

NGHIÊN CỨU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN CÁM GẠO LÀM GIÀU POLYPHENOL BẰNG NẤM MEN

Đặng Thu Hương, Trần Thị Ngoan, Nguyễn La Anh*

Viện Công nghiệp thực phẩm, 301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

*Email: anhnl@firi.vn

Đến Tòa soạn: 15/8/2012; Chấp nhận đăng: 6/11/2013

TÓM TẮT

Việc sử dụng vi sinh vật trong lên men dịch cám gạo có thể làm tăng khả năng thu nhận polyphenol, tập hợp các chất có hoạt chất chống oxy hóa. Các sản phẩm lên men từ cám gạo có tính chất chống u biểu, có khả năng ngăn ngừa huyết khối trong não, nhồi máu não, tắc mạch phổi do huyết khối và tăng cường sức đề kháng. Các vi sinh vật được sử dụng cho lên men thường được chọn lựa thuộc các nhóm nấm mốc, nấm men, vi khuẩn lactic - là những vi sinh vật an toàn, được sử dụng trong lên men các sản phẩm truyền thống từ lâu đời. 6 chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong Bộ Sơ tập giống của Viện Công nghiệp thực phẩm đã được lựa chọn để lên men cám gạo và chúng đều làm tăng khả năng thu nhận polyphenol trong môi trường cám gạo. Trong đó, sử dụng chủng CNTP7072 để lên men đã trích li được hàm lượng polyphenol trong môi trường lớn nhất là 544 mg/l, tăng hơn 150 % so với môi trường chưa lên men. Với các điều kiện lên men thích hợp (tỉ lệ tiếp giống 6×10^7 tế bào/ml, pH 6,5, nhiệt độ lên men 30 °C, chế độ nuôi cấy tĩnh, thời gian 24 giờ), hàm lượng polyphenol trong môi trường cám gạo lên men bằng chủng CNTP7072 là 587 mg/l, tăng hơn 163 % so với môi trường chưa lên men.

Từ khóa: cám gạo, nấm men, polyphenol.

1. TỔNG QUAN

Ngũ cốc và các thành phần của ngũ cốc có thể được dùng làm cơ chất cho quá trình lên men cho vi sinh vật probiotic, nhằm tạo ra các sản phẩm có tính chất prebiotic. Theo truyền thống, cơ chất được sử dụng cho vi sinh vật probiotic thường là sản phẩm từ sữa. Tuy nhiên gần đây, tại Nhật và Châu Âu có phổ biến loại thực phẩm chức năng là probiotic trên cơ chất ngũ cốc nguyên hạt hoặc thành phần của nó. Tại Hoa Kỳ, các sản phẩm pre- hoặc probiotic thường được sử dụng ở dạng dinh dưỡng bổ sung. Các công bố về nghiên cứu công nghệ và sản phẩm trong lĩnh vực này đều rất mới mẻ, xuất hiện sau năm 2000.

Cám gạo bao gồm mầm phôi của hạt và lớp vỏ nội nhũ và một phần từ tấm, chiếm đến 10 - 12 % khối lượng và 60 % giá trị dinh dưỡng của gạo nguyên hạt. Cám gạo bị loại bỏ trong quá trình xay xát để sản xuất gạo trắng. Hạt gạo đã qua xay xát và đánh bóng bị mất đến 67 % vitamin B3, 80 % vitamin B1, 90 % vitamin B6, 50 % mangan, 50 % photpho, 60 % sắt. Thành

phần hoá học của cám gạo bao gồm: nước, chất đạm, chất béo, chất bột đường, chất xơ, chất khoáng và các vitamin khác. Trong cám gạo chứa 16 % - 22 % dầu. Dầu cám thô bao gồm 88-89 % chất béo trung tính, 3 – 4 % sáp, 2 % - 4 % axit béo tự do và khoảng 4 % các chất không xà phòng hóa. Các chất không xà phòng hóa chủ yếu gồm phytosterol (1,8 - 3,0 %), γ -oryzanol (0,9 - 2,9 %) và vitamin E (0,10 - 0,14 %). Ngoài ra còn có các hoạt chất khác có giá trị trong cám gạo như phenolic, axit phytic, vitamin E, B, gamma- aminobutyric (GABA)...[1, 2]

Các sinh vật probiotic được sử dụng trong lên men ngũ cốc nguyên hạt hay các thành phần của nó vì bản thân chúng có lợi cho tiêu hóa. Ngoài ra probiotic sinh ra hệ enzym bao gồm enzym phytaza, có tác dụng giải phóng phosphate từ phytate, thủy phân phức chất được định hình bởi phytate, ion kim loại hoặc cation; làm cho các hoạt chất dễ hòa tan hơn và do đó tăng khả năng được hấp thụ qua ruột. Tương tự phương pháp sử dụng enzym, phương pháp lên men cho phép trích li tập hợp các hoạt chất chống oxy hóa, muối khoáng, vitamin, chất xơ hòa tan từ cám. Thời gian lên men thường kéo dài từ một đến vài ngày tại nhiệt độ thấp (28 – 30 °C), do đó quá trình thủy phân, trích li diễn ra với hiệu quả cao. Các hoạt chất được trích li được từ cám lên men có tác dụng tương tác, hỗ trợ nhau, chống lại nhiều loại gốc tự do có mặt trong cơ thể, do vậy có tác dụng bảo vệ cơ thể ở mức cao hơn so với việc chỉ sử dụng từng chất chống oxy hóa đơn lẻ [3].

Người ta phát hiện ra rằng các sản phẩm lên men từ cám phôi gạo, lúa mì và đậu tương có tính chất chống u biểu, có khả năng ngăn ngừa huyết khối trong não, nhồi máu não, tắc mạch phổi do huyết khối và tăng cường sức đề kháng [4]. Các vi sinh vật được sử dụng cho lên men thường được chọn lựa thuộc các nhóm nấm mốc, nấm men, vi khuẩn lactic. Đây là những vi sinh vật an toàn, được sử dụng trong lên men các sản phẩm truyền thống từ lâu đời. Các sản phẩm lên men này được dùng làm nguyên liệu thành phần trong một số loại đồ uống cũng như thực phẩm. Khả năng chống ung thư của các sản phẩm này được thể hiện ở khả năng tăng cường sự miễn dịch chống lại tế bào u, tăng hoạt tính bạch cầu để làm tăng sức đề kháng chống; tan tính thể axit uric trong máu; sửa chữa các tế bào hồng cầu bất bình thường trở về hình dạng bình thường, do vậy có tác dụng hỗ trợ chữa các bệnh liên quan đến sự dị dạng của hồng cầu [5].

Việt Nam là nước sản xuất lúa gạo đứng thứ 4 trên thế giới. Hàng năm, có hàng triệu tấn cám nguyên liệu, nhưng chỉ có khoảng 3,5 % sản lượng cám của cả nước được sử dụng để trích li dầu cám hoặc làm thức ăn chăn nuôi gia súc, thủy sản. Nhằm nâng cao giá trị sử dụng của các hợp chất dinh dưỡng sẵn có trong cám gạo, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng làm giàu polyphenol từ phôi cám gạo bằng phương pháp lên men.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Cám gạo.

Chủng vi sinh vật: Trong Bộ Sưu tập giống của Viện Công nghiệp Thực phẩm.

2.2. Phương pháp

Phương pháp xác định hàm lượng polyphenol [6]: Sử dụng thuốc thử Folin – Denis oxy hóa các hợp chất polyphenol có trong mẫu tạo ra sản phẩm màu xanh lam. Cường độ màu của hỗn hợp tỉ lệ thuận với hàm lượng polyphenol trong dung dịch. Căn cứ vào cường độ màu đo được trên máy so màu ở bước sóng 770 nm và đồ thị chuẩn của axit gallic với thuốc thử này có thể xác định được hàm lượng polyphenol trong mẫu nghiên cứu.

Phương pháp xác định đường tổng [7]: Sử dụng axit sunfuric đặc có tác dụng phân cắt đường có phân tử lớn thành glucoza. Phân tử glucoza tạo phức với phenol 5 % lập thành màu. So màu trên bước sóng 490 nm xác định được đường tổng trong mẫu phân tích

Phương pháp đếm tế bào bằng buồng đếm hồng cầu [8]: Pha loãng mẫu cần đếm và đếm trực tiếp số lượng tế bào trong các ô của buồng đếm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lựa chọn giống nấm men cho lên men cám gạo để trích li polyphenol

Mate Hidvegi và CS. đã thành công trong việc sử dụng công nghệ lên men phôi lúa mì bởi nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* để tách chiết được lượng lớn 2,6-dimethoxy-p-benzoquinone (2,6-DMBQ)- một loại hợp chất quinone có tác dụng điều hòa trao đổi chất bậc một, có tác dụng ức chế tế bào ung thư [9]. Sáu chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong Bộ sưu tập giống của Viện Công nghiệp Thực phẩm được lựa chọn cho công nghệ lên men cám gạo. Đây là những chủng nấm men bánh mì có khả năng phát triển tốt trong điều kiện môi trường có nhiều đường, có nhiều tinh bột và chất xơ.

Sáu chủng nấm men được lên men trong môi trường cám gạo tại nhiệt độ 28 °C. Sau 24 giờ, đánh giá khả năng lên men của chúng qua các chỉ số số lượng tế bào, đường tổng, nồng độ chất khô, hàm lượng polyphenol. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

*Bảng 1. Khả năng lên men cám gạo của các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.*

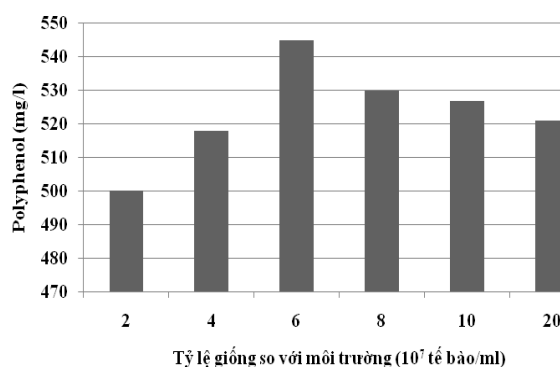
STT	Kí hiệu chủng	Nồng độ chất khô (⁰ Bx)	Tế bào (tế bào/ml)	Đường tổng (%)	Polyphenol (mg/l)	% polyphenol so với trước lên men
	Trước lên men	4	0	1,7	360	100
1	MRLN	2,5	1,21×10 ⁸	0,95	433	120,3
2	CNTP7069	3,0	1,25×10 ⁸	1,12	443	123,1
3	CNTP7072	3,0	1,28×10 ⁸	0,85	544	151,1
4	CNTP7073	3,0	0,79×10 ⁸	0,96	503	139,7
5	CNTP7074	3,0	1,09×10 ⁸	0,93	436	121,1
6	CNTP7075	3,0	1,16×10 ⁸	0,93	449	124,7

Kết quả ở bảng 1 cho thấy chủng CNTP7072 là chủng phát triển tốt nhất trong môi trường cám gạo (1,28×10⁸ tế bào/ml). Sau lên men, nồng độ chất khô và hàm lượng đường tổng của môi trường đều giảm xuống, đồng thời làm tăng hàm lượng polyphenol. Chủng CNTP7072 là chủng sử dụng đường nhiều nhất cũng là chủng có sinh khối lớn nhất và thu nhận được hàm lượng polyphenol cao nhất (tăng hơn 50 % so với ban đầu). Do đó, chủng CNTP7072 được lựa chọn để lên men cám gạo nhằm thu nhận polyphenol.

3.2. Các điều kiện thích hợp cho lên men cám gạo để thu nhận polyphenol bằng chủng nấm men CNTP7072

3.2.1. Lựa chọn tỉ lệ tiếp giống cho lên men cám gạo bằng chủng nấm men CNTP7072

Thí nghiệm xác định tỉ lệ tiếp giống thích hợp cho lên men cám gạo của chủng nấm men CNTP7072 được tiến hành trên môi trường dịch cám gạo có nồng độ chất khô là 4⁰Bx, hàm lượng polyphenol là 360 mg/l, đường tổng là 17 g/l. Lên men được thực hiện tại 28 °C, pH 6. Sau 24 giờ, xác định hàm lượng polyphenol. Kết quả được thể hiện trên hình 1.

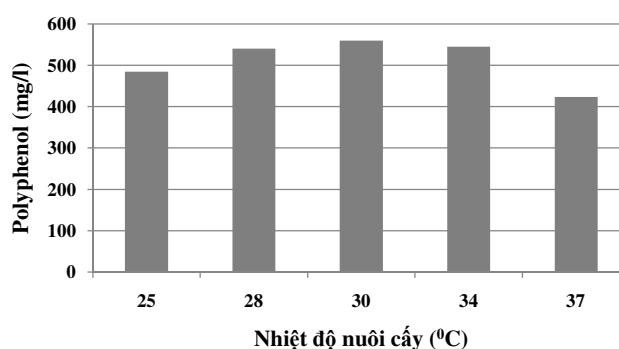


Hình 1. Polyphenol tổng số của dịch cám gạo lên men bằng chủng nấm men CNTP7072 ở các tỉ lệ giống ban đầu khác nhau.

Kết quả ở hình 1 cho thấy ở tỉ lệ giống ban đầu so với môi trường là 6×10^7 tế bào/ml cho lượng polyphenol cao nhất (tăng trên 51 % so với môi trường ban đầu). Khi bổ sung lượng giống ban đầu nhiều hơn tỉ lệ này thì hàm lượng polyphenol thu được lại giảm. Do đó lựa chọn tỉ lệ giống ban đầu so với môi trường là 6×10^7 tế bào/ml.

3.2.2. Lựa chọn nhiệt độ phù hợp cho lên men cám gạo bằng chủng nấm men CNTP7072

Mỗi chủng nấm men đều sinh trưởng và phát triển tốt nhất trong điều kiện nhiệt độ nhất định, thông thường là từ 25 – 28 °C. Do đó thí nghiệm được tiến hành nghiên cứu trong khoảng nhiệt độ từ 25 °C đến 37 °C. Môi trường cám có nồng độ chất khô là 4⁰Bx, hàm lượng polyphenol là 360 mg/l; đường tổng là 17 g/l. Sau 24 giờ, xác định hàm lượng polyphenol của các mẫu. Kết quả nhận được thể hiện ở hình 2.



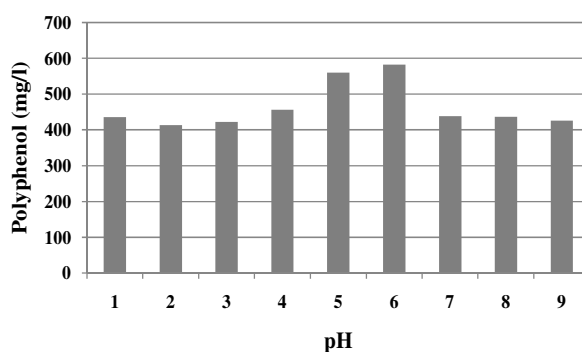
Hình 2. Hàm lượng polyphenol của dịch cám gạo lên men tại các nhiệt độ khác nhau.

Kết quả ở hình 2 thể hiện chủng CNTP7072 có khả năng làm tăng hàm lượng polyphenol tổng số (đều tăng ít nhất là hơn 17 %). Ở nhiệt độ 30 °C, chủng nấm men CNTP7072 phát triển tốt nhất trên môi trường cám gạo đồng thời cũng cho hàm lượng polyphenol cao nhất (tăng hơn 55 %). Nhiệt độ lên men tại 30 °C được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3. Lựa chọn pH phù hợp cho lên men cám gạo bằng chủng nấm men CNTP7072

pH thích hợp cho nấm men nằm trong khoảng 4,5 - 6, do đó thí nghiệm được tiến hành trong khoảng giá trị pH là 4,0 - 8,0. Lên men được thực hiện ở nhiệt độ 30 °C. Môi trường cám có nồng độ chất khô là 4 °Bx, hàm lượng polyphenol là 360 mg/l; đường tổng là 17 g/l. Sau 24 giờ, đánh giá khả năng tách chiết polyphenol của chúng qua chỉ số hàm lượng polyphenol. Kết quả nhận được thể hiện ở hình 3.

Chủng CNTP7072 có thể phát triển được trong các điều kiện pH khác nhau từ môi trường axit đến môi trường có pH cao (pH 8). Tuy nhiên, hàm lượng polyphenol tại pH 4,5 lại thấp (chỉ tăng khoảng 15 % so với môi trường ban đầu không lên men).



Hình 3. Polyphenol tổng số của dịch cám gạo lên men bằng nấm men tại các pH môi trường khác nhau.

Ở pH 6 – 6,5 hàm lượng polyphenol là cao nhất (tăng xấp xỉ 60 % so với ban đầu). Xuất phát từ mục tiêu thu được hàm lượng polyphenol lớn nhất, lựa chọn pH môi trường là 6,5 cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.4. Lựa chọn chế độ nuôi cấy của việc lên men cám gạo bằng nấm men

Thí nghiệm lựa chọn chế độ nuôi cấy của việc lên men cám gạo bằng nấm men được thực hiện ở nhiệt độ 30 °C trong điều kiện nuôi cấy lắc 200 vòng/phút và tĩnh. Sau 24 giờ, đánh giá khả năng lên men của chúng qua các chỉ số số lượng tế bào, nồng độ chất khô, pH, hàm lượng polyphenol. Kết quả nhận được thể hiện ở bảng 2. Đối chứng là mẫu môi trường cám gạo không lên men.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy chế độ nuôi lắc hay tĩnh không ảnh hưởng nhiều đến kết quả hàm lượng polyphenol hay lượng sinh khối thu được. Chế độ nuôi cấy lắc cho lượng tế bào nấm men nhiều hơn chế độ nuôi cấy tĩnh không nhiều. Tuy nhiên, chế độ nuôi cấy tĩnh cho hàm lượng polyphenol nhiều hơn (tăng trên 62 %). Việc thiết kế nuôi cấy tĩnh cũng đơn giản và kinh tế hơn, do đó lựa chọn chế độ nuôi cấy tĩnh cho lên men cám gạo bằng nấm men.

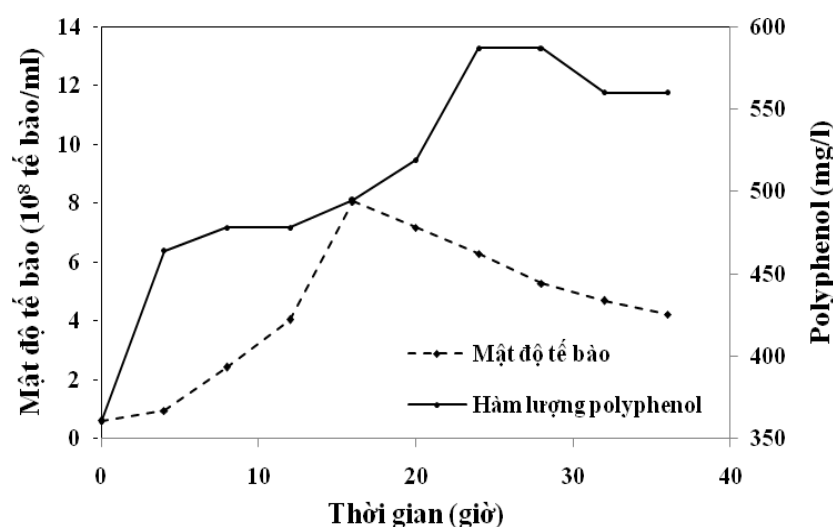
Bảng 2. Chế độ nuôi cấy của chủng nấm men lên men dịch cám gạo.

Chế độ nuôi cấy	pH sau lên men	Nồng độ chất khô ($^{\circ}\text{Bx}$)	Tế bào (tế bào/ml)	Polyphenol tổng số (mg/l)	% polyphenol so với trước lên men
Trước lên men	6,5	4	0	360	100
Lắc	4,8	3,0	$7,39 \times 10^8$	555	154.17
Tĩnh	5,2	3,0	$6,75 \times 10^8$	585	162.50

3.2.5. Lựa chọn thời gian kết thúc lên men phù hợp cho việc lên men cám gạo bằng chủng nấm men CNTP7072

Thí nghiệm được tiến hành lên men trên môi trường với các điều kiện đã lựa chọn trong các phần nghiên cứu ở trên (tỉ lệ tiếp giống 6×10^7 tế bào/ml, pH 6,5, nhiệt độ lên men 30°C , chế độ nuôi cấy tĩnh). Kết quả nhận được thể hiện ở hình 4.

Kết quả ở hình 4 cho thấy chủng CNTP7072 phát triển tốt nhất tại thời điểm 16h ($8,05 \times 10^8$ tế bào/ml). Sau thời điểm này lượng tế bào giảm dần. Hàm lượng polyphenol tăng dần theo thời gian. Tuy nhiên 24 giờ là thời điểm tích lũy polyphenol nhiều nhất (tăng trên 63 %). Sau thời điểm này, lượng polyphenol trong môi trường không tăng nữa hoặc giảm nhẹ. Do đó lựa chọn 24 giờ là thời điểm kết thúc lên men cám gạo.



Hình 4. Hàm lượng polyphenol và mật độ tế bào của dịch cám gạo lên men bằng nấm men ở các thời điểm khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Sáu chủng nấm men bánh mì *Saccharomyces cerevisiae* của Bộ Sư tập giống Viện Công nghiệp Thực phẩm đều có khả năng lên men trong môi trường cám gạo và trích li được hàm lượng polyphenol cao hơn so với dịch cám chưa lên men. Trong đó, chủng CNTP7072 có khả năng trích li được hàm lượng polyphenol trong môi trường lớn nhất là 544 mg/l, tăng hơn 150 %

so với môi trường chưa lên men. Các điều kiện lên men cám gạo thích hợp để trích li polyphenol của chủng CNTP7072 là tỉ lệ tiếp giống 6×10^7 tế bào/ml, pH 6,5, nhiệt độ lên men 30 °C, chế độ nuôi cấy tĩnh trong thời gian 24 giờ. Với các điều kiện lên men thích hợp, chủng CNTP7072 có khả năng trích li được hàm lượng polyphenol trong môi trường cám gạo là 587 mg/l, tăng hơn 163 % so với môi trường chưa lên men.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Azrina A., Maznah I. and Azizah A. H. - Extraction and Determination of Oryzanol in Rice Bran of Mixed Herbarium, *ASEAN Food Journal* **15** (1) (2008) 89-96.
2. Garcias M. J. L., Martinez J. M. H., Alfonso E. F. S., Mendonoza C. R. B. and Ramos G. R. - Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol, *Food Chemistry* **115** (2) (2009) 389-404.
3. Famularo G., De Simone C., Pandey V., Sahu A. R., Minisola G. - Probiotic lactobacilli: an innovative tool to correct the malabsorption syndrome of vegetarians, *Med. Hypotheses* **65** (6) (2005) 1132–1135.
4. Sugiyama T., Matsuo T., Futakuchi K. - Anti-tumor agent, beverages and foods using the same, and a process for manufacturing the anti-tumor agent, USPTO Application No: 20050281898, 2004.
5. Saunders R. M. - The properties of rice bran as a food stuff, *Cereal Foods World* **35** (1990) 632-635.
6. Waterhouse A. L. - Determination of Total Phenolics, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2003.
7. Kimberley A. C. C. Taylor - A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances, *Applied biochemistry and biotechnology* **53** (3) (1995) 207-214.
8. Ronald M. Atlas, Lawrence C. Parks, Alfred E. Brown - Laboratory manual of experimental microbiology, Mosby-Year Book, Inc., USA, 1995.
9. Hidvegi M., Tomoskozine R. F., Lapis K., Raso E., Szende B. - Immunostimulatory and metastasis inhibiting fermented vegetal material, United States Patent 6355474, 2002.

ABSTRACT

EFFECT OF YEAST FERMENTATION CONDITIONS ON POLYPHENOLS ENRICHMENT FROM RICE BRAN

Dang Thu Huong, Tran Thi Ngoan, Nguyen La Anh*

Food Industries Research Institute, 301 Nguyễn Trãi Rd, Thanh Xuân Distr., Hanoi, Vietnam

*Email: anhnl@firi.vn

Fermented rice bran by microorganisms is capable to enrich polyphenols. The fermented products from rice bran have anti-tumor properties. It can prevent cerebral thrombosis, brain infarct and pulmonary thromboembolism, as well as increase immunity. The microorganisms

for fermentation usually are mold, yeast, lactic acid bacteria. They are safe microorganisms used in traditional fermentation products. Six strains of *S. cerevisiae* in Culture Collection of Food Industries Research Institute have been selected for rice bran fermentation and all of them are capable of enhancing the polyphenol enrichment in rice bran. In particular, strains CNTP7072 are the best to extract polyphenols (544 mg/l), more than 150 % compared with unfermented rice bran. The CNTP7072 can extract 587 mg/l polyphenols from rice bran medium, more than 163 % compared with unfermented medium at proper fermentation conditions (rate of seed: 6×10^7 cells/ml, pH 6.5, temperature 30 °C, static culture, fermentation time: 24 hour).

Keywords: rice bran, yeast, polyphenols.