

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN THU NHẬN CHIẾT XUẤT TỪ ĐÀI BỤP GIẤM (*Hibiscus sabdariffa* L.) VÀ ỨNG DỤNG TRONG LÊN MEN KOMBUCHA

Lưu Minh Châu, Danh Trường Thọ, Lê Quốc Việt,

Nguyễn Ngọc Thạnh, Huỳnh Xuân Phong*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: hxphong@ctu.edu.vn

Ngày nhận bài: 16/8/2023; Ngày chấp nhận đăng: 23/10/2023

TÓM TẮT

Đài hoa búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) có màu đỏ sẫm hấp dẫn, vị chua đặc trưng và có hàm lượng anthocyanin khá cao. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tìm ra điều kiện thích hợp để thu nhận dịch chiết từ đài búp giấm tươi và ứng dụng trong lên men kombucha. Điều kiện thu nhận dịch chiết được khảo sát với 5 tỷ lệ nguyên liệu và dung môi (1:4 - 1:12 g/mL), 6 mức nhiệt độ (50 - 100 °C) và 4 mốc thời gian (20 - 50 phút); trên cơ sở đó thu nhận dịch chiết và xây quy trình lên men kombucha búp giấm thông qua việc xác định các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình lên men bao gồm nồng độ đường (10, 15, 20% w/v), tỷ lệ giống (5, 10, 15, 20% v/v) và thời gian lên men (1, 2, 3, 4, 5 ngày). Kết quả cho thấy tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:8 (g/mL) và ngâm cách thủy ở nhiệt độ 80 °C trong thời gian 30 phút sẽ thu được chiết xuất có hàm lượng anthocyanin cao nhất. Bên cạnh đó, việc bổ sung đường và giống với cùng nồng độ 15% w/v, lên men trong 3 ngày sẽ tạo ra sản phẩm kombucha có vị chua ngọt hài hoà, mùi, màu đặc trưng với hàm lượng acid tổng đạt 7,83 g/L và hàm lượng ethanol là 0,41% v/v.

Từ khóa: Anthocyanin, búp giấm, chiết xuất, *Hibiscus sabdariffa* L., kombucha.

1. MỞ ĐẦU

Búp giấm hay búp giấm (*Hibiscus sabdariffa* L.) là loài thuộc họ Malvaceae có nguồn gốc ở Tây Phi. Búp giấm là loài dễ trồng, ưa nắng, có sức sống mạnh nên chúng mọc được ở nhiều vùng thuộc châu Á như Malaysia, Indonesia, Thái Lan, Ấn Độ và Việt Nam. Đối với búp giấm, đài hoa được xem là bộ phận chính và thường được sử dụng nhất. Đài hoa búp giấm có màu đỏ sẫm hấp dẫn, vị chua đặc trưng và có hàm lượng anthocyanin khá cao. Theo các nghiên cứu, đài hoa của búp giấm rất giàu carbohydrate, chất xơ, protein, vitamin (niacin, riboflavin và acid ascorbic), khoáng chất (Ca, Fe, K, Mg) và các acid hữu cơ (acid citric, malic, hibisicic, oxalic, tartaric) [1, 2]. Bên cạnh đó, đài hoa búp giấm cũng chứa một lượng đáng kể các hợp chất có hoạt tính sinh học như acid phenolic, flavonoid, anthocyanin và acid hữu cơ [3, 4]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng đài hoa có tác dụng chống oxy hóa mạnh, chống viêm, chống vi khuẩn, chống tăng lipid máu, hạ huyết áp, ức chế kết tập tiểu cầu, lợi tiểu, chống ung thư, bảo vệ gan và điều hòa miễn dịch [4, 5]. Do những giá trị từ đài hoa mang lại mà nhiều nghiên cứu trong nước đã được thực hiện để ứng dụng búp giấm như một loại thực phẩm chức năng [6-8] hay làm chất bổ sung trong thực phẩm [9, 10]. Mặc dù vậy, hiện nay trên thị trường chỉ phổ biến một số dòng sản phẩm truyền thống có sử dụng búp giấm như nước cốt, mứt, sirô và trà hoa khô.

Hiện nay, thị trường thực phẩm và đồ uống hữu cơ của Việt Nam có nhiều triển vọng và rất tiềm năng trong tương lai. Song song với các ngành thực phẩm, ngành đồ uống cũng rất phát triển. Đặc biệt, trong xã hội hiện đại, con người ngày càng quan tâm đến sức khỏe, vì vậy các dòng sản phẩm thức uống tốt cho sức khỏe có nguồn gốc từ hữu cơ thiên nhiên đang ngày càng được quan tâm. Một trong số các sản phẩm gần đây được người tiêu dùng ưa chuộng là kombucha. Không giống với các sản phẩm lên men khác, kombucha là sản phẩm của nhiều quá trình lên men tùy vào hệ vi sinh vật có trong “con giống SCOBY (Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast)”, bao gồm quá trình lên men rượu nhờ nấm men, lên men acid acetic nhờ nhóm vi khuẩn acetic và lên men acid lactic nhờ nhóm vi khuẩn lactic. Chính điều này đã tạo nên một loại thức uống hài hòa, vừa có vị chua của acid, vị ngọt của đường sót, một ít vị chát và mùi thơm của trà và vị cay nhẹ của cồn. Trà kombucha được cho là có lợi tương tự như ăn sữa chua và sự phổ biến của trà kombucha đã tăng lên. Người ta cho rằng kombucha có thể làm giảm huyết áp và cholesterol, tăng cường giảm cân, giảm viêm khớp, tăng phản ứng miễn dịch, hỗ trợ tiêu hóa, ức chế sự phát triển của ung thư [11].

Thông thường, kombucha truyền thống chủ yếu được làm bằng cách sử dụng trà bổ sung đường và con giống SCOBY. Tuy nhiên, nhận thấy những lợi ích của búp giấm và kombucha mang lại, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tạo ra một loại thức uống mới lạ bằng cách lên men kombucha trong dịch chiết của búp giấm. Từ đó, tạo ra một sản phẩm mới có giá trị cao về mặt sinh học và dinh dưỡng, giúp đa dạng hóa sản phẩm và đáp ứng nhu cầu của người tiêu dùng trong ngành công nghiệp đồ uống chức năng.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Đài hoa búp giấm được mua tại chợ Hưng Lợi (phường Hưng Lợi, quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ). Đài hoa vẫn còn tươi, cánh hoa dày, màu đỏ sẫm và không bị sâu bệnh.

Giống SCOBY được cung cấp bởi công ty TNHH FoodPlus và được nhân giống theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau 7 ngày lên men, dịch kombucha với mật số nấm men $7,9 \times 10^4$ CFU/mL, vi khuẩn acetic $4,1 \times 10^4$ CFU/mL và vi khuẩn lactic $7,5 \times 10^5$ CFU/mL.

Hóa chất: NaOH chuẩn 0,1 N (Cemaco, Việt Nam), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Tokyo Chemical Industry, Nhật Bản), ethanol (Merck, Đức), tri-butyl phosphate (Sigma-Aldrich, Đức), acid gallic (Sigma-Aldrich, Đức), thuốc thử Folin-Ciocalteu (Merck, Đức), H_2SO_4 , $K_2Cr_2O_7$, Na_2CO_3 , KCl, $CH_3CO_2Na.3H_2O$ (Xilong Scientific, Trung Quốc), đường sucrose (Biên Hòa, Việt Nam).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát tỷ lệ đài búp giấm tươi và nước thích hợp cho quá trình chiết xuất

Đài hoa đạt yêu cầu được tách để loại bỏ phần quả và hạt bên trong. Năm gram đài búp giấm tươi được cho vào bình tam giác 100 mL và bổ sung nước theo các tỷ lệ 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 (g/mL). Tiếp theo, các bình tam giác được ngâm trong nồi cách thủy ở nhiệt độ 80 °C trong 30 phút (khoảng 10 phút lắc đều 1 lần). Sau đó, chiết xuất được thu hồi và để nguội đến nhiệt độ phòng. Tiến hành xác định các chỉ tiêu bao gồm pH, hàm lượng acid tổng, hàm lượng anthocyanin và hàm lượng phenolic tổng.

2.2.2. Khảo sát thời gian và nhiệt độ thích hợp cho quá trình chiết xuất

Năm gram đài búp giấm tươi được cho vào bình tam giác 100 mL và bổ sung nước theo tỷ lệ được chọn từ nội dung 2.2.1. Tiếp theo, các bình tam giác được ngâm trong nồi cách thủy

ở các mức nhiệt độ 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C trong thời gian 20, 30, 40, 50 phút (khoảng 10 phút lắc đều 1 lần). Sau đó, chiết xuất được thu hồi và để nguội đến nhiệt độ phòng. Các chỉ tiêu bao gồm pH, hàm lượng acid tổng, hàm lượng anthocyanin và hàm lượng phenolic tổng cũng được xác định.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường bổ sung và tỷ lệ giống đến quá trình lên men kombucha búp giấm

Sau khi xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình thu nhận chiết xuất đài hoa búp giấm, tiến hành thu nhận dịch chiết và bổ sung đường vào dịch chiết để đạt nồng độ 10%, 15%, 20% (w/v). Chuyển dịch chiết vào các bình tam giác 250 mL và bổ sung 5%, 10%, 15%, 20% (v/v) nước kombucha từ quá trình lên men trước. Đặt bình tam giác bằng vải cotton đã nhúng qua cồn 96° (tạo điều kiện hiếu khí và hạn chế nhiễm các vi sinh vật khác) và ủ 3 ngày ở nhiệt độ phòng (28-32 °C). Xác định giá trị pH, hàm lượng acid tổng, hàm lượng ethanol của sản phẩm và tiến hành đánh giá cảm quan.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình lên men kombucha búp giấm

Tiến hành thu nhận dịch chiết và thực hiện quá trình lên men với nồng độ đường và tỷ lệ giống thích hợp được chọn ở thí nghiệm 2.2.3. Đặt bình tam giác bằng vải cotton và ủ ở nhiệt độ phòng (28-32 °C). Theo dõi các chỉ tiêu sau lên men (pH, hàm lượng acid tổng, hàm lượng ethanol) và đánh giá cảm quan sản phẩm trong 1, 2, 3, 4 và 5 ngày.

2.2.5. Thử nghiệm lên men kombucha ở quy mô phòng thí nghiệm và phân tích sản phẩm sau lên men

Sau khi chọn được tỷ lệ thích hợp giữa búp giấm và nước. Tiến hành cân búp giấm và bổ sung thêm nước theo tỷ lệ được chọn để được 1 L dịch chiết xuất. Ngâm trong nồi cách thủy ở nhiệt độ và thời gian được chọn. Tiến hành thu nhận chiết xuất của đài búp giấm ở điều kiện thích hợp. Bổ sung nồng độ đường sucrose thích hợp được chọn ở thí nghiệm trên và khuấy cho đường tan hoàn toàn, bổ sung tỷ lệ giống thích hợp được chọn. Các bình lên men được cố định bằng vải cotton để đảm bảo điều kiện hiếu khí. Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ phòng với thời gian được chọn. Sau khi kết thúc quá trình lên men, tiến hành phân tích các chỉ tiêu và đánh giá cảm quan sản phẩm.

2.2.6. Phương pháp phân tích chỉ tiêu và xử lý số liệu

- Xác định pH bằng máy đo pH Horiba (pH1100, Nhật Bản) và °Brix được xác định bằng khúc xạ kế Atago (Master-2α, Nhật Bản).

- Hàm lượng anthocyanin được xác định bằng phương pháp pH vi sai [12].

- Hàm lượng acid tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ [13].

- Hàm lượng ethanol được xác định dựa trên phản ứng với tri-n-butyl phosphate và kali chromate [14].

- Hàm lượng phenolic tổng được xác định dựa trên phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu [15].

- Khả năng kháng oxy hóa được xác định thông qua khả năng trung hòa gốc tự do DPPH [16].

- Đánh giá cảm quan sản phẩm: Xây dựng thang điểm cảm quan dựa theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN) 12828:2019 về nước giải khát [17], TCVN 3215:1979 về sản phẩm thực phẩm (phân tích cảm quan và phương pháp cho điểm) [18]. Phương pháp đánh giá, cho điểm cảm quan đối với nước giải khát lên men được xây dựng dựa vào các chỉ tiêu gồm: Màu sắc, độ trong, mùi và vị. Hội đồng cảm quan gồm 9 thành viên tham ra đánh giá cho điểm dựa trên

thang điểm cảm quan đã xây dựng. Tiêu chuẩn này sử dụng hệ 20 điểm xây dựng trên một thang thống nhất có 6 bậc (0 đến 5) và cho điểm 5 là cao nhất cho một tiêu chuẩn.

- Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý và phân tích thống kê phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ) và Design Expert 7.0 (StatEase Inc., Hoa Kỳ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ đài hoa búp giấm tươi và nước tới quá trình thu nhận chiết xuất từ đài hoa búp giấm

Nước được biết đến là dung môi phân cực và là dung môi phổ biến nhất hòa tan được nhiều loại hợp chất khác nhau. Trong nghiên cứu này, nước được sử dụng làm dung môi để chiết xuất đài hoa búp giấm và 5 tỷ lệ giữa nguyên liệu và dung môi (1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 g/mL) đã được khảo sát. Kết quả được ghi nhận ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân tích thành phần của chiết xuất đài hoa búp giấm khi trích ly ở các tỷ lệ khảo sát

Tỷ lệ búp giấm tươi và nước (g/mL)	pH	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng anthocyanin (mg/g)	Hàm lượng phenolic tổng (mgGAE/g)
1:4	2,68	4,63±0,12 ^a	0,66±0,01 ^d	13,31±0,09 ^d
1:6	2,63	3,35±0,23 ^b	0,83±0,01 ^b	15,61±0,22 ^c
1:8	2,65	2,68±0,04 ^c	0,93±0,01 ^a	18,51±0,40 ^a
1:10	2,63	2,14±0,11 ^d	0,91±0,01 ^a	16,76±0,14 ^b
1:12	2,65	2,01±0,09 ^d	0,79±0,02 ^c	16,57±0,82 ^{bc}

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy, khi tăng thể tích nước thì hàm lượng acid tổng có xu hướng giảm từ 4,63 g/L ở tỷ lệ búp giấm và nước là 1:4 (g/mL) còn 2,01 g/L ở tỷ lệ 1:12 (g/mL). Tuy nhiên, giá trị pH không có sự dao động lớn và chỉ nằm trong khoảng 2,63 - 2,68. Nguyên nhân có thể là do cùng một lượng búp giấm nhưng việc tăng thể tích nước đã làm loãng hàm lượng acid có trong dịch chiết. Ngoài ra, trong đài hoa búp giấm rất giàu anthocyanin và sau quá trình chiết xuất, từ Bảng 1 có thể thấy hàm lượng anthocyanin có xu hướng tăng dần khi lượng nước tăng. Tuy nhiên, khi lượng nước bổ sung quá nhiều lại làm giảm hiệu quả chiết xuất. Cụ thể là ở tỷ lệ 1:4 (g/mL), chiết xuất có hàm lượng anthocyanin thấp nhất (0,66 mg/g), sau đó tăng dần rồi đạt cao nhất ở tỷ lệ 1:8 (g/mL) với hàm lượng anthocyanin là 0,93 mg/g nhưng không có khác biệt ý nghĩa thống kê so với hàm lượng anthocyanin ở tỷ lệ 1:10 (g/mL). Ở tỷ lệ 1:12 (g/mL), hàm lượng anthocyanin có xu hướng giảm nhẹ. Giải thích cho sự biến thiên của hàm lượng anthocyanin, nguyên nhân là do khi thể tích dung môi quá thấp có thể dẫn đến việc không thể thu nhận tối đa lượng anthocyanin có trong búp giấm và khi tăng thể tích dung môi tới mức nào đó, nồng độ anthocyanin không tăng nữa mà chỉ tăng thêm tạp chất do việc khuếch tán theo cơ chế gradient nồng độ cũng đi kèm với sự khuếch tán của một số chất khác [19]. Bên cạnh đó, kết quả ghi nhận hàm lượng phenolic tổng cũng dao động tương tự với kết quả của anthocyanin. Tuy nhiên, do hàm lượng phenolic tổng cao nhất ở tỷ lệ 1:8 (g/mL) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các tỷ lệ còn lại nên tỷ lệ 1:8 được xác định là thích hợp nhất cho quá trình thu nhận chiết xuất từ đài hoa búp giấm.

Khi so sánh với kết quả của một số nghiên cứu trước đây thì kết quả này cũng tương đối khả quan so với kết quả của Nguyễn Thị Bình Yên và Phùng Thị Lan Hương (2019) khi điều chế dịch chiết anthocyanin từ rau dền đỏ cho hàm lượng anthocyanin 0,982 mg/L [20] và Hoàng Thị Hồng (2020) thực hiện nghiên cứu quá trình chiết anthocyanin trong hoa đậu biếc thì với tỷ lệ pha loãng 1:9 (nguyên liệu và dung môi) thu được lượng anthocyanin khá cao (1,79 mg/g) [21].

3.2. Thời gian và nhiệt độ thích hợp để thu nhận chiết xuất từ đài hoa búp giấm

Bên cạnh việc chọn được tỷ lệ nguyên liệu và dung môi thích hợp thì thời gian và nhiệt độ cũng là nhân tố đóng vai trò quan trọng để tối ưu hóa quá trình thu nhận dịch chiết đài hoa búp giấm. Ở thí nghiệm này, quá trình chiết xuất được cố định với tỷ lệ đài hoa và nước là 1:8 (g/mL), thời gian ngâm kéo dài từ 20-50 phút và nhiệt độ khảo sát ở các mức nhiệt độ 50, 60, 70, 80, 90 và 100 °C. Kết quả phân tích các chỉ tiêu được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích thành phần của chiết xuất từ đài hoa búp giấm tươi khi trích ly ở các mức thời gian và nhiệt độ khảo sát

Thí nghiệm thứ	Nhân tố		Chỉ tiêu theo dõi			
	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	pH	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng anthocyanin (mg/g)	Hàm lượng phenolic tổng (mgGAE/g)
1	50	20	2,93	1,06±0,15 ^d	0,64±0,00 ^{kl}	16,53±0,23 ^l
2	50	30	2,94	1,12±0,08 ^d	0,65±0,01 ^k	18,61±0,33 ^k
3	50	40	2,92	1,12±0,00 ^d	0,61±0,01 ^m	16,22±0,23 ^l
4	50	50	2,93	1,12±0,13 ^d	0,59±0,00 ⁿ	15,74±0,37 ^l
5	60	20	2,95	1,28±0,20 ^{cd}	0,69±0,00 ^j	18,99±0,10 ^{jk}
6	60	30	2,93	1,40±0,09 ^c	0,74±0,00 ^h	19,40±0,20 ^{hijk}
7	60	40	2,96	1,28±0,08 ^{cd}	0,71±0,00 ⁱ	18,85±0,23 ^k
8	60	50	2,92	1,23±0,04 ^{cd}	0,70±0,00 ^{ij}	18,66±0,30 ^k
9	70	20	2,72	1,73±0,08 ^{ab}	0,79±0,00 ^{bcd}	19,56±0,23 ^{hijk}
10	70	30	2,73	1,95±0,00 ^a	0,80±0,01 ^b	20,87±0,04 ^{fg}
11	70	40	2,71	1,95±0,15 ^a	0,79±0,01 ^{cde}	20,04±0,10 ^{ghi}
12	70	50	2,72	1,90±0,11 ^a	0,78±0,00 ^{ef}	19,95±0,27 ^{ghij}
13	80	20	2,71	1,73±0,13 ^{ab}	0,80±0,01 ^{bc}	22,76±0,26 ^{cd}
14	80	30	2,68	1,95±0,26 ^a	0,89±0,00 ^a	26,84±0,13 ^a
15	80	40	2,69	1,79±0,11 ^{ab}	0,78±0,01 ^{de}	21,64±0,46 ^{ef}
16	80	50	2,67	1,73±0,20 ^{ab}	0,77±0,00 ^f	20,21±0,04 ^{gh}
17	90	20	2,73	1,62±0,16 ^b	0,64±0,00 ^l	21,90±0,66 ^{de}
18	90	30	2,71	1,95±0,15 ^a	0,75±0,00 ^g	25,94±0,43 ^a
19	90	40	2,69	1,90±0,09 ^a	0,64±0,00 ^{kl}	24,60±0,59 ^b
20	90	50	2,70	1,90±0,17 ^a	0,64±0,00 ^l	22,76±0,33 ^{cd}
21	100	20	2,73	1,90±0,11 ^a	0,59±0,00 ⁿ	21,92±0,51 ^{ef}
22	100	30	2,72	1,90±0,23 ^a	0,60±0,00 ^{mn}	22,95±0,20 ^c
23	100	40	2,72	1,79±0,11 ^{ab}	0,55±0,00 ^o	21,33±0,17 ^{ef}
24	100	50	2,71	1,73±0,08 ^{ab}	0,50±0,00 ^p	19,20±0,04 ^{ijk}

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy thời gian và nhiệt độ có ảnh hưởng đến hàm lượng anthocyanin cũng như pH, hàm lượng acid tổng và phenolic tổng của dịch chiết xuất. Ở nghiệm thức 24 (nhiệt độ 100 °C và thời gian 50 phút) ghi nhận hàm lượng anthocyanin thấp nhất (0,50 mg/g) với giá trị pH 2,71, hàm lượng acid tổng là 1,73 g/L và hàm lượng phenolic tổng là 19,20 mgGAE/g. Ở nghiệm thức 14 (nhiệt độ 80°C và thời gian 30 phút) thì chiết xuất có hàm lượng anthocyanin cao nhất, đạt 0,89 mg/g với pH là 2,68, hàm lượng acid tổng là 1,95 g/L và hàm lượng phenolic tổng là 26,84 mgGAE/g. Nhìn chung, trong cùng khoảng thời gian, nhiệt độ cao hơn sẽ chiết xuất được nhiều anthocyanin hơn, cụ thể là hàm lượng anthocyanin có xu hướng tăng khi nhiệt độ tăng từ 50 °C đến 80 °C. Tuy nhiên, lượng anthocyanin lại giảm xuống liên tục khi nhiệt độ lớn hơn 80 °C. Ngoài ra, xét về thời gian tương ứng với mỗi nhiệt độ thì hàm lượng anthocyanin hầu hết có xu hướng tăng cao nhất sau 30 phút chiết xuất và sau đó lại giảm dần khi kéo dài thời gian chiết (40 phút và 50 phút). Nguyên nhân là do đài hoa được chiết ở nhiệt độ cao cùng với thời gian lâu làm cho một phần anthocyanin bị phân hủy dẫn đến hàm lượng anthocyanin thấp. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy anthocyanin được trích tự nhiên thường rất dễ bị phân hủy hóa học, dẫn đến phai màu và mất hoạt tính sinh học. Tốc độ phân hủy anthocyanin bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố bao gồm độ pH, ánh sáng, nhiệt độ, oxy, enzyme và sự tương tác với nhiều hợp chất khác [22, 23].

Năm 2021, Đặng Huỳnh Đức và cộng sự cũng đã nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của điều kiện trích ly hợp chất hòa tan từ búp giấm khô và điều kiện phù hợp để trích ly được xác định là tỷ lệ 1/10 (g/mL) đài hoa khô với nước ở 50 °C trong 30 phút [8]. Năm 2022, Đinh Lê Khanh và cộng sự cũng đã xác định quy trình tách chiết anthocyanin từ củ hành tím có kết hợp siêu âm với tần số 37 kHz ở nhiệt độ 50 °C trong thời gian 40 phút đã thu được hàm lượng anthocyanin cao nhất đạt 0,2417 mg/g [24]. Nhìn chung, kết quả giữa các nghiên cứu có sự khác nhau nhưng kết quả trong thí nghiệm này là chấp nhận được và nhiệt độ 80°C và thời gian 30 phút được lựa chọn cho quá trình chiết xuất để thực hiện các thí nghiệm sau. Nguyên nhân có thể là do khác biệt về nguồn nguyên liệu, dạng nguyên liệu chiết xuất (khô và tươi) hay phương pháp chiết xuất.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ đường bổ sung và tỷ lệ giống đến quá trình lên men kombucha búp giấm

Sau khi xác định được nhiệt độ và thời gian thích hợp cho quá trình thu nhận dịch chiết ở thí nghiệm trên, tiến hành khảo sát 2 nhân tố là nồng độ đường và tỷ lệ giống khởi động bổ sung vào dịch chiết búp giấm. Kết quả của quá trình lên men kombucha sau 3 ngày được trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy hệ vi sinh có trong SCOBY đã thực hiện quá trình lên men và được thể hiện qua các giá trị pH và độ Brix. Cụ thể là pH giảm so với pH ban đầu của dịch chiết (2,70) và nằm trong khoảng 2,58 - 2,62; tương tự, độ Brix cũng giảm và dao động trong khoảng 8,4 - 14,7 °Brix ở tất cả nghiệm thức. Mặc khác, kết quả cũng cho thấy sự tác động của nồng độ đường và tỷ lệ giống đến quá trình lên men kombucha thông qua 2 chỉ tiêu là hàm lượng acid tổng và ethanol. Lượng cơ chất, đường và giống được sử dụng trong quá trình lên men thay đổi tùy theo khu vực địa lý và nhu cầu của người tiêu dùng. Hàm lượng trà hoặc cơ chất có thể được pha chế ở nhiều nồng độ khác nhau, từ khoảng 1,0 đến 100 g/L.

Sucrose có thể được sử dụng ở nồng độ 1 - 20% w/v, làm nguồn carbon chính cho sự phát triển của vi sinh vật. SCOBY và chất lỏng từ quá trình lên men trước đó được bổ sung với nồng độ tương ứng khoảng 0,25 - 10% và 3 - 30% để sử dụng làm nguồn khởi động cho quá trình lên men [25]. Khác với các sản phẩm lên men thông thường, kombucha là sản phẩm của nhiều quá trình lên men tùy vào hệ vi sinh vật có trong “con giống SCOBY”, thường là sự cộng sinh của nấm men và vi khuẩn. Nấm men sẽ thủy phân sucrose thành glucose và fructose bằng cách sử dụng enzyme invertase nằm trong chu chất của tế bào nấm men và tạo ra ethanol thông qua con đường đường phân. Sau đó, vi khuẩn acetic tạo ra acid acetic từ quá trình oxy hóa ethanol, thông qua các enzyme alcohol dehydrogenase và aldehyde dehydrogenase [26].

Do đó, trong thí nghiệm này, hàm lượng ethanol sinh ra bởi nấm men đã được vi khuẩn acetic sử dụng nên sau 3 ngày lên men đều có giá trị nhỏ hơn 0,5% v/v. Riêng hàm lượng acid tổng sinh ra ở các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Trong đó, nghiệm thức 1 có hàm lượng acid thấp nhất (4,79 g/L). Ở nghiệm thức 7, hàm lượng acid tổng cao nhất (7,83 g/L) nhưng khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê so với nghiệm thức 8 và 12.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ đường và tỷ lệ giống sau 3 ngày lên men

Nghiệm thức	Nhân tố		Chỉ tiêu theo dõi			
	Nồng độ đường (% w/v)	Tỷ lệ giống (% v/v)	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	pH	Brix
1	10	5	4,79±0,02 ^h	0,39±0,03 ^{abcd}	2,61	8,6
2	10	10	5,37±0,03 ^f	0,40±0,03 ^{abcd}	2,62	8,7
3	10	15	7,49±0,05 ^c	0,48±0,02 ^a	2,60	8,5
4	10	20	7,60±0,05 ^{bc}	0,44±0,03 ^{ab}	2,58	8,4
5	15	5	5,10±0,06 ^g	0,32±0,05 ^d	2,62	11,7
6	15	10	5,57±0,02 ^e	0,33±0,02 ^{cd}	2,60	11,8
7	15	15	7,83±0,06 ^a	0,41±0,03 ^{abcd}	2,61	11,9
8	15	20	7,72±0,08 ^{ab}	0,45±0,01 ^a	2,59	11,7
9	20	5	4,88±0,02 ^h	0,42±0,05 ^{abc}	2,62	14,6
10	20	10	5,42±0,05 ^f	0,44±0,08 ^{ab}	2,60	14,7
11	20	15	7,08±0,06 ^d	0,46±0,01 ^a	2,60	14,4
12	20	20	7,76±0,05 ^a	0,34±0,02 ^{bcd}	2,59	14,3

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Ngoài ra, sản phẩm còn được đánh giá bởi 9 thành viên dựa theo chỉ tiêu trong phương pháp đánh giá cảm quan. Kết quả cũng chỉ ra rằng nghiệm thức 7 (nồng độ đường 15% và nồng độ men 15%) có điểm cảm quan cao nhất với độ trong và màu sắc đạt 97,78% (4,89/5,0 điểm), mùi đạt 91,11% (4,56/5,0 điểm) và vị đạt 91,11% (4,56/5,0 điểm). Ở nồng độ này các thành viên tham gia đánh giá nhận thấy được sự hài hòa của sản phẩm, độ trong và màu sắc gần như đạt điểm tuyệt đối vì sản phẩm mang màu sắc đặc trưng của búp giấm, mùi vị cũng được đánh giá khá cao với sự kết hợp vị chua của acid và vị ngọt vừa phải của đường sót. Ở các nồng độ còn lại không được đánh giá cao do mùi vị vẫn chưa hài hòa và chưa mang vị đặc trưng của sản phẩm.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình lên men kombucha búp giấm

Thời gian lên men là một yếu tố ảnh hưởng lớn đến quá trình lên men, quyết định đến chất lượng của kombucha. Chính vì thế, việc xác định thời gian lên men là rất cần thiết để hàm lượng ethanol, acid tổng nằm trong khoảng thích hợp cũng như tạo ra sản phẩm có cảm quan phù hợp với người tiêu dùng. Bảng 4 trình bày kết quả khảo sát thời gian lên men kombucha búp giấm (1 - 5 ngày) với các điều kiện đã được xác định trước đó.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy pH và độ Brix có xu hướng giảm dần qua từng ngày, tương ứng với sự tăng dần của hàm lượng ethanol và acid tổng. Có thể thấy rằng sau 1 ngày lên men thì hàm lượng acid tổng sinh ra là 3,66 g/L, hàm lượng ethanol 0,23% v/v, pH 2,71 và Brix vẫn chưa giảm nhiều, ở mức với 12,7 °Brix. Điều này chứng tỏ rằng nấm men vẫn còn đang trong giai đoạn thích nghi do pH ban đầu của môi trường khá thấp, lúc này đường vẫn chưa

được chuyển đổi nhiều bởi nấm men để tạo ra ethanol và CO₂. Sau 2, 3 và 4 ngày lên men thì hàm lượng acid và ethanol tăng cao và đạt cao nhất ở ngày thứ 5 với hàm lượng acid tổng là 20,58 g/L. Tuy nhiên, hàm lượng ethanol lại đạt cao nhất vào ngày thứ 4 với 0,83% v/v và giảm ở ngày thứ 5, còn 0,64% v/v. Nguyên nhân là do sự tương tác trong quá trình lên men giữa nấm men và vi khuẩn. Acid acetic được tạo ra bởi vi khuẩn acetic kích thích nấm men sản xuất ethanol, và ngược lại, ethanol là nguồn nguyên liệu cho sự phát triển của vi khuẩn acetic và sau đó tạo ra nhiều acid acetic hơn [27]. Nhìn chung, ở ngày thứ 3, sản phẩm kombucha có hàm lượng acid tổng đạt 7,59 g/L và nằm ở mức thông thường của nồng độ acid acetic trong trà kombucha là dưới 10 g/L [28]. Ngoài ra, pH (2,57) và hàm lượng ethanol (0,50% v/v) sau 3 ngày lên men của sản phẩm cũng phù hợp với yêu cầu chất lượng kombucha trên thế giới với độ pH trong khoảng 2,5 - 4,2, phân loại độ cồn của kombucha không cồn (nhỏ hơn 0,50% v/v) và có cồn (0,60 - 0,80% v/v) [29-31].

Bảng 4. Kết quả thời gian lên men đến quá trình lên men kombucha

Thời gian (ngày)	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	pH	Brix
1	3,66±0,09 ^c	0,23±0,02 ^c	2,71	12,7
2	5,67±0,12 ^d	0,42±0,02 ^d	2,60	11,8
3	7,59±0,09 ^c	0,50±0,02 ^c	2,57	11,6
4	13,98±0,08 ^b	0,83±0,03 ^a	2,48	10,9
5	20,58±0,11 ^a	0,64±0,02 ^b	2,47	10,3

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Mặt khác, sản phẩm được đánh giá cảm quan theo từng ngày và ngày thứ 3 nhận được điểm đánh giá cảm quan cao nhất, trong đó độ trong và màu sắc đạt 97,78% (4,89/5,0 điểm), mùi đạt 93,33% (4,67/5,0 điểm) và vị đạt 91,11% (4,56/5,0 điểm). Nhìn chung, ở ngày thứ 3 sản phẩm có độ trong và màu sắc, cũng như mùi vị đều được đánh giá khá cao do sản phẩm có sự hài hòa giữa vị chua và ngọt. Ở các ngày còn lại thì độ trong và màu sắc cũng được đánh giá khá cao, tuy nhiên ở ngày 1 và ngày 2 do hệ vi sinh chưa hoạt động mạnh nên sản phẩm vẫn còn vị ngọt nhiều, ít chua. Ngược lại, ở ngày 4 và đặc biệt là ở ngày 5 thì kombucha lại có vị chua sốc cho nên ở những ngày này vẫn chưa nhận được sự đánh giá cao từ các thành viên đánh giá. Thông thường, thời gian lên men kombucha trung bình là 15 ngày nhưng có thể dao động từ 7 - 60 ngày. Tuy nhiên, thời gian lên men còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như giống khởi động, cơ chất, pH, nhiệt độ, lượng oxy khi bắt đầu quá trình lên men. Trong nghiên cứu này, thời gian lên men được rút ngắn còn 3 ngày sẽ là lợi thế trong việc tiết kiệm thời gian để sản xuất ra một loại thức uống tốt cho sức khỏe của con người nhờ sự kết hợp các giá trị của búp giấm và kombucha.

3.5. Thử nghiệm lên men kombucha ở quy mô phòng thí nghiệm và phân tích sản phẩm sau lên men

Sau khi xác định được các điều kiện thích hợp để thu nhận dịch chiết và lên men kombucha, tiến hành thử nghiệm lên men ở quy mô phòng thí nghiệm (1 L) để làm tiền đề áp dụng trong sản xuất thực tiễn. Kết quả phân tích sản phẩm sau khi lên men được trình bày ở Bảng 5. Kết quả cho thấy ở ngày 3 hàm lượng acid tổng là 5,84 g/L và ngày 4 là 6,18 g/L, thấp hơn so với hàm lượng acid tổng của ngày 3 và ngày 4 ở thí nghiệm trước. Khả năng là do trà kombucha được lên men nhờ hoạt động của vi sinh vật bao gồm vi khuẩn hiếu khí và nấm men, việc tạo mảng kombucha nổi trên bề mặt tạo điều kiện hiếu khí cho các vi sinh vật. Khi

lên men với quy mô lớn mà diện tích bề mặt không đủ lớn sẽ hạn chế vi khuẩn acetic tiếp xúc với oxy, từ đó sẽ làm cho vi sinh vật hoạt động chậm hơn, dẫn đến quá trình lên men lâu hơn. Khi phân tích sản phẩm sau khi lên men thì hàm lượng anthocyanin giảm từ 0,68 mg/L ở ngày 3 còn 0,64 mg/L ở ngày 4. Nghiên cứu của Ifie et al. (2018) cho thấy lượng anthocyanin đều giảm trong quá trình lên men ở tất cả các loại rượu vang và việc giảm nồng độ có thể là do anthocyanin đơn phân tử có thể được biến đổi thành anthocyanin cao phân tử trong quá trình lên men và các phân tử này không nhạy cảm với sự thay đổi pH nên không thể đo bằng phương pháp chênh lệch độ pH [32].

Bảng 5. Kết quả phân tích sản phẩm sau khi lên men ở quy mô 1 lít

Ngày	Hàm lượng acid tổng (g/L)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	pH	Brix	Hàm lượng anthocyanin (mg/L)	Hàm lượng phenolic tổng (mgGAE/L)	Kháng oxy hóa (%)
3	5,84±0,08 ^b	0,41±0,03 ^b	2,59	11,7	0,68±0,00 ^a	24,60±0,13 ^b	47,20
4	6,18±0,08 ^a	0,56±0,03 ^a	2,45	11,0	0,64±0,00 ^b	26,44±0,20 ^a	34,58

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Ngoài ra, hoạt tính chống oxy hóa của kombucha búp giấm cũng giảm khi khả năng trung hòa gốc tự do DPPH ở ngày 3 là 47,20%, còn ở ngày 4 là 34,58%. Tuy nhiên, hàm lượng phenolic ở ngày 4 lại cao hơn ngày 3 và đạt 26,44 mgGAE/L. Kết quả này phù hợp với công bố của Ahmed (2018) khi xác định các hoạt tính chống oxy hóa và phenolic của các loại trà thảo mộc kombucha sau quá trình lên men. Hoạt tính chống oxy hóa của trà thảo mộc kombucha dao động từ 26,58 đến 94,51% với thứ tự tăng dần: gừng < hồi < quế < ngải cứu < bạc hà < kinh giới < búp giấm < cây xô thơm và quá trình lên men được cho là làm tăng hoạt động chống oxy hóa cao hơn so với thảo mộc không lên men. Tổng số hợp chất phenolic của trà thảo mộc kombucha cũng được xác định và nằm trong khoảng 39,5 đến 108,4 mgGAE/L [33]. Một nghiên cứu khác của Jakubczyk et al. (2020) đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và tổng hàm lượng phenolic của kombucha thu được từ quá trình lên men của trà xanh, đen, trắng và đỏ đã nhận thấy rằng hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng phenolic của kombucha thay đổi phụ thuộc vào loại trà cũng như thời gian lên men [34].

4. KẾT LUẬN

Đài hoa búp giấm là nguyên liệu tiềm năng để ứng dụng trong quá trình sản xuất đồ uống hữu cơ. Việc sử dụng hệ vi sinh SCOBY để lên men sản phẩm kombucha búp giấm tạo ra một loại thức uống mới có giá trị cao về mặt sinh học và dinh dưỡng so với trà lên men truyền thống. Nghiên cứu đã tiến hành thu nhận dịch chiết đài hoa búp giấm với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1:8, ngâm cách thủy ở 80 °C trong 30 phút. Dịch chiết sau đó được ứng dụng lên men kombucha bằng cách bổ sung 15% w/v đường và 15% v/v nước kombucha từ quá trình lên men trước và lên men 3 ngày trong điều kiện hiếu khí ở nhiệt độ phòng (28 - 32 °C) cho sản phẩm có mùi vị hài hòa và màu sắc đặc trưng cho sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Patel, S. - *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4 (1) (2014) 23-27. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2013.10.004>

2. Islam, M. M. - Food and medicinal values of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. Linne Malvaceae) plant parts: A review. *Open Journal of Nutrition and Food Sciences* **1** (1) (2019) 1003.
3. Singh, P., Khan, M., & Hailemariam, H. - Nutritional and health importance of *Hibiscus sabdariffa*: a review and indication for research needs. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering* **6** (5) (2017) 125-128. <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2017.06.00212>
4. Shruthi, V. H., & Ramachandra, C. T. - Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces: a potential source of natural color and its health benefits. Apple Academic Press. In *Food Bioactives* (2019) 169-190.
5. Riaz, G., & Chopra, R. - A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **102** (2018) 575-586. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023>
6. Yên, Đ. T. & Tiên, Đ. Q. - Nghiên cứu quy trình sản xuất trà búp giấm hòa tan. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm* **15** (1) (2018) 95-105.
7. Phương, L. T. L. & Dung, N. P. - Đánh giá tác dụng điều trị rối loạn lipid máu của cốm búp giấm trên chuột nhắt trắng. *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh* **22** (5) (2018) 58-64. <https://doi.org/10.56535/jmpm.v48.503>
8. Đức, Đ. H., Trang, V. P. P., Khê Đ. T. & Tùng, N. V. - Nghiên cứu quá trình tạo bột búp giấm từ đài hoa búp giấm khô. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm* **21** (2) (2021) 142-151.
9. Lan T. A., Hòa P. N., Hiền P. L. D. - Thu nhận dịch chiết giàu anthocyanin từ đài hoa búp giấm và ứng dụng để tạo màu cho kẹo dẻo. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Đồng Tháp* **17** (2015) 72-78.
10. Yên, Đ. T. & Tuấn, N. V. - Nghiên cứu sử dụng đài hoa búp giấm trong sản xuất mứt đông từ dâu tây. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm* **13** (1) (2017) 111-120.
11. Kapp, J. M., & Sumner, W. - Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology* **30** (2019) 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001>
12. Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., & Collaborators: Barnes K.W., Eisele T., Giusti, M.M, Haché, J., Hofsommer, H., Koswig S., Krueger, D.A, Kupina, S., Martin, S.K., Martinsen, B.K., Miller, T.C., Paquette, F., Ryabkova, A., Skrede, G., Trenn, U., Wightman, J.D. - Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International* **88** (5) (2005) 1269-1278. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>
13. Mai, L. T. - Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội (2009).
14. Sriariyanun M., Mutrakulcharoen P., Tapaamorndech S., Cheenkachorn K. and Rattanaporn K. - A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of ethanol in fermentation products. *Oriental Journal of Chemistry* **35** (2) (2019) 744-750. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/350234>
15. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. - Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. Academic press. In *Methods in Enzymology* **299** (1999) 152-178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

16. Ye, M., Ren, L., Wu, Y., Wang, Y., & Liu, Y. - Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt. *LWT-Food Science and Technology* **51**(1) (2013) 314-318. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.027>
17. Tiêu chuẩn Việt Nam: (TCVN) 12828:2019. Nước giải khát. Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định. Bộ Khoa học và Công nghệ (2019).
18. Tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 3215:1979. Sản phẩm thực phẩm - Phân tích cảm quan. Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước ban hành (1979).
19. Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. - Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (6) (2005) 2111-2117. <https://doi.org/10.1021/jf0488110>
20. Yên N. T. B. & Hương, P. T. L. - Nghiên cứu tạo giấy chỉ thị từ anthocyanin chiết xuất từ rau dền đỏ (*Amaranthus tricolor*) để thử hàn the trong thực phẩm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Hùng Vương* **15** (2) (2019) 27-35.
21. Hồng, H. T. - Nghiên cứu quá trình chiết và đánh giá độ ổn định của anthocyanin trong hoa Đậu biếc (*Clitoria ternatea* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Nguyễn Tất Thành* **12** (2020) 50-57.
22. Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. - Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols. *Food Chemistry* **212** (2016) 596-603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.025>
23. Constantin, O. E., & Istrati, D. I. - Extraction, quantification and characterization techniques for anthocyanin compounds in various food matrices - A review. *Horticulturae* **8** (11) (2022) 1084. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111084>
24. Khanh, Đ. L., Quỳnh, C.T. T. & Hằng, H. T. L. - Xác định điều kiện tối ưu tách chiết anthocyanin có hỗ trợ siêu âm từ củ hành tím Sóc Trăng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* **5** (138) (2022) 31-37.
25. de Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., & Lima, A. R. - Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science* **87** (2) (2022) 503-527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
26. Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., & Di Gioia, D. - Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients* **11** (1) (2018) 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
27. Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. - A review on kombucha tea - microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13** (4) (2014) 538-550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
28. Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H., & Mortlock, R. P. - Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/kombucha beverage. *Acta Biotechnologica*, **16** (2-3) (1996) 199-205. <https://doi.org/10.1002/abio.370160219>
29. Brasil. - Estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional (Instrução Normativa No. 41, de 17 de Setembro de 2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União,

- Brasilia. (2019). <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>
30. Centre for Disease Control - Food safety assessment of kombucha tea recipe and food safety plan: British Columbia. Environmental Health Services (2020) 1-14. <http://www.bccdc.ca/resourcegallery/Documents/Educational%20Materials/EH/FPS/Food/kombucha1.pdf>
31. Kombucha Brewers International - Kombucha Code of Practice (2021) <https://kombuchabrewers.org/kombucha-code-of-practice/>
32. Ifie, I., Ifie, B. E., Ibitoye, D. O., Marshall, L. J., & Williamson, G. Seasonal variation in *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) calyx phytochemical profile, soluble solids and α -glucosidase inhibition. *Food Chemistry* **261** (2018) 164-168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.052>
33. Ahmed, R. F. - Antioxidant and antibacterial activity of some fermented herbal teas with kombucha culture. *Middle East Journal of Applied* **8** (4) (2018) 1560-1568.
34. Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J., & Janda, K. - Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants* **9** (5) (2020) 447. <https://doi.org/10.3390/antiox9050447>

ABSTRACT

STUDY ON THE CONDITIONS FOR OBTAINING THE EXTRACT FROM ROSELLE CALYX (*Hibiscus sabdariffa* L.) AND APPLICATION IN KOMBUCHA FERMENTATION

Luu Minh Chau, Danh Truong Tho, Le Quoc Viet,
Nguyen Ngoc Thanh, Huynh Xuan Phong*
Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

*Email: hxphong@ctu.edu.vn

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx has an attractive dark red color, a fantastic and sour taste, and a reasonably high anthocyanin content. The objective of this study is to find out suitable conditions to obtain the extract from fresh hibiscus calyxes and apply it in kombucha fermentation. Extraction conditions were investigated with 5 ratios of fresh roselle calyxes to water (1:4 - 1:12 (g/mL), 6 levels of temperature (50 - 100 °C) and 4 levels of time (20-50 minutes). On that basis, the extract was obtained and a process of fermenting kombucha roselle was developed by determining the factors affecting the fermentation process including sugar concentration (10, 15, 20% w/v), starter concentration (5, 10, 15, 20% v/v) and fermentation time (1, 2, 3, 4, 5 days). The results showed that the material and water ratio at 1:8 (g/mL) and soaking in a water bath at 80 °C for 30 minutes were the most appropriate conditions to obtain the extract with the highest anthocyanin content. Besides, at the conditions of sugar and starter concentration of 15% w/v, fermentation of 3 days, a kombucha product was obtained with a harmonious sweet and sour taste, a special odor and color with a total acid content of 7.83 g/L and an ethanol content of 0.41% v/v.

Keywords: Anthocyanin, roselle, extract, *Hibiscus sabdariffa* L., kombucha.