

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



NGUYỄN THỊ THÙY LAM

**THỬ NGHIỆM LÊN MEN GIẤM TRÁI CÂY THEO
PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN HỒI LƯU CỐ ĐỊNH
VI KHUẨN TRÊN GIÁ THỂ**

Luận văn kỹ sư

Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 8/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

๑๑*๑๑

**THỬ NGHIỆM LÊN MEN GIẤM TRÁI CÂY THEO
PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN HỒI LƯU CỐ ĐỊNH
VI KHUẨN TRÊN GIÁ THỂ**

Luận văn kỹ sư

Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học

Giáo viên hướng dẫn:

Th.s VƯƠNG THỊ VIỆT HOA

Sinh viên thực hiện:

NGUYỄN THỊ THÙY LAM

Khóa: 2002 - 2006

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 8/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**EXPERIMENT OF FERMENTING FRUIT VINEGAR
BY METHOD MOBILIED CELL**

**Graduation thesis
Major: Biotechnololy**

**Professor
VUONG THI VIET HOA**

**Student
NGUYEN THI THUY LAM
Term: 2002 – 2006**

**Ho Chi Minh City
September,2006**

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn:

- Ban giám hiệu trường Đại Học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, Ban chủ nhiệm Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, cùng tất cả quý thầy cô đã truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tập tại trường.
- Th.s Vương Thị Việt Hoa, giảng viên khoa Công Nghệ Thực Phẩm đã hết lòng hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực tập tốt nghiệp.
- Cô Nguyễn Minh Hiền, phụ trách phòng thí nghiệm vi sinh đã hết lòng giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực tập.
- Chân thành cảm ơn bạn bè thân yêu lớp CNSH 28 cùng tất cả các bạn bè khác lớp đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Sinh viên thực hiện

Nguyễn Thị Thùy Lam

TÓM TẮT

NGUYỄN THỊ THÙY LAM, Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Tháng 8/2006. “THỬ NGHIỆM SẢN XUẤT GIẤM TRÁI CÂY THEO PHƯƠNG PHÁP HỒI LƯU CÓ ĐỊNH VI KHUẨN TRÊN GIÁ THỂ”.

Giáo viên hướng dẫn:

Th.s VƯƠNG THỊ VIỆT HOA.

Đề tài được thực hiện nhằm tạo điều kiện cho việc sử dụng triệt để nguồn nguyên liệu, tạo ra sản phẩm giấm ăn có nguồn gốc từ dịch trái cây lên men, có mùi thơm đặc trưng, giá thành thấp, đảm bảo an toàn vệ sinh cho người sử dụng.

Các thí nghiệm:

1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ rượu bổ sung trong quá trình lên men giấm từ nước dứa già.
2. Khảo sát các phương pháp lên men: lên men tĩnh, lên men động, lên men theo phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể. Chọn ra phương pháp tối ưu.
3. Khảo sát tính đa dạng của các loại chất mang vi khuẩn
 - Chất mang bằng chất liệu cellulose (bã mía).
 - Chất mang bằng chất liệu polymer (xốp).
4. Thử nghiệm sản xuất giấm trái cây từ dịch trái cây đã lên men rượu.
 - Sản xuất giấm điều từ dịch điều đã lên men rượu.
 - Sản xuất giấm sả từ dịch sả đã lên men rượu.
 - Sản xuất giấm trà.

Kết quả ghi nhận:

1. Xác định được nồng độ rượu thích hợp cho quá trình lên men giấm từ nước dứa già là 8%.
2. Phương pháp lên men tối ưu là phương pháp lên men hồi lưu, sản phẩm giấm sinh ra có nồng độ acid acetic cao và chất lượng tốt.
3. Sử dụng chất mang có chất liệu bằng cellulose hay polymer đều cho nồng độ acid acetic tương đương nhau. Tuy nhiên, đối với chất mang bằng chất liệu cellulose (bã mía), sản phẩm giấm rất trong nhưng không có màu trắng đặc trưng của giấm dứa; đối với chất mang bằng chất liệu polymer (xốp), sản phẩm giấm trong và có màu trắng đặc trưng của giấm dứa.
4. Sản xuất được một số giấm trái cây có mùi thơm đặc trưng, giàu vitamin như: giấm điều, giấm sả, giấm trà.

MỤC LỤC

Lời cảm ơn.....	i
Tóm tắt.....	ii
Mục lục	iv
Danh sách các bảng	viii
Danh sách các hình và sơ đồ	ix
Chương 1: MỞ ĐẦU	
1.1 Đặt vấn đề.....	1
1.2 Mục đích và yêu cầu.....	2
1.2.1 Mục đích	2
1.2.2 Yêu cầu	2
Chương 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
2.1 Tổng quan về vi khuẩn acetic	3
2.1.1 Đặc điểm sinh học của vi khuẩn acetic.....	3
2.1.2 Phân loại vi khuẩn acetic	4
2.2 Sơ lược về giấm - Ứng dụng	6
2.2.1 Sơ lược về giấm	6
2.2.2 Ứng dụng.....	6
2.3 Lên men giấm	6
2.3.1 Các loại giấm phổ biến trên thế giới	6
2.3.2 Cơ chế lên men giấm.....	6
2.4 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men giấm	8
2.4.1 Ảnh hưởng của Oxy.....	8
2.4.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ.....	8
2.4.3 Sự acid hóa dịch lên men	8
2.4.4 Hàm lượng rượu ethylic trong dịch lên men giấm.....	9
2.4.5 Các chất C, N, P và các nguyên tố vi lượng	9
2.5 Các phương pháp lên men	9
2.5.1 Phương pháp lên men chậm.....	9
2.5.2 Phương pháp lên men nhanh.....	10
2.5.3 Phương pháp lên men chìm.....	11
2.5.4 Phương pháp lên men hỗn hợp	11

2.6 Những kỹ thuật cần chú ý khi sản xuất giấm ăn.....	11
2.7 Một số nguyên nhân làm giảm chất lượng lên men giấm	12
2.7.1 Giấm bị đục và giảm độ chua	12
2.7.2 Hiện tượng lươn giấm.....	12
2.7.3 Bọ giấm.....	12
2.7.4 Ruồi giấm.....	13
2.8 Các công đoạn sau khi thu hoạch giấm	13
2.8.1 Bảo quản giấm	13
2.8.2 Lão hóa giấm.....	13
2.8.3 Gạn trong.....	13
2.8.4 Đóng chai và xử lý.....	13
2.8.5 Phương tiện bảo quản giấm thích hợp	14
2.9 Khái quát nguyên liệu.....	14
2.9.1 Nguyên liệu dứa.....	14
2.9.2 Nguyên liệu saboche	15
2.9.3 Nguyên liệu điều	16
2.9.4 Nguyên liệu trà xanh (chè).....	17
2.10 Chất mang vi khuẩn acetic	18
2.10.1 Yêu cầu đối với chất mang vi khuẩn acetic.....	18
2.10.2 Lựa chọn chất mang vi khuẩn.....	18
Chương 3: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM	
3.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu	20
3.2 Vật liệu thí nghiệm	20
3.2.1 Nguyên liệu.....	20
3.2.1.1 Giống vi khuẩn giấm	20
3.2.1.2 Nước dứa già và dịch nước quả.....	20
3.2.1.3 Các loại chất mang vi khuẩn.....	21
3.2.2 Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm.....	22
3.3.3 Hóa chất	23
3.2.4 Môi trường	23
3.3 Phương pháp thí nghiệm.....	24
3.3.1 Quy trình sản xuất giấm từ nước dứa già.....	24

3.3.2 Quy trình sản xuất giấm trái cây	25
3.4 Nội dung thí nghiệm	25
3.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ rượu bổ sung trong quá trình lên men giấm từ nước dứa già	25
3.4.2 Khảo sát các phương pháp lên men giấm	26
3.4.3 Khảo sát tính đa dạng của các loại chất mang vi khuẩn acetic	27
3.4.4 Thử nghiệm sản xuất giấm trái cây từ các loại dịch quả đã lên men rượu	27
3.4.4.1 Thử nghiệm sản xuất giấm saboche từ dịch saboche đã lên men rượu.....	28
3.4.4.2 Thử nghiệm sản xuất giấm điều từ dịch điều đã lên men rượu	28
3.4.5 Thử nghiệm sản xuất giấm từ trà xanh	29
3.5 Xử lý số liệu	29

Chương 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Xác định nồng độ rượu bổ sung thích hợp để đạt được nồng độ acid acetic cao nhất	20
4.2 Xác định phương pháp lên men tối ưu	31
4.3 Kết quả khảo sát tính đa dạng các loại chất mang vi khuẩn acetic	34
4.4 Sản xuất giấm trái cây từ dịch trái cây lên men	36
4.4.1 Sản xuất giấm điều từ dịch điều đã lên men rượu	36
4.4.2 Sản xuất giấm saboche từ dịch saboche đã lên men rượu	37
4.5 Sản xuất giấm trà.....	39

Chương 5: KẾT QUẢ VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận.....	41
5.2 Đề nghị	41

TÀI LIỆU THAM KHẢO

DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 2.1: Thành phần hóa học của dứa.....	14
Bảng 2.2: Thành phần hóa học của sáoche.....	15
Bảng 2.3: Thành phần hóa học của quả điều.....	16
Bảng 2.4: Thành phần hóa học của trà xanh	17
Bảng 4.1: Nồng độ acid acetic thu được sau quá trình lên men ở thí nghiệm 1.....	30
Bảng 4.2: Nồng độ acid acetic ở các phương pháp lên men	32
Bảng 4.3: Nồng độ acid acetic sinh ra ở thí nghiệm 3	34
Bảng 4.4: Nồng độ acid acetic từ lên men giấm điều.....	36
Bảng 4.5: Nồng độ acid acetic từ lên men giấm sáoche.....	37
Bảng 4.6: Nồng độ acid acetic từ lên men giấm trà	39

DANH SÁCH CÁC HÌNH VÀ SƠ ĐỒ

HÌNH	TRANG
Hình 2.1: Vi khuẩn <i>Acetobactor aceti</i>	5
Hình 2.2: Quá trình oxy hóa rượu thành acid acetic	7
Hình 2.3: Nguyên liệu saboche	15
Hình 2.4: Nguyên liệu điều.....	16
Hình 2.5: Nguyên liệu trà	17
Hình 2.6: Bã mía.....	19
Hình 2.7: Xốp	19
Hình 4.1: Sản phẩm giấm từ 2 quá trình lên men.....	35
Hình 4.2: Sản phẩm giấm điều	36
Hình 4.3: Sản phẩm giấm saboche	38
Hình 4.4: Sản phẩm giấm trà	39
Hình 4.5: Sản phẩm giấm trái cây	40
ĐỒ THỊ	
Đồ thị 4.1: Ảnh hưởng của nồng độ rượu trong dịch lên men đến hàm lượng acid acetic tạo thành	30
Đồ thị 4.2: Khảo sát các phương pháp lên men	32
Đồ thị 4.3: Khảo sát tính đa dạng các loại chất mang	35
SƠ ĐỒ	
Sơ đồ 3.1: Xử lý nguyên liệu điều.....	20
Sơ đồ 3.2: Xử lý nguyên liệu saboche.....	21
Sơ đồ 3.3: Xử lý nguyên liệu trà.....	21
Sơ đồ 3.4: Quy trình sản xuất giấm từ nước dứa già.....	24
Sơ đồ 3.5: Quy trình sản xuất giấm trái cây	25
Sơ đồ 4.1: Quy trình sản xuất giấm điều	37
Sơ đồ 4.2: Quy trình sản xuất giấm saboche	38
Sơ đồ 4.3: Quy trình sản xuất giấm trà.....	40

Chương 1. MỞ ĐẦU

1.1 Đặt vấn đề

Việt Nam là nước nông nghiệp có khí hậu nhiệt đới nên có nhiều loại rau quả đặc trưng, giàu chất dinh dưỡng, thơm ngon: dưa, saboche, điều, chuối, đu đủ,... Theo số liệu của bộ nông nghiệp và phát triển nông thôn, đến nay sản lượng rau quả Việt Nam đạt gần 10 triệu tấn, tỷ lệ hư hao sau thu hoạch trên 20% và chỉ mới chế biến được khoảng 6% tổng sản lượng hàng năm.

Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu để tìm biện pháp hạn chế thất thoát sau thu hoạch, nâng cao giá trị sử dụng của các loại rau quả. Ví dụ như chế biến các sản phẩm từ trái cây: đóng hộp, sấy khô, làm mứt, nước hoa quả, các loại rượu vang trái cây...

Việc chế biến giấm luôn gắn liền với hoạt động bảo quản và chế biến rau quả vì phần lớn lớp vỏ, quả bị loại, các sản phẩm bỏ đi khi xử lý rau quả vẫn có thể được sử dụng để sản xuất các sản phẩm lên men như giấm.

Trong quá trình sản xuất rượu vang còn một lượng lớn dinh dưỡng và bã trái cây sau khi thẩm thấu chưa được sử dụng triệt để. Đây là một nguồn có thể sử dụng để lên men giấm.

Giấm nuôi ở nước ta hiện nay chỉ sản xuất ở quy mô hộ gia đình, giá thành khá cao so với giấm hoá học, nhưng chất dinh dưỡng lại thấp, giấm lại bị đục, độ chua không cao.

Nhằm tạo điều kiện cho việc sử dụng triệt để nguồn nguyên liệu, tạo ra sản phẩm giấm ăn có nguồn gốc dịch trái cây lên men, có mùi thơm đặc trưng, giá thành thấp, đảm bảo vệ sinh an toàn cho người sử dụng. Được sự chấp nhận của bộ môn Công Nghệ Sinh Học, trường Đại Học Nông Lâm tp.Hồ Chí Minh và sự hướng dẫn tận tình của Th.s Vương Thị Việt Hoa, chúng tôi tiến hành đề tài:” **Nghiên cứu lên men giấm trái cây theo phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể**”.

1.2 Mục đích và yêu cầu của đề tài

1.2.1 Mục đích

- Tận dụng dịch của một số loại trái cây nhằm tạo ra sản phẩm giấm trái cây có hương vị đặc trưng, làm gia vị trong công nghệ chế biến thực phẩm, đảm bảo chất lượng vệ sinh

- Khảo sát tính đa dạng của các loại chất mang vi khuẩn acetic.

1.2.2 Yêu cầu

- Khảo sát một số phương pháp lên men giấm.

- Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ rượu bổ sung lên quá trình lên men giấm.

- Tạo ra một số sản phẩm giấm trái cây nhằm đa dạng hóa sản phẩm giấm.

Chương II: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Tổng quan về vi khuẩn acetic

2.1.1 Đặc điểm sinh học của vi khuẩn acetic

Ngày nay người ta đã biết hơn 20 loài vi khuẩn có khả năng lên men acetic, chúng có tên chung là vi khuẩn acetic. Những vi khuẩn này dễ tìm thấy trong không khí, đất, nước. các dịch nước quả, bia, rượu có nồng độ thấp, dịch đường... để tiếp xúc với không khí dễ bị vẩn đục nhẹ, trên bề mặt tạo thành một lớp màng mỏng, màng mỏng mịn màu trắng xám hoặc vàng xám. Đó là do các vi khuẩn acetic phát triển. Trước đây Pasteur cho rằng quá trình lên men giấm là do một loại vi khuẩn thuộc nhóm *Acetobacter* hoặc *Bacterium*. Những vi khuẩn acetic không những oxy hóa được rượu ethylic thành acid acetic mà còn oxy hóa được rượu proryonic thành acid propyonic, rượu butylic thành acid butyric; nhưng chúng không oxy hóa được rượu methylic và những rượu bậc cao. Trong môi trường đủ rượu ethylic (5-13%) thì sản phẩm chủ yếu là acid acetic, ở nồng độ rượu thấp hơn các vi khuẩn acetic oxy hóa triệt để rượu thành CO₂ và H₂O [Lương Đức Phẩm, 1998].

Vi khuẩn acetic là các trực khuẩn, không sinh bào tử, có hình que, bầu dục, kích thước: $0,8 \times (1,0-3,0)$ μm , có dạng đơn, sợi, chuỗi, một số loài có dạng xoắn, dạng cầu, que phình ra, hình chùy... Các vi khuẩn này có loài chuyển động được nhờ tiêm mao, có loài không chuyển động được. Khi tế bào còn non là vi khuẩn Gr⁻, khi già chúng có thể thay đổi Gram. Chúng hầu hết là Catalase dương tính, không có oxydase, thường tạo sắc tố. Một số chúng tạo váng màu hồng nhờ Parphyrens

Vi khuẩn acetic thuộc nhóm hiếu khí. Tốc độ sinh trưởng của chúng rất nhanh, từ một tế bào sau 12 giờ có thể sinh sản thành 17 triệu tế bào. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển chúng tạo thành acid acetic, ở nồng độ acid thấp sẽ kích thích sự phát triển của chúng [Lương Đức Phẩm, 1998]

Vi khuẩn acetic có khả năng đồng hóa các nguồn cacbon khác nhau như etanol, glucose, fuctose, sacharose, maltose, glycerin, lactose,... không có khả năng sử dụng tinh bột, có khả năng đồng hóa được đạm hữu cơ. Còn nguồn khoáng, vitamin thì đòi hỏi phải có acid pantothenic và các chất khoáng (K, Ca, Fe, S, P,...) mới đồng hóa được.

Các loài vi khuẩn acetic sinh trưởng ở nhiệt độ tối ưu trong khoảng 23-30°C và pH tối ưu là 5,5-6,2. Chúng có khả năng chịu acid cao, một số có thể phát triển ở pH<3,2.

Những vi khuẩn acetic có đặc điểm là dễ thay đổi hình dạng tế bào. Trong những điều kiện sinh trưởng không bình thường tế bào có : dạng sợi to và dài , phình trương lên hoặc có những hình thù kỳ lạ.

2.1.2 Phân loại vi khuẩn acetic

Hiện nay trên thế giới đã tìm ra trên 20 loài vi khuẩn acetic - gọi chung là *Acetobacter* – là một loại trực khuẩn khá lớn thuộc loại hiếu khí bắt buộc, nhiệt độ thích hợp cho chúng phát triển từ 30-40°C .

Vi khuẩn acetic thuộc 2 giống *Acetobacter* (chu mao) và *Acetomonas* (tiêm mao ở một đầu) . Nhiều loại khi phát triển lâu trên môi trường dễ dàng sinh ra những dạng có hình thái đặc biệt (tế bào phình to hay keo dài, có thể phân nhánh).

Vi khuẩn *Acetobacter* phân bố rộng trong tự nhiên, nhất là trên thực phẩm, hoa quả, không khí, nhiều trường hợp có thể phát đồng thời với nấm men trên cơ chất thực vật có nhiều đường.

Dưới đây là một số chủng vi khuẩn điển hình:

- *Acetobacter aceti*: vi khuẩn này có hình dạng giống như vi khuẩn hình que khác, nhưng kích thước rất ngắn. Chúng không thể tạo được bào tử và các tế bào thường tạo thành hình chuỗi có kích thước rất dài. Khi nhuộm iot tế bào chuyển thành màu vàng. Chúng chịu được nồng độ rượu 11% thể tích và trong môi trường thuận lợi chúng có khả năng tạo ra được 6% acid acetic. Nhiệt độ thích hợp nhất để *Acetobacter aceti* phát triển là 34°C.

- *Acetobacter pasteurianum*: hình thái giống *Acetobacter aceti*, nhưng khi nhuộm với iot tế bào sẽ cho màu xanh. Khả năng chịu nồng độ cồn của chúng thấp hơn của *acetobacter aceti*. Trong điều kiện môi trường thuận lợi chúng có khả năng tạo được 5-6% acid acetic.

- *Acetobacter orlcanense*: hình thái vi khuẩn này giống hai vi khuẩn trên nhưng lại có kích thước nhỏ hơn nhiều. Đặc biệt hai đầu của tế bào thường nhỏ lại. Nhiều trường hợp người ta lẫn lộn giữa vi khuẩn này với vi khuẩn kỵ khí *Clostridium*. Trong dịch nước cấy, chúng thường tạo ra một vầng rất mỏng, trên bề mặt vầng vi khuẩn thường rất chắc. Khi nhuộm với iot, tế bào chỉ sang màu vàng.

Vi khuẩn này chịu được lượng cồn đến 12%V, và trong điều kiện lên men thích hợp, chúng có thể tạo ra được 9,5% acid acetic.

- *Acetobacter xylinum*: Vi khuẩn này khi phát triển trong môi trường thuận lợi có thể tạo ra 4,5% acid acetic và tạo ra một màng rất dày trên bề mặt môi trường.

Ở nhiều nước như Trung Quốc, Triều Tiên và Nhật Bản, người ta thường sử dụng vi khuẩn này cùng với nấm men để sản xuất ra loại thức uống rất đặc hiệu.

- *Acetobacter schiitzenbachii*: Vi khuẩn này thuộc vi khuẩn hình que, nhưng kích thước của chúng dài hơn các giống đã trình bày ở trên. Chúng không tạo bào tử, không có khả năng chuyển động, thuộc nhóm Gr⁻.

Khi phát triển ở môi trường lỏng chúng tạo lớp màng dày nhưng không chắc. Ở các nước trên thế giới, người ta sử dụng chúng để sản xuất giấm theo phương pháp chìm.

Trong điều kiện môi trường thuận lợi, chúng có khả năng tạo được 11-12% acid acetic.

- *Acetobacter curvum*: Về cơ bản vi khuẩn này giống *Acetobacter schiitzenbachii*. Trong môi trường thuận lợi, vi khuẩn này có thể tạo ra được 10-11% acid acetic. Vi khuẩn *Acetobacter curvum* tạo váng rất chắc trên bề mặt môi trường. Nhiệt độ lên men tối ưu của vi khuẩn này là 35-37°C.

- *Acetobacter suboxydans*: Được sử dụng nhiều trong công nghệ sản xuất vitamin C. Chúng có khả năng chịu được nồng độ cồn rất cao. Nếu trong môi trường ta chọn thêm một lượng nhỏ các chất dinh dưỡng cần thiết vi khuẩn này có thể chuyển hoá cồn thành acid acetic. Lượng acid acetic tạo được từ quá trình lên men có thể lên đến 13%.

Nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn này tiến hành lên men là 28-30°C. Thời gian lên men xảy ra rất nhanh, chỉ cần 48 giờ, lượng acid acetic có thể đạt được 13%.



Hình 2.1: Vi khuẩn *Acetobacter acetii*

2.2 Sơ lược về giấm - Ứng dụng

2.2.1 Sơ lược về giấm

Giấm là loại gia vị được sử dụng từ các nguyên liệu có đường hoặc bột bằng cách lên men rượu và acid acetic. Từ giấm trong tiếng Pháp là “Vinaigre” có nghĩa là vang chua.

Có rất nhiều loại giấm: giấm quả, giấm gạo, giấm mật... Giấm quả được chế biến bằng cách cho nước quả lên men rượu và acid acetic.

Giấm được dùng trong sản xuất dưa muối, tương ớt, và dùng như một gia vị trong nấu nướng.

2.2.2 Ứng dụng

Acid acetic được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất như: làm sản phẩm trung gian để tổng hợp acid monocloacetic, etylacetat, butylacetat, cellulose acetat, aceton, trong công nghiệp cao su (điều chế vinylacetat) tổng hợp nhựa PVA, trong dược phẩm (điều chế aspirin) , trong công nghiệp thực phẩm (làm giấm ăn, sản xuất bánh kẹo,...)

2.3 Lên men giấm

2.3.1 Các loại giấm phổ biến trên thế giới

- Balsamic Vinegar: đây là loại giấm cổ truyền được lên men từ một loại vang nho trắng, loại nho này phát triển ở vùng núi Modena thuộc nước Ý. Trong quá trình lên men giấm, người ta cho thêm một thanh gỗ (Balsamic) có nhựa thơm vào thùng lên men nhằm tạo hương vị đặc trưng. Giấm thành phẩm có màu nâu sẫm, vị chua ngọt.

- Malt Vinegar: là giấm truyền thống rất phổ biến ở nước Anh, được lên men từ ngũ cốc.

- Raspberry Red win Vinegar: loại giấm này làm từ rượu vang đỏ. Giấm có màu đỏ sậm với hương tự nhiên của cây Raspberry.

- Rice Vinegar: hầu hết giấm trong suốt, không màu, một số ít có màu vàng nhạt, hơi đục. Loại giấm này được sử dụng rộng rãi tại các nước châu Á.

- Coconut and cane Vinegar: là loại giấm phổ biến ở Ấn Độ, Philipine và Indonesia.

- Date Vinegar: phổ biến ở Địa Trung Hải.

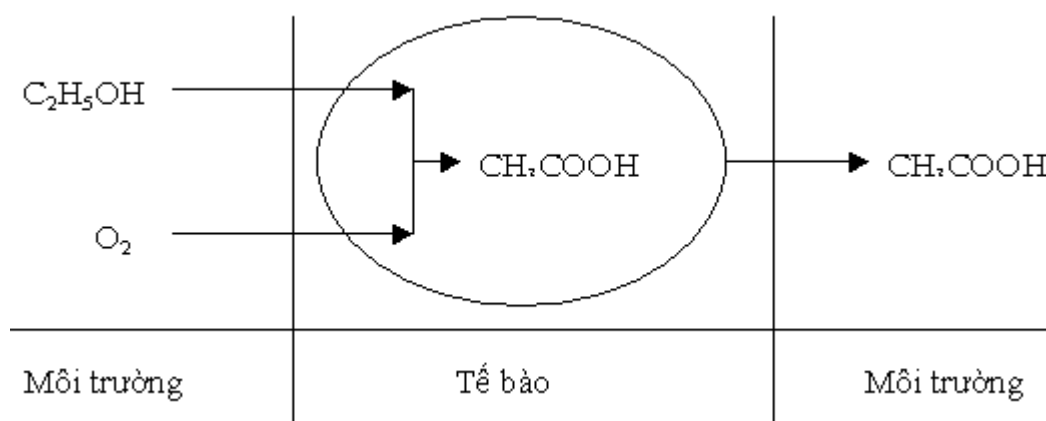
2.3.2 Cơ chế lên men giấm

Lên men acid acetic là quá trình oxy hóa cồn thành acid acetic, nhờ vi khuẩn acetic, trong điều kiện hiếu khí.

Phương trình tổng quát của quá trình lên men là:

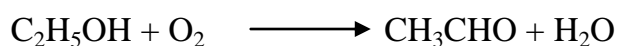


Phản ứng xảy ra trong tế bào của vi khuẩn. Muốn phản ứng được xảy ra, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ và O_2 phải được thẩm thấu vào trong tế bào. Khi đó các enzyme oxy hóa có trong tế bào của vi khuẩn tham gia oxy hóa rượu tạo thành CH_3COOH . CH_3COOH được tạo thành sẽ thoát ra khỏi tế bào và tan trong dung dịch môi trường.

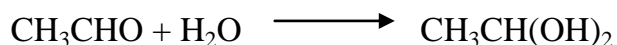


Hình 2.2: Quá trình oxy hóa rượu thành acid acetic

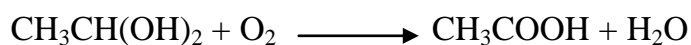
Trong tế bào của vi khuẩn, quá trình oxy hóa xảy ra rất phức tạp. Quá trình này xảy ra qua hai giai đoạn. Các giai đoạn được tóm tắt như sau:



Acetaldehyd



Hydrate acetaldehyd



Phương trình tổng quát:

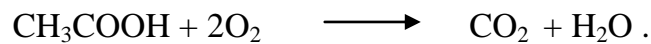


Ngoài khả năng oxy hóa cồn thành acid acetic, các vi khuẩn acetic còn có khả năng tham gia chuyển hóa một loại các loại rượu khác thành acid tương ứng và các chất khác.

- Chuyển hóa rượu propyonic \longrightarrow acid propyonic.
- Chuyển hóa rượu butanol \longrightarrow acid butylic.

- Chuyển hóa rượu glycerin \longrightarrow dioxyaceton.
- Chuyển hóa sobic \longrightarrow sorbose.
- Chuyển hóa arabino \longrightarrow acid arabanic.
- Chuyển hóa glucose \longrightarrow acid glucosenic.
- Chuyển hóa acid lactic \longrightarrow acid glucosenic.

Điều nên lưu ý là, trong quá trình lên men rượu, vi khuẩn acetic sẽ tham gia quá trình oxy hoá acid acetic thành CO_2 và H_2O để nhận năng lượng dùng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của mình.



Chính vì thế sau khi lên men, bao giờ người ta cũng để lại một lượng rượu khoảng 0,3-0,5% để vi khuẩn có thể sử dụng cồn mà không sử dụng acid acetic như một nguồn năng lượng.

2.4 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men giấm

Theo Ebner và Hromatka (1949-1953), acid acetic được tạo thành bởi chính các tế bào sinh sản. Do vậy, tác động quan trọng nhất đối với quá trình lên men giấm là thành phần môi trường, nhiệt độ và chế độ thông khí, sự thay đổi chế độ nuôi cấy làm thay đổi các thông số : tốc độ sinh sản /giờ, sinh khối(%), nồng độ sản phẩm giấm (% acid acetic).

2.4.1 Ảnh hưởng của Oxy

Theo cơ chế của quá trình oxy hóa, lượng không khí cho quá trình lên men giấm là tương đối lớn. Để oxy hóa hết 1kg rượu khan cần $2,3\text{m}^3$ không khí (theo lý thuyết), hay để oxy hóa hết 1mol rượu cần 1mol O_2 . Qua thực tế nhiều tác giả cho thấy lượng oxy cần thiết phải lớn gấp đôi lượng oxy theo lý thuyết. Thực tế càng thoáng khí năng suất càng cao (nhưng có giới hạn do khả năng tạo acid của chủng đã chọn).

2.4.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Vi khuẩn *Acetobacter* thuộc nhóm ưa ấm, nhiệt độ thích hợp từ 25-32°C. Ở nhiệt độ thấp quá trình lên men giấm xảy ra chậm. Ở nhiệt độ cao sẽ ức chế sự hoạt động và đến mức độ nào đó sẽ đình chỉ sự sinh sản của tế bào làm tăng tổn thất cho vi khuẩn và làm giảm hiệu suất quá trình lên men do sự bay hơi acid acetic và rượu.

2.4.3 Sự acid hoá dịch lên men

Trong sản xuất giấm người ta cho vào cơ chất ban đầu một lượng giấm nhất định để acid hóa môi trường nhằm : ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật có hại, đưa vào dịch lên men một lượng tế bào nhất định.

Độ acid ban đầu có thể dao động từ 2-6%. Theo nghiên cứu của Eapen và Rao năm 1979, hiệu suất cao nhất đạt được ở độ acid ban đầu là 2 %. Những công trình gần đây cho thấy để được hàm lượng acid cao hơn, người ta tiến hành lên men ở nồng độ acid ban đầu 2-6% [Abrini và ctv, 1992]. Tuy nhiên hàm lượng acid cao sẽ hạn chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và làm giảm khả năng lên men. Theo Henry, cho thấy nồng độ acid ban đầu 8% đã ức chế hoạt động của vi khuẩn rất lớn. Lượng acid ban đầu cần hoạt hóa là 2-2,5% [Nodes.E, 1986], 2% [Ebner, 1985].

2.4.4 Hàm lượng rượu ethylic trong dung dịch lên men giấm

Rượu ethylic cũng giống như acid acetic là một chất sát khuẩn với vi khuẩn *Acetobacter*, nó được sử dụng như một cơ chất. Hàm lượng rượu có thể thay đổi từ 2-10% thể tích, hàm lượng rượu cao hơn sẽ làm giảm năng suất lên men. Ebner (1985) và Heirich (1987) cho lượng rượu ethylic sử dụng từ 2-10% thể tích. Lượng rượu ethylic duy trì trong môi trường luôn giữ ở 3-3,5% thể tích [Nodes, 1986].

Để tránh hiện tượng tiếp tục oxy hóa đến CO₂ và H₂O, cần có một lượng rượu trong giấm từ 0,2-0,5% thể tích. Lượng rượu sót trong giấm có tác dụng ức chế sự tổng hợp enzyme oxy hóa acid acetic và muối acetac (Dires, 1973).

2.4.5 Các chất C, N, P và các nguyên tố vi lượng

Để quá trình oxy hoá xảy ra nhanh trong dung dịch lên men cần bổ sung thêm một số muối khoáng: K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, FeCl₃.6H₂O, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄,...tùy theo nhu cầu cụ thể của từng loài. Ngoài ra còn bổ sung thêm vitamin và các chất kích thích sinh trưởng như: glucoza, cao nấm men, pepton...

2.5 Các phương pháp lên men

Yếu tố quan trọng quyết định hiệu suất của một phương pháp sản xuất acid acetic chính là bề mặt tiếp xúc giữa oxy của không khí và cơ chất. Đến thời điểm hiện tại đã có 4 phương pháp sản xuất acid acetic bằng cách lên men:

- Phương pháp lên men chậm.
- Phương pháp lên men nhanh.

- Phương pháp lên men chìm.
- Phương pháp lên men hỗn hợp.

2.5.1 Phương pháp lên men chậm

Phương pháp chậm còn gọi là phương pháp Orleans hay phương pháp Pháp. Phương pháp này được biết đến năm 1670, khởi đầu là vùng trồng nho nổi tiếng ở nước Pháp. Do người ta nhận thấy dịch vang nho để trong những thùng gỗ hủ nếp dần dần bị đục, có màng phủ trên bề mặt và trở nên chua.

Đây là phương pháp lâu đời nhất, quá trình lên men diễn ra ở bề mặt tiếp xúc giữa khối dịch lên men và không khí trong những thùng lên men đặt nằm ngang.

Để tiến hành sản xuất giấm theo phương pháp này, tiến hành như sau: đổ vào thùng 1/5 thể tích giấm tươi chất lượng cao để acid hóa, sau đó đổ thêm dịch lên men vào cho đến ½ thể tích thùng. Tiếp theo cứ mỗi chu kỳ đổ thêm dịch lên men cho đến khi đầy. Khi nào nhận thấy rượu đã oxy hóa gần hết lấy một phần giấm ra để đem chế biến và bảo quản, đồng thời cho tiếp dịch lên men vào để lên men tiếp.

Khi lên men, vi khuẩn giấm phát triển tạo thành màng vi sinh vật trên bề mặt thoáng, khi bị chấn động (do va chạm hay quá trình đổ dịch lên men vào và tháo sản phẩm ra) nó sẽ bị phá vỡ, chìm xuống tiêu thụ cơ chất mà không tạo acid acetic. Dần dần trên bề mặt thoáng lại hình thành màng vi khuẩn mới và lại diễn ra quá trình lên men tiếp tục.

Do hạn chế của bề mặt thoáng nên phương pháp này có những nhược điểm sau: thời gian lên men dài, nồng độ acid acetic thấp, năng suất thấp. Tuy vậy, phương pháp này có ưu điểm là giấm thơm ngon, thiết bị dễ chế tạo.

2.5.2 Phương pháp lên men nhanh

Phương pháp này tạo được bề mặt tiếp xúc pha giữa lỏng, khí và vi sinh vật lớn nhờ bổ sung vật liệu bám trong thiết bị nên năng suất và hiệu suất cao hơn.

Ở phương pháp này người ta tưới dịch lên men, bên trong có đồ đầy vật liệu bám và màng vi khuẩn mới ở trên bề mặt, không khí đi ngược chiều từ dưới lên, dịch lên men được chuyển hóa nhanh nhờ vi khuẩn. Nếu thiết bị lên men đủ cao, điều kiện vận hành được khống chế tốt thì chỉ cần cho dịch lên men qua tháp một lần đã có thể thu được giấm đặc ở đáy. Phương pháp này có những ưu và nhược điểm:

- Ưu điểm:
 - + Thời gian lên men ngắn
 - + Thiết bị tương đối đơn giản, năng suất cao, ổn định
 - + Giấm thu được có nồng độ acid cao (có thể đến 11-12%)
- Nhược điểm:
 - + Hiệu suất không cao
 - + Phải chọn vật liệu bám phù hợp

2.5.3 Phương pháp lên men chìm

Ở phương pháp này, không khí sục qua khối dịch lên men mãnh liệt sẽ tạo thành một thể huyền phù có pha rắn là vi khuẩn giấm, pha lỏng là dịch lên trong các thiết bị lên men có tên là acetator, dịch lên men được chuyển hoá thành giấm rất nhanh .

2.5.4 Phương pháp lên men hỗn hợp

Đây là phương pháp lai giữa hai phương pháp nhanh và chìm. Thiết bị lên men này gồm hai phần:

- Phần trên như generator có đồ đầy đệm, hoạt động theo nguyên tắc lên men nhanh.
- Phần dưới (phần chứa dịch sau khi đi qua vật liệu bám) có lắp thêm bộ phận sục khí tạo thành vùng oxy hóa bổ sung như một acetator trong phương pháp chìm.

Khi ngừng cung cấp oxy qua bộ phận sục khí (khi ngắt điện) vẫn không ảnh hưởng đến vi khuẩn vì lúc đó các vang thông khí trong thiết bị được mở ra và không khí đi vào nhờ thông khí tự nhiên, do đó màng vi khuẩn trên đệm vẫn không bị chết.

Phương pháp này khắc phục được nhược điểm và phát huy ưu điểm của hai phương pháp nhanh và chìm.

2.6 Những kỹ thuật cần chú ý khi sản xuất giấm ăn

Vi khuẩn acetic thường tiêu hóa rất ít các chất dinh dưỡng. Để có được giấm có chất lượng cao và tránh hiện tượng nhạt ở phôi bào cần phải bổ sung các chất dinh dưỡng làm nhiều lần, mỗi lần với lượng thấp, vì dùng với liều cao sẽ làm cho vi khuẩn phát triển mạnh, kém khả năng lên men hoặc tạo điều kiện cho các vi khuẩn khác phát triển. Nếu trường hợp lên men bị yếu, thì có thể bổ sung vào môi trường chất malt hoặc bia.

Môi trường nhân giống hoặc lên men cần được acid hóa bằng chính acid acetic nhằm kích thích giống phát triển và ức chế các vi khuẩn khác.

Thiết bị lên men và các phôi bào đã vô trùng cũng cần tiến hành acid hóa bằng acid acetic 6-9%. Cách tiến hành như sau: phôi bào đã tiệt trùng bằng nồi autoclave đem xếp vào thiết bị lên men, sau đó cho dòng acid acetic 6-9% đi qua phôi bào trong một thời gian, cuối cùng thu lại phần acid đó trước khi cho dịch lên men vào thiết bị.

Trong quá trình lên men liên tục thì có thể không cần nhân giống lại mà hiệu suất lên men vẫn đảm bảo. [Lương Đức Phẩm, 1998]

2.7 Một số nguyên nhân làm giảm chất lượng lên men giấm

2.7.1 Giấm bị đục và giảm độ chua

Trong sản xuất giấm, thường xảy ra hai quá trình oxy hóa:

- Quá trình oxy hóa C_2H_5OH thành CH_3COOH
- Quá trình oxy hóa CH_3COOH thành CO_2 và H_2O

Quá trình oxy hóa C_2H_5OH thành CH_3COOH là quá trình có lợi cho sản xuất. Quá trình oxy hóa CH_3COOH thành CO_2 và H_2O là quá trình có hại cho sản xuất. Trong quá trình oxy hóa này có thể xảy ra hai hướng: oxy hóa hóa học và oxy hóa sinh học. Oxy hóa sinh học chuyển CH_3COOH thành CO_2 và H_2O xảy ra do nấm *Comdida mycoderma*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti* gây ra. Các giống vi sinh vật này có khả năng tạo màng nhầy làm cho giấm đục và tạo cặn.

Người ta khắc phục tình trạng này bằng cách cho lên men lại và trước khi lên men phải vệ sinh thiết bị lên men thật sạch hoặc thanh trùng Pasteur ở nhiệt độ 60-70°C, hoặc cho thêm vào giấm $K_2S_2O_5$ với liều lượng 5-15gam/100 lít giấm kết hợp với thanh trùng Pasteur để tăng độ bền của giấm.

2.7.2 Hiện tượng lươn giấm

Lươn giấm có tên khoa học là *Angiullula aceti*. Chúng thuộc loại động vật như giun tròn, rất nhỏ, có màu hồng. Con đực ở tuổi trưởng thành có kích thước 1mm, con cái ở tuổi trưởng thành có kích thước 1-2 mm.

Nếu nồng độ giấm < 6%, lươn giấm rất dễ phát triển. Nồng độ giấm cao khoảng > 9%, chúng bị ức chế và không thể phát triển được.

Lươn giấm thường sử dụng vi khuẩn acetic như nguồn dinh dưỡng. Tuy nhiên, chúng cũng có khả năng sử dụng C_2H_5OH , CH_3COOH , đường, các chất hữu cơ chứa nitơ để phát triển. Chúng thường không gây độc cho người mà chỉ gây đục giấm và làm giảm hiệu suất lên men.

Để phòng ngừa lươn giấm phát triển, người ta thường cho vào giấm thành phẩm 1-2% NaCl (muối ăn). Sau 1-2 ngày lươn giấm chết, người ta đem lọc hoặc đưa nhiệt độ lên đến 40-50°C, sau đó lọc giấm để loại bỏ lươn giấm.

2.7.3 Bộ giấm

Trong sản xuất giấm, người ta thường thấy hai loại bộ giấm.

Loại to, màu trắng, có kích thước 0,8-1,5mm

Loại nhỏ, màu nâu, có kích thước 0,3-0,4mm.

Người ta thường dùng dầu khoáng bôi vào những nơi hay có bộ giấm. Trong trường hợp có nhiều bộ giấm ở thiết bị lên men, người ta phải dùng hơi nóng để diệt chúng.

2.7.4 Ruồi giấm

Ở những cơ sở sản xuất giấm, người ta thường thấy có rất nhiều ruồi giấm. Ruồi giấm thường có màu nâu đỏ, có kích thước khoảng 2,5-3mm. Ruồi giấm thường phát triển ở phần trên, phần dưới của thiết bị lên men. Chúng làm giảm acid acetic, sinh ra những ấu trùng ăn vi khuẩn lactic và thường là vật trung gian lây nhiễm các vi sinh vật gây hại giấm. Do đó cần phải hạn chế sự xuất hiện ruồi giấm bằng cách che kín cửa, đậy kín các phần hở của thiết bị lên men và vệ sinh đất khu sản xuất.

2.8 Các công đoạn sau khi thu hoạch giấm

2.8.1 Bảo quản giấm

Khi quá trình lên men vẫn còn tiếp tục, nghĩa là rượu vẫn chưa chuyển hóa hết thành giấm thì chưa được nhập giấm vào kho. Các thùng giấm phải được đậy

kín. Nếu để mở, các vi khuẩn tạo acid acetic và các enzyme của chúng sẽ dần dần bị oxy hóa và phân hủy. Vì vậy không được oxy lọt vào thùng giấm.

2.8.2 Lão hóa giấm

Giấm được lão hóa bằng cách để lâu có mùi vị dễ chịu, nhất là khi giấm được sản xuất từ các loại nước quả có mùi thơm. Trong giai đoạn lão hóa giấm, các este được hình thành và mùi chua gắt của giấm tươi sẽ dần biến mất.

2.8.3 Gạn trong

Gạn trong giấm trước khi đóng chai bằng cách lọc giấm. Trộn đều thạch, bentonit với giấm rồi để lắng trong, dùng xi phông hút phần giấm trong ở trên ra chai, thao tác làm thật chậm để cặn ở trong chai không vẩn lên. Cứ 300 lít giấm ta dùng 1kg bentonit và 5% thạch (tính theo trọng lượng).

2.8.4 Đóng chai và xử lý

Giấm phải được lão hóa và gạn trong trước khi đóng chai. Cho giấm vào đầy chai rồi nút thật kín để ngăn không khí lọt vào chai. Khử trùng giấm bằng cách làm nóng chai giấm ở nhiệt độ 65°C cho đến khi giấm trong chai đạt 60°C trong khoảng 30 phút. Nếu số lượng giấm lớn ta có thể dùng phương pháp: khử trùng tất cả lượng giấm rồi để nguội đến 24°C thì đóng chai ngay.

2.8.5 Phương tiện bảo quản giấm thích hợp

Giấm có khả năng ăn mòn cao, thậm chí nó còn ăn mòn cả thép không gỉ nếu tiếp xúc lâu. Sắt rất dễ bị giấm ăn mòn, còn kẽm bị giấm ăn mòn và tạo ra acetat kẽm có mùi khó chịu và rất độc, ngay cả đồng cũng không nên dùng để đựng giấm vì đồng cũng tác dụng đến mùi vị của giấm. Chỉ những vật liệu như: gỗ, nhôm, thủy tinh, cao su cứng, gỗ ép hoặc giấy đã qua xử lý là có thể dùng để đựng giấm.

2.9 Khái quát nguyên liệu

2.9.1 Nguyên liệu dừa

Dừa có tên khoa học là *Cocos Nucifera*, có hai giống chính là dừa cao và dừa lùn được trồng phổ biến ở các nước Philippine, Indonesia, Malaysia, Việt Nam. Khi dừa chín có thành phần trung bình theo trọng lượng như sau: cơm dừa 30%, vỏ dừa 33,5%, gáo dừa 15%, nước dừa 21,5%.

Bảng 2.1: Thành phần hóa học của dứa

Thành phần	% Khối lượng
Chất khô	4.71
Đường tổng	2.08
Khoáng	0.02
Protein	0.55
Béo	0.74

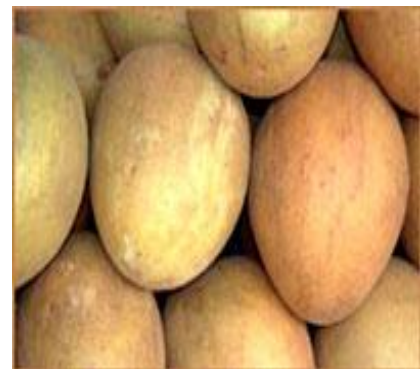
(Nghiên cứu sử dụng tổng hợp cây dứa-Phạm Hoàng Hộ-NXB GD 1970)

Ngoài ra trong nước dứa già còn có rất nhiều acid amin và vitamin như Lysin, Histidin, Prolin, Glysin, Acid Glutamic, Acid Ascorbic, Acid Penthotennic, Acid Folic, Acid Nicotinic, Riboflavin.

Các chất kích thích sinh trưởng như: Zeatin, Sorbitol, Hexitol, Phicocosine... chính thành phần phong phú của các chất kích thích sinh trưởng này khiến nước dứa trở thành môi trường dinh dưỡng thích hợp để nuôi cấy vi sinh vật.

2.9.2 Nguyên liệu saboche

Saboche (*Manilkara zapota*, Linn Van royen hay *Achras zapota* Linn) còn gọi là hồng xiêm hay lòng mứt, là loại cây quen thuộc của vùng nhiệt đới và bán nhiệt đới. Saboche đã trồng ở nhiều nơi, kể cả vùng đất bị nhiễm mặn, ven biển (những vùng chuyên canh như xã Vĩnh Kim, Kim Sơn, Song Thuận, Phú Phong huyện Châu Thành với diện tích



Hình 2.3: Nguyên liệu saboche

23000 tấn/năm). Cây có khả năng cho nhiều trái trong năm, năng suất cao (20 – 40 tấn/ha từ năm thứ 7 trở đi), mau cho trái.

Quả saboche chín ăn rất ngon, có mùi nhẹ, mát và mềm ngon, chứa nhiều loại vitamin (như vitamin A, B1, B2, C,...). Đây là thứ quả quý cho người già, trẻ em, người có bệnh dạ dày.

Phần ăn được của trái saboche chứa một lượng dưỡng chất (trong 100 g phân tích) như sau (Intergan et al., 1968).

Bảng 2.2: Thành phần hoá học của Sabôchê

Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
Phaen aên nơôic	84	Laân (mg)	9
Aâm nơã (%)	74,1	Saét (mg)	1
Naêng lờõing (calo)	96	Natrium (mg)	5
Protein (%)	0,5	Kalium (mg)	198
Lipid (%)	0,9	Vitamin A (IU)	85
Carbohydrates (%)	24,1	Vitamin B1 (mg)	0,01
Chaát xô (%)	3	Vitamin B2 (mg)	0,01
Muoái khoaùng (%)	0,4	Niacin (mg)	0,3
Calcium (mg)	32	A. ascorbic (mg)	26

Sabôchê gồm các giống: Sabôchê Xuân Đĩnh, sabôchê Thanh Hà, sabôchê quả trám, sabôchê quả nhót, sabôchê quả dài, Sabôchê Đồ Trạch (còn gọi là hồng Dấm).

2.9.3 Nguyên liệu điều

Cây điều là cây hoang dại, mọc tự nhiên ở các bãi cát ven biển và trong rừng tự nhiên ở quần đảo Anti, Brasil và lưu vực sông Amazon thuộc Nam Mỹ.

Cây điều là loại cây vùng nhiệt đới có tên khoa học là *Anacardium occidentale* Linne thuộc họ *Anacardiaceae* bộ *Rutates*.



Hình 2.4: Nguyên liệu điều

Quả điều có tính giải nhiệt, mùi hương hấp dẫn và chứa một lượng vitamin dồi dào. Khi chín quả có màu vàng hoặc đỏ tùy loại.

Dựa vào màu sắc của quả ta có hai loại chính là điều đỏ và điều vàng. Mỗi loại có chứa về số lượng các chất khác nhau. Theo nghiên cứu cho thấy các thành phần bên trong quả điều được ghi nhận như sau:

Bảng 2.3: Thành phần hóa học của quả điều:

Thành phần	Quả đỏ	Quả vàng
Nước	85.92	86.83
Tro	0.44	0.51
Đường	7.74	7.26
Đạm	0.88	0.52
Chất béo	0.33	0.27
Glucid khác	0.86	0.98
Tanin	0.42	0.48
Cellulose	3.36	3.34
Acid citric	0.20	0.16

Ngoài ra, điều còn chứa một số lượng vitamin (đặc biệt là vitamin C) và muối khoáng canxi, phospho, sắt...

Tuy nhiên, quả điều có vị chát và nếu xử lý không kịp thời sẽ làm biến màu dịch quả do quả điều có hàm lượng tanin cao.

2.9.4 Nguyên liệu trà xanh (chè):

Cho đến nay nguồn gốc cây chè vẫn là một sự tranh cãi lớn và chưa đến sự thống nhất nào về xuất xứ của cây chè. Tuy nhiên các công trình nghiên cứu và khảo sát trước đây cho rằng nguồn gốc cây chè là từ vùng Vân Nam Trung Quốc, nơi có nhiệt độ khí hậu nóng ẩm quanh năm (Kingdon-Ward, 1951). Cây chè có nguồn gốc từ vùng



Hình 2.5: Nguyên liệu trà

Đông Nam Á, trải dài từ Tây (vùng Assam, Ấn Độ) sang Đông (Trung Quốc) và kéo dài xuống phía Nam (vùng Tây Bắc, Việt Nam) (Mathews và Steplan, 1998).

Về phân loại thực vật, cây chè thuộc ngành thực vật hạt kín *Angiospermae*, lớp song tử diệp *Dicotyledonace*, bộ chè *Theales*, họ chè *Theaceace*, chi chè *Camellia*, loại *Sinensis*.

Ở Việt Nam, chè được trồng ở 34/36 tỉnh thành phố.

Hợp chất EGCG trong chè có khả năng là một giải pháp ngăn chặn sự lây truyền của bệnh AIDS và làm giảm các tỉ lệ ung thư, tim mạch cùng các chứng viêm khớp. Ngoài ra, chè xanh còn có tác dụng giảm béo.

Bảng 2.4: Thành phần hóa học của trà xanh

Thành phần	Hàm lượng (%)
Nước	75-85
Hợp chất phenol	
Hợp chất amin	30
Hợp chất Alkaloid	7-10
Hợp chất tinh dầu	0,02
Hợp chất Nitrogen	16-25
Hợp chất Pectin	2-3
Các chất vô cơ	4-7
Cafein	4-5

Ngoài ra, trà xanh còn chứa:

- Các nhóm sắc tố
- Vitamin: hầu hết là vitamin không tan trong nước bao gồm: provitamin A, các vitamin thuộc nhóm B như B1, B2, P, C, PP.
- Enzyme: + Enzyme thủy phân: amilase, protease
+ Enzyme oxy hóa khử: polyphenoloxydase

2.10 Chất mang vi khuẩn acetic

2.10.1 Yêu cầu đối với chất mang vi khuẩn acetic

Chất mang vi khuẩn acetic là yếu tố quan trọng quyết định tính hơn hẳn của phương pháp nhanh so với phương pháp chậm. Vì vậy yêu cầu đối với chất mang phải thích hợp với chức năng làm vật mang vi khuẩn acetic:

- Có độ bền cơ học cao, diện tích bề mặt riêng lớn, độ xốp cao.
- Khối lượng riêng tương đối nhỏ.

- Có tính trơ, tức không phản ứng với dịch lên men, không khí và sản phẩm lên men, cũng như không tiết ra các chất hóa học gây độc hại đối với vi sinh vật và mùi khó chịu cho giấm.

- Độ nhám và xốp để màng vi khuẩn có thể bám chặt ở một chế độ thủy động lực học nhất định.

- Rẻ tiền, dễ kiếm, ổn định.

2.10.2 Lựa chọn chất mang vi khuẩn

- Chất mang bằng chất liệu cellulose:

Trong các loại chất mang có nguồn gốc cellulose có những ưu điểm phù hợp với điều kiện Việt Nam hiện nay như: công nghệ gia công không phức tạp, rẻ tiền, dễ kiếm (tre, bã mía, gỗ, ...).

Trước đây, nhiều công trình nghiên cứu thử nghiệm với nhiều loại vật liệu bám chứa cellulose khác nhau như phoi gỗ, lõi ngô, tre nứa, ...

Bã mía là loại vật liệu bám dễ kiếm, rẻ tiền, có đầy đủ điều kiện của một loại vật liệu mang. Vì vậy nó được chọn sử dụng làm vật liệu mang trong luận văn.

- Chất mang bằng chất liệu polymer:

Xốp nệm là một loại polymer có đầy đủ điều kiện của một chất mang: có tính trơ tức không phản ứng với dịch lên men, khối lượng riêng nhỏ, có độ nhám xốp để vi khuẩn acetic có thể bám, dễ kiếm, dễ gia công..



Hình 2.5: Bã mía



Hình 2.6: Xốp

Chương 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

3.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: từ tháng 2 đến tháng 7 năm 2006.

Địa điểm: phòng thí nghiệm vi sinh-khoa Công Nghệ Thực Phẩm-trường Đại Học Nông Lâm tp.Hồ Chí Minh.

3.2 Vật liệu thí nghiệm

3.2.1 Nguyên liệu

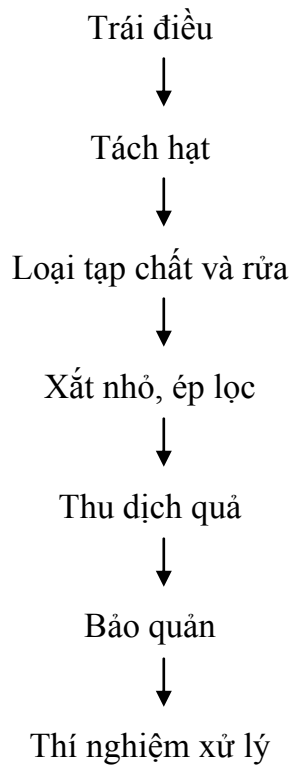
3.2.1.1 Giống vi khuẩn lên men giấm: vi khuẩn *Acetobactor aceti* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Vi Sinh, Khoa Công Nghệ Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh.

3.2.1.2 Nước dứa già và dịch nước quả:

a, Nước dứa già được mua ở chợ Suối Tiên

b, Dịch điều:

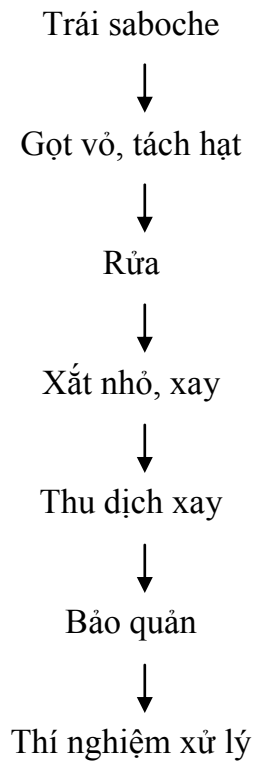
Trái điều được hái trên cây và được xử lý như sau:



Sơ đồ 3.1: Xử lý nguyên liệu điều

c, Dịch Saboche:

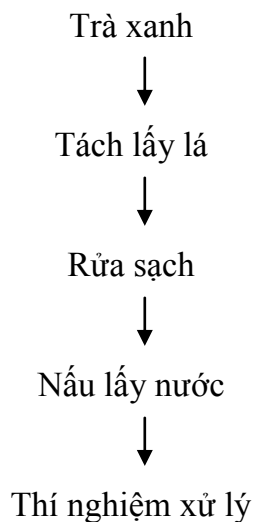
Trái saboche được mua từ chợ và xử lý như sau:



Sơ đồ 3.2: Xử lý nguyên liệu saboche

d, Nước trà xanh:

Trà xanh được mua từ chợ và được xử lý như sau:



Sơ đồ 3.3: Xử lý nguyên liệu trà

3.2.1.3 Các loại chất mang vi khuẩn:

Bã mía và xốp được khử trùng qua nước nóng, sấy khô. Sau đó đem ngâm với dịch cấy giống trong 1 ngày rồi cho vào bình lên men một cách ngẫu nhiên.

3.2.2 Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm:

- Máy đo pH: 744 pH Metrolum.
- Buret tự động chuẩn độ acid.
- Những dụng cụ trong phòng thí nghiệm: ống nghiệm, pipet, bình tam giác, ống đong, que cấy, đĩa petri,...
- Tủ sấy, nồi autoclave, máy lắc, cân điện tử, tủ cấy vô trùng...
- Thiết bị lên men hồi lưu:
 - + Thiết bị sục khí. [AC 220/240v; 50Hz; 30 – 35w]
 - + Máy bơm FM 1200.[AC 220/240v; 50Hz; 17/20 w]
 - + Bình chứa A, B: làm bằng nhựa PEP có dung tích 21l/bình.



Hình 3.1: Thiết bị lên men hồi lưu

Thiết bị lên men hồi lưu bao gồm:

- Bình A: chứa dịch lên men
- Bình B: chứa vật liệu mang và vi khuẩn acetic, là nơi lên men giấm.
- Bộ phận bơm dịch lên men và thông khí

3.2.3 Hóa chất

Những hóa chất được sử dụng trong thí nghiệm: NaOH, CH₃COOH, CaCO₃, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, glucoza, pepton, rượu ethylic, agar, phenoltalin, gelatin.

3.2.4 Môi trường

- Môi trường cấy giống:

Nước dừa già: 5 lít

Đường: 100g

Cồn thực phẩm: 250ml

Giống (từ lên men chậm)

- Môi trường Hansen lỏng:

Glucoza: 50g

Pepton: 10 g

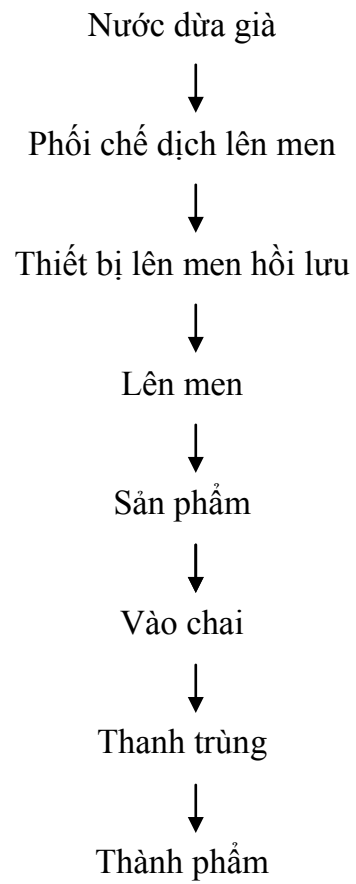
KH₂PO₄: 3 g

MgSO₄: 3-5 g

Nước cất: 1 lít

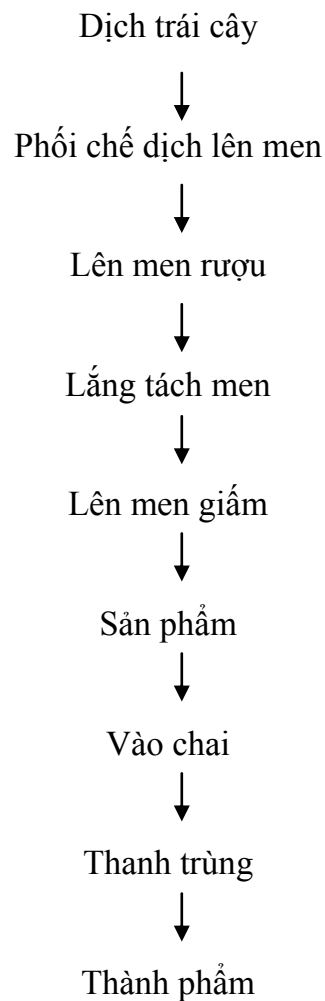
3.3 Phương pháp thí nghiệm

3.3.1 Sản xuất giấm dừa bằng phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể



Sơ đồ 3.4: Quy trình sản xuất giấm từ nước dừa già

3.3.2 Sản xuất giấm trái cây bằng phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể



Sơ đồ 3.5: Quy trình sản xuất giấm trái cây

3.4 Nội dung thí nghiệm

3.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ rượu bổ sung trong quá trình lên men giấm từ nước dứa già.

Mục đích: Xác định nồng độ rượu thích hợp để nồng độ acid acetic sinh ra lớn nhất.

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố 3 lần lặp lại.

Nước dứa già được phối chế dịch lên men với các nồng độ rượu khác nhau, sau đó tiến hành lên men trong các bình lên men theo phương pháp lên men có sục khí.

Nồng độ rượu (%V)	4	6	8	10
Nồng độ acid acetic (%)				

- Các thông số cố định:

Thể tích lên men: 10 lít

Đường: 2%

Nồng độ acid acetic ban đầu: 0.5%

Nồng độ rượu bổ sung:

Nhiệt độ lên men: nhiệt độ phòng

PH = 5.2

- Thời gian lên men: 10 ngày

- Cách lấy mẫu: 1 lần/ngày

- Phương pháp phân tích: dựa vào phương pháp chuẩn độ acid – bazơ để xác định nồng độ acid acetic trong mẫu.

- Chỉ tiêu theo dõi: nồng độ acid acetic sinh ra.

3.4.2 Khảo sát các phương pháp lên men giấm.

Mục đích: xác định phương pháp lên men giấm tối ưu sử dụng cho lên men giấm trái cây.

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố 3 lần lặp lại.

Nghiệm thức tối ưu trong thí nghiệm 1 được sử dụng trong thí nghiệm này.

Nước dứa già sau khi phối chế dịch lên men, cho lên men bằng những phương pháp khác nhau: lên men tĩnh, lên men có sục khí, lên men theo phương pháp hồi lưu.

- Lên men tĩnh: dịch lên men được cho vào bình, đậy nắp, để nơi yên tĩnh.
- Lên men có sục khí: dịch lên men được cho vào bình, sục khí liên tục.
- Lên men theo phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể: dịch lên men được cho vào thiết bị lên men hồi lưu.

Phương pháp lên men	Lên men tĩnh	Lên men có sục khí	Lên men theo phương pháp hồi lưu
Nồng độ acid acetic (%)			

- Các thông số cố định:
 - Thể tích lên men: 10 lít
 - Đường: 2%
 - Nồng độ acid ban đầu: 0.5%
 - Nhiệt độ lên men: nhiệt độ phòng
 - pH = 5.2
- Chỉ tiêu theo dõi: nồng độ acid acetic sinh ra

3.4.3 Khảo sát tính đa dạng của các loại chất mang vi khuẩn acetic.

Mục đích: Xác định từng loại vật liệu mang phù hợp để sản xuất các loại giấm khác nhau.

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 1 yếu tố 3 lần lặp lại.

Nghiệm thức tối ưu trong các thí nghiệm trước được sử dụng trong thí nghiệm này.

Nước dừa già được phối chế dịch lên men với các thông số cố định. Cho lên men trong trong thiết bị lên men hồi lưu. Thiết bị hồi lưu sử dụng vật liệu mang vi khuẩn: chất mang bằng chất liệu cellulose (bã mía), chất mang bằng chất liệu polymer (xốp).

Chất liệu mang vi khuẩn	Chất liệu bằng cellulose (bã mía)	Chất liệu bằng polymer (xốp)
Nồng độ acid acetic (%)		

- Các thông số cố định:
 - Thể tích lên men : 10 lít
 - Đường: 2%
 - Nồng độ acetic ban đầu: 0.5%
 - Nhiệt độ lên men: nhiệt độ phòng
 - pH = 5.2
- Thời gian lên men: 8 ngày
- Cách lấy mẫu: 1lần/ngày
- Chỉ tiêu theo dõi: nồng độ acid acetic sinh ra, chất lượng giấm.

3.4.4 Thử nghiệm sản xuất giấm trái cây từ các loại dịch quả đã lên men rượu.

Mục đích: Giảm chi phí sản xuất khi không bổ sung rượu ethylic vào dịch lên men. Tạo ra sản phẩm giấm có mùi đặc trưng, giàu vitamin., giảm giá thành sản phẩm.

Cách thực hiện: gồm 2 giai đoạn lên men là giai đoạn rượu hóa và giai đoạn giấm hóa.

❖ Chuẩn bị dịch lên men cho giai đoạn rượu hóa:

Dịch quả sau khi phối chế thành dịch lên men với độ Brix thích hợp, pH = 3,8.

❖ Lên men:

Bổ sung 0.1% giống *Saccharomyces cereviceae* vào 10 lít dịch quả (pH = 3,8) để lên men rượu, ở nhiệt độ phòng, theo dõi quá trình giảm độ Brix trong dịch lên men. Khi độ Brix không thay đổi nữa thì lúc này quá trình lên men rượu kết thúc, xác nấm men lắng xuống dưới, gạn lấy dịch trong có nồng độ rượu thấp. Tiếp tục đưa dịch này vào hệ thống lên men giấm hồi lưu thực hiện giai đoạn giấm hóa.

Các thông số cố định trong các thí nghiệm lên men giấm trái cây:

Thể tích lên men: 10 lít

Tỷ lệ men giống: 5%

Nồng độ acetic ban đầu: 0.5%

Nhiệt độ lên men: nhiệt độ phòng

pH = 5.2

3.4.4.1 Thử nghiệm sản xuất giấm Saboche từ dịch saboche đã lên men rượu.

❖ Chuẩn bị dịch lên men:

Dịch Saboche được phối chế thành dịch lên men có độ brix thích hợp 22⁰Brix, pH = 3,8.

❖ Lên men:

Bổ sung 5% giống *Saccharomyces cereviceae* vào 10 lít dịch đường để lên men rượu, ở nhiệt độ phòng (*Saccharomyces cereviceae* được tăng sinh trong môi trường Hansen lỏng đến 5-7 triệu tế bào/ml). Cho lên men rượu trong thời gian 15 ngày, khi độ Brix còn 12⁰Brix. Thu dịch trong và tiếp tục cho lên men trong thiết bị lên men hồi lưu.

- Thời gian lên men: 8 ngày, cách lấy mẫu 1 lần/ngày.

- Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng acid acetic sinh ra.

3.4.4.2 Thử nghiệm sản xuất giấm điều từ dịch điều đã lên men rượu.

❖ Chuẩn bị dịch lên men:

Dịch điều xử lý tanin bằng gelatin với tỷ lệ 1,5g/l. Gelatin được khuấy tan trong nước nóng và khuấy đều với dịch ép quả điều ở chế độ nhiệt 60⁰C trong 5 phút. Sau đó để yên trong 20-30 phút để lắng kết tủa. Sau đó đem lọc để tách kết tủa, thu dịch phối chế dịch lên men có độ Brix 25⁰Brix.

❖ Lên men:

Bổ sung 5% giống *Saccharomyces cereviceae* vào 10 lít dịch để lên men rượu ở nhiệt độ phòng. Cho lên men rượu trong 15 ngày, khi độ Brix còn 10⁰Brix. Thu dịch này và tiếp tục cho lên men giấm trong thiết bị hồi lưu.

- Thời gian lên men giấm: 8 ngày, cách lấy mẫu: 1 lần/ngày.
- Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng acid acetic sinh ra.

3.4.5 Thử nghiệm sản xuất giấm từ trà xanh

Trà xanh sau khi được xử lý, phối chế dịch lên men, cho lên men trong thiết bị lên men hồi lưu.

- Các thông số cố định:

Nước máy 10 lít

Trà xanh: 300g

Đường: 2%

Nồng độ rượu: 8%

Nồng độ acid ban đầu: 0.5%

Nhiệt độ lên men: nhiệt độ phòng

pH = 5.2

- Thời gian lên men: 8 ngày, cách lấy mẫu: 1 lần/ngày
- Chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng acid acetic sinh ra.

3.5 Xử lý số liệu

Số liệu sau khi thu thập được xử lý bằng phần mềm thống kê Statgraphics version 7.0.

Chương 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

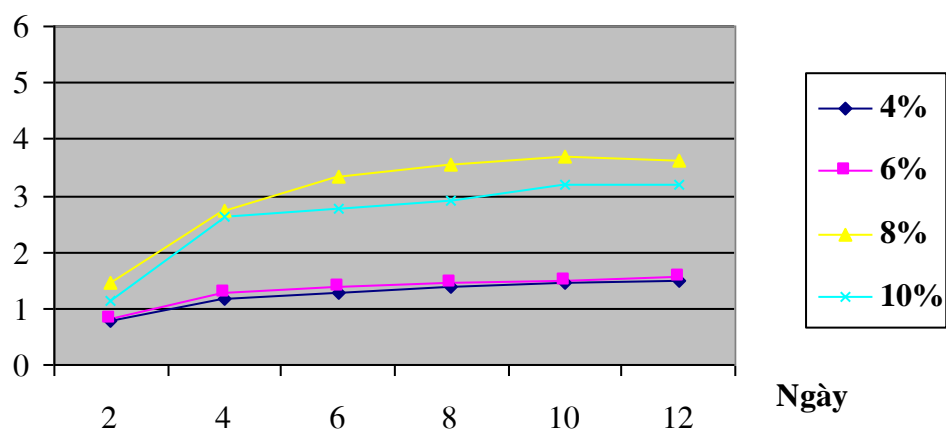
4.1 Xác định nồng độ rượu bổ sung thích hợp để đạt được nồng độ acid acetic cao nhất.

Nước dứa già được phối chế dịch lên men với các nồng độ rượu khác nhau: 4%, 6%, 8%, 10%. Cho lên men trong các bình 10 lít theo phương pháp có sục khí. Kết quả thu được theo bảng 4.1

Bảng 4.1: Nồng độ acid acetic thu được sau quá trình lên men

Thời gian (Ngày)	Nồng độ rượu (%V)			
	4	6	8	10
2	0,78	0,801	1,44	1,146
4	1,171	1,29	2,73	2,04
6	1,261	1,38	3,34	2,76
8	1,401	1,451	3,54	2,9
10	1,45	1,50	3,69	3,18
12	1,501	1,55	3,61	3,20

Acid acetic (%)



Đồ thị 4.1: Ảnh hưởng của nồng độ rượu bổ sung đến nồng độ acid acetic sinh ra

Từ đồ thị ta thấy nồng độ rượu bổ sung vào dịch lên men: 4%, 6%, 8%, 10% là khác nhau: hàm lượng acid acetic tăng dần khi hàm lượng rượu bổ sung từ 4%, 6%, 10%, 8%. Điều này có thể giải thích: do bản chất quá trình lên men acetic là quá trình oxy hóa rượu thành acid acetic với sự tham gia của oxy phân tử. Như vậy khi tăng hàm lượng rượu ethylic thì hàm lượng acid acetic cũng tăng nhưng chỉ tăng nhưng đến một giới hạn. Rượu ethylic khi ở nồng độ cao còn là chất sát khuẩn nên môi trường có hàm lượng rượu cao sẽ ức chế sự hoạt động của vi khuẩn *Acetobactor*.

Dựa vào kết quả bảng 4.1 và đồ thị 4.1 cho thấy nghiệm thức thu được tốt nhất ở thí nghiệm này là dịch lên men có bổ sung 8%V rượu ethylic.

Theo kết quả xử lý thống kê cho thấy: hàm lượng acid acetic thu được từ ngày 2 đến ngày 12 là khác biệt có ý nghĩa. Từ ngày 2 đến ngày 10 nồng độ acid acetic tăng nhanh, tuy nhiên từ ngày 10 đến ngày 12 nồng độ acid acetic tăng rất chậm dề và giảm. Theo lý thuyết thì nồng độ acid cao sẽ ức chế trở lại sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Do đó sau 8-10 ngày là ta có thể thu sản phẩm và kết thúc quá trình lên men.

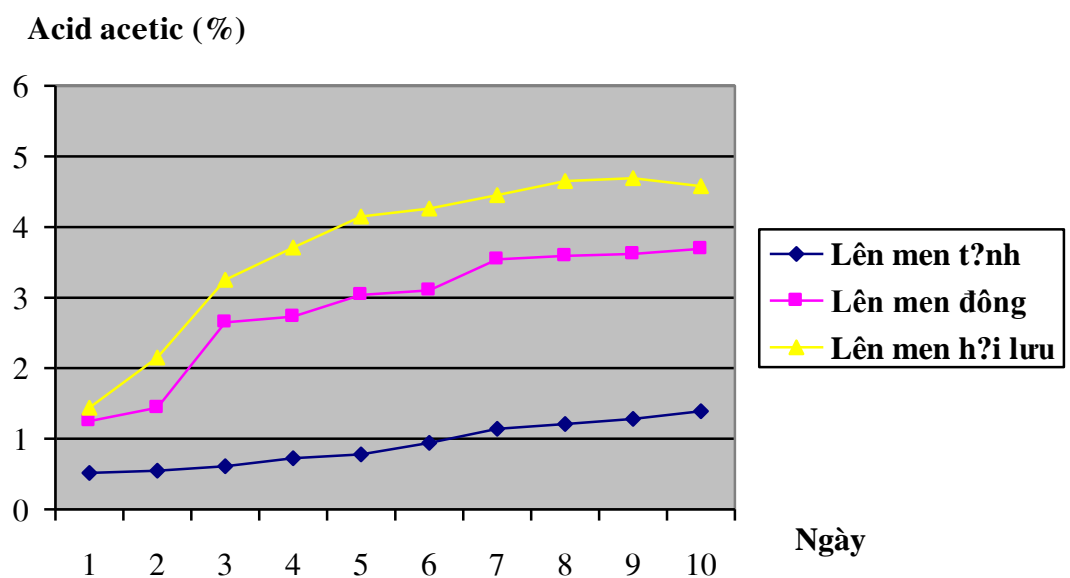
Kết luận: Điều kiện tốt nhất của thí nghiệm 1 là bổ sung 8%V rượu vào dịch lên men, sau thời gian 8-10 ngày thu được sản phẩm có nồng độ acid acetic đạt 3.54-3.69%.

4.2 Xác định phương pháp lên men tối ưu

Sau khi phối chế dịch lên men với nồng độ rượu bổ sung 8%, tiến hành lên men giám bằng 3 phương pháp khác nhau: lên men tĩnh, lên men có sục khí, lên men theo phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể. Ta thu được nồng độ acid acetic khác nhau ở các phương pháp lên men.

Bảng 4.2: Nồng độ acetic theo khác phương pháp lên men.

Thời gian (Ngày)	Nồng độ acid acetic (%)		
	Lên men tĩnh	Lên men có sục khí	Lên men theo phương pháp hồi lưu
1	0,515	1,25	1,44
2	0,55	1,44	2,15
3	0,61	2,65	3,25
4	0,725	2,73	3,71
5	0,78	3,04	4,15
6	0,94	3,10	4,26
7	1,14	3,54	4,45
8	1,21	3,59	4,65
9	1,28	3,62	4,69
10	1,39	3,69	4,58



Đồ thị 4.2: Khảo sát các phương pháp lên men

Qua mỗi liên hệ trên đồ thị ta thấy: hiệu quả lên men acid acetic của phương pháp hồi lưu định vi khuẩn trên giá thể nhanh hơn rất nhiều so với phương pháp lên men động và tĩnh. Ở phương pháp hồi lưu định vi khuẩn trên giá thể, nồng độ acid ban đầu tăng rất nhanh nhưng sau đó tăng chậm dần và giảm do nồng độ cơ chất giảm. Ở phương pháp lên men động nồng độ acid acetic có tăng nhưng chậm hơn phương pháp hồi lưu. Ở phương pháp lên men tĩnh, ban đầu nồng độ acid tăng chậm là do chưa có sự hình thành màng vi khuẩn giấm nhưng đến khoảng 3-4 ngày trở đi thì nồng độ acid acetic bắt đầu tăng, lý do là lúc này đã hình thành nên màng vi khuẩn giấm trên bề mặt của bình lên men.

Sau 9 ngày lên men thì phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể đã đạt được nồng độ acid acetic là 4.67%, sản phẩm giấm rất trong. Phương pháp lên men động, đạt được nồng độ acid acetic là 3.62%, sản phẩm giấm đục. Trong khi đó thì phương pháp chậm chỉ đạt nồng độ acid acetic là 1.28%, tức là nhỏ hơn nhiều so với phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể. Để đạt được nồng độ acid acetic như phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể thì ở phương pháp chậm phải mất một khoảng thời gian rất dài (khoảng 1,5 tháng).

Qua đây cho ta thấy được hiệu quả của phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể so với phương pháp lên men động và tĩnh:

- Phương pháp lên men hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể có nồng độ acid acetic tăng nhanh là do thời gian tiếp xúc của vi khuẩn với dịch lên men tăng, bề mặt tiếp xúc giữa vi khuẩn giấm và O_2 cao nên vi khuẩn giấm sử dụng cơ chất chính là C_2H_5OH và tạo ra sản phẩm là acid acetic. Với phương pháp lên men hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể lớp vật liệu mang vi khuẩn vừa có tác dụng thông khí vừa là lớp vật liệu để cấy vi khuẩn acetic. Do vậy các tế bào vi khuẩn ít phân bố trong môi trường lên men, đồng thời còn có tác dụng như một lớp vật liệu lọc do đó sản phẩm lên men hồi lưu trong hơn so với sản phẩm lên men động.

- Phương pháp lên men động, sản phẩm lên men bị đục do đó sau khi lên men phải trải qua công đoạn lọc trong bằng hỗn hợp thạch 5% và Bentonit 0.3%.

- Phương pháp lên men tĩnh, do hạn chế về bề mặt tiếp xúc giữa vi khuẩn giấm và O_2 nên lượng acid acetic tạo ra chậm hơn nhiều so với phương pháp hồi lưu. Và chỉ đến khi màng vi khuẩn tạo ra đủ dày thì lúc này tốc độ acid acetic mới tăng nhanh.

- Qua số liệu xử lý thống kê cho thấy hàm lượng acid acetic tăng dần từ ngày 1 đến ngày 10. Ở phương pháp lên men hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể, nồng độ acid acetic tăng cao từ ngày 1 đến ngày 7, tăng chậm từ ngày 7 đến ngày 9 và giảm nhẹ vào ngày 10. Quá trình trên diễn ra là do: lúc đầu nồng độ cơ chất cao nên nồng độ acid tăng nhanh, đến ngày 7 nồng độ cơ chất giảm, đến ngày 10 thì nồng độ cơ chất không còn hoặc lúc này nồng độ acid cao ức chế hoạt động của vi khuẩn nên nồng độ acid giảm.

Kết luận: Phương pháp lên men hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể là phương pháp tối ưu nhất. Sản phẩm giấm trong và có nồng độ acid acetic cao. Sau 7-9 ngày ta có thể kết thúc quá trình lên men và thu sản phẩm.

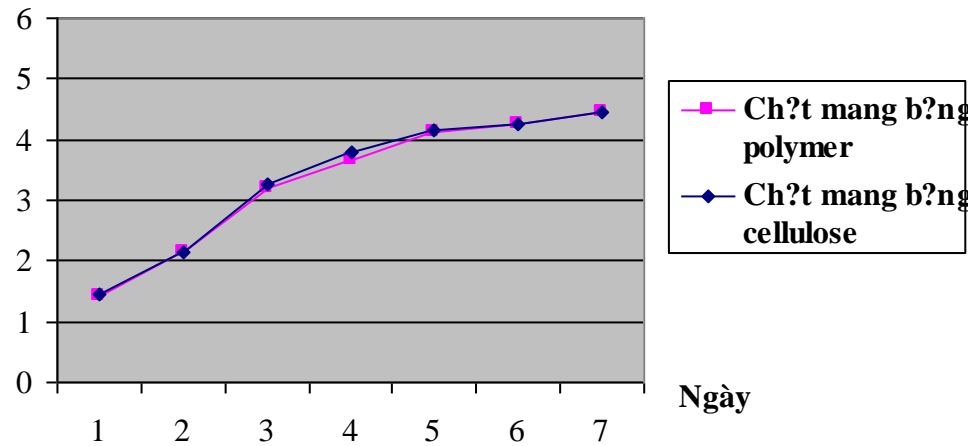
4.3 Khảo sát tính đa dạng của các loại chất mang vi khuẩn acetic.

Phối chế dịch lên men từ nước dừa già với nồng độ rượu 8% sau đó cho lên men giấm trong các thiết bị hồi lưu chứa chất mang bằng chất liệu cellulose (bã mía) và bằng chất liệu polymer (xốp), ta thu được kết quả về nồng độ acid acetic như sau:

Bảng 4.3: Nồng độ acid acetic sinh ra.

Thời gian (Ngày)	Chất liệu chất mang	
	Bã mía	Xốp
1	1,440	1,421
2	2,146	2,144
3	3,250	3,20
4	3,780	3,671
5	4,151	4,125
6	4,254	4,254
7	4,45	4,45

Acid acetic (%)



Đồ thị 4.3: Khảo sát tính đa dạng của các loại chất mang

Qua xử lý thống kê và đồ thị ta thấy nồng độ acid acetic sinh ra trong 2 quá trình lên men tương đương nhau. Sản phẩm giấm từ quá trình lên men sử dụng vật liệu mang bằng cellulose có đặc điểm: trong, màu vàng nhạt, có mùi giấm đặc trưng. Sản phẩm giấm từ quá trình lên men sử dụng vật liệu mang bằng polymer có đặc điểm: giấm trong, màu trắng đặc trưng, không có mùi lạ.

Kết luận: Đối với chất mang bằng cellulose (bã mía), ta có thể sử dụng lên men các loại giấm trái cây vì giấm trái cây có màu. Còn đối với giấm trắng ta sử dụng chất mang bằng polymer (xốp) để giấm có màu trắng đặc trưng.



Hình 4.1: Sản phẩm giấm từ 2 quá trình lên men

A: Sản phẩm từ quá trình lên men sử dụng vật liệu mang bằng cellulose

B: Sản phẩm từ quá trình lên men sử dụng vật liệu mang bằng polymer

4.4 Thử nghiệm sản xuất giấm trái cây từ dịch trái cây lên men

4.4.1 Sản xuất giấm điều từ dịch điều đã lên men rượu

Dịch điều xử lý gelatin với tỷ lệ 1.5g/l, phối chế dịch để lên men rượu với 25⁰Brix, bổ sung 5% *Saccharomyces cereviceae*, cho lên men rượu trong 15 ngày. Thu dịch, tiếp tục cho lên men giấm trong thiết bị lên men hồi lưu.

Kết quả thu được như sau:

Bảng 4.4: Nồng độ acid acetic từ giấm điều

Thời gian (ngày)	Nồng độ acetic (%)
1	1,25
2	2,38
3	3,15
4	3,52
5	4,01
6	4,36
7	4,42
8	4,55

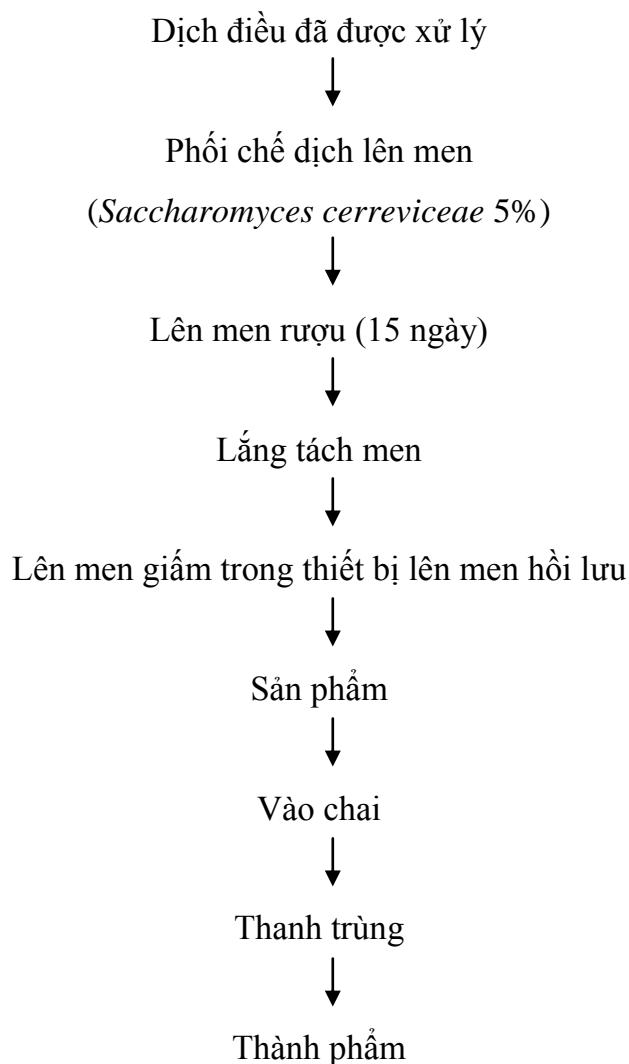
Từ bảng trên ta thấy: nồng độ acid acetic tăng dần từ ngày 1 đến ngày 8. Nồng độ acid acetic tăng nhanh trong những ngày từ 1-4, vì lý do nồng độ cơ chất lúc này còn cao. Từ ngày 4-8, nồng độ acid acetic tăng chậm dần do lúc này nồng độ cơ chất đã giảm. Đến ngày thứ 8 nồng độ acid acetic đạt được là 4.55%.

Giấm điều trong, có màu nâu đỏ, mùi thơm dễ chịu, có thể sử dụng làm gia vị trong thực phẩm.



Hình 4.2: Sản phẩm giấm điều

Quá trình được thực hiện như sau:



Sơ đồ 4.1: Quy trình sản xuất giấm điều

4.4.2 Sản xuất giấm saboche từ dịch saboche đã lên men rượu

Dịch saboche phối chế dịch lên men rượu với 22⁰Brix, bổ sung 5% *Saccharomyces cereviceae*, cho lên men rượu trong 15 ngày. Sau đó thu dịch trong, cho lên men giấm trong thiết bị lên men hồi lưu.

Kết quả thu được:

Bảng 4.5: Nồng độ acid acetic từ giấm saboche

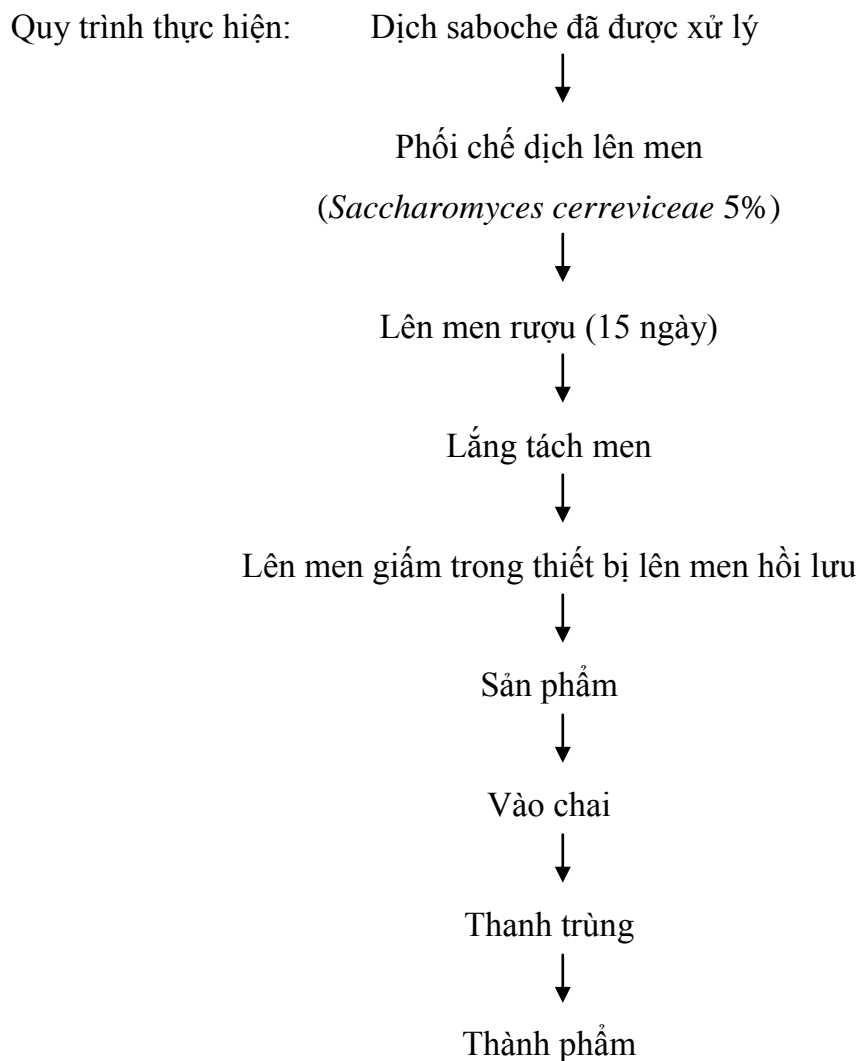
Thời gian (Ngày)	Nồng độ acetic (%)
1	1,46
2	2,23
3	2,62
4	3,15
5	3,75
6	4,37
7	4,82
8	5,11

Nồng độ acid acetic tăng rất nhanh. Đến ngày thứ 8 nồng độ acid acetic đạt 5.11%, lúc này có thể kết thúc quá trình lên men và thu sản phẩm.

Giấm saboche có màu nâu sẫm, trong, có mùi thơm đặc trưng của saboche, dùng làm gia vị trong thực phẩm.



Hình 4.3: Sản phẩm giấm saboche



Sơ đồ 4.2: Quy trình sản xuất giấm saboche

4.5 Sản xuất giấm trà xanh

Trà xanh mua từ chợ, xử lý, phối chế dịch lên men với nồng độ rượu bổ sung 8%, cho lên men trong thiết bị hồi lưu.

Kết quả thu được như sau:

Bảng 4.6: Nồng độ acid acetic từ giấm trà

Thời gian (Ngày)	Nồng độ acetic (%)
1	1,21
2	1,74
3	2,22
4	2,76
5	3,47
6	4,29
7	4,38
8	4,51

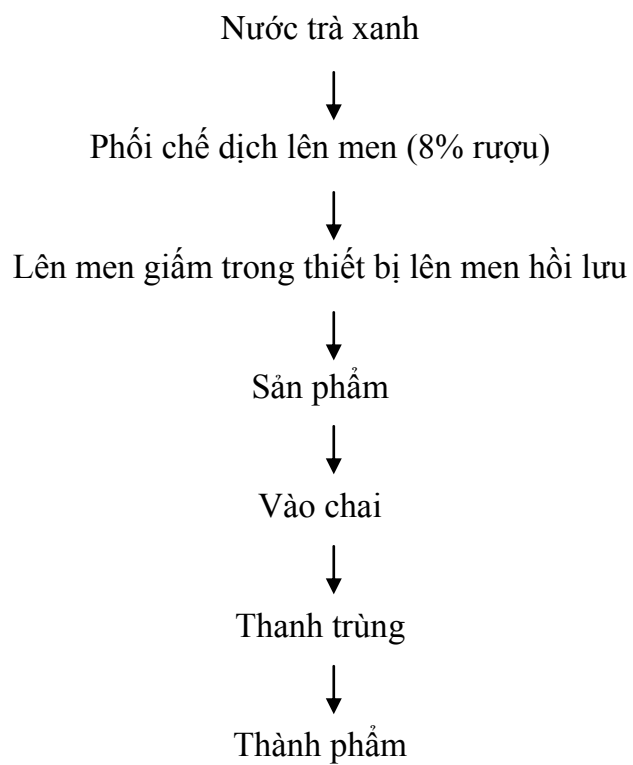
Đối với phương pháp lên men chậm nồng độ acid acetic đạt được rất ít sau thời gian dài lên men. Đối với phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể nồng độ acid acetic đạt được 4.51% sau 8 ngày lên men.

Sản phẩm giấm trà có màu vàng đậm, mùi thơm, có thể sử dụng trong thực phẩm. Giấm trà còn được dùng để chữa một số bệnh trong dân gian.



Hình 4.4: Sản phẩm giấm trà

Quy trình như sau:



Sơ đồ 4.3: Quy trình sản xuất giấm từ trà



Hình 4.5: Các sản phẩm giấm

Chương 5. KẾT QUẢ VÀ ĐỀ NGHỊ

1 KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu trên có thể rút ra những kết luận

1. Xác định được nồng độ rượu thích hợp cho quá trình lên men giấm từ nước dứa già là 8%.
2. Phương pháp lên men tối ưu là phương pháp lên men hồi lưu, sản phẩm giấm sinh ra có nồng độ acid acetic cao và chất lượng tốt.
3. Sử dụng chất mang có chất liệu bằng cellulose hay polymer đều cho nồng độ acid acetic tương đương nhau. Tuy nhiên, đối với chất mang bằng chất liệu cellulose (bã mía), sản phẩm giấm rất trong nhưng không có màu trắng đặc trưng của giấm dứa; đối với chất mang bằng chất liệu polymer (xốp), sản phẩm giấm trong và có màu trắng đặc trưng của giấm dứa.
4. Bằng phương pháp hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể chúng tôi đã sản xuất được một số giấm trái cây có mùi thơm đặc trưng, giàu vitamin như: giấm điều, giấm saboche, giấm trà.

2 ĐỀ NGHỊ

1. Khảo sát thêm nhiều loại dịch trái cây (sori, xoài,...) để lên men giấm nhằm đa dạng hóa sản phẩm.
2. Khảo sát một số loại chất mang khác như: xơ mướp, hạt xoài - phế phẩm của công nghệ xoài sấy - lõi bắp...
3. Nghiên cứu kỹ ảnh hưởng của chất mang bằng polymer đến giấm thành phẩm.
4. Tiến hành thử nghiệm ở quy mô lớn hơn có thể áp dụng trong quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Lâm Dũng và ctv, 1978. *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*. Nxb Khoa học - Kỹ thuật
2. Quách Đĩnh và ctv, 1996. *Công nghệ sau thu hoạch và chế biến rau quả*. Nxb Khoa học - Kỹ thuật.
3. Vương Thị Việt Hoa, 2003. *Giáo trình thực tập vi sinh thực phẩm*. Trường đại học Nông Lâm.
4. Phạm Hoàng Hộ, 1970. *Nghiên cứu sử dụng tổng hợp cây dứa*. Nxb Giáo dục.
5. Nguyễn Đức Lượng, 2002. *Công nghệ vi sinh*, tập 2. Nxb Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh.
6. Bộ Nông Nghiệp, 2000. *Dinh dưỡng ứng dụng và chế biến thực phẩm*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
7. Lê Văn Nhung, 1990. *Nghiên cứu công nghệ lên men sản xuất giấm năng suất cao*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
8. Lương Đức Phẩm, 1998. *Công nghệ vi sinh*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
9. Trần Thị Thanh, 2001. *Công nghệ vi sinh*. Nxb Giáo dục
10. Đồng Thị Thanh Thu. *Sinh hóa ứng dụng*. Đại Học Khoa Học Tự Nhiên Thành Phố Hồ Chí Minh.
11. Lê Ngọc Tú, 1977. *Tận dụng phế liệu của công nghệ thực phẩm*. Nxb Khoa học - kỹ thuật.
12. Một số đề tài liên quan đến giấm.

II. TÀI LIỆU TIẾNG ANH

13. Abrini.J và ctv, 1992. *Growth and acetic acid production inhibition*. Sarfactant Biotechnol.lett.

14. Agency.D. 1998. *In the present of growth stimulating nutrients acetic acid production*. P. Patent JPN. Number 76631.
15. Ebner. H. 1985. *Process for the production of Vinegar*. P.paten. Number 4583078
16. <http://www.versatilevinegar.org/>
17. <http://www.vinegarman.com/>

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Ảnh hưởng của nồng độ rượu bổ sung vào dịch lên men đến hàm lượng acid acetic tạo thành

Analysis of variance (**ACETIC 4**)

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio
Between groups	1.0665163	5	.2133033	2668.144
Within groups	.0009593	12	.0000799	
Total (corrected)	1.0674756	17		

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở nồng độ rượu bổ sung 4%.

Multiple range analysis for ACETIC4.NDACE4 by ACETIC4.NGAY

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	.7766667	X
4	3	1.1720000	X
6	3	1.2630000	X
8	3	1.4040000	X
10	3	1.4466667	X
12	3	1.5020000	X

Analysis of variance (**ACETIC 6**)

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio
Between groups	1.1349705	5	.2269941	3387.972
Within groups	.0008040	12	.0000670	
Total (corrected)	1.1357745	17		

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở nồng độ rượu bổ sung 6%.

Multiple range analysis for ACETIC6.NDACE6 by ACETIC6.NGAY

```

-----
Method: 95 Percent LSD
Level      Count      Average      Homogeneous Groups
-----
2          3          .8020000    X
4          3          1.2900000    X
6          3          1.3800000    X
8          3          1.4510000    X
10         3          1.5100000    X
12         3          1.5500000    X
-----

```

Analysis of variance (**ACETIC 8**)

```

-----
Source of variation  Sum of Squares  d.f.  Mean square  F-ratio
Sig. level
-----
Between groups      11.152228      5      2.2304456  20074.010
.0000
Within groups       .001333       12      .0001111
-----
Total (corrected)   11.153561     17
-----

```

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở nồng độ rượu bổ sung 8%.

Multiple range analysis for ACETIC8.NDACE8 by ACETIC8.NGAY

```

-----
Method: 95 Percent LSD
Level      Count      Average      Homogeneous Groups
-----
2          3          1.4400000    X
4          3          2.7400000    X
6          3          3.3366667    X
8          3          3.5366667    X
12         3          3.6100000    X
10         3          3.6800000    X
-----

```

Analysis of variance (**ACETIC 10**)

```

-----
Source of variation  Sum of Squares  d.f.  Mean square  F-ratio
Sig. level
-----
Between groups      9.7154978      5      1.9430996  18379.292
.0000
Within groups       .0012687       12      .0001057
-----

```


Total (corrected) 9.7167664 17

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở nồng độ rượu bổ sung 10%.

Multiple range analysis for ACETIC10.NDACE10 by ACETIC10.NGAY

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

2	3	1.1460000	X
4	3	2.0400000	X
6	3	2.7633333	X
8	3	2.9100000	X
10	3	3.1800000	X
12	3	3.2100000	X

Phụ lục 2: So sánh các phương pháp lên men

Analysis of variance (ACETIC TINH)

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio
---------------------	----------------	------	-------------	---------

Between groups	2.8362323	9	.3151369	16986.682
----------------	-----------	---	----------	-----------

.0000

Within groups	.0003710	20	.0000186	
---------------	----------	----	----------	--

Total (corrected)	2.8366033	29		
-------------------	-----------	----	--	--

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở phương pháp lên men tĩnh

Multiple range analysis for ACETICT.NDACET by ACETICT.NGAY

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

1	3	.5153333	X
2	3	.5533333	X
3	3	.6116667	X
4	3	.7253333	X
5	3	.7846667	X
6	3	.9436667	X
7	3	1.1436667	X
8	3	1.2180000	X
9	3	1.2836667	X

10	3	1.3936667	X
----	---	-----------	---

Analysis of variance (**ACETIC DONG**)

Source of variation Sig. level	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio
Between groups .0000	21.101932	9	2.3446591	152580.852
Within groups	.000307	20	.0000154	
Total (corrected)	21.102239	29		

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở phương pháp lên men động.

Multiple range analysis for ACETICD.NDAGED by ACETICD.NGAY

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
1	3	1.2510000	X
2	3	1.4410000	X
3	3	2.6516667	X
4	3	2.7313333	X
5	3	3.0410000	X
6	3	3.1100000	X
7	3	3.5440000	X
8	3	3.5910000	X
9	3	3.6210000	X
10	3	3.6940000	X

Analysis of variance (**ACETIC HOI**)

Source of variation Sig. level	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio
Between groups .0000	34.513816	9	3.8348684	9956.387
Within groups	.007703	20	.0003852	
Total (corrected)	34.521519	29		

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở phương pháp lên men hồi lưu cố định vi khuẩn trên giá thể.

Multiple range analysis for ACETICH.NDACEH by ACETICH.NGAY

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

1	3	1.4416667	X
2	3	2.1520000	X
3	3	3.2533333	X
4	3	3.7120000	X
5	3	4.1516667	X
6	3	4.2643333	X
7	3	4.4883333	X
10	3	4.5833333	X
8	3	4.6556667	X
9	3	4.6933333	X

Phụ lục 3: Khảo sát tính đa dạng các loại chất mang (thí nghiệm 3)

Bảng Anova phân tích phương sai trong thí nghiệm 3

Analysis of Variance for **ACETIC3.NDACE** - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio

MAIN EFFECTS				
A:ACETIC3.NGAY	50.163469	6	8.3605782	350.995
B:ACETIC3.NLIEU	.004006	1	.0040063	.168
INTERACTIONS				
AB	.1824936	6	.0304156	1.277
RESIDUAL	.6669503	28	.0238197	

TOTAL (CORRECTED)	51.016920	41		

Bảng trắc nghiệm LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic trong các ngày lấy mẫu ở thí nghiệm 3.

Multiple range analysis for **ACETIC3.NDACE** by **ACETIC3.NGAY**

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups

Method:	95 Percent	LSD	
Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups

1	6	1.4315000	X
2	6	1.9785333	X
3	6	3.2305000	X
4	6	3.7265000	X
5	6	4.1381333	X
6	6	4.2541333	X
7	6	4.4511667	X

Bảng LSD so sánh trung bình độ biến thiên hàm lượng acid acetic ở 2 quá trình lên men với các chất liệu mang khác nhau.

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
B	21	3.3060143	X
X	21	3.3255476	X

B: Chất liệu mang là bã mía

X: Chất liệu mang là xốp

Phụ lục 4: Phương pháp xác định độ chua.

Định nghĩa: Độ chua bao gồm các loại acid có trong thực phẩm. Các acid này hoặc có sẵn tự nhiên trong thực phẩm (acid hữu cơ trong quả, trong sữa...) hoặc được cho vào thực phẩm với mục đích chế biến hoặc các acid sinh ra trong quá trình chuyển hóa thực phẩm.

Nguyên lý: Dùng một dung dịch kiềm chuẩn (KOH hay NaOH) để trung hòa hết các acid có trong thực phẩm, với phenoltalin là chỉ thị màu.

Cách tiến hành: Lấy chính xác 10 ml dung dịch mẫu thử cho vào bình định mức 50 ml, cho thêm nước cất vừa đủ 30 ml. Lấy dịch thử cho vào bình tam giác, cho thêm 2 giọt phenoltalin chuẩn độ với NaOH 0,1 N cho đến khi dịch thử có màu hồng nhạt bền vững.

Tính kết quả: Độ acid theo phần trăm (%X) tính bằng công thức

$$X = k * n * 100/V$$

Trong đó:

n = số ml NaOH 0,1N sử dụng để chuẩn độ 30 ml dịch thử.

V = thể tích mẫu thử.

k = hệ số loại acid (acid acetic $k = 0,006$).