanh long nữ hoàng (*Hylocereus polyrhizus*), thuộc dòng H14 có xuất xứ từ Colombia. Bên ngoài trái thanh long có màu đỏ đậm tươi sáng. Bên trong trái thanh long có màu đỏ thẫm, lạ mắt. Thanh long ruột đỏ chứa đầy đủ các chất dinh dưỡng vi lượng cần thiết cho cơ thể bao gồm nhiều loại vitamin (các chỉ số vitamin C: 6 – 12, protein: 1,08 – 1,30, vitamin A, glucid) [2].

Thành phần betacyanin trong các dịch chiết thực vật dễ bị phân hủy do ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, ánh sáng và hoạt độ nước. Các thực phẩm chứa chất betacyanin dần dần bị phai màu hay mất màu tùy theo điều kiện bảo quản. Việc ổn định hàm lượng betacyanin trong quá trình chế biến thanh long ruột đỏ là mục tiêu đã được nhiều nhà nghiên cứu trong và ngoài nước quan tâm.

Các yếu tố môi trường như pH, nhiệt độ lên men, mật số nấm men, nồng độ chất khô và thời gian lên men cũng ảnh hưởng rất lớn đến quá trình lên men. Việc tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình lên men dịch thanh long sao cho đạt giá trị tối ưu về cảm quan cũng như ổn định các giá trị hoạt tính sinh học của dịch trích thanh long ruột đỏ là một vấn đề rất khó khăn trong nghiên cứu và sản xuất các sản phẩm lên men từ nước thanh long ruột đỏ.

Việc ứng dụng phương pháp thiết kế bề mặt đáp ứng với ma trận Box-Behnken không chỉ làm giảm bớt các công việc nghiên cứu mà còn tìm ra các giá trị tối ưu để biểu diễn một cách gần đúng mối tương quan giữa biến tiêu chí Y và các yếu tố Xi.

Wybraniec et al. [3] cho thấy rượu lên men từ trái cây (với pH ban đầu là 4,29 và 23,07°Brix (bổ sung Saccharose)) và lên men với 10^6 tế bào nấm men/ml bao gồm hai chủng nấm men với tỉ lệ 50% *S. oviformis*, 50% *S. vini*, lên men ở nhiệt độ 31 – 32°C trong 7 ngày sau đó lên men ở nhiệt độ 13 – 16°C trong 23 ngày. Kết quả cho thấy sản phẩm lên men có màu sắc, mùi vị, độ trong tốt và có độ đồng nhất trong sản phẩm.

Bên cạnh đó, theo Choo et al. [4], trong quá trình lên men tự nhiên nước thanh long ruột đỏ,

hàm lượng betacyanin giảm 20% và còn giảm tiếp trong quá trình bảo quản. Sau quá trình lên men tự nhiên trong 8 tuần, dịch lên men trải qua quá trình thanh trùng ở 75°C trong 15 giây và được giữ lạnh ở 4°C, bảo quản ở nhiệt độ 25°C trong 8 tuần.

Phan Thị Thanh Quế và cộng sự [5] đã công bố ảnh hưởng của các điều kiện chế biến và bảo quản đến sự ổn định betacyanin trong nước ép thanh long ruột đỏ. Song song đó, nghiên cứu của Vũ Thu Trang và cộng sự [6] về ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ tới sự ổn định của betacyanin trong nước quả thanh long ruột đỏ có pH 4 – 5 là khoảng tối ưu cho sự ổn định màu của dịch quả. Wong et al. [7] nghiên cứu sự ảnh hưởng từ các điều kiện quy trình chế biến khác nhau lên hàm lượng betacyanin của nước thanh long ruột đỏ trong quá trình cô đặc. Kết quả cho thấy, việc bổ sung Ascorbic acid (0,25% w/w) vào nước thanh long ruột đỏ đã được điều chỉnh đến pH 4,0 và được thanh trùng 65°C cho 30 phút với tốc độ khuấy 220 vòng/phút. Điều kiện chế biến này được cho là tối ưu để duy trì tối đa hàm lượng betacyanin trong nước siro thanh long ruột đỏ.

Thông kê đáp ứng bề mặt cũng được ứng dụng rất nhiều trong các nghiên cứu về nông nghiệp. Trương Phước Thiên Hoàng và cộng sự [8] tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Đây là tiền đề tạo chế phẩm ứng dụng vào thực tế sản xuất. Thành phần môi trường lên men được tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM), với ma trận Box-Behnken được sử dụng, trong đó, mật rỉ đường, cao nấm men và MgSO₄ là ba yếu tố có tác động tới sản xuất sinh khối (P < 0,05).

Theo Adebo et al. [9], theo thời gian lên men, hàm lượng polyphenol giảm. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Hou et al. [10], hàm lượng phenolic tổng giảm đáng kể trong quá trình lên men. Vì vậy, nghiên cứu tìm ra những điều kiện phù hợp cho quá trình lên men sparkling thanh long ruột đỏ nhằm hạn chế được sự hao hụt các hợp chất có hoạt tính sinh học (betacyanin, polyphenol) của dịch quả thanh long ruột đỏ trong quá trình lên men.

III. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Nguyên liệu cho nghiên cứu

- Thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) được thu trực tiếp từ tỉnh Trà Vinh. Nguyên liệu được lựa chọn thu mua theo các tiêu chí: không bị hư hỏng, sâu bệnh, vỏ quả phải còn nguyên vẹn, không trầy xước, không bầm dập.

- Nấm men: Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV002 được cung cấp bởi Công ty ICF Việt Nam.

B. Phương pháp thí nghiệm

Quy trình lên men dịch quả thanh long ruột đỏ

Thanh long ruột đỏ sau khi đem về được rửa sạch, lột vỏ, cấp đông trong 24 giờ, sau đó đem đi trích li lấy dịch quả.

Dịch quả thu được từ thanh long ruột đỏ được điều chỉnh nồng độ chất khô hòa tan (^oBrix) theo bố trí thí nghiệm. Sau đó, hỗn hợp được thanh trùng với NaHSO₃ 122 mg/L trong 120 phút [11]. Hỗn hợp được cho vào bình bổ sung mật số nấm men và lên men ở các nhiệt độ (Bảng 2).

Tất cả các mẫu sẽ được theo dõi thời gian lên men cho đến khi đạt được độ cồn 5% vol, sau đó được phân tích hàm lượng polyphenol và betacyanin.

Thiết kế thí nghiệm

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được lựa chọn để ước tính tác động của các nhân tố đối với thời gian lên men, hàm lượng polyphenol và betacyanin khi dịch quả thanh long ruột đỏ đạt độ cồn mục tiêu 5% vol. Ba nhân tố độc lập được chọn là nồng độ chất khô hòa tan (X₁), mật số nấm men (X₂), nhiệt độ lên men (X₃). Thiết kế Box-behnken được sử dụng cho nghiên cứu này gồm 17 nghiệm thức với 5 điểm trung tâm (Bảng 2).

Các ước tính cho thời gian lên men, hàm lượng polyphenol, betacyanin và nghiên cứu tuân theo cùng một phương trình hồi quy bậc hai, được biểu thị như sau:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

Trong đó:

Y_i: Biến tiêu chí (thời gian lên men, hàm lượng polyphenol, betacyanin)

- X_1 : Nồng độ chất khô hòa tan ($^{\circ}$ Brix)
 X_2 : Mật số nấm men ($\log_{10}(\text{CFU/mL})$)
 X_3 : Nhiệt độ lên men ($^{\circ}\text{C}$)

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

Kí hiệu	Nhân tố	Đơn vị	Mức độ		
			-1	0	1
X_1	Nồng độ chất khô hòa tan	$^{\circ}$ Brix	12	17	22
X_2	Mật số nấm men	Log10 (CFU/mL)	5	6	7
X_3	Nhiệt độ lên men	$^{\circ}\text{C}$	20	25	30

Bảng 2: Bố trí nghiệm thức theo thể thức Box-Behnken bằng phần mềm Statgraphics 19

STT	X_1	X_2	X_3	Brix	MSNM	Nhiệt độ
1	0	0	0	17	6	25
2	-1	0	1	12	6	30
3	1	0	1	22	6	30
4	0	0	0	17	6	25
5	1	0	-1	22	6	20
6	0	1	-1	17	7	20
7	0	0	0	17	6	25
8	0	0	0	17	6	25
9	0	-1	1	17	5	30
10	1	1	0	22	7	25
11	0	0	0	17	6	25
12	0	-1	-1	17	5	20
13	-1	-1	0	12	5	25
14	-1	0	-1	12	6	20
15	-1	1	0	12	7	25
16	1	-1	0	22	5	25
17	0	1	1	17	7	30

Phương pháp lên men

Nghiên cứu này được thực hiện với chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV002 thương mại cung cấp từ Công ty TNHH IC Food Việt Nam. Trước khi sử dụng, nấm men được trữ ở 4°C . Nấm men được tăng sinh trong môi trường PDA lỏng (môi trường khoai tây lỏng) trong 24 giờ ở $28 - 30^{\circ}\text{C}$. Trước khi bổ sung vào dịch lên men, nấm men được hoạt hóa trong 02 giờ ở nhiệt độ phòng.

Khi lên men, sử dụng bình có thể tích 02 lít, trong đó chứa 1,5 lít dịch lên men. Điều chỉnh pH môi trường về 4,5 và nồng độ chất khô hòa tan theo bố trí thí nghiệm. Môi trường được thanh trùng bằng NaHSO_3 122 mg/L [11] trong 02 giờ. Lên men ở điều kiện tĩnh.

Phương pháp phân tích

- Xác định hàm lượng polyphenol tổng bằng phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu [12, 13]. Nguyên tắc của phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu: Trong quá trình phản ứng, những nhóm hydroxyl của phenol phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu tạo ra phức phosphotungstic-phosphomolybdic màu xanh và có thể phát hiện nhờ quang phổ hấp thụ ở bước sóng 765 nm.

Cách tiến hành: Cho 1 mL dịch chiết phản ứng với 2,5 mL FC 10%, để yên 05 phút và thêm 02 mL Na_2CO_3 2%. Hỗn hợp để yên trong bóng tối 45 phút và đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm. Dựa vào đường chuẩn để xác định hàm lượng polyphenol trong mẫu thí nghiệm. Hàm lượng phenolic tổng số được tính theo công thức:

$$P = \frac{C \times V}{m} \times k$$

Trong đó:

P: Hàm lượng phenolic tổng số (mg GAE/L)

C: Hàm lượng của acid galic (mg/L) (được suy ra từ phương trình đường chuẩn)

m: Khối lượng mẫu thử đem đi định lượng (g)

V: Thể tích dung dịch mẫu (mL)

K: Hệ số pha loãng

- Xác định hàm lượng betacyanin theo phương pháp vật lý dựa trên độ hấp thụ ánh sáng [7]. Nguyên tắc của phương pháp dựa trên định luật Lambert-Beer với độ hấp thụ ở 538 nm. Độ hấp thụ quang của một dung dịch đối với một chùm sáng đơn sắc tỉ lệ thuận với độ dày truyền quang và nồng độ chất tan trong dung dịch.

Cách tiến hành: Mẫu được pha loãng trong dung dịch đệm 0,1 M acid citric (30 mL) và 0,2 M natri phosphate (70 mL) (pH 6,5). Tất cả mẫu thí nghiệm được đo độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 538 nm. Hàm lượng betacyanin tổng số được tính theo công thức:

$$BC = \frac{Abs * DF * MW * 1000}{\epsilon} (mg/L)$$

Trong đó:

BC: hàm lượng betacyanin tổng số (mg/L)

Abs: giá trị hấp thụ tại bước sóng 538 nm

DF: hệ số pha loãng

MW: khối lượng phân tử của betacyanin (550 g/mol)

ϵ : độ hấp thụ phân tử của betacyanin trong nước (60.000 L/mol.cm)

Tỉ lệ betacyanin còn lại sau khi lên men và sau thời gian bảo quản được tính toán theo công thức [14]:

$$\text{Tỉ lệ betacyanin còn lại (\%)} = \frac{BC_1}{BC_0} \times 100$$

- Xác định độ cồn theo phương pháp chưng cất, dựa trên nguyên lí bay hơi và ngưng tụ.

Cách tiến hành: Mẫu rượu được chưng cất bằng hệ thống chưng cất rượu [15]. Rượu sau khi chưng cất dùng nhiệt kế đo đạt 20°C thì dùng cồn kế đo độ rượu. Giá trị đọc được trên cồn kế là độ rượu của mẫu.

Xử lí số liệu

Kết quả được xử lí theo phương pháp phân tích phương sai bằng phần mềm Statgraphics Centurion XIX.

IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

A. Mô hình tương quan giữa ba nhân tố đối với thời gian lên men, hàm lượng polyphenol và betacyanin của dịch thanh long ruột đỏ

Nhằm xác định tác động tổng hợp của các biến độc lập (Brix, mật số nấm men, nhiệt độ lên men) về thời gian lên men, hàm lượng betacyanin và polyphenol của dịch quả thanh long ruột đỏ, kết quả từ thiết kế mô hình Box-Behnken cho 17 nghiệm thức. Kết quả thực nghiệm được trình bày cụ thể ở Bảng 3 (kết quả trung bình của ba lần lặp lại thí nghiệm).

Kết quả Bảng 3 cho thấy, thời gian thấp nhất để đạt được độ cồn mục tiêu 5% vol là 02 ngày và cao nhất là 06 ngày. Hàm lượng polyphenol trong dịch lên men dao động từ 153 đến 198 mgGAE/L và hàm lượng betacyanin dao động từ 341 đến 368 mg/L.

Các nghiệm thức được thực hiện theo phương trình bậc hai, bao gồm tác động tuyến tính của từng biến độc lập và biến tương tác. Bảng 4 trình bày các giá trị tham số của mô hình thu được từ phân tích hồi quy tuyến tính.

Kết quả cho thấy, ở cả ba mô hình (thời gian lên men, hàm lượng polyphenol và betacyanin), giá trị p của các biến độc lập (X_1 , X_2 , X_3) đều nhỏ hơn mức ý nghĩa 95%. Điều này có nghĩa các biến độc lập có sự tác động mạnh đến các

biến tiêu chí. Bảng kết quả còn cho thấy giá trị Lack of fit của cả ba mô hình đều lớn hơn 0,05. Kết quả lần lượt là 0,75, 18,845 và 10,960. Nếu giá trị của Lack of fit càng lớn thì mức độ phù hợp của mô hình càng cao. Từ đó, nghiên cứu có thể khẳng định rằng mô hình phù hợp với dữ liệu thu được.

Độ phù hợp của mô hình còn được biểu thị bằng hệ số R_2 . Nếu hệ số R_2 càng cao thì mô hình càng phù hợp. Trong nghiên cứu, các giá trị R_2 được dùng để dự đoán thời gian lên men, hàm lượng polyphenol và betacyanin. Khi đã xác định mô hình có độ tin cậy cao, các dự đoán về thời gian lên men, hàm lượng polyphenol và betacyanin trong dịch quả thanh long ruột đỏ có thể thu được thông qua các phương trình hồi quy.

B. Tối ưu hóa thời gian lên men

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy các biến độc lập có sự tác động mạnh mẽ đến biến tiêu chí (thời gian lên men). Tuy nhiên, giá trị p của các biến bậc hai (X_{12} , X_{22} , X_{32}) và các biến tương tác (X_{12} , X_{13} , X_{23}) có giá trị lớn hơn 0,05. Kết quả này cho thấy sự tác động không có ảnh hưởng đối với biến tiêu chí. Ngoài ra, mô hình còn có hệ số R_2 là 0,91 và giá trị Lack of fit > 0,05. Kết quả này cho thấy cách bố trí phù hợp với mô hình và có độ tin cậy cao. Phương trình hồi quy biểu diễn mối quan hệ giữa thời gian lên men và ba biến phụ thuộc (nồng độ chất khô, mật số nấm men, nhiệt độ) cho mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng Box-behnken được trình bày dưới đây:

$$Y_1 = 24,2483 - 0,523333 * X_1 - 0,691667 * X_2 - 0,721667 * X_3 + 0,00166667 * X_{12} + 0,0333333 * X_1 * X_2 + 0,00666667 * X_1 * X_3 - 0,0416667 * X_{22} + 0,0166667 * X_2 * X_3 + 0,005 * X_{32}$$

Ảnh hưởng của độ Brix, mật số nấm men, nhiệt độ lên men đối với thời gian lên men có thể quan sát trong Hình 1(a), 1(b), 1(c). Trong cùng điều kiện độ Brix và nhiệt độ lên men, hàm lượng rượu tạo thành phụ thuộc chủ yếu vào mật số nấm men sử dụng. Kết quả cho thấy khi mật số nấm men càng cao, thời gian lên men để đạt được độ cồn càng ngắn. Mật số nấm men là tác nhân quan trọng của quá trình lên men, mật số thấp thì nguồn carbon được sử dụng nhiều để tăng sinh khối. Vì vậy, lượng rượu tạo thành thấp, thời gian

Bảng 3: Ảnh hưởng của độ Brix, MSNM và nhiệt độ lên men đến thời gian lên men, hàm lượng betacyanin, hàm lượng polyphenol của dịch thanh long ruột đỏ

Thứ tự	Brix	MSNM (Log10 (CFU/ml))	Nhiệt độ (°C)	Thời gian lên men (ngày)	Polyphenol (mgGAE/L)	Betacyanin (mg/L)
Đối chứng					140,00	370,00
1	17	6	25	4,00 ^c	196,13 ^a ± 0,61	366,04 ^{ab} ± 0,15
2	12	6	30	3,00 ^{de}	164,16 ^{ef} ± 0,84	357,62 ^g ± 0,06
3	22	6	30	2,67 ^e ± 0,58	191,08 ^b ± 0,80	363,49 ^{cd} ± 2,09
4	17	6	25	4,00 ^c	198,66 ^a ± 0,58	367,31 ^a ± 0,26
5	22	6	20	5,00 ^b	184,00 ^c ± 4,51	357,64 ^g ± 0,36
6	17	7	20	5,00 ^b	153,59 ^g ± 1,62	366,40 ^{hk} ± 0,22
7	17	6	25	4,00 ^c	196,65 ^a ± 2,11	366,20 ^{ab} ± 0,47
8	17	6	25	4,00 ^c	197,63 ^a ± 1,71	367,04 ^a ± 0,33
9	17	5	30	3,00 ^{de}	166,71 ^e ± 0,36	360,80 ^{ef} ± 3,81
10	22	7	25	3,33 ^d ± 0,58	185,70 ^c ± 0,29	365,05 ^{bc} ± 0,14
11	17	6	25	4,00 ^c	196,26 ^a ± 0,09	367,00 ^a ± 0,48
12	17	5	20	5,67 ^a ± 0,58	179,61 ^d ± 1,36	359,13 ^{fg} ± 0,23
13	12	5	25	5,00 ^b	162,78 ^f ± 3,87	362,58 ^{de} ± 0,10
14	12	6	20	6,00 ^a	152,81 ^g ± 1,47	341,50 ^k ± 0,49
15	12	7	25	4,33 ^c ± 0,58	154,46 ^g ± 0,94	343,68 ^h ± 0,06
16	22	5	25	3,33 ^d ± 0,58	186,14 ^c ± 0,18	366,40 ^{ab} ± 0,21
17	17	7	30	2,67 ^e ± 0,58	180,12 ^d ± 2,82	360,71 ^{ef} ± 1,48

Bảng 4: Phân tích anova của các mô hình đa thức bậc hai

Nguồn	Độ tự do	Thời gian lên men (ngày)			Polyphenol (mgGAE/L)			Betacyanin (mg/L)		
		Hệ số tương quan	Tổng bình phương	Giá trị P	Hệ số tương quan	Tổng bình phương	Giá trị P	Hệ số tương quan	Tổng bình phương	Giá trị P
X ₁	1	-0,523	6,000	0,000	16,337	4762,530	0,000	3,962	835,794	0,000
X ₂	1	-0,692	1,042	0,032	108,136	171,254	0,000	-0,832	506,829	0,000
X ₃	1	-0,722	40,042	0,000	16,008	385,073	0,000	13,135	650,833	0,000
X ₁ X ₁	1	0,002	0,022	0,651	-0,436	1500,000	0,000	-0,161	205,055	0,000
X ₁ X ₂	1	0,033	0,333	0,083	0,394	46,571	0,001	0,877	230,826	0,000
X ₁ X ₃	1	0,007	0,333	0,083	-0,043	13,577	0,058	-0,103	78,951	0,000
X ₂ X ₂	1	-0,042	0,022	0,651	-13,899	2440,340	0,000	-3,230	134,168	0,000
X ₂ X ₃	1	0,017	0,083	0,379	1,972	1166,040	0,000	0,817	200,410	0,000
X ₃ X ₃	1	0,005	0,197	0,179	-0,526	2186,420	0,000	-0,305	734,713	0,000
Không phù hợp	3		0,75	0,085		18,845	0,168		10,960	0,049
Sai số thuần	38		4,000			134,469			48,270	
Tổng (corr.)	50		52,824			13535,600			3740,130	
R ²		0,91			0,989			0,984		

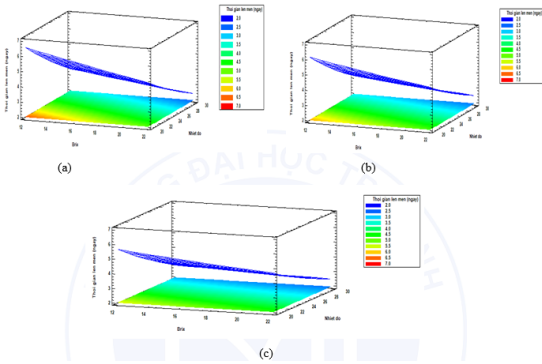
để đạt được độ cồn mục tiêu dài. Tuy nhiên, khi lượng men giống nhiều sẽ xảy ra sự cạnh tranh nguồn dinh dưỡng, ảnh hưởng đến quá trình lên men [16].

Trong cùng điều kiện độ Brix và mật số nấm men, thời gian lên men phụ thuộc chủ yếu vào nhiệt độ lên men. Hình 1(a) và 1(c) cho thấy nếu nhiệt độ càng cao thì thời gian lên men càng ngắn. Thời gian lên men ở nhiệt độ thấp thường dài do nhiệt độ thấp ảnh hưởng đến khả năng

lên men của nấm men. Tuy nhiên, việc lên men ở nhiệt độ quá cao sẽ làm tổn thất sản phẩm và ảnh hưởng đến mùi vị sản phẩm. Điều này phù hợp với công bố của Lương Đức Phẩm [16].

Khi lên men ở cùng điều kiện mật số nấm men và nhiệt độ, hàm lượng rượu tăng đáng kể. Thời gian để đạt được độ cồn mục tiêu càng ngắn khi dịch lên men có nồng độ chất khô tăng dần. Carbohydrate cung cấp nhu cầu dinh dưỡng cho nấm men sinh trưởng và trao đổi chất. Đường

là cơ chất cần thiết cho quá trình lên men. Nấm men có khả năng lên men đường thành rượu. Do đó, độ rượu cao hay thấp sẽ phụ thuộc vào hàm lượng đường được sử dụng trong dịch lên men.



Hình 1: Biểu đồ bề mặt đáp ứng biểu thị tác động của nồng độ chất khô hòa tan và nhiệt độ đến thời gian lên men (ngày) của sản phẩm ở mật số nấm men ban đầu: (a) 5 log₁₀ (CFU/mL); (b) 6 log₁₀ (CFU/mL); (c) 7 log₁₀ (CFU/mL)

C. Tối ưu hóa betacyanin

Kết quả phân tích ở Bảng 4 cho thấy, ngoài sự tác động của các biến độc lập (X_1, X_2, X_3), các biến bậc hai (X_{12}, X_{22}, X_{32}) và các biến tương tác (X_{12}, X_{13}, X_{23}) cũng thể hiện sự tác động mạnh mẽ đối với biến tiêu chí (hàm lượng betacyanin). Ngoài ra, theo Bảng 4, mô hình có độ tin cậy cao khi hệ số R_2 là 0,984. Phương trình hồi quy biểu diễn mối quan hệ giữa hàm lượng betacyanin và ba biến phụ thuộc (nồng độ chất khô, mật số nấm men, nhiệt độ) được trình bày cụ thể như sau:

$$Y_2 = 162,086 + 3,9618 * X_1 - 0,831583 * X_2 + 13,1349 * X_3 - 0,161163 * X_{12} + 0,877167 * X_1 * X_2 - 0,1026 * X_1 * X_3 - 3,25908 * X_{22} + 0,817333 * X_2 * X_3 - 0,305063 * X_{32}$$

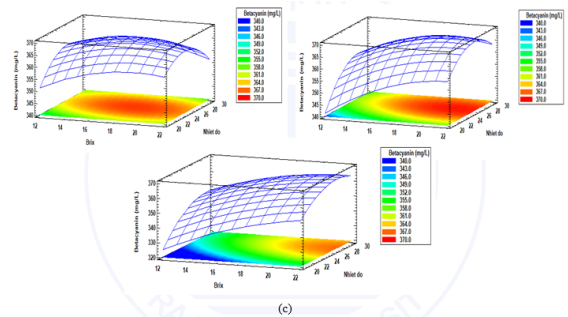
Quá trình oxy hóa là nguyên nhân làm mất màu betacyanin trong quả thanh long [17]. Hàm lượng betacyanin bị ảnh hưởng bởi nồng độ chất khô, mật số nấm men và nhiệt độ trong quá trình lên men. Điều này được thể hiện ở Hình 2(a), 2(b), 2(c).

Trong cùng điều kiện nồng độ chất khô và mật số nấm men, hàm lượng betacyanin thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ lên men. Hình 2(a), 2(b), 2(c)

cho thấy nếu nhiệt độ càng cao thì hàm lượng betacyanin trong quá trình lên men càng hao hụt. Hàm lượng betacyanin ổn định ở nhiệt độ thấp hơn. Điều này phù hợp với công bố của Priatni S et al. [18]. Ngoài ra, nghiên cứu của Nguyễn Thị Hương Giang cũng cho thấy việc lên men ở 25°C là tốt nhất để giữ betalain tổng số (betaxanthin và betacyanin). Quá trình lên men ở nhiệt độ cao (30°C) cho thấy rượu bị xuống màu nghiêm trọng [19].

Ở cùng điều kiện mật số nấm men và nhiệt độ lên men, hàm lượng betacyanin có sự thay đổi đáng kể khi gia tăng nồng độ chất khô. Kết quả các nghiệm thức có nồng độ chất khô cao cho thấy hàm lượng betacyanin hao hụt ít hơn so với nghiệm thức có nồng độ chất khô thấp (Bảng 3).

So sánh các mẫu có cùng nồng độ chất khô và nhiệt độ lên men cho thấy hàm lượng betacyanin hao hụt tỉ lệ thuận với mật số nấm men. Nếu mật số nấm men càng cao thì hàm lượng betacyanin càng giảm. Hàm lượng betacyanin giảm do bị ảnh hưởng trong quá trình lên men.



Hình 2: Biểu đồ bề mặt đáp ứng biểu thị tác động của nồng độ chất khô hòa tan và nhiệt độ đến hàm lượng betacyanin (mg/L) của sản phẩm ở mật số nấm men ban đầu: (a) 5 log₁₀ (CFU/mL); (b) 6 log₁₀ (CFU/mL); (c) 7 log₁₀ (CFU/mL)

D. Tối ưu hóa polyphenol

Trong số các chất chống oxy hóa tự nhiên trong rau quả, polyphenol là nhóm chất rất được quan tâm bởi vì polyphenol thể hiện những đặc tính sinh học quý giá, đặc biệt là khả năng kháng oxy hóa, kháng u, chống viêm, chống dị ứng và khả năng kháng khuẩn [20, 21]. Việc tối ưu hàm

lượng polyphenol trong sản phẩm là cần thiết để hướng đến sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao.

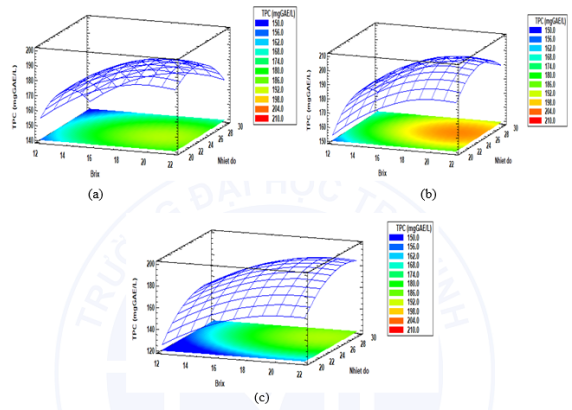
Từ kết quả phân tích anova (Bảng 4), hàm lượng polyphenol bị ảnh hưởng bởi cả ba biến phụ thuộc. Tuy nhiên, biến tương tác giữa nồng độ chất khô và nhiệt độ lên men không có sự tác động đối với hàm lượng polyphenol ($p > 0,05$). Mô hình có giá trị $R_2 = 0,989$ và giá trị Lack of fit $> 0,05$ cho thấy cách bố trí phù hợp với mô hình và có độ tin cậy cao. Phương trình hồi quy biểu diễn mối quan hệ giữa hàm lượng polyphenol và ba biến phụ thuộc (nồng độ chất khô, mật số nấm men, nhiệt độ) được trình bày theo phương trình đa thức bậc hai và hệ số hồi quy của hàm lượng polyphenol như sau:

$$Y_3 = -492,26 + 16,3373 * X_1 + 108,136 * X_2 + 16,0082 * X_3 - 0,43589 * X_{12} + 0,394 * X_1 * X_2 - 0,0425467 * X_1 * X_3 - 13,8994 * X_{22} + 1,9715 * X_2 * X_3 - 0,526257 * X_{32}$$

Bảng 3 cho thấy, hàm lượng polyphenol dao động 152 – 191 mgGAE/L. Hàm lượng polyphenol thay đổi sau quá trình lên men do sự ảnh hưởng bởi nồng độ chất khô, mật số nấm men và nhiệt độ lên men. Trong cùng điều kiện lên men (nồng độ chất khô, nhiệt độ), sự thay đổi hàm lượng polyphenol xảy ra do sự tác động mạnh mẽ của mật số nấm men ($p < 0,05$). Hình 3(a), 3(b), 3(c) cho thấy, mật số nấm men càng tăng, sự gia tăng hàm lượng polyphenol càng nhiều do thời gian lên men ngắn. Tuy nhiên, nếu mật số nấm men quá cao (107) thì sự hao hụt của hàm lượng polyphenol tăng. Tương tự nghiên cứu của Adebo et al. [9], kết quả cho thấy, hàm lượng phenolic tổng số giảm theo thời gian lên men. Tuy nhiên, thời gian lên men tăng sẽ làm giảm hàm lượng phenolic tổng số [10]. Việc so sánh với các nghiên cứu trên cho thấy kết quả của nghiên cứu đang thực hiện là phù hợp.

Hình 3(a), 3(b), 3(c) còn cho thấy, nếu các nghiệm thức có cùng điều kiện (nồng độ chất khô, mật số nấm men) lên men thì sự thay đổi của hàm lượng polyphenol sẽ bị nhiệt độ tác động chủ yếu, nhiệt độ cao thời gian lên men ngắn, hàm lượng polyphenol cao hơn so với nhiệt độ thấp. Tuy nhiên, nhiệt độ quá cao sẽ làm ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol trong dịch lên men thanh long ruột đỏ. Sự gia tăng hàm lượng phenolic tổng số trong quá trình lên men là do các hoạt động của vi sinh vật có thể giải phóng

liên kết phenolic thành dạng tự do [22, 23].



Hình 3: Biểu đồ bề mặt đáp ứng biểu thị tác động của nồng độ chất khô hòa tan và nhiệt độ đến thời gian lên men (ngày) của sản phẩm ở mật số nấm men ban đầu: (a) 5 log₁₀ (CFU/mL); (b) 6 log₁₀ (CFU/mL); (c) 7 log₁₀ (CFU/mL)

E. Kiểm định mô hình tối ưu hoá

Kết quả tối ưu hóa cho thấy, tại điều kiện nồng độ chất khô 19°C Brix, mật số nấm men 5,6 log₁₀ (CFU/mL), nhiệt độ lên men 23°C cho dịch quả sau lên men có hàm lượng polyphenol 196,68 mgGAE/L, betacyanin 366,65 mg/L và thời gian để đạt được độ cồn mục tiêu là 4,4 ngày. Kiểm chứng mô hình thí nghiệm kết quả cho thấy khác biệt không có ý nghĩa giữa giá trị mô hình và giá trị thực nghiệm, kết quả được trình bày cụ thể ở Bảng 5.

V. KẾT LUẬN

Trong quá trình lên men thanh long ruột đỏ, thời gian lên men, hàm lượng polyphenol và betacyanin bị ảnh hưởng bởi nồng độ chất khô, mật số nấm men và nhiệt độ lên men. Kết quả thực nghiệm cho thấy, nếu điều kiện lên men có nồng độ chất khô 17°C Brix, mật số nấm men 6 log₁₀ (CFU/mL), nhiệt độ lên men 25°C thì sau 04 ngày đạt độ cồn mục tiêu, dịch quả có hàm lượng polyphenol 195,95 mgGAE/L, betacyanin 365,99 mg/L.

Trong khi đó, phương pháp thiết kế bề mặt đáp ứng với ma trận Box-behnken đã xác định được

Bảng 5: Giá trị tối ưu đạt được từ mô hình so với thực nghiệm

	Brix	MSNM Log10 (CFU/mL)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian lên men (ngày)	Polyphenol (mgGAE/L)	Betacyanin (mg/L)
Giá trị mô hình	19	5,6	23	4,4	196,68	366,65
Giá trị thực nghiệm	17	6	25	4	195,95	365,99

các điều kiện tối ưu (nồng độ chất khô 19°C Brix, mật số nấm men 5,6 log10 (CFU/mL)), nhiệt độ lên men 23°C cho quá trình lên men. Tại các điều kiện tối ưu, dịch quả thanh long ruột đỏ sau khi đạt độ cồn mục tiêu 5% vol sẽ có hàm lượng polyphenol 196,68 mgGAE/L, betacyanin 366,65 mg/L và thời gian để đạt được độ cồn mục tiêu là 4,4 ngày.

LỜI CẢM ƠN

Cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Trà Vinh đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008; 76(5): 965–977. doi: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- Nguyễn Văn Kế. *Cây ăn quả nhiệt đới*. Thành phố Hồ Chí Minh: Nhà Xuất bản Nông nghiệp; 2001. [Nguyen Van Ke. *Tropical fruit trees*. Ho Chi Minh City: Agricultural Publishing House; 2001].
- Wybraniec S, Platzner I, Geresh S, Gottlieb HE, Haimberg M, Mogilnitski M, Mizrahi Y. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. *Phytochemistry*. 2001;58(8): 1209–1212. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00336-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00336-3).
- Choo KY, Kho C, Ong YY, Thoo YY, Lim RLH, Tan CP, Ho CW. Studies on the storage stability of fermented red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) drink. *Food Science Biotechnology*. 2018;27(5): 1411–1417. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0367-4>.
- Phan Thị Thanh Quế, Nguyễn Thị Thu Thủy, Tống Thị Ánh Ngọc, Lê Duy Nghĩa. Ảnh hưởng của điều kiện chế biến và bảo quản đến sự ổn định màu betacyanin trong nước ép thịt quả thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 2017;51: 16–23. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.074>. [Phan Thị Thanh Quế, Nguyễn Thị Thu Thủy, Tống Thị Ánh Ngọc, Lê Duy Nghĩa. Effect of processing and storage condition on the stability of betacyanin in juice of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Can Tho University Journal of Science*. 2017;51: 16–23. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.074>].
- Vũ Thu Trang, Nguyễn Thị Thảo Nguyên, Nguyễn Văn Hưng, Nguyễn Tiến Cường, Hoàng Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Thảo và cộng sự. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố công nghệ tới sự ổn định của betacyanin trong nước quả thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) Lạp Thạch, Vĩnh Phúc. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. 2020;140: 71–76. [Vu Thu Trang, Nguyen Thi Thao Nguyen, Nguyen Van Hung, Nguyen Tien Cuong, Hoang Quoc Tuan, Nguyen Thi Thao et al. Stability of betacyanin in red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice obtained from Lap Thach, Vinh Phuc province. *Journal of Science and Technology - Technical Universities*. 2020;140: 71–76].
- Wong YM, Siow LF. Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52(5): 3086–3092. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1362-2>.
- Trương Phước Thiên Hoàng, Lê Phước Thọ, Vũ Phú Quang, Nguyễn Phú Hòa, Nguyễn Văn Thống, Phạm Công Hoạt. Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 2021;19(11): 1509–1521. [Truong Phuoc Thien Hoang, Le Phuoc Tho, Vu Phu Quang, Nguyen Phu Hoa, Nguyen Van Thong, Pham Cong Hoat. Optimization of the medium composition for biomass production of *Pseudomonas stutzeri* by response surface methodology (RSM). *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*. 2021;19(11): 1509–1521].
- Adebo OA, Njobeh PB, Adebisi JA, Kayitesi E. Co-influence of fermentation time and temperature on physicochemical properties, bioactive components and microstructure of ting (a Southern African food) from whole grain sorghum. *Food Bioscience*. 2018;25: 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.007>.
- Hou X, Chen S, Pu Y, Wang T, Xu H, Li H, et al. Effect of winemaking on phenolic compounds and antioxidant activities of msalais wine. *Molecules*. 2023;28(3): 1250. <https://doi.org/10.3390/molecules28031250>.
- Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành, Bùi Thị Thúy Ngân. Tuyển chọn các dòng nấm men được phân lập từ nước cốt nôt. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 2011;18b: 1–5. [Nguyen Minh Thuy, Nguyen Van Thanh, Bui Thi Thuy Ngan. Selection of high activity yeast strains isolated from palm juice harvested at Tinh Bien, An Giang. *Can Tho University*

- Journal of Science*. 2011;18b: 1–5].
- [12] Gougoulis N. Comparative study on the polyphenol content and antioxidant activity of some medicinal plants. *Oxidation Communication*. 2012;35(4): 1001–1010.
- [13] Teixeira EI, Fischer G, Van VH, Walter C, Ewert F. Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*. 2013;170: 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2011.09.002>.
- [14] Schweiggert RM, Villalobos-Gutierrez MG, Esquivel P, Carle R. Development and optimization of low temperature enzyme-assisted liquefaction for the production of colouring foodstuff from purple pitaya (*Hylocereus sp.* [Weber] Britton & Rose). *European Food Research and Technology*. 2009;230: 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1167-0>.
- [15] Nguyễn Đình Thường, Nguyễn Thanh Hằng. *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic*. Hà Nội: Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2012. [Nguyen Dinh Thuong, Nguyen Thanh Hang. *Production technology and testing of ethyl alcohol*. Hanoi: Science and Technics Publishing House; 2012].
- [16] Lương Đức Phẩm. *Nấm men công nghiệp*. Hà Nội: Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2009. [Luong Duc Pham. *Industrial production of yeast*. Hanoi: Science and Technics Publishing House; 2009].
- [17] Woo KK, Ngou FH, Ngo LS, Soong WK, Tang PY. Stability of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *American Journal of Food Technology*. 2011;6(2): 140–148. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.140.148>.
- [18] Priatni S, Pradita A. Stability study of betacyanin extract from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peels. *Procedia Chemistry*. 2015;16: 438–444. doi: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.076>.
- [19] Nguyễn Thị Hương Giang. Effect of fermentation on quality of red beetroot (*beta vulgaris l.*) based spirit. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB)*. 2022;8(4): 37–44.
- [20] Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathe G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2002;56(4): 200–207. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00178-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00178-6).
- [21] Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005;45(4): 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>.
- [22] Rai AK, Sanjukta S, Chourasia R, Bhat I, Bhardwaj PK, Sahoo D. Production of bioactive hydrolysate using protease, B-glucosidase and A-amylase of *Bacillus* spp. isolated from kinema. *Bioresource Technology*. 2017;235: 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.139>.
- [23] Riciputi Y, Serrazanetti DI, Verardo V, Vannini L, Caboni MF, Lanciotti R. Effect of fermentation on the content of bioactive compounds in tofu-type products. *Journal of Functional Foods*. 2016;27: 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.041>.

