

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN CỦA TỎI SAU LÊN MEN VÀ ỨNG DỤNG ĐỂ SẢN XUẤT NƯỚC MẮM TỎI ĐEN

Đoàn Thị Hoài Nam, Lê Đức Hoàng Lan, Lê Thị Thủy Tiên
Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng

Liên hệ email: hoainamgvbk@yahoo.com.vn;

TÓM TẮT

Tỏi đen là sản phẩm lên men từ tỏi tươi không có sự tham gia của vi sinh vật và được chứng minh có tác dụng dược lý cao hơn so với tỏi tươi. Trong nghiên cứu này, thành phần vật lý, hóa học và hoạt tính sinh học của tỏi đen được khảo sát và nghiên cứu tỷ lệ phối trộn phù hợp giữa tỏi đen và nước mắm để sản xuất nước mắm tỏi đen để bổ sung chất chống oxy hóa cho cơ thể, đồng thời nâng cao giá trị kinh tế của tỏi đen và đưa chúng đến gần hơn với người tiêu dùng. Đầu tiên, tỏi tươi được ủ ở 70°C ở độ ẩm từ 80 - 90% trong 35 ngày. Các chỉ tiêu lý hóa gồm màu sắc, mùi vị, đường tổng và đường khử, hoạt tính chống oxy hóa, tính kháng khuẩn của tỏi đen được so sánh với tỏi tươi. Kết quả, tỏi đen có màu đen, mềm, vị ngọt, không còn mùi hăng cay. Lượng đường khử (220 mg/g) tăng 11 lần so với tỏi trắng (20 mg/g). Khả năng chống oxy hóa của tỏi đen (IC₅₀ = 125,04 µg/mL) tăng gấp 5 lần so với tỏi tươi (IC₅₀ = 646,3 µg/mL). Các kết quả trên được dùng làm cơ sở tính toán và lựa chọn tỉ lệ thích hợp tạo ra loại nước mắm tỏi đen hài hòa, thơm ngon và giàu hoạt tính chống oxy hóa được sử dụng trong các bữa ăn hằng ngày.

Từ khóa: Hoạt tính chống oxy hóa; lên men; nước mắm tỏi đen, tỏi đen; tỏi tươi.

Nhận bài: 28/10/2018

Hoàn thành phản biện: 14/01/2019

Chấp nhận bài: 30/01/2019

1. MỞ ĐẦU

Tỏi là loại gia vị được dùng phổ biến trong bữa ăn hằng ngày của người dân nhiều nước trên thế giới. Tỏi có chứa các hợp chất của lưu huỳnh như allicin có tác dụng ức chế sự phát triển của các loài vi khuẩn, virus (Nguyễn Thanh Hải và Bùi Thị Thọ, 2013). Bên cạnh đó, tỏi có chứa các chất chống oxy hóa mạnh có khả năng trung hòa các gốc tự do làm tổn hại đến các tế bào, giúp làm chậm quá trình lão hóa cũng như ngăn ngừa sự hình thành và phát triển các khối u ác tính, giảm quá trình xơ vữa động mạch và bệnh tim mạch (Arunkumar và cs., 2006; Hồ Anh Sơn và Vũ Bình Dương, 2014; Xin Wang và cs., 2012).

Khi lên men tỏi ở nhiệt độ cao với độ ẩm chính xác, tỏi trải qua các thay đổi đặc tính lý hóa bao gồm thay đổi mùi vị, màu sắc và thành phần dinh dưỡng bên trong. Dưới tác dụng của nhiệt độ, một số acid amin trong tỏi cũng chuyển hóa và giảm đi đáng kể giúp tạo hương vị mới cho sản phẩm. Ví dụ các hợp chất chứa lưu huỳnh như methionine, cysteine, methanethiol trong tỏi tươi quyết định đến mùi hăng và vị cay nồng trong quá trình lên men sẽ được chuyển hóa thành những hợp chất mới chứa lưu huỳnh tan được trong nước như S-Allyl-S-cysteine, alliin, isoalliin, methionine, cycloalliin. Những chất mới này làm giảm vị hăng cay của tỏi, tỏi từ màu trắng sẽ chuyển sang màu đen, có vị ngọt, đồng thời các chất mới được tạo thành đã được chứng minh có vai trò tốt hơn trong chống oxy hóa các gốc tự do và chống ung thư (Duk-Ju Choi và cs., 2008; Lei Feng-Chao và cs., 2012).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tỏi đen có hoạt tính dược lý cao hơn tỏi trắng như hàm lượng glucid tăng 1,6 lần, S-allyl-S-cysteine tăng 6 lần... (Sook Choi và cs., 2014). Với

các tính chất ưu việt như vậy nhưng do sản phẩm tỏi đen hiện nay có giá thành khá cao cũng như còn rất ít các dòng sản phẩm đi từ tỏi đen nên chúng vẫn còn xa lạ với người tiêu dùng.

Người Việt Nam có thói quen sử dụng nước mắm trong chế biến các món ăn, do đó với mục đích đưa sản phẩm tỏi đen vào đời sống hằng ngày, gần gũi hơn với người tiêu dùng, chúng tôi nghiên cứu các thành phần và tỷ lệ thích hợp để tạo ra các sản phẩm nước mắm tỏi đen hài hòa, thơm ngon thuận tiện sử dụng trong các bữa ăn đồng thời giúp đáp ứng được nhu cầu chất chống oxy hóa tối thiểu hằng ngày cho con người.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu:

- Nguyên liệu: Tỏi tươi Hải Dương, nước mắm Mươi Thu
- Hóa chất: Natri hydroxide tinh thể (NaOH), chì acetate ($Pb(CH_3COO)_2$), đồng sulfate tinh thể ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), sắt (III) sulfate tinh thể ($Fe_2(SO_4)_3$), kali permanganate ($KMnO_4$), magie (Mg), methanol (CH_3OH), ethanol (C_2H_5OH), sắt clorua ($FeCl_3$), kali natri tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$), kali clorua (KCl) của Trung Quốc, DPPH của Sigma...
- Thiết bị: Tủ ẩm hãng Memmerk (Đức), tủ cấy vô trùng Esco Smart Control (Úc), nồi hấp CL-40L (Nhật), máy đo bước sóng Bio-Rad SmartSpec Plus Spectrophotometer (Mỹ)....

2.2. Phương pháp

2.2.1. Sản xuất tỏi đen từ tỏi tươi

Tỏi được làm sạch, sau đó bọc kín trong giấy bạc, đem ủ ở nhiệt độ $70^\circ C$ và duy trì độ ẩm của không khí khoảng 80 - 90% từ 30 đến 35 ngày. Khi tỏi chín, làm khô tỏi trong tủ ẩm ở nhiệt độ $35^\circ C$ đến khi độ ẩm thành phần của tỏi đen đạt 40 - 45% thì thu nhận sản phẩm (Nguyễn Đức Vương, 2015). Bảo quản ở tủ mát $4^\circ C$ trong suốt quá trình nghiên cứu.

2.2.2. Xác định thành phần vật lý, hóa học của tỏi đen và tỏi tươi

- Xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở $115^\circ C$ (TCVN 4069, 2009).

Tỏi trắng được sấy trong tủ ẩm ở $40^\circ C$, lấy mẫu và kiểm tra độ ẩm của tỏi trong suốt quá trình sấy bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi (TCVN 4069, 2009) đến khi độ ẩm của tỏi đạt 45% tương ứng với độ ẩm của tỏi đen thì dừng lại. Xác định thành phần hóa học của tỏi trắng và tỏi đen như sau:

- Xác định hàm lượng nitơ tổng số bằng phương pháp Kjeldahl (AOAC, 2016).
- Phương pháp chuẩn bị dịch chiết tỏi: tỏi được chiết bằng phương pháp ngâm kiệt với cồn 96° . Tỏi được bóc vỏ, lấy 53 g mẫu tỏi ngâm trong 500 mL cồn 96° trong 48 giờ sau đó chiết thu phần dịch chiết và đem cô quay chân không được cao chiết cồn. Nguyên liệu thu được được giữ ở $4^\circ C$ cho đến khi sử dụng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2001).
- Xác định hàm lượng đường tổng và đường khử bằng phương pháp Bertrand (TCVN 7044, 2013).

2.2.3. Khảo sát hoạt tính sinh học của tỏi tươi và tỏi đen

- Định tính flavonoid: dịch chiết tỏi được kiểm tra với dung dịch NaOH 10%, phản ứng Shinoda với thuốc thử HCl đậm đặc và bột magie kim loại, phản ứng với dung dịch sắt (III) clorua 5% và phản ứng với chì acetate (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2001).
- Định lượng flavonoid bằng phương pháp trọng lượng (Nguyễn Kim Phi Phụng,

2001): Cân chính xác 10 g tỏi ($W = 45\%$) đã được nghiền nhỏ, chiết bằng n-hexan ở dụng cụ Soxhlet, dịch chiết đem cô quay chân không đuổi dung môi thu cao hexan. Phần bã tiếp tục chiết bằng etyl-acetate, đuổi dung môi dịch chiết bằng phương pháp cô quay thu cao etyl-acetate. Tiếp tục chiết bã bằng ethanol 70°, lặp lại tương tự ta có cao ethanol. Chiết bã bằng nước ấm, tương tự ta thu được cao nước. Gôm chung cao chiết các lần chiết ta được các flavonoid có độ phân cực khác nhau trong mẫu. Kết quả được tính theo công thức:

$$F(\%) = \frac{(M \times 100)}{M_0 \times (100 - W)} \times 100 (\%)$$

Trong đó: F là hàm lượng phần trăm flavonoid toàn phần, M là khối lượng flavonoid thu được, M_0 là khối lượng mẫu nguyên liệu ban đầu và W là hàm lượng ẩm của nguyên liệu

- Xác định hoạt tính chống oxy hóa: sử dụng phương pháp DPPH (Blois, 1958). Hỗn hợp phản ứng có thể tích 1500 μL gồm 750 μL DPPH (250 μM) và 750 μL cao chiết pha trong ethanol với các nồng độ khác nhau. Hỗn hợp được ủ trong tối ở 37°C trong 30 phút, sau đó đo độ hấp thụ của DPPH bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 517 nm. Thí nghiệm lặp lại tương tự với chứng dương là vitamin C với dãy nồng độ vitamin C cuối cùng trong phản ứng lần lượt là 1; 2; 5; 10 và 20 $\mu\text{g/mL}$. Khả năng kháng oxy hóa được tính dựa vào giá trị IC50 (khả năng trung hòa 50% gốc tự do) dựa trên phương trình tuyến tính của vitamin C và dịch chiết.

- Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn: Sử dụng phương pháp đo đường kính vòng kháng khuẩn của dịch chiết với *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* và *Staphylococcus*. Trải 50 μL dịch huyền phù các dòng vi khuẩn trên các đĩa môi trường LB, đục 2 giếng trên mỗi đĩa thạch, cho 15 μL dịch chiết tỏi các loại cho vào các giếng. Ủ 37°C trong 24 giờ, xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn D - d (mm) (Phạm Hùng Vân và Phạm Thái Bình, 2013).

2.2.4. Sản xuất nước mắt tỏi đen

- Xác định hàm lượng muối NaCl: Sử dụng phương pháp Mohr bằng cách dùng dung dịch chuẩn AgNO_3 (0,1 N) để phản ứng hết với muối có trong dung dịch trung tính với chất chỉ thị K_2CrO_4 (TCVN 3701, 2009).

- Lựa chọn tỷ lệ phối trộn tỏi đen và nước mắm thích hợp: Dựa trên hàm lượng chất chống oxy hóa trong tỏi đen (IC50), nhu cầu chất chống oxy hóa (vitamin C) tối thiểu mỗi ngày cho mỗi người và lượng muối trong nước mắm để tính toán tỷ lệ phối trộn giữa tỏi đen và nước mắm thích hợp nhằm tạo ra nước mắm tỏi đen thơm ngon. Pha chế 6 mẫu nước mắm tỏi đen với tỷ lệ lần lượt là 2g; 2,5g; 3g; 3,5g; 4g; 4,5g tỏi đen trong 15 mL nước mắm.

Để chọn lựa tỷ lệ phối trộn thích hợp giữa tỏi đen và nước mắm mà tại đó được nhiều người ưa thích nhất, chúng tôi sử dụng phép so hàng thị hiếu để đo mức độ hài lòng, chấp nhận và ưa thích của người sử dụng đối với sản phẩm mới. Phép thử được tiến hành trên 6 mẫu thử với số người thử là 60. Người thử được yêu cầu sắp xếp mẫu thử theo mức độ ưa thích tăng dần (hạng 1: ít được ưa thích và hạng 6: được ưa thích nhất). Kết quả sẽ được sử dụng để tính toán giá trị Friedman và giá trị LSRD (khác biệt thứ tự ưu tiên nhỏ nhất có ý nghĩa) (Nguyễn Hoàng Dũng và cs., 2007).

Kiểm định Friedman (F_{test}) sử dụng cho phép thử so hàng thị hiếu được tính toán theo công thức:

$$F_{\text{test}} = \frac{12}{j \cdot p \cdot (p+1)} (R1^2 + \dots + Rp^2) - 3 \cdot j \cdot (p+1)$$

Trong đó: *j* là số người thử; *p* là số sản phẩm; *R_i* là tổng hạng.

Công thức tính giá trị LSRD như sau:

$$LSRD = z \cdot \sqrt{\frac{j \cdot p \cdot (p+1)}{6}}$$

Trong đó: *z* được lấy từ phân bố chuẩn 2 đuôi với độ rủi ro $\alpha = 5\%$ là 1,96

Tiếp tục sử dụng phép thử mô tả để tìm hiểu những tính chất đặc trưng nào của nước mắm tỏi đen được ưa thích nhất và so sánh tính chất cảm quan đặc trưng về màu sắc, mùi, vị và trạng thái giữa 6 mẫu thử với nhau. Phép thử mô tả được thực hiện với hội đồng gồm 13 người là giảng viên Khoa Hóa, trường Đại học Bách Khoa Đà Nẵng. Sản phẩm là 6 mẫu nước mắm tỏi đen với các thuật ngữ mô tả được hội đồng thống nhất như sau:

Bảng 1. Bảng mô tả đặc tính của sản phẩm

Đặc tính	Thuật ngữ	Định nghĩa	Cách đánh giá
Màu sắc	Màu vàng	Mức độ vàng của màu	Đặt mẫu dưới ánh sáng trắng và quan sát mẫu theo góc thẳng đứng
Vị	Vị ngọt	Vị ngọt của tỏi đen	Trái mẫu đều trên bề mặt lưỡi, nuốt mẫu, đánh giá độ ngọt của mẫu
	Vị mặn	Vị mặn của muối có trong mẫu	Ngâm mẫu 2 giây, nuốt mẫu, cảm nhận vị mặn của mẫu
Mùi	Mùi tỏi đen	Mùi đặc trưng của tỏi đen như mùi thuốc bắc	Khứu giác
	Mùi mắm	Mùi nước mắm đặc trưng	Khứu giác
Trạng thái	Độ đồng nhất	Khả năng phân lớp	Đề mẫu 10 phút ở chế độ tĩnh, quan sát khả năng phân lớp dưới ánh sáng trắng
	Độ sánh	Trạng thái lỏng hoặc đặc của sản phẩm	Lấy mẫu và xem khả năng bám dính của mẫu trên thành bình

- Định lượng coliform: Hàm lượng coliform trong mẫu nước mắm và nước mắm tỏi đen được xác định bằng phương pháp định lượng MPN (TCVN 4882 - 2007).

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần, kết quả được tính toán trung bình, xử lý số liệu và vẽ đồ thị bằng phần mềm Excel 2003

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sản xuất tỏi đen từ tỏi tươi

Trong các giống tỏi phổ biến trên thị trường hiện nay như tỏi cô đơn, tỏi Hải Dương, tỏi Trung Quốc, tỏi Lý Sơn, chúng tôi chọn tỏi Hải Dương làm nguyên liệu nghiên cứu do loại tỏi này có tép lớn, giá thành rẻ phù hợp cho việc sản xuất tỏi đen. Mặc dầu tỏi Trung Quốc có kích thước tương tự và rẻ hơn nhưng chúng tôi không sử dụng do chúng được khuyến cáo không an toàn cho người sử dụng.

Tỏi sau khi ngâm được ủ ở 70°C và độ ẩm được duy trì ở 80% - 90% trong tủ ẩm. Độ ẩm là một trong những thông số quan trọng trong khi ủ tỏi, nếu độ ẩm không khí thấp, tỏi sẽ bị khô và khi chín sẽ có vị đắng, nếu độ ẩm duy trì quá cao, sản phẩm tỏi đen sẽ bị quá ướt, tỏi bị nhão và biến dạng, màu đen của thịt tỏi sẽ làm đen phần vỏ bên ngoài giảm tính cảm quan của sản phẩm. Trong nghiên cứu này, để duy trì được độ ẩm 80-90% trong suốt quá trình ủ ở nhiệt

độ cao, chúng tôi ngâm tỏi trong nước từ 4 – 5 giờ để nước ngấm qua lớp vỏ bên ngoài, sau đó bọc kín bằng giấy bạc để tránh hiện tượng mất nước do bay hơi. Dưới tác động của nhiệt độ cao trong quá trình ủ, nước ở lớp vỏ bên ngoài bốc hơi và làm tăng độ ẩm không khí trong gói giấy bạc. Sử dụng ẩm kế Testo 175 - H1 để đo độ ẩm của không khí trong gói giấy bạc. Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi nhận thấy ngâm tỏi trước khi ủ sẽ giúp duy trì độ ẩm không khí trong gói giấy bạc tốt hơn, tỏi không bị khô và độ ẩm không khí trong khối ủ được duy trì từ 80 – 90% trong khoảng 15 - 20 ngày đầu. Ở những ngày tiếp theo, nếu độ ẩm trong gói giấy bạc giảm, sử dụng bình phun nước dạng sương xịt nhẹ lên trên bề mặt tỏi rồi gói kỹ sẽ giúp làm tăng độ ẩm trong khối ủ. Theo thời gian kiểm tra và quan sát, màu trắng của tỏi giảm dần và ngày càng hóa nâu, mùi hăng nồng của tỏi cũng giảm và vị ngọt xuất hiện thay thế dần cho vị cay của tỏi. Vào ngày thứ 35, khi tỏi chín hoàn toàn, tép tỏi sẽ có màu từ nâu đậm đến đen, mềm và dẻo, có vị chua ngọt đậm đà, không có vị đắng và mùi không còn nồng mà dịu đi đáng kể. Tỏi sau khi chín được tiếp tục làm khô trong tủ ẩm ở 35°C từ 2 đến 3 ngày.



Hình 1. Tỏi tại các thời điểm lên men.

A. Tỏi ngày thứ 1 B. Tỏi ngày thứ 15 C. Tỏi ngày thứ 35

Trong quá trình lên men ở nhiệt độ và độ ẩm cao, các thành phần trong tỏi được phân cắt thành các sản phẩm đơn giản như các đường, các acid amin làm cho tỏi có vị ngọt và chua nhẹ. Bên cạnh đó, phản ứng giữa các đường và các acid amin giúp hình thành melanoidin làm tỏi có màu nâu đậm (Duk-Ju Choi và cs., 2008).

3.2. Xác định một số các thành phần hóa học

Kết quả xác định một số thành phần lý hóa của nguyên liệu tỏi tươi và tỏi đen thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Thành phần hóa học của tỏi (a: tính theo lượng chất khô tuyệt đối)

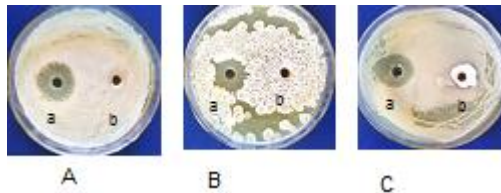
Chỉ tiêu	Tỏi tươi	Tỏi đen
Độ ẩm (%)	61,73 ± 0,5	45,39 ± 0,43
Đường khử ^a (mg/g)	20 ± 0,36	220 ± 2,1
Đường tổng ^a (mg/g)	92,5 ± 0,72	260 ± 1,27
Nitơ tổng số ^a (%)	3,95 ± 0,05	3,32 ± 0,08

Đường đóng vai trò tạo vị ngọt cho sản phẩm. Tỏi trắng có hàm lượng ẩm khá cao (61,73%), hàm lượng nitơ tổng số chiếm 3,32%, Sau khi lên men, độ ẩm của sản phẩm đạt 45,39%. Hàm lượng đường tổng của tỏi đen là 260 mg/g, tăng 2,8 lần so với tỏi tươi là 92,5 mg/g. Hàm lượng đường khử cũng tăng lên đáng kể, từ 20 mg/g trong tỏi tươi tăng 11 lần lên 220 mg/g trong tỏi đen. Lượng đường khử ở đây chính là tất cả các loại đường có chứa tác nhân khử là aldehyd và xetone, chúng tham gia phản ứng với các acid amin trong phản ứng Maillard để tạo màu đen cho tỏi (Duk-Ju Choi và cs., 2008).

3.3. Kết quả khảo sát các hoạt tính sinh học của tỏi tươi và tỏi đen

3.3.1. Hoạt tính kháng khuẩn

Kết quả xác định tính kháng khuẩn của tỏi đen và tỏi tươi được thể hiện ở hình 2. Dịch chiết tỏi tươi tạo vòng kháng khuẩn to và rõ nét với cả ba loại vi khuẩn. Đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết tỏi tươi với vi khuẩn *E.coli* là 25mm, với *Staphylococcus* là 21 mm và với *B. subtilis* là 23 mm. Trong khi đó, dịch chiết tỏi đen chỉ tạo vòng kháng khuẩn nhỏ, không rõ nét với vi khuẩn *E.coli*, không tạo được vòng kháng khuẩn với vi khuẩn *Staphylococcus* và vi khuẩn *B. subtilis*.



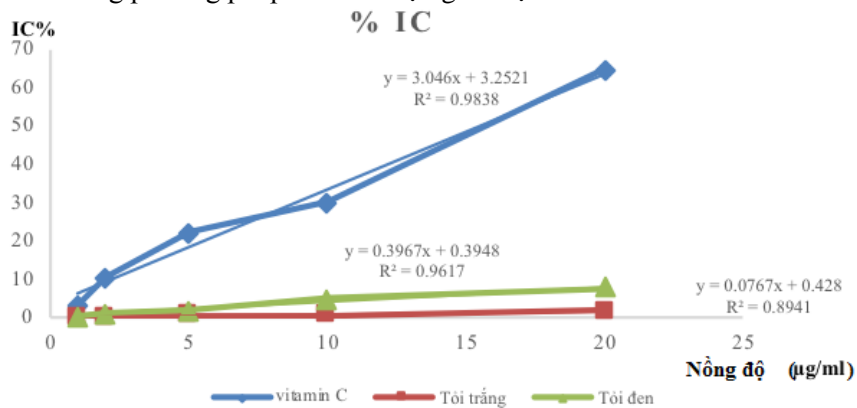
Hình 2. Kết quả vòng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi tươi và tỏi đen.

A. *E.coli*; B. *B.subtilis*; C. *Staphylococcus*

a. Vòng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi tươi b. Vòng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi đen

3.3.2. Hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết tỏi được đánh giá bằng phương pháp bẫy gốc tự do DPPH với chất chuẩn là vitamin C, thể hiện qua giá trị nồng độ của mẫu mà tại nồng độ đó có thể ức chế hoặc trung hòa 50% gốc tự do DPPH. IC50 có giá trị càng thấp thì khả năng chống oxy hóa của mẫu đó càng mạnh và ngược lại. Kết quả thử hoạt tính kháng oxy hóa của cao tỏi bằng phương pháp DPPH được ghi nhận ở Hình 3.



Hình 3. Biểu đồ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa của tỏi đen so với tỏi tươi và vitamin C.

Khả năng chống oxy hóa cũng như hiệu quả trung hòa gốc tự do của vitamin C và dịch chiết tỏi được so sánh dựa vào giá trị IC50. Giá trị IC50 của dịch chiết tỏi tươi và tỏi đen tính dựa vào phương trình tuyến tính của từng loại thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Giá trị IC50 của vitamin C và dịch chiết tỏi

Dịch chiết	Phương trình tuyến tính	IC50 (µg/mL)
Tỏi tươi	$Y = 0,0767x + 0,428, R^2 = 0,8941$	646,3
Tỏi đen	$Y = 0,3967x + 0,3948, R^2 = 0,9617$	125,04
Vitamin C	$Y = 3,046x + 3,2521, R^2 = 0,9838$	15,35

Kết quả cho thấy, khả năng chống oxy hóa của chất chuẩn vitamin C cao nhất rồi đến dịch chiết tỏi đen. IC50 của dịch chiết tỏi đen là 125,04 $\mu\text{g/mL}$, mạnh hơn gấp 5 lần của tỏi tươi với IC50 là 646,3 $\mu\text{g/mL}$.

Trong tỏi tươi, ngoài chất allicin - kháng sinh thảo mộc rất mạnh, còn các chứa các hợp chất sulfur và polyphenol có nhiều tác dụng sinh học khác (Duk-Ju Choi và cs., 2008; Lei Feng-Chao và cs., 2012; Sook Choi và cs., 2014). Các hợp chất này tạo mùi hăng cay có khả năng kháng khuẩn cao nên khả năng kháng khuẩn là một trong những tác dụng nổi bật của tỏi. Tuy nhiên, trong quá trình lên men, các chất allicin và các hợp chất sulfur lại được chuyển hóa thành các hợp chất chống oxy hóa như S-ally-cysteine, alkaloid và flavonoid. Do đó, khả năng chống oxy hóa của tỏi đen tăng lên nhưng khả năng kháng khuẩn lại thấp hơn so với tỏi tươi, đồng thời nhờ sự giảm hợp chất chứa gốc lưu huỳnh mà tỏi đen không có mùi hăng cay sau khi ủ.

3.3.3. Định tính và định lượng flavonoid

Để nhận biết sự có mặt của flavonoid trong dịch chiết tỏi, một số phản ứng hóa học định tính đặc trưng đã được tiến hành trong ống nghiệm.

Bảng 4. Phản ứng nhận biết flavonoid

Mẫu \ Phản ứng	NaOH 10%	FeCl ₃	Mg + HCl _d	Chì Acetat
Tỏi trắng	+	-	+	+
Tỏi đen	++	++	++	++
Chỉ thị nhận biết	Vàng đậm	Xanh đen	Đỏ cam	Tạo tủa
Nhóm flavonoid	Flavon, flavonol	Tùy lượng gốc OH	Flavon, flavanol, flavonol	Flavonoid phenol

Ghi chú: - không xuất hiện chỉ thị; + có xuất hiện chỉ thị; ++ xuất hiện chỉ thị rõ ràng

Bảng 4 cho thấy hợp chất flavonoid có mặt trong cả tỏi tươi và tỏi đen. Tuy nhiên, dấu hiệu nhận biết của dịch chiết tỏi đen cho phản ứng với các chất hóa học đậm màu, rõ ràng hơn so với dịch chiết tỏi trắng khi tác dụng với cùng một hóa chất. Điều đó chứng tỏ tỏi đen có hàm lượng flavonoid cao hơn trong tỏi trắng. Các hợp chất này là thành phần hóa học chính quyết định được tính quý giá của sản phẩm tỏi đen. Các mẫu tỏi tiếp tục được đem đi chiết flavonoid tổng số theo phương pháp trọng lượng. Rất khó có phương pháp chung để trích ly flavonoid do chúng có số lượng nhóm OH và các nhóm thế khác nhau trong cấu trúc hóa học. Trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng các chất hữu cơ có độ phân cực từ yếu đến mạnh để chiết các flavonoid có độ phân cực khác nhau. Kết quả, hàm lượng flavonoid của tỏi sau lên men là 49 mg/g chiếm tỉ lệ 5,02% cao hơn của tỏi tươi ban đầu là 6 mg/g chiếm tỷ lệ 0,604%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu khảo sát sự thay đổi hàm lượng acid amin và các hợp chất polyphenol và flavonoid của Sook Choi và cs. (2014), hàm lượng các hợp chất polyphenol và flavonoid của tỏi sau lên men cao hơn so với tỏi tươi.

3.4. Ứng dụng sản xuất nước mắt tỏi đen

3.4.1. Xác định tỷ lệ phối trộn phù hợp giữa tỏi đen và nước mắt

Lượng muối trong nước mắt Mùri Thu được xác định là 199,67 g/L. Dựa vào khuyến cáo lượng muối sử dụng của một người trên một ngày là 3 – 6 g, thì thể tích nước mắt để đáp ứng 50% nhu cầu muối trung bình cho một người trong ngày là 15 mL.

Theo Viện sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ, nhu cầu vitamin C tối thiểu bổ sung cho cơ thể không cố định, dao động từ 10 – 120 mg/ngày/người tùy thể trạng. Nếu cơ thể tiếp xúc nhiều với các chất độc hại như thuốc lá thì nên bổ sung thêm ít nhất 35 mg vào giá trị trên (National Institute of Health, 2011). vitamin C bổ sung cho cơ thể thông qua nguồn thực phẩm tuy nhiên không phải toàn bộ lượng vitamin C đưa vào sẽ được cơ thể hấp thụ hoàn toàn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn 150 mg/ngày/người làm thông số để tính số gram tối đen cần sử dụng cung cấp cho nhu cầu chống oxy hóa tối thiểu quy về chất chuẩn vitamin C. Dựa trên nhu cầu vitamin C tối thiểu của cơ thể hằng ngày và khả năng chống oxy hóa của tối đen IC50 là 125,04 $\mu\text{g/mL}$, chúng tôi đã tính ra được lượng tối đen cần sử dụng hằng ngày là 3 g.

Để sản xuất nước mắt tối đen, chúng tôi khảo sát khối lượng tối đen bổ sung trong 15 mL nước mắt với tỷ lệ lần lượt từ 2 – 4,5 g. Kết quả phép thử so sánh thị hiệu được thể hiện ở bảng sau:

Bảng 5. Tổng hạng đánh giá 6 mẫu nước mắt tối đen của hội đồng theo phép thử so sánh thị hiệu

Mẫu ($m_{\text{td}} : V_{\text{mắm}}$) (g/mL)	Tổng hạng	$F_{\text{Test}} = 190,81$
Mẫu 1 (2 : 15)	144	
Mẫu 2 (2,5 : 15)	275	
Mẫu 3 (3 : 15)	314	LSRD = 40,186
Mẫu 4 (3,5 : 15)	277	
Mẫu 5 (4 : 15)	156	
Mẫu 6 (4,5 : 15)	93	

Từ bảng giá trị tới hạn của khi-bình phương, giá trị tới hạn cho phép thử Friedman ($F_{\text{tra bảng}}$) là 11,07 ($p-1$ bậc tự do, $\alpha = 0,05$). $F_{\text{test}} (190,81) > F_{\text{tra bảng}}$, do đó, LSRD (sự khác biệt thứ hạng nhỏ nhất có ý nghĩa) cần được sử dụng để quyết định mẫu nào khác nhau có ý nghĩa. Những mẫu thử có thứ hạng cách nhau lớn hơn 40,146 được xem là khác nhau có ý nghĩa. Kết quả được tổng kết trong bảng sau:

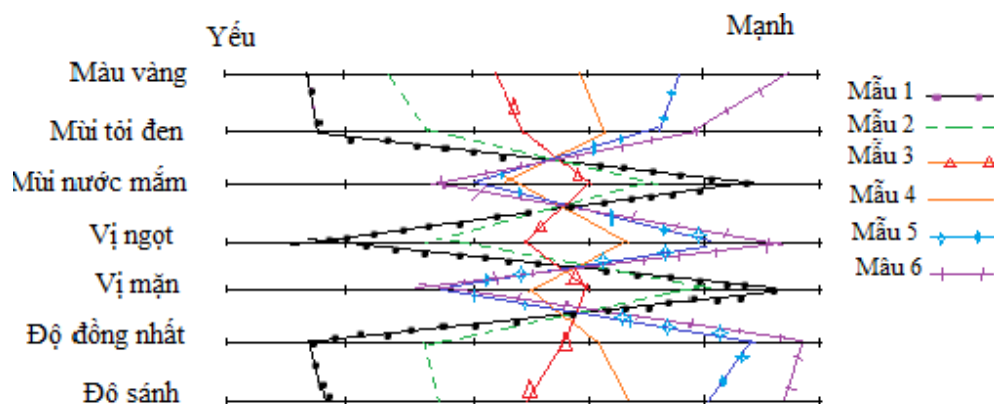
Bảng 6. Mức ý nghĩa của phép thử so hàng thị hiệu 6 mẫu nước mắt tối đen

Mẫu ($m_{\text{td}} : V_{\text{mắm}}$) (g/mL)	Tổng hạng	Mức ý nghĩa ¹
Mẫu 1 (2 : 15)	144	AE
Mẫu 2 (2,5 : 15)	275	BD
Mẫu 3 (3 : 15)	314	C
Mẫu 4 (3,5 : 15)	277	BD
Mẫu 5 (4 : 15)	156	AE
Mẫu 6 (4,5 : 15)	93	F

Ghi chú: ¹Những mẫu có cùng ký tự là không khác nhau có nghĩa ($p < 0,05$).

Vậy có sự khác biệt có ý nghĩa về mức độ ưa thích của người tiêu dùng giữa 6 mẫu thử ($p < 0,05$). Mẫu 3 có mức độ ưa thích cao nhất giữa các mẫu. Tiếp đến là mẫu 4 và mẫu 2 mặc dầu mẫu 2 và mẫu 4 khác nhau không có nghĩa. Mẫu 1 và mẫu 5 cũng khác nhau không có nghĩa trong đó mẫu 5 được ưa thích hơn mẫu 1. Mẫu ít được thích nhất là mẫu 6.

Khi biết có sự khác nhau về mức độ ưa thích chúng tôi tiếp tục sử dụng phép thử mô tả để tìm hiểu những tính chất đặc trưng của sản phẩm được hội đồng ưa thích nhất. Kết quả phép thử mô tả được trình bày ở sơ đồ sau:



Hình 4. Sơ đồ đánh giá cảm quan các mẫu mắm tòi đen bằng phép thử mô tả.

Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy: Mẫu 1 có màu vàng, mùi mắm gắt, không có mùi tòi đen, vị mặn gắt, có vị ngọt đầu lưỡi, trạng thái lỏng và phân lớp;

Mẫu 2 có màu vàng đậm, có mùi mắm, thoảng mùi tòi, vị mặn của mắm nhưng có vị ngọt hơn của tòi đen, trạng thái lỏng, phân lớp;

Mẫu 3 có màu vàng đậm, có mùi nước mắm và mùi tòi đen, vị mặn vừa phải kết hợp với vị ngọt của tòi, trạng thái sánh, không phân lớp;

Mẫu 4 có màu nâu đậm, mùi tòi đen rõ rệt, mùi mắm giảm, có vị mặn của mắm nhưng hơi ngọt, trạng thái sệt, không phân lớp;

Mẫu 5 có màu nâu đen, mùi tòi đen át mùi mắm, vị quá ngọt, trạng thái sệt nhiều, dẻo;

Mẫu 6 có màu đen, mùi tòi đen lấn át mùi mắm, vị quá ngọt, trạng thái đặc quánh, quá dẻo.

Vậy, với phép thử so hạng, mẫu nước mắm tòi đen với tỷ lệ phối trộn là 3 g tòi đen trong 15 mL nước mắm được ưa thích nhất, mẫu mắm tòi đen này khi đánh giá bằng phương pháp mô tả đặc tính của hội đồng cho thấy sản phẩm nước mắm tòi đen có màu vàng đậm, vừa có mùi thơm của tòi vừa có mùi vị đặc trưng của nước mắm, sản phẩm không bị phân lớp, độ sệt vừa phải.

3.4.2. Xác định hàm lượng coliform

Coliform là chỉ tiêu thông dụng để đánh giá mức an toàn vi sinh trong thực phẩm. Kết quả kiểm tra tổng số coliform trong 3 mẫu: nước mắm Mười Thu, nước mắm tòi đen ở ngày đầu tiên và nước mắm tòi đen sau 10 ngày để ở nhiệt độ phòng cho bảng tổng kết sau:

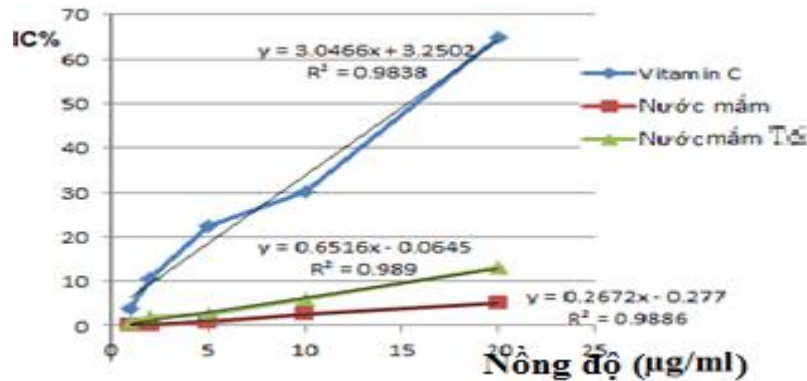
Bảng 7. Kết quả kiểm tra coliform trong các mẫu nước mắm

Mẫu	Coliform (CFU/mL)
Nước mắm	2 ± 0,00
Mắm tòi đen (1)	3 ± 0,00
Mắm tòi đen (10)	3 ± 0,00

Kết quả cho thấy có phát hiện coliform trong mẫu nước chấm. Tuy nhiên, hàm lượng coliform này đã có sẵn trong mẫu nước mắm ban đầu. Dựa theo quyết định số 46/2007/QĐ-BYT (2007) của bộ Y tế về tiêu chuẩn “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm”, giới hạn cho phép vi sinh vật trong gia vị và nước chấm đối với coliform là 10^2 (CFU/mL). Kết quả này chứng tỏ lượng coliform trong mẫu nước mắm tòi đen không vượt quá giới hạn qui định.

3.4.1. Kiểm tra hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm nước mắm tỏi đen

Để kiểm tra khả năng chống oxy hóa của sản phẩm sản xuất có giữ được hoạt tính ban đầu của tỏi đen hay không, tiến hành kiểm tra theo phương pháp DPPH.



Hình 5. Biểu đồ thể hiện hoạt tính chống oxy hóa của nước mắm, nước mắm tỏi đen so với vitamin C

Từ phương trình trên đồ thị, chúng tôi tính được IC₅₀ của vitamin C, của mắm tỏi đen, của nước mắm lần lượt là 15,35 µg/mL, 76,64 µg/mL và 186,09 µg/mL. Kết quả cho thấy khả năng chống oxy hóa của nước mắm tỏi đen cao hơn của nước mắm. Như vậy trong nước mắm tỏi đen, ngoài một lượng chất chống oxy hóa có sẵn trong nước mắm còn có thêm một lượng chất chống oxy hóa khác từ tỏi đen đưa vào.

4. KẾT LUẬN

Tỏi tươi qua quá trình lên men ở độ ẩm và nhiệt độ cao sẽ trải qua quá trình biến đổi các thành phần lý hóa của tỏi làm tỏi có màu đen, mềm, vị ngọt, không còn mùi hăng cay. Khả năng chống oxy hóa của tỏi đen tăng gấp 5 lần, hàm lượng flavonoid tăng 8 lần, hàm lượng đường tổng tăng 2,8 lần và đường khử tăng 11 lần so với tỏi tươi nên tỏi đen được xem là có giá trị dược tính cao hơn so với tỏi tươi. Tỏi đen được ứng dụng để sản xuất nước mắm tỏi đen với tỷ lệ tỏi đen và nước mắm là 3 : 15 (g/mL) cung cấp đủ lượng chất chống oxy hóa tối thiểu cho một người trong một ngày. Sản phẩm có mùi thơm của tỏi và mùi vị đặc trưng của nước mắm, sản phẩm không bị phân lớp, độ sệt sản phẩm vừa phải, đạt giới hạn về coliform và vẫn giữ được hoạt tính chống oxy hóa của tỏi đen ban đầu. Trong những nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiếp tục khảo sát các phương pháp khác nhau để bảo quản và duy trì chất lượng của sản phẩm, cũng như tiếp tục phát triển các sản phẩm mới như nước tương tỏi đen, sốt tỏi đen nhằm tạo ra nhiều sản phẩm chất lượng cho người tiêu dùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- Nguyễn Hoàng Dũng, Trương Cao Xuyên, Nguyễn Thị Minh Tú và Phan Thị Xuân Uyên. (2007). *Đánh giá cảm quan thực phẩm – Nguyên Lý và Thực hành*. Tp. Hồ Chí Minh: NXB Đại học Quốc Gia.
- Nguyễn Thanh Hải và Bùi Thị Tho. (2013). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn invitro của dịch chiết tỏi (*Allium Sativum* L) đối với E.coli gây bệnh và E.coli kháng Ampicillin, Kanamycin. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(6), 804 - 808.
- Nguyễn Kim Phi Phụng. (2001). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Tp. Hồ Chí Minh: NXB Đại học Quốc Gia.
- QĐ 46/2007/QĐ-BYT. (2007). *Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm*. Khai thác từ: <http://www.fsi.org.vn/pic/files/462007qdbyt.pdf>

- Hồ Anh Sơn và Vũ Bình Dương. (2014). Nghiên cứu tác dụng bảo vệ của dịch chiết tỏi đen đối với một số cơ quan lympho trên chuột bị chiếu xạ. *Tạp chí Y-Dược học Quân sự*, 9, 15 - 19.
- TCVN 3701. (2009). Thủy sản và các sản phẩm thủy sản – *Xác định hàm lượng muối*. Khai thác từ: <https://vanbanphapluat.co/tcvn-3701-2009-thuy-san-va-san-pham-thuy-san-xac-dinh-ham-luong-natri-clorua>
- TCVN 4069. (2009). *Kẹo, Xác định độ ẩm*. Khai thác từ: <https://vanbanphapluat.co/tcvn-4069-2009-keo-xac-dinh-do-am>.
- TCVN 4882. (2007). *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp phát hiện và định lượng Coliform - Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*. Khai thác từ: <https://vanbanphapluat.co/tcvn-4882-2007-phuong-phap-phat-hien-va-dinh-luong-coliform>.
- TCVN 7044. (2013). *Rượu mùi*. Khai thác từ: <http://tieuchuan.mard.gov.vn/Documents/Uploads/TCVN%207044-2013.pdf>
- Phạm Hùng Vân và Phạm Thái Bình. (2013). *Kháng sinh - Đề kháng kháng sinh - Kỹ thuật kháng sinh đồ. Các vấn đề cơ bản thường gặp*. NXB Y học, 61 - 63.
- Nguyễn Đức Vượng. (2015). Nghiên cứu lên men tỏi đen từ tỏi trắng xã Quảng Hòa - Quảng Trạch - Quảng Bình. *Tạp chí thông tin khoa học và công nghệ Quảng Bình*, 1.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Virginia
- Arunkumar, A, Vijayababu, M.R, Srinivasan, N, Aruldas, M.M, & Arunakaran, J. (2006). Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Molecular and cellular biochemistry*, 288(1-2), 107 - 113. DOI: 10.1007/s11010-006-9126-6.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Duk-Ju Choi, Soo-Jung Lee, Min-Jung Kang, Min-Jung Kang, Nak-Ju Sung, & Jung-Hye Shin. (2008). Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37(4), 465 - 471. DOI: [10.3746/jkfn.2008.37.4.465](https://doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.4.465).
- Lei Feng-Chao, Hao Guo, Zhu Li, Yang Ying, & Zhang You-Lin. (2012). Research progress in the nutritional value and health effects of black garlic. *Science and Technology of Food Industry*, 33(13), 429 - 432.
- National Institute of Health (2011), *Vitamin C*. Khai thác từ <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-Consumer/>
- Sook Choi, Han Sam Cha, & Young Soon Lee. (2014). Physicochemical and Antioxidant Properties of Black Garlic, *Molecules*, 19(10), 16811 - 16823. DOI: 10.3390/molecules191016811.
- Xin Wang, Fei Jiao, Qin-Wen Wang, Juan Wang, Ke Yang, Rong-Rong Hu, Han-Chen Liu, Hong-Yang Wang, & Yi-Shan Wang. (2012). Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports*, 5(1), 66 - 72.

RESEARCH ON THE COMPONENTS OF GARLIC AFTER FERMENTED AND APPLY FOR PRODUCING OF BLACK GARLIC FISH SAUCE

Doan Thi Hoai Nam, Le Duc Hoang Lan, Le Thi Thuy Tien
University of Science and Technology - The University of Danang;

Contact email: hoainamgvbk@yahoo.com.vn;

ABSTRACT

Black garlic, a fermented product without the participation of microorganisms from fresh garlic has been shown to have higher pharmacological effects than fresh garlic. In this research, we evaluated the components including physical and chemical norms and bio-activity of black garlic and found out the suitable ratio of black garlic and fish sauce to produce black garlic fish sauce which could be used to supplement our body's antioxidant. Besides, this product also helps not only to increase the economic value of black garlic but also to bring it nearer to the consumers. To produce black garlic, fresh garlic was annealed at 70°C, 80 - 90% moisture content for 35 days. Physical norms including color, taste, total sugar and reducing sugar, antioxidant and antibacterial activities of black garlic were evaluated and compared with those of fresh garlic. As a result, the black garlic is black, soft, sweet, and no pungent odor. Reduced sugar (220 mg/g) of black garlic was 11 times higher than that of white garlic (20 mg/g). Antioxidant capacity of black garlic (%IC₅₀ = 125.04 µg/mL) increased 5 times compared to fresh garlic (%IC₅₀ = 646.3 µg/mL). These obtained results were used to select the appropriate ratio of black garlic and fish sauce to create harmonious, delicious and rich antioxidant black garlic fish sauce which can be used in daily meals.

Key words: Antioxidant activity; fermentation; black garlic fish sauce; black garlic; fresh garlic.

Received: 28th October 2018

Reviewed: 14th January 2019

Accepted: 30th January 2019