

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



NGUYỄN THỊ ÁNH NGỌC

**NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM CHẾ BIẾN
RƯỢU VANG SABÔCHÊ**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 08 – 2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM CHẾ BIẾN RƯỢU VANG SABÔCHÊ

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học**

Giáo viên hướng dẫn
ThS. VƯƠNG THỊ VIỆT HOA

Sinh viên thực hiện
NGUYỄN THỊ ÁNH NGỌC
Niên khóa: 2002 - 2006

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 08 - 2006

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



RESEARCHING TO PRODUCE THE WINE FROM SABOCHE FRUITS

Graduation thesis
Major: Biotechnology

Professor

PhD. VƯƠNG THỊ VIỆT HOA

Student

NGUYỄN THỊ ÁNH NGỌC

Term: 2002 - 2006

Hồ Chí Minh City

08 - 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 cho tôi những kiến thức quý báu trong suốt thời gian tôi học tập tại trường.

ThS. Vương Thị Việt Hoa _ giảng viên khoa Công Nghệ Thực Phẩm trường Đại Học Nông Lâm đã hết lòng hướng dẫn tôi trong suốt thời gian thực tập tốt nghiệp.

Cô Nguyễn Minh Hiền cùng tất cả các thầy cô trong phòng thí nghiệm Vi Sinh thuộc khoa Công Nghệ Thực Phẩm đã tạo những điều kiện thuận lợi, tận tình hướng dẫn, giải đáp những thắc mắc và cho tôi những lời khuyên hữu ích để tôi hoàn thành tốt luận văn tốt nghiệp.

Chân thành cảm các anh chị CNSH 27 và bạn bè thân yêu của lớp CNSH 28 cùng tất cả các bạn ngoài lớp đã trao đổi, đóng góp, phê bình, động viên và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Xin chân thành cảm ơn!

Tp.HCM, tháng 8/2006

Sinh viên thực hiện

Nguyễn Thị Ánh Ngọc

TÓM TẮT

Đề tài “*Nghiên cứu thử nghiệm chế biến rượu vang Sabôchê*” được thực hiện tại khoa Công Nghệ Thực Phẩm, trường Đại Học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 02 năm 2006 đến tháng 06 năm 2006 dưới sự hướng dẫn của Ths.Vương Thị Việt Hoa nhằm xây dựng quy trình chế biến để tạo ra loại thức uống mới cung cấp cho thị trường, nâng cao giá trị kinh tế của quả Sabôchê.

Cây Sabôchê ở nước ta được trồng với diện tích tương đối lớn (phổ biến là giống Sabôchê Xuân Đỉnh). Tuy nhiên, quả Sabôchê hiện nay chỉ được sử dụng như một loại trái cây dùng để tráng miệng, sự vận chuyển quả Sabôchê chín gặp rất nhiều khó khăn như dễ bị dập nát, hư hỏng, thường chiếm khoảng 25% – 40%. Tận dụng nguồn nguyên liệu này, chúng ta có thể sử dụng những quả chín mùi không thể vận chuyển làm nguyên liệu cho quá trình lên men. Bên cạnh đó, quả Sabôchê còn có hàm lượng đường, khoáng vi lượng, khoáng đa lượng và hàm lượng vitamin rất thích hợp cho quá trình lên men.

Đề tài sẽ khảo sát khả năng lên men của một số chủng nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* F43 hoặc *Saccharomyces cerevisiae* 28 hay giống nấm men được phân lập từ quả chín, khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả lên men trong quá trình sản xuất như tỷ lệ nấm men bổ sung, mật độ tế bào nấm men, pH...

Các bước thực hiện:

- ✓ Tiến hành thu dịch chiết quả Sabôchê để làm nguyên liệu cho quá trình lên men.
- ✓ Khảo sát nồng độ chất rắn hòa tan (độ Brix) thích hợp cho quá trình lên men.
- ✓ Thử nghiệm trên các chủng nấm men như chủng *Saccharomyces cerevisiae* F43 (*Sc.F43*), *Saccharomyces cerevisiae* 28 (*Sc.28*) hay chủng nấm men *Saccharomyces* được phân lập từ dịch quả Sabôchê chín (*S.Sabôchê*).
- ✓ Thử nghiệm các tỷ lệ nấm men bổ sung trong quá trình lên men.

Sau quá trình thực hiện chúng tôi đã đạt được những kết quả sau:

- ✓ Phương pháp chiết xuất tốt nhất là phương pháp xay với tỷ lệ đường bổ sung là 50% theo khối lượng và tỷ lệ Sabôchê : nước là 1 : 3

- ✓ Chủng nấm men phân lập từ dịch quả Sabôchê (*S.Sabôchê*) và *Saccharomyces cerevisiae* 28 (*Sc.28*) được chọn làm giống sử dụng với tỷ lệ 10% trong môi trường dịch quả có nồng độ chất rắn hoà tan 20⁰Bx và mật độ tế bào nấm men là 5×10^6 tb/ml.
- ✓ Quá trình lên men chính kết thúc sau 4 ngày lên men. Quá trình lên men phụ được tiến hành sau khi kết thúc lên men chính và cho kết quả cảm quan khá cao: 16,23 điểm sau 1 tháng.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
TÓM TẮT	ii
MỤC LỤC	iv
DANH SÁCH CÁC HÌNH – SƠ ĐỒ - ĐỒ THỊ.....	vii
DANH SÁCH CÁC BẢNG.....	viii
DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT	ix
Phần 1. GIỚI THIỆU	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích và yêu cầu thực hiện	2
1.2.1. Mục đích	2
1.2.2. Yêu cầu thực hiện	2
1.2.3. Giới hạn đề tài.....	2
Phần 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Tổng quan về cây Sabôchê.....	3
2.1.1. Giới thiệu	3
2.1.2. Nguồn gốc và phân bố	3
2.1.3. Đặc điểm sinh học của Sabôchê.....	3
2.1.3.1. Rễ.....	3
2.1.3.2. Thân tán	4
2.1.3.3. Lá.....	4
2.1.3.4. Lộc, cành.....	4
2.1.3.5. Nụ, hoa	5
2.1.3.6. Trái.....	5
2.1.4. Thành phần hoá học.....	6
2.1.5. Phân loại	6
2.1.6. Tình hình tiêu thụ Sabôchê.....	7
2.2. Giới thiệu chung về rượu vang.....	8
2.2.1. Lịch sử phát triển rượu vang.....	8
2.2.2. Định nghĩa rượu vang	8
2.2.3. Nguyên liệu để sản xuất rượu vang.....	8
2.2.4. Thành phần hóa học của rượu vang	9
2.2.5. Phân loại rượu vang	9
2.2.5.1. Nhóm rượu vang không có gas (CO ₂)	9
2.2.5.2. Nhóm rượu vang có gas (CO ₂).....	10

2.3. Nấm men dùng trong sản xuất	10
2.3.1. Định nghĩa nấm men	10
2.3.2. Hình thái và kích thước tế bào nấm men	11
2.3.3. Cấu tạo tế bào nấm men	11
2.3.4. Sinh sản của nấm men.....	11
2.4. Công nghệ lên men	13
2.4.1. Khái niệm chung.....	13
2.4.2. Cơ sở sinh hoá của quá trình lên men rượu.....	13
2.4.3. Quy trình cơ bản trong sản xuất rượu	15
2.4.4. Chất lượng rượu vang.....	16
2.4.5. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu	17
2.4.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ	17
2.4.5.2. Ảnh hưởng của pH.....	17
2.4.5.3. Ảnh hưởng của oxygen môi trường.....	18
2.4.5.4. Ảnh hưởng của ethanol	18
2.4.5.5. Ảnh hưởng của nồng độ dịch đường lên men	19
2.4.5.6. Ảnh hưởng của thời gian lên men	19
2.4.5.7. Ảnh hưởng của khí SO ₂	20
2.4.5.8. Ảnh hưởng của nồng độ CO ₂ trong môi trường lên men	20
2.4.6. Các dạng hư hỏng của rượu	21
2.4.6.1. Hư hỏng do vi sinh vật hiếu khí	21
2.4.6.2. Hư hỏng do vi sinh vật yếm khí hay hiếu khí tùy nghi.....	21
Phần 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
3.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	24
3.2. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị.....	24
3.3. Nội dung và phương pháp tiến hành	25
3.3.1. Khảo sát thành phần nguyên liệu.....	25
3.3.2. Phương pháp xác định các chỉ tiêu	25
3.3.2.1. Chỉ tiêu hóa lý.....	25
3.3.2.2. Chỉ tiêu vi sinh	25
3.3.2.3. Chỉ tiêu cảm quan.....	26
3.3.2.4. Thí nghiệm 1: thử nghiệm các phương pháp chiết xuất dịch quả.....	27
3.3.2.5. Thí nghiệm 2: khảo sát ảnh hưởng của các chủng nấm men lên quá trình lên men dịch quả.....	28
3.3.2.6. Thí nghiệm 3: khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men lên chất lượng của dịch lên men.....	30

3.3.2.7. Thí nghiệm 4: khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất khô lên quá trình lên men.....	31
3.4. Kiểm tra chất lượng sản phẩm.....	31
3.5. Xử lý số liệu.....	31
Phần 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	32
4.1. Khảo sát thành phần nguyên liệu.....	32
4.2. Thử nghiệm các phương pháp chiết xuất dịch quả.....	32
4.3. Khảo sát ảnh hưởng của các chủng nấm men lên quá trình lên men dịch quả.....	34
4.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men lên chất lượng của dịch lên men.....	35
4.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất khô lên chất lượng của dịch lên men.....	38
4.6. Kiểm tra chất lượng sản phẩm.....	40
Phần 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	42
5.1. Kết luận.....	42
5.2. Đề nghị.....	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	44
PHỤ LỤC.....	47

DANH SÁCH CÁC HÌNH – SƠ ĐỒ - ĐỒ THỊ

Hình 2.1. Cây Sabôchê	3
Hình 2.2. Lá Sabôchê.....	4
Hình 2.3. Hoa Sabôchê	5
Hình 2.4. Quả Sabôchê.....	5
Hình 2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	11
Sơ đồ 2.1. Quy trình cơ bản sản xuất rượu vang.....	15
Sơ đồ 3.1. Quy trình tiến hành thí nghiệm.....	27
Hình 4.1. So sánh dịch thu hồi giữa hai phương pháp chiết xuất	33
Hình 4.2. Thay đổi nồng độ chất khô của các chủng nấm men.....	34
Hình 4.3. Thay đổi độ cồn của các chủng nấm men	35
Hình 4.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ men giống đến sự thay đổi chất khô	36
Hình 4.5. Ảnh hưởng của tỷ lệ men giống đến sự thay đổi độ cồn.....	37
Hình 4.6. Ảnh hưởng của nồng độ chất khô lên sự thay đổi của độ cồn	38
Hình 4.7. Rượu vang sabôchê.....	41

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần hoá học của Sabôchê.....	6
Bảng 2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến một số loại nấm men.....	19
Bảng 3.1. Thành phần nguyên liệu được khảo sát.....	25
Bảng 3.2. Phương pháp xác định chỉ tiêu hóa lý.....	25
Bảng 4.1. Thành phần dịch quả Sabôchê.....	32
Bảng 4.2. Các chỉ tiêu của dịch Sabôchê.....	33
Bảng 4.3. Ảnh hưởng của chủng nấm men đến quá trình lên men.....	34
Bảng 4.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men lên nồng độ chất khô, độ cồn và pH.....	36
Bảng 4.5. Ảnh hưởng của nồng độ chất khô của dung dịch lên men lên sự thay đổi của pH và độ cồn.....	38
Bảng 4.6. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu vi sinh dịch sau lên men.....	40
Bảng 4.7. Kết quả đánh giá cảm quan sản phẩm rượu vang Sabôchê theo phương pháp cho điểm.....	40

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

TSVKHK: tổng số vi khuẩn hiếu khí.

TSNM: tổng số nấm mốc.

Môi trường BGBL: Brilliant Green Bile Lactose.

Môi trường EMB: Eosin Methylene Bleu Agar.

Môi trường NA: Nutrion Agar.

Môi trường PGA: Potato Glucose Agar.

Phương pháp MPN: Most Probable Number.

Phần 1. GIỚI THIỆU

1.1. Đặt vấn đề

Rau quả là một nguồn thực phẩm không thể thiếu đối với con người. Đây là nguồn cung cấp vitamin và chất xơ chính. Nước ta có gần 70% dân số tham gia vào sản xuất nông nghiệp, trong đó, sản xuất rau quả chiếm một vị trí quan trọng. Như vậy, sản xuất rau quả đã tạo công ăn việc làm và thu nhập cho người dân.

Ngày nay, khi xã hội càng phát triển, mức sống con người được nâng cao thì nhu cầu về ăn uống của con người ngày càng được quan tâm và đòi hỏi các mặt hàng thực phẩm không những phải phong phú, đa dạng mà còn phải có tính chất được phẩm, dinh dưỡng.

Hiện nay, các loại thức uống sản xuất từ trái cây có xu hướng tiêu thụ ngày càng nhiều trên thế giới. Nhiều nước có mức tiêu thụ hàng năm lên đến hàng trăm triệu lít. Thức uống trái cây ngày càng được sử dụng nhiều là do chúng có nhiều ưu điểm so với các loại nước uống khác: chứa nhiều vitamin, muối khoáng, các dạng đường đơn dễ tiêu hóa, có hương vị thơm ngon tự nhiên hấp dẫn, vừa có giá trị dinh dưỡng cao vừa có tác dụng chữa bệnh, có thể chống ngộ độc, chống ung thư...

Thức uống trái cây có nhiều dạng khác nhau về tính chất sản phẩm và công nghệ chế biến như nước trái cây tự nhiên, necta quả, nước quả cô đặc, sirô quả, squash quả, rượu vang ... Trong đó, rượu vang là loại thức uống rất được ưa chuộng với hương vị thơm ngon và tính giải khát. Đây là nước uống lên men một phần từ dịch trái cây. Nó có độ cồn thấp, giàu chất dinh dưỡng. Hiện nay, việc chế biến rượu vang từ Sabôchê đang được nghiên cứu thử nghiệm do đây là loại trái cây có rất nhiều ưu điểm so với các loại trái cây khác.

Sabôchê là loại cây được trồng khá phổ biến ở nước ta. Loại cây này có thể trồng được ở nhiều nơi kể cả những vùng đất bị nhiễm mặn, ven biển, ít sâu bệnh, chịu được ngập úng. Cây có khả năng cho nhiều trái trong năm. Với năng suất cao (20 – 40t/ha từ năm thứ 7 trở đi), mau cho trái (cây chiết cho trái từ năm thứ 3), tỷ lệ đậu quả của Sabôchê là rất cao (giống Thanh Hà là 11,96%, giống Xuân Đình là 9,89%) so với cam quýt (binh quân tỷ lệ đậu quả là 1 – 2,1%). Cây Sabôchê có thể mang lại nhiều lợi tức cho các vùng đất bị nhiễm mặn, canh tác gặp nhiều khó khăn, lợi tức gấp 5 – 10 lần lúa (Công nghệ sinh học cây ăn quả, Trần Văn Minh, viện sinh học nhiệt đới).

Tuy là loại quả có giá trị dinh dưỡng cao, nhưng Sabôchê luôn có giá rẻ khi đến mùa rộ, quả dễ bị hư hỏng, dập nát và khó vận chuyển đi xa. Do đó, việc chế biến Sabôchê thành các sản phẩm có giá trị là vấn đề rất cần thiết.

Với đề tài “*Nghiên cứu thử nghiệm chế biến rượu vang Sabôchê*” chúng tôi hy vọng sẽ nâng cao giá trị vốn có của quả Sabôchê, nhằm nâng cao thu nhập của người nông dân và đưa ra thị trường các sản phẩm mới phục vụ nhu cầu cho người tiêu dùng.

1.2. Mục đích và yêu cầu thực hiện

1.2.1. Mục đích

- ✓ Xác định phương pháp chiết xuất tốt nhất.
- ✓ Xác định các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng rượu vang Sabôchê.

1.2.2. Yêu cầu thực hiện

- ✓ Thử nghiệm các phương pháp chiết xuất.
- ✓ Xác định nồng độ đường, chủng nấm men và tỷ lệ nấm men thích hợp cho quá trình lên men rượu.
- ✓ Đánh giá chất lượng sản phẩm bằng phương pháp cảm quan.

1.2.3. Giới hạn đề tài

- ✓ Chỉ thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm.
- ✓ Do giới hạn về thời gian nên thời gian lên men phụ chỉ theo dõi trong 1 tháng (thay vì 9 tháng).

Phần 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Tổng quan về cây Sabôchê

2.1.1. Giới thiệu

Sabôchê (*Manilkara zapota*, Linn. Van Royen hay *Achras zapota* Linn.) còn gọi là hồng xiêm hay lông mứt, là loại cây quen thuộc của vùng nhiệt đới và bán nhiệt đới. Sabôchê dễ trồng ở nhiều nơi, kể cả các 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 2.300ha, sản lượng 23.000tấn/năm). Cây mau cho trái, có khả năng cho nhiều trái trong năm với năng suất cao (20 – 40t/ha từ năm thứ 7 trở đi).

Ngoài việc để ăn tươi hay chế biến làm kem, mứt, nước trái cây,... cây Sabôchê được trồng làm kiếng nhờ có tán đẹp. Nhựa cây (latex) cũng được dùng làm nguyên liệu chế biến ‘chewing gum’ và dùng trong nha khoa. Gỗ thân được sử dụng làm bàn ghế (nhờ có gân đẹp như Nụ), vật dụng trang trí, vật liệu xây dựng và các chân móng cầu chịu mặn tại các hải cảng. Hạt Sabôchê xay nhuyễn (chứa saponin, quercetin và 23% dầu) dùng trị sán, lã và có tính lợi tiểu. Đặc biệt, quả Sabôchê chín ăn rất ngọt, có mùi thơm nhẹ, mát và mềm ngon, chứa nhiều loại vitamin (như vitamin A, B1, B2, C...). Đây là thứ quả rất tốt cho người già, trẻ em, người có bệnh dạ dày và đường ruột...

2.1.2. Nguồn gốc và phân bố



Hình 2.1. Cây Sabôchê

Sabôchê là cây gỗ cao có tán đẹp, lá xanh quanh năm, vừa là cây bóng mát, vừa là cây cảnh. Trồng Sabôchê để lấy quả, lấy nhựa, đồng thời Sabôchê là cây có tác dụng cải tạo môi trường sống.

Sabôchê có nguồn gốc nhiệt đới Châu Mỹ, Mêhicô từ đó lan truyền sang các vùng nhiệt đới phía Nam Brazil, phía bắc Florida, và Haoai của Châu Mỹ; còn ở Châu Á thì có

Ấn Độ, Thái Lan, Sirilanka, Việt Nam, Indonesia, Philippin và một số nước Châu Phi khác như Công Gô...(Trần Thế Tục, kỹ thuật trồng và chăm sóc xoài, na, hồng xiêm).

2.1.3. Đặc điểm sinh học của Sabôchê

2.1.3.1. Rễ

Do nhân giống bằng cành chiết nên bộ rễ Sabôchê thuộc loại rễ ăn nông, đại bộ phận tập trung ở tầng đất 0 – 40cm (90 – 92%) (Sabôchê Xuân Đình và Thanh Hà). Rễ tơ chiếm khoảng 3,5 – 3,7%; rễ dẫn 9,5 – 10,3% và rễ cái chiếm 85 – 87% so với tổng lượng rễ của cây. Độ ăn xa của rễ so với đường kính tán cây có tỷ lệ 1 : 1,2. Sự phân bố và trọng lượng rễ còn tùy thuộc vào giống.

2.1.3.2. Thân tán

Cây Sabôchê có 1 thân chính, chiều cao từ 10 – 15m, chỗ đất tốt có thể cao 20m. Vỏ thân màu nâu thẫm, dày, sù sì. Tán cây có nhiều dạng tùy theo giống: có hình cầu, mâm xôi, hình tháp. Có giống phân tầng rõ. Các giống trồng ở Đồng Bằng Sông Cửu Long thường cao 3m, tán rộng 1,3 – 1,6m sau 3 năm và cao 6 – 8m, tán 6 – 8m sau 10 năm; trên 10 năm cây ít cao thêm nhưng có tán rộng 10m.

2.1.3.3. Lá

Lá nguyên, dài, dày, bóng, mọc so le và tạo thành chùm ở ngọn các nhánh nhỏ. Lá non màu vàng nâu và xanh đậm khi già. Lá Sabôchê hầu như xanh quanh năm,



Hình 2.2. Lá Sabôchê

không rụng lá hàng năm, mà thông thường chỉ có cành già mới rụng. Màu sắc lá, độ lớn của lá, cấu trúc mặt lá và biên lá là những chỉ tiêu giúp phân biệt được các giống khác nhau trong sản xuất. Ví dụ lá Sabôchê Xuân Đình bầu, mặt lá vênh, mép lá có gợn sóng, lá dày và có màu xanh vàng; còn giống Thanh Hà lá nhỏ, dài, ít vênh, mép lá không gợn sóng, lá mỏng và có màu xanh đậm...

2.1.3.4. Lộc, cành

Trong điều kiện khí hậu ở vùng đồng bằng Bắc Bộ các đợt lộc của Sabôchê xuất hiện từ cuối tháng 2 cho đến tháng 11. Trong 1 năm có 3 đợt lộc chính. Đợt 1 từ tháng 3 đến tháng 5 (vụ xuân), đợt 2 từ cuối tháng 5 đến tháng 7 (vụ hè), đợt lộc thứ 3 từ giữa tháng 7 đến tháng 11 (vụ thu). Số đợt lộc trong năm, số lượng lộc trên cây nhiều hay ít, thời gian hoàn thành một đợt dài hay ngắn phụ thuộc vào tuổi cây, tình hình dinh dưỡng, số quả trên cây, thời tiết khí hậu của từng năm. Trong điều kiện thời tiết ẩm áp và cây được bón đủ phân, nước thì hầu như quanh năm lúc nào trên cây cũng có những đợt lộc mới. Trong vụ thu thời gian để hoàn thành 1 đợt lộc khoảng 19 – 20 ngày.

2.1.3.5. Nụ, hoa

Hoa Sabôchê nhỏ, trắng, không mùi, có lông tơ ở mặt ngoài dài 6 – 8mm. Đường kính khi nở 1,0 – 1,5cm, cuống nhỏ, dài 1 – 2cm. Đầu tiên ở nách lá xuất hiện mầm hoa, dần dần lớn lên thành nụ, trên 1 cành thường có 5 – 15 nụ hoa ở nách lá. Hoa mọc tập trung hay đơn độc từ nách lá ở chỗ gần ngọn nhánh. Hoa có cánh dính liền ở đáy, dạng hình chuông hoặc phình ở đáy, trắng chia thành 6 thùy. Từ khi xuất hiện nụ đến hoa đầu tiên nở mất khoảng 24 – 38 ngày, trên 1 chùm hoa, hoa đầu tiên đến hoa cuối cùng nở khoảng 6 – 7 ngày. Thời gian để hoàn thành 1 đợt hoa trên cây phải mất 35 – 45 ngày. Hoa Sabôchê nở từ buổi sáng đến trưa, nở rộ lúc 6 – 8h sáng (theo dõi ở vườn quả của trường Đại học Nông Nghiệp I với 2 giống Sabôchê Xuân Đình và Thanh Hà, năm 1989). Còn theo Dương Minh và cộng sự (1993) ở trường Đại học Cần Thơ thì hoa Sabôchê bắt đầu nở khoảng 3h chiều và nở hoàn toàn vào 1h trưa hôm sau. Thời điểm thụ phấn từ 8h sáng đến 5h chiều, nhưng thường vào lúc 10h – 11h30’.



Hình 2.3. Hoa Sabôchê

2.1.3.6. Trái



Hình 2.4. Quả Sabôchê

Từ hai ngày sau khi thụ phấn, bầu noãn đã phát triển thành dạng trái. Trái chín 4 – 6 tháng sau khi trổ, tùy giống và điều kiện canh tác. Tại vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long, mùa trái chín tháng 1– 5(dương lịch).

Trái Sabôchê hình cầu hay hơi dài, kích thước thay đổi tùy giống (dài 3 – 9,5cm, đường kính 3 – 8cm, nặng 50 – 250g), có màu đỏ mốc hay vàng nâu khi chín. Một vài giống cho trái nặng đến 700g. Vỏ trái mỏng, được bao phủ bởi một lớp phấn nâu, lớp này bị tróc loang lổ khi trái chín. Thịt trái có màu vàng, đến nâu đỏ, mềm, mọng nước, thơm ngon, ngọt, sớ thịt mịn hay thô (cát) tùy giống. Trái non chứa nhiều mũ trắng, lượng mũ này giảm dần khi trái già. Trái có 0 – 10 hạt (thường 1 – 4 hạt). Hạt đẹp, màu nâu sậm hay đen bóng, có ngạnh bén với vỏ cứng dày 0,6 – 1,5mm (Công nghệ sinh học cây ăn quả, Trần Văn Minh, viện sinh học nhiệt đới).

2.1.4. Thành phần hoá học

Phần ăn được của trái Sabôchê chứa một lượng dưỡng chất (trong 100g phân tích) như sau:

Bảng 2.1. Thành phần hoá học của Sabôchê

Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
Phần ăn được	84	Lân (mg)	9
Âm độ (%)	74,1	Sắt (mg)	1
Năng lượng (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
Chất xơ (%)	3	Vitamin B2 (mg)	0,01
Muối khoáng (%)	0,4	Niacin (mg)	0,3
Calcium (mg)	32	A. ascorbic (mg)	26

(Nguồn: Intergan et al., 1968).

2.1.5. Phân loại

Sabôchê gồm có các giống:

- *Sabôchê Xuân Đỉnh*: Trồng nhiều ở xã Xuân Đỉnh (huyện Từ Liêm, ngoại thành Hà Nội). Tán cây có hình chổi xể, cây thưa thoáng. Lá màu xanh vàng, mặt lá hơi vênh, mép lá có gợn sóng, đầu lá tù. Quả hình tim, trọng lượng trung bình 100g, chín ăn rất ngọt, thơm nhẹ, rất ít xơ, không có cát. Đây là giống chín sớm nhất trong các giống Sabôchê hiện có.
- *Sabôchê Thanh Hà*: Trồng nhiều ở Hải Dương. Tán cây có dạng hình cầu, cây rậm rạp, khoẻ, nhiều cành. Lá nhỏ và dài hơn Sabôchê Xuân Đỉnh, quả nặng trung bình 80g, cây sai quả, khi chín ăn có nhiều cát nên ít hấp dẫn người mua. Quả chín muộn hơn Sabôchê Xuân Đỉnh.

- *Sabôchê quả trám*: Tán cây có dạng hình tháp, phân tầng, cành nhỏ. Lá màu xanh, nhỏ, thuôn dài về hai đầu. Quả nhọn có hình quả trám, trọng lượng trung bình 66g, rất sai quả, quả đậu thành chùm. Quả chín ăn rất ngọt, không có cát nhưng thịt quả hơi nhão, quả nhỏ hơn Sabôchê Xuân Đỉnh.
- *Sabôchê quả nhót*: Tán cây dạng hình tháp, phân tầng, góc độ phân cành so với thân chính tương đối đồng đều, lá nhỏ, thon dài màu xanh đậm, mép lá không gợn sóng. Quả hình nhót, thường đậu quả thành chùm, quả nhỏ – trung bình 56g. Quả chín ăn ngọt, ngon, không có cát.
- *Sabôchê quả dài*: Tán cây hình chổi xể, cành lá xòe rộng. Lá to màu xanh nhạt, mép lá gợn sóng. Quả to hơn Sabôchê quả nhót, quả dài có dạng hình ôvan. Quả chín thì ngọt, ăn ngon, không có cát.
- *Sabôchê Đồ Trạch (còn gọi là hồng Dăm)*: Tán cây có dạng hình tháp, cành lá rậm rạp, lá màu xanh đậm, lá to và dài hơn so với Sabôchê Xuân Đỉnh và Thanh Hà, mép lá không có gợn sóng, lá bóng và nhẵn. Quả to trung bình 120g, không có cát, đây là giống quả chín muộn nhất (sang tháng 4).

Ngoài các giống Sabôchê kể trên, ở Huế còn có các giống quả dài trông tựa quả xoài: Quả to, có trọng lượng 200 – 300g, ngoài ra còn có giống quả tròn, quả to có thể đến 300g, ăn ngọt, nhiều nước. Cả hai loại này thịt quả không chắc và mịn như Sabôchê Xuân Đỉnh (Trịnh Thu Hương, kỹ thuật trồng và chăm sóc vườn rau, vườn quả hộ gia đình).

2.1.6. Tình hình tiêu thụ Sabôchê

Theo Nguyễn Đình Khang (1992) thì “trái Sabôchê do cha Gernet đưa từ Mỹ đến năm 1890” và từ đó đến nay Sabôchê được đem trồng ở nhiều vùng trong nước từ Nam chí Bắc. Ở xã Xuân Đỉnh (Hà Nội) nhà nào cũng trồng Sabôchê với tổng số 13.746 cây ở các lứa tuổi (Trần Thế Tục, 1989), ở đây có giống Sabôchê ngon nổi tiếng khắp miền Bắc. Ở Hải Hưng xã Thanh Sơn, huyện Nam Thanh có 1.700 hộ gia đình, toàn xã có 18.700 cây là nơi có nhiều Sabôchê nhất của tỉnh Hải Hưng và trồng giống Thanh Hà. Ở miền Trung và miền Nam đều có trồng Sabôchê nhưng mức độ trồng tập trung nhất phải nói ở cù lao Mỹ Phước huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng (năng suất của mỗi hộ có thể lên đến 10 tấn quả/năm).

2.2. Giới thiệu chung về rượu vang

2.2.1. Lịch sử phát triển rượu vang

Theo người Hy Lạp và người Ai Cập cổ xưa, rượu vang được sản xuất từ rất lâu đời trên thế giới. Loại quả đầu tiên được dùng để chế biến rượu vang là từ các giống nho khác nhau (*Vitis vinifera*). Đây là những giống nho hoang dại, sau đó được thuần chủng cách đây 4000 năm trước công nguyên.

Những năm 600 trước công nguyên, rượu vang đã được chế biến rộng rãi từ khu vực Địa Trung Hải đến Pháp, sau đó lan sang Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha, Algeria. Khi lan sang khu vực Châu Âu và Bắc Phi, những nhà sản xuất mới bắt đầu quan tâm tới số lượng và chất lượng của rượu vang. Hiện tại, Pháp, Mỹ, Argentina và Nga đứng đầu trong 10 nước sản xuất rượu vang của thế giới (COABC: BC Organic Certification Standards, 2003).

Hiện nay, mỗi năm người ta chế biến hàng tỉ lít rượu vang nho, có những nước như Pháp mỗi ngày tiêu thụ 1/2l vang nho mỗi người.

Người Việt Nam mới làm quen với vang khoảng 100 năm nay, chủ yếu ở thành thị. Năm 1979, một số cơ sở của ngành nông nghiệp như Viện kỹ thuật miền Đông Nam Bộ, nông trường Thanh Hà, Bộ lương thực thực phẩm bước đầu sản xuất vang dứa, vang dâu. Đến năm 1983, ngành công nghiệp vang nước ta chính thức ra đời với công trình nghiên cứu của Nguyễn Quang Hào và cộng sự. Từ đó lần lượt ra đời các loại vang Thăng Long (1983), vang Gia Lâm (1985), vang Tây Đô (1986). Tháng 12/1997 Nguyễn Quang Hào và cộng sự đã bảo vệ thành công đề tài “Nâng cao chất lượng vang Việt Nam”, sau đó, nhiều cơ sở sản xuất rượu vang đã được hình thành, nghiên cứu, giúp cho ngành rượu vang Việt Nam phát triển một cách vững chắc (Trần Quý Thắng, 1999).

2.2.2. Định nghĩa rượu vang

Theo định nghĩa ngày nay, rượu vang là loại rượu được sản xuất từ dịch quả ép của các loại quả khác nhau (táo, nho, mơ, thơm...), có hương vị thơm ngon của quả tự nhiên, giàu vitamine và có độ cồn nhẹ 10 – 14% thích hợp cho phụ nữ (Lâm Thanh Hiền, 2004).

2.2.3. Nguyên liệu để sản xuất rượu vang

Tất cả các loại quả tươi có chứa đường, protid, vitamine, muối khoáng, không chứa độc tố có hại thì có thể dùng để sản xuất rượu vang. Thành phần hóa học của các

loại quả ảnh hưởng nhiều đến chất lượng rượu vang đặc biệt là mùi vị của vang. Trong đó, thành phần dịch quả quyết định đến 60% chất lượng vang, 40% còn lại là do chế biến. Để sản xuất rượu vang có chất lượng thì ngoài các thành phần khác, quả phải có một hương thơm dễ chịu và một lượng các acid hữu cơ như: acid citric, acid malic... thích hợp (Vũ Công Hậu, 1983).

2.2.4. Thành phần hóa học của rượu vang

Ngoài hương vị vang đặc trưng, rượu vang còn chứa các thành phần hóa học khác như:

- Etylic: là thành phần quan trọng trong sản xuất rượu vang, độ cồn phổ biến của rượu vang vào khoảng 9 – 12%.
- Đường: thành phần đường trong rượu vang chủ yếu là đường trong dịch quả và đường cho vào trước khi lên men và lượng đường sót lại sau khi lên men.
- Glyxeryl: có thể hiện diện ở nồng độ 0,5 – 1,5%.
- Aldehyde: rượu vang có chứa một hàm lượng Aldehyde nhất định, quan trọng nhất là acetatdehyde.
- Acid: acid trong rượu vang có từ nguyên liệu và từ quá trình lên men.
- Vitamine: trong rượu vang rất giàu vitamine như vitamine C, vitamine B1, vitamine B2, PP...
- Phenol: đóng vai trò quan trọng trong việc tạo màu và hương vị rượu vang.
- Tanin: có từ quả hoặc bổ sung trong quá trình sản xuất.
- Khoáng: rượu vang có nhiều muối khoáng, phổ biến là P, S, K, Na, Mg, Fe, Cu.... Mặc dù hàm lượng rất thấp nhưng giữ vai trò quan trọng. Những chất này góp phần làm tăng hương vị của rượu, làm tăng giá trị dinh dưỡng.

2.2.5. Phân loại rượu vang

Rượu vang có nhiều loại, thông thường người ta dựa vào công nghệ sản xuất để phân loại, có thể chia làm 2 nhóm lớn:

2.2.5.1. Nhóm rượu vang không có gas (CO₂)

Có thể chia thành các nhóm nhỏ sau:

- ❖ Nhóm vang phổ thông: lên men hoàn toàn, không được bổ sung cồn ethylic trong quá trình sản xuất, bao gồm 2 loại:
 - Vang khô (lên men cạn kiệt) chứa hàm lượng ethanol tích tụ do lên men có thể từ 9 – 14%, hàm lượng đường còn lại không quá 0,3%.

- Vang bán ngọt: chứa hàm lượng ethanol do lên men tự nhiên từ 9 – 12%, hàm lượng đường còn lại từ 3 – 8%.
- ❖ Nhóm rượu vang cao độ: là những loại rượu vang có hàm lượng ethanol cao hơn so với nhóm vang phổ thông. Có thể dùng cồn tinh luyện để nâng cao hàm lượng ethanol trong quá trình sản xuất. Nhóm này gồm 2 loại:
 - Vang nặng: có hàm lượng ethanol từ 17 – 20%, ethanol sinh ra do lên men không ít hơn 3%. Hàm lượng đường còn lại từ 1 – 4%.
 - Vang khai vị: hàm lượng ethanol từ 12 -17%, trong đó ethanol sinh ra do lên men không ít hơn 1,2%. Tùy thuộc vào hàm lượng đường tồn tại trong vang mà vang khai vị có thể chia thành các dạng sau:
 - Vang khai vị bán ngọt: ethanol từ 14 – 16% và đường từ 5 – 12%.
 - Vang khai vị ngọt: ethanol từ 15 – 17% và đường từ 14 – 20%.
 - Vang khai vị rất ngọt (còn gọi là rượu liquor): ethanol từ 14 – 17% và đường từ 21 – 35%.

2.2.5.2. Nhóm rượu vang có gas (CO₂)

Có thể chia làm 2 nhóm:

- ❖ Rượu vang có gas tự nhiên (do lên men tạo ra): để giữ được gas tự nhiên trong sản phẩm người ta thực hiện quá trình lên men phụ trong các chai kín, thùng, hệ thống thùng kín. Tùy thuộc vào điều kiện lên men phụ (nhiệt độ, thời gian) sẽ cho ra loại rượu Champagne với các mức độ chất lượng khác nhau. Tuy nhiên, nhóm vang có gas tự nhiên thường có độ rượu từ 10 – 12,5%, độ ngọt từ 3 – 5%.
- ❖ Rượu vang có gas nhân tạo (do nạp CO₂ vào trong sản phẩm): có thể tạo ra nhiều loại rượu vang khác nhau theo thị hiếu hoặc theo yêu cầu của thị trường tiêu thụ cụ thể. Nhóm vang có gas nhân tạo thường có độ rượu từ 9 – 12%, độ ngọt từ 3 – 8%.

2.3. Nấm men dùng trong sản xuất

2.3.1. Định nghĩa nấm men

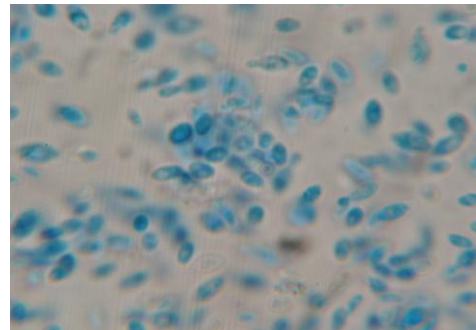
Nấm men là tên chung để chỉ nhóm nấm có cấu tạo đơn bào, thường sinh sản theo kiểu nảy chồi và phân cắt. Nhóm này có trong tự nhiên, nhiều loài trong nhóm này có khả năng lên men rượu, sinh sản nhanh chóng, sinh khối giàu protein và vitamin. Vì

vậy chúng được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến rượu, bia, cồn, thức ăn cho người và gia súc, làm nở bột mì, gây hương nước chấm (Lương Đức Phẩm, 2002).

2.3.2. Hình thái và kích thước tế bào nấm men

Hasen đã nghiên cứu và phân lập được nhiều loài nấm men rượu vang. Hình dạng, kích thước tế bào nấm men thay đổi tùy loài, giống và điều kiện ngoại cảnh. Chúng thường có dạng hình trứng, hình cầu, hình oval ellip, một số có dạng ellip kéo dài, hình tam giác, và một số dạng đặc biệt khác.

Saccharomyces thường có dạng hình bầu dục trong môi trường nuôi cấy giàu dinh dưỡng, trong điều kiện yếm khí có dạng hình tròn, trong điều kiện hiếu khí thì tế bào có hình dài hơn. Kích thước của tế bào nấm men vào khoảng 3 – 5 x 5 – 10 μ m. Ngoài ra, những nang bào tử của nấm men cũng có dạng hình cầu với kích thước từ 2– 4 μ m.



Hình 2.5. *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.3. Cấu tạo tế bào nấm men

Nấm men có cấu tạo đơn bào gồm có: thành tế bào, màng nguyên sinh chất, tế bào chất, nhân, và các cơ quan khác như không bào, các giọt mỡ, hạt glycogen...

Ở một số nấm men, đặc biệt là nấm men trong sản xuất rượu vang, sản xuất bia, vỏ tế bào có khả năng kết dính, vì vậy chúng có thể kết với nhau và lắng xuống phía dưới gọi là men chìm. Các chủng này có ý nghĩa lớn trong nghề nấu bia và làm rượu vang vì làm cho dịch lên men trong, sáng. Những nấm men không có khả năng kết lắng gọi là men nổi.

2.3.4. Sinh sản của nấm men

Các chủng nấm men khi gặp điều kiện thuận lợi sẽ sinh sản, hình thức sinh sản chủ yếu bằng cách nảy chồi. Tế bào mẹ nảy sinh ra một hoặc nhiều chồi nhỏ rồi lớn dần và tách ra thành các tế bào riêng lẻ. Quá trình này xảy ra khoảng 2h. Một số tế bào nấm men khi gặp điều kiện không thuận lợi cũng có thể sinh sản bằng bào tử. Bào tử khi ra ngoài gặp điều kiện thuận lợi sẽ phát triển thành tế bào nấm men mới. Mỗi loại nấm men khác nhau cần điều kiện sinh sản khác nhau (Lương Đức Phẩm, 2002).

❖ Những tính chất đặc trưng của nấm men

Theo Bùi Ái (2003) nấm men tồn tại rất rộng rãi trong tự nhiên, thường gặp chúng trên các loại quả chín nhưng không nhiều so với những vi sinh vật có hại khác như nấm mốc, nấm men dại, vi khuẩn. Tuy nhiên, khi cho lên men tự nhiên thì các loại nấm men này sẽ phát triển và tăng số lượng tế bào nhanh chóng lấn lướt các vi sinh vật dại khác nhất là ở giai đoạn cuối của quá trình lên men. Điều này là do hầu hết các tế bào nấm men có khả năng chịu đựng độ cồn cao. Có những nòi lên men tạo được độ cồn đến 18 – 20,5%.

Nấm men có khả năng sử dụng các loại đường khác nhau như glucose, fructose, manose, saccharose, maltose...

Trong môi trường giàu các acid hữu cơ, nấm men cũng thích nghi để chịu đựng được hàm lượng acid tartaric cao. Khả năng này giúp cho chúng phát triển tốt, vượt trội khi sống trong môi trường nước quả chua.

Hiện nay, giống nấm men được sử dụng trong sản xuất rượu là *Saccharosemyces cerevisiae* hay *Saccharosemyces ellipsoideus*.

❖ Đặc điểm của nấm men *Saccharosemyces cerevisiae*:

- ✓ Hình ellip hoặc oval, kích thước chiều dài trung bình 8 – 10 μ m, cấu tạo đơn bào, không có chất diệp lục.
- ✓ Là loại nấm men kỵ khí không bắt buộc.
- ✓ Nồng độ cồn có thể tồn tại là 18 – 19% thể tích và bị dừng lên men ở nồng độ 16 – 17% thể tích.
- ✓ Nồng độ đường, nồng độ SO₂ mà nấm men chịu được tùy theo chủng nấm men.
- ✓ Nấm men phát triển bình thường trong pH 3,5 – 4, do đó pH của dịch lên men phải được chỉnh đến vùng có pH 3,5 – 4.

Saccharosemyces ellipsoideus có khả năng phân huỷ đường glucose, galactose, saccharose, maltose nhưng không lên men được lactose, dextrin.

Sau khi lên men chúng tạo thành khối kết lắng nhanh và không có màng.

❖ Yêu cầu đối với nấm men

Hương vị đặc trưng của từng loại rượu vang không những phụ thuộc chủ yếu vào đặc tính của nguyên liệu, quy trình công nghệ mà còn phụ thuộc vào chủng nấm men. Những nấm men được phân lập và sử dụng trong sản xuất cần phải đạt các yêu cầu sau:

- ✓ Tốc độ phát triển mạnh, số lượng tế bào nấm men $120 - 140.10^6$ tb/ml, hoạt lực men cao.
- ✓ Lên men được nhiều loại đường khác nhau, đạt tốc độ lên men nhanh và có khả năng lên men ở nhiệt độ tương đối cao $> 35^{\circ}\text{C}$.
- ✓ Có tính kết lắng tốt, sản phẩm tạo ra có hương thơm đặc trưng.
- ✓ Số lượng tế bào nảy chồi $10 - 15\%$.
- ✓ Số lượng tế bào chết $< 2\%$.

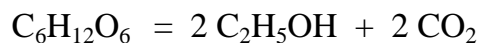
2.4. Công nghệ lên men

2.4.1. Khái niệm chung

Lên men rượu là quá trình oxy – hoá khử sinh học để thu năng lượng và các hợp chất trung gian trong điều kiện kỵ khí, trong đó đường được phân huỷ thành rượu và khí CO_2 dưới tác dụng của vi sinh vật. Tác nhân chính của quá trình lên men rượu là các chủng nấm men thuộc giống *Saccharosmyces*. Quá trình này là một chuỗi các phản ứng phức tạp với sự tham gia của nhiều hệ enzym do nấm men tiết ra.

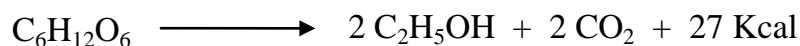
2.4.2. Cơ sở sinh hoá của quá trình lên men rượu

Từ năm 1803, L.J.Thenard chứng minh rằng nấm men là nguyên nhân trực tiếp của các quá trình lên men rượu. Đến năm 1810, Gay – Lussac viết thành phương trình:



Năm 1857, Pasteur đã chỉ ra rằng: “Sự phân giải đường thành rượu và CO_2 là sự hô hấp của nấm men trong điều kiện yếm khí”

Phương trình tổng quát của sự lên men rượu là:

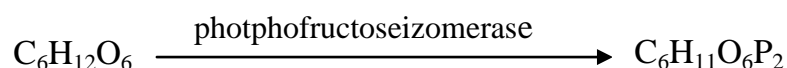


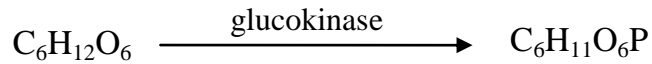
Sản phẩm chính là ethanol và khí CO_2 ; sản phẩm phụ là glyceryl, acid succinic, một số aldehyde, rượu cao phân tử...

Quá trình lên men rượu nếu đi từ glucose lên men ở pH 4 – 5 sẽ qua 5 giai đoạn sau:

Giai đoạn 1: photphoryl hoá

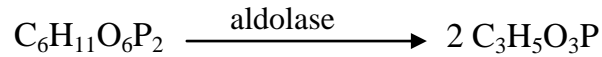
Thực hiện nhờ sự tham gia của enzym glucokinase và ATP tạo ra glucose – 6 – photphat. Glucose – 6 – photphat dễ dàng chuyển thành fructose 1 – 6 diphotphat dưới tác dụng của izomerase





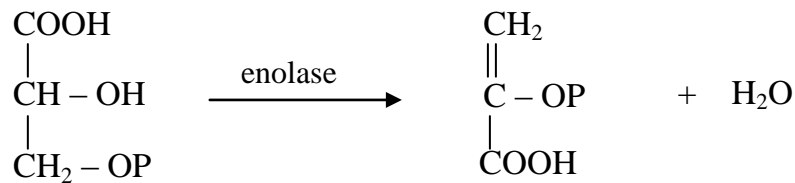
Giai đoạn 2: cắt đôi mạch

Fructose – 1 – 6 diphosphat chứa 2 gốc photphat và ở 2 vị trí đối xứng nên dễ dàng bị cắt làm 2 tạo thành 3 – photpho glycerinaldehyde

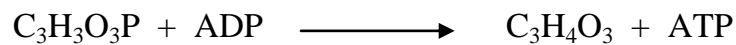


Giai đoạn 3: oxy hoá

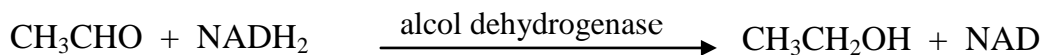
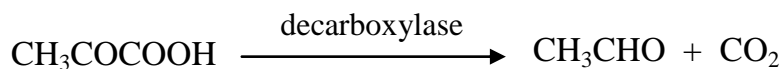
3 – photpho glycerinaldehyde bị loại một phân tử nước chuyển thành acid photphoenol pyruvic



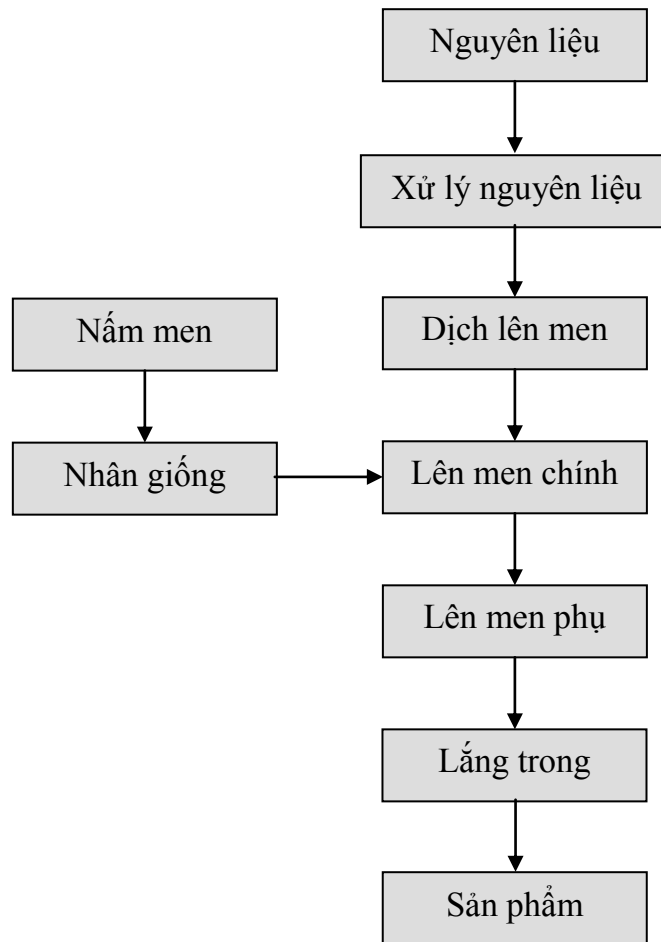
Giai đoạn 4: tạo acid pyruvic



Giai đoạn 5: acid pyruvic tạo thành rượu trong điều kiện yếm khí dưới tác dụng của enzyme decarboxylase và enzyme alcol dehydrogenase



2.4.3. Quy trình cơ bản trong sản xuất rượu



Sơ đồ 2.1. Quy trình cơ bản sản xuất rượu vang

Trong quá trình sản xuất rượu vang thường trải qua 3 giai đoạn phát triển như sau:

Giai đoạn 1: lên men chính. Xảy ra ở nhiệt độ 20 – 30⁰C khoảng 10 ngày hoặc dài hơn. Điều quan trọng nhất trong giai đoạn này là hoạt động của nấm men tiêu thụ các chất dinh dưỡng, chất có đạm, biến đường thành cồn ethylic đồng thời liên tục giải phóng CO₂ làm tăng nhiệt độ. Cuối giai đoạn lên men chính, dịch lên men trong dần vì protein lắng xuống. Nấm men trong nước quả tươi thường ít hơn nấm mốc nhưng nấm men lại có khả năng phát triển trong điều kiện thiếu oxy hoặc kỵ khí, đồng thời lên men tích tụ rượu. Với điều kiện kỵ khí và nồng độ rượu cao trong dung dịch đã làm ức chế nấm mốc, chính trong điều kiện này nấm men đã phát triển và chiếm ưu thế trong quá trình lên men tự nhiên.

Giai đoạn 2: lên men phụ. Khi kết thúc quá trình lên men chính, rượu vang có nồng độ rượu thích hợp ức chế hoàn toàn hoạt động của nấm men và giai đoạn lên men

phụ bắt đầu. Giai đoạn này không còn lên men rượu ô ạt nữa mà chỉ lên men chậm chậm phân huỷ những gam đường cuối cùng. Đồng thời khuẩn lactic bắt đầu hoạt động lên men malolactic làm cho rượu bớt chua, CO₂ vẫn tiếp tục được giải phóng nhưng ít dần đi. Acid citric được chuyển hoá thành diacetyl, axetoin, 2– 3 butylenglicol là những tiền chất trong việc tạo chất thơm đặc trưng cho rượu vang. Cuối giai đoạn này, CO₂ trong rượu vang được bão hoà, các hạt lơ lửng, các tanat, muối tartrat được lắng xuống làm cho rượu vang trở nên trong.

Giai đoạn 3: tồn trữ rượu. Đây là giai đoạn nhằm làm tăng chất lượng rượu. Sau vài năm (2 – 4 năm) tàng trữ trong thùng gỗ, rượu vang lắng trong hơn và hương vị của vang đặc trưng hơn. Với nhiệt độ thấp làm cho vang mau trong hơn. Mỗi loại rượu có hương vị đặc trưng riêng. Mùi hương của mỗi loại rượu được hình thành từ quá trình oxy hóa và hình thành các ester. Các ester được hình thành là do sự kết hợp giữa rượu và acid. Quá trình oxy hóa xảy ra nhờ sự có mặt của các phân tử oxy, lượng nhỏ các phân tử oxy này có được từ bên ngoài và chúng chui vào trong qua các khe hở cực nhỏ của thùng chứa rượu. Tuy nhiên, nếu lượng O₂ tràn vào quá nhiều, các vi sinh vật không mong muốn sẽ có cơ hội phát triển gây hỏng vang. Hiện tượng này có thể tránh được khi tàng trữ ở nhiệt độ thấp và giữ cho thùng chứa luôn đầy rượu.

2.4.4. Chất lượng rượu vang

Rượu vang đạt chất lượng tốt khi đảm bảo các tiêu chuẩn sau:

- ✓ Độ cồn không vượt quá 15⁰.
- ✓ Tinh cặn (độ khô) khoảng 30 – 32 g/l.
- ✓ Đường khử khoảng 2 g/l.
- ✓ Tro 2 – 3 g/l.
- ✓ Độ chua khoảng 5 g/l (biểu thị bằng acid sunfuric).
- ✓ Hàm lượng acid tartaric 2 – 7 g/l.
- ✓ Chất sát trùng duy nhất được sử dụng là SO₂, hàm lượng toàn phần không được quá 0,45 g/l.
- ✓ Độ trong và màu sắc: phải là chất lỏng trong suốt, không có vật thể lạ, màu sắc hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
- ✓ Mùi hoà hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
- ✓ Vị hoà hợp, êm dịu, hậu vị tốt, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.

2.4.5. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu

2.4.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ của môi trường lên men có ý nghĩa rất quan trọng đối với sự phát triển của quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.

Mỗi loài vi sinh vật có nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của chúng. Đối với nấm men *Saccharosemyces* nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển là 28⁰C đến 32⁰C. Nếu nhiệt độ thấp thì nấm men sinh trưởng, phát triển kém dẫn đến thời gian lên men bị kéo dài. Nếu nhiệt độ cao hơn 32⁰C, tốc độ sinh trưởng, phát triển của nấm men mạnh nhưng dễ bị nhiễm khuẩn vì đây là nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn phát triển (ví dụ: ở 42⁰C sự lên men ngừng hẳn, ở nhiệt độ cao vi khuẩn và nấm men dại, nhất là vi khuẩn axetic, vi khuẩn lactic sẽ phát triển mạnh ảnh hưởng đến chất lượng rượu).

Sự lên men ở nhiệt độ thấp tốt hơn sự lên men ở nhiệt độ cao vì rượu sẽ trong hơn, giúp quá trình tạo hương, mùi vị được thơm ngon, hài hòa. Ngoài ra, ở nhiệt độ cao nấm men phát triển càng nhanh thì sự chuyển hóa đường thành rượu càng kém, đồng thời nấm men sẽ tiết ra nhiều chất phụ.

Nên giữ nhiệt độ ổn định trong suốt quá trình lên men do nhiệt độ ảnh hưởng đến quá trình lên men và những hoá chất hình thành. Ngoài ra, quá trình lên men rượu là quá trình sinh năng lượng cho nên nhiệt độ tối ưu nhất cho quá trình lên men là 21 – 24⁰C và trong quy trình sản xuất các dịch trái cây lên men thường kèm theo các bồn chứa nước để giảm nhiệt độ môi trường bên trong.

2.4.5.2. Ảnh hưởng của pH

pH của môi trường ảnh hưởng rất lớn đến quá trình phát triển của nấm men. Tuy nhiên, pH tối ưu cho sự phát triển và lên men rượu của nấm men không cố định, pH này phụ thuộc vào nhiều yếu tố:

- ✓ Loài, chủng nấm men.
- ✓ Thành phần của môi trường lên men.
- ✓ Điều kiện lên men.

Đối với các loại nấm men rượu vang, pH tối ưu vào khoảng 4 – 5. Tuy nhiên ở pH = 3 – 3,5 nhiều chủng nấm men vẫn phát triển tốt, vì vậy khi làm rượu vang người ta thường chọn những chủng nấm men hoạt động và phát triển tốt ở pH = 3,2 – 4, đồng thời ở pH này sẽ hạn chế các vi sinh vật làm hư hỏng rượu vang (Vũ Công Hậu, 1983).

Đối với nấm men *Saccharosemyces ellipsoideus*, Odinchova đã nghiên cứu vùng pH thấp nhất mà nấm men phát triển được:

- ✓ Ở pH 3,5 tất cả các loại nấm men đều phát triển bình thường.
- ✓ Ở pH 3,1 – 2,9 chỉ có 30% phát triển bình thường.
- ✓ Ở pH 2,7 chỉ có 3% phát triển bình thường.

Ở pH thấp (2,5 – 2,7) tác giả phát hiện thấy kích thước của tế bào nấm men bị nhỏ lại và phần lớn những tế bào của một vài giống bị chết. Do đó, trong quá trình lên men thường xuyên kiểm tra chặt chẽ môi trường chuẩn bị lên men nhằm đảm bảo quá trình lên men được hoàn thiện.

2.4.5.3. Ảnh hưởng của oxygen môi trường

Mặc dù lên men rượu là một quá trình hô hấp yếm khí, nhưng trong giai đoạn đầu của quá trình lên men cần phải cung cấp oxygen để cho nấm men sinh trưởng và phát triển để tăng sinh khối, nếu thiếu oxygen thì hoạt động của nấm men sẽ yếu đi. Tuy nhiên khi bắt đầu chuyển sang giai đoạn lên men hoàn toàn, nếu trong môi trường có oxygen thì nấm men sẽ tăng sinh khối và không thực hiện quá trình lên men. Do đó, độ thoáng khí của môi trường rất bất lợi cho quá trình lên men. Ngoài ra, việc tạo môi trường yếm khí có tác dụng hạn chế sự hoạt động của vi khuẩn lactic, nấm men đại làm hư hỏng rượu.

2.4.5.4. Ảnh hưởng của ethanol

Ethanol là sản phẩm quan trọng của quá trình lên men rượu vang, thường chứa từ 10 – 14%. Tuy nhiên nó có thể ức chế hoạt động của nấm men. Khi độ cồn bằng 1,5% thể tích thì bắt đầu ức chế sự phát triển và sinh sản của nấm men. Khi hàm lượng cồn tăng đến 5% thể tích thì sự sinh sản bắt đầu ngừng trệ. Nồng độ cồn lên 7 – 8% thể tích thì quá trình lên men giảm dần.

Ảnh hưởng của nồng độ cồn lên các loại nấm men không giống nhau. Đa số các loại nấm men ở điều kiện tối ưu chịu được nồng độ cồn khoảng 14 – 16% thể tích. Những nấm men đại chỉ chịu được độ cồn thấp, do đó chúng chỉ sống sót trong giai đoạn đầu của quá trình lên men. Khi lượng cồn tăng cao thì những chủng nấm men chịu được độ cồn cao sẽ chiếm ưu thế (Bùi Ái, 2003).

Bảng 2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến một số loại nấm men

Loại nấm men	Nồng độ cồn cực đại nấm men có thể tồn tại (tính theo phần trăm thể tích)
<i>Saccharosemyces oviformic</i>	18 – 19
<i>Haseni aspoire</i>	4 – 5,9
<i>Saccharosemyces ellipsoideus</i>	18
<i>Saccharosemyces pasteurianus</i>	10
Nấm men rượu vang	18 – 19
Nấm men đại	4 – 5

Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến hoạt động sống của nấm men còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác: nhiệt độ, pH.

2.4.5.5. Ảnh hưởng của nồng độ dịch đường lên men

Đường cũng là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động của nấm men và quá trình lên men. Đường cung cấp năng lượng và carbon cho nấm men hoạt động. Môi trường có nồng độ đường từ 10 – 25% thuận lợi cho sự lên men, khi nồng độ đường từ 25% trở lên thì sự lên men khó khăn và chậm. Dung dịch đường có nồng độ rất cao sẽ tạo ra áp suất thẩm thấu lớn gây phá hủy trạng thái sinh lý bình thường của nấm men, thời gian lên men sẽ kéo dài, sử dụng đường không triệt để, hiệu suất tạo thành rượu từ một đơn vị đường giảm, lượng rượu tạo ra không nhiều, đồng thời nồng độ rượu tạo thành lớn sẽ ức chế hoạt động của nấm men. Ngược lại môi trường lên men có nồng độ đường quá thấp sẽ không đủ cơ chất cho nấm men hoạt động (Lê Ngọc Tú, 2002).

Đối với đa số nấm men vang, khi tăng nồng độ đường trong môi trường hơn 30% thì hiệu suất cồn ethylic tạo ra giảm dần. Một nghiên cứu của Bendensvin cho thấy những nấm men chịu được nồng độ rượu cao là những nấm men chịu được áp suất thẩm thấu của đường mạnh.

Nồng độ đường trong môi trường lên men cao thường gây nhiều bất lợi, làm tăng một lượng acid bay hơi trong môi trường. Một giải pháp cho vấn đề này là bổ sung đường vào nhiều lần với lượng nhỏ thay vì chỉ một lần.

2.4.5.6. Ảnh hưởng của thời gian lên men

Thời gian là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm vang. Trong thời gian lên men chính, nếu thời gian lên men quá ngắn, có thể lượng cồn tạo ra quá ít. Trong thời gian lên men phụ, nếu thời gian lên men không đủ để hương hình thành, mùi vang sẽ không đặc trưng. Đối với đa số nấm men, thời gian lên men chính tốt nhất là 7 – 20 ngày. Thời gian lên men phụ và tàng trữ của các loại rượu phải từ vài tháng trở lên.

Thời gian lên men chịu ảnh hưởng của các yếu tố như: nhiệt độ lên men, nồng độ đường, chủng nấm men ... Nếu nồng độ đường càng cao thì thời gian lên men càng dài. Ngoài ra, lượng giống bổ sung cũng là một yếu tố quyết định thời gian lên men. Với đa số các loại vang, lượng giống bổ sung vào khoảng 3 – 10% thể tích dịch lên men.

2.4.5.7. Ảnh hưởng của khí SO₂

Nấm men rất bền với SO₂ so với các loại vi sinh vật khác, do đó, người ta thường xông khí SO₂ vào thùng lên men thanh trùng trong sản xuất rượu vang. Tuy nhiên, với nồng độ cao, khí SO₂ có thể làm ức chế quá trình lên men của nấm men.

Theo Xamxonova, khí SO₂ với liều lượng 0,1% làm giảm hoạt độ của chế phẩm enzyme còn với liều lượng 0,5% thì hoàn toàn ức chế các hoạt động của enzyme.

Theo N.K Mogilianskii, hàm lượng SO₂ trong môi trường càng cao sẽ kéo dài thời gian lên men:

- ✓ Nồng độ khí SO₂ 50 mg/l dịch lên men sẽ kéo dài thời gian lên men 18 – 24 giờ.
- ✓ Nồng độ khí SO₂ 70 mg/l dịch lên men sẽ kéo dài thời gian lên men 5 – 6 ngày.
- ✓ Nồng độ khí SO₂ 1000 – 1500 mg/l dịch lên men sẽ kéo dài thời gian lên men 1 năm.

2.4.5.8. Ảnh hưởng của nồng độ CO₂ trong môi trường lên men

CO₂ được hình thành trong quá trình lên men rượu từ đường: một phần sẽ tồn tại trong môi trường, một phần sẽ tách lên trên bề mặt môi trường, một phần sẽ tích tụ lại thành bề mặt ngăn cách giữa không khí và môi trường.

CO₂ tích tụ trong môi trường chỉ làm giảm khả năng sinh sản của nấm men, nhưng không làm yếu khả năng lên men của nấm men.

Theo Muler Turgar với nồng độ khoảng 0,25% trọng lượng CO₂ trong môi trường sẽ ức chế sự sinh sản của nấm men.

Theo Smitener, sự sinh sản của nấm men ngừng lại khi nồng độ CO₂ đạt đến 1,5% trọng lượng. Với lượng CO₂ này tương đương với áp suất 7,7atm ở 15⁰C.

CO₂ nằm trong khoảng không giữa bề mặt môi trường và không khí có tác dụng kiềm chế sự phát triển của vi sinh vật hiếu khí gây hại.

2.4.6. Các dạng hư hỏng của rượu

2.4.6.1. Hư hỏng do vi sinh vật hiếu khí

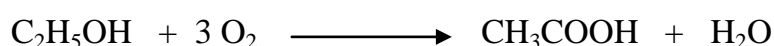
Chủ yếu là loài *Mycoderma vini* và vi khuẩn acetic. Những vi khuẩn này phát triển tốt trong điều kiện có oxy, chúng không gây trở ngại nếu quá trình làm rượu được theo dõi cẩn thận.

Candida mycoderma hình thành màng trên bề mặt rượu và tấn công vào dịch chiết của rượu. Nó sinh ra CO₂ làm cho rượu có độ cồn thấp và nhạt.

Phương trình hóa học:



Vi khuẩn acetic sẽ sinh ra dấm từ rượu khi có mặt của oxy:



2.4.6.2. Hư hỏng do vi sinh vật yếm khí hay hiếu khí tùy nghi

❖ *Tourne dicase*

Loài này được phát hiện bằng kính hiển vi, thu được từ sự ly tâm mẫu vang. Là vi khuẩn yếm khí, hình que mảnh, phát triển mạnh trong môi trường có độ cồn không quá cao. Sự phát triển của loài này có thể được ngăn chặn bằng một lượng tanin và SO₂ từ Na₂SO₃. Hậu quả khi chúng tồn tại trong môi trường lên men là làm tăng độ acid bay hơi, làm giảm lượng acid không bay hơi và quan trọng là mùi vị cũng bị ảnh hưởng. Chúng sinh ra CO₂, acid acetic, acid propionic và acid lactic.

❖ *Vi khuẩn gây quánh dính và đục*

Khi rót rượu ra ly, vang không chảy đều, lỏng như nước mà dính như có hồ nếp. Loại vi khuẩn này không phổ biến, có thể phòng ngừa bằng cách thêm tanin hoặc dùng SO₂.

❖ **Các loại nấm men dại**

- ✓ *Hasenula anomala*: loài này phát triển tạo thành lớp màng trên bề mặt, khả năng lên men rất yếu, tích lũy 2 – 3% thể tích cồn, chúng có khả năng oxy hóa rượu thành CO₂ và nước.
- ✓ *Pichia alcoholophila*: loài này có khả năng tạo màng, có khả năng oxy hóa rượu tạo CO₂ và nước.
- ✓ *Candida mycoderma*: tế bào hình ovan, không tạo bào tử. Chúng phát triển trên bề mặt rượu và cũng có khả năng oxy hóa rượu tạo thành nước và CO₂.
- ✓ *Bretanomyces vini*: loài này thường gây hỏng rượu champagne, chúng bị tiêu diệt ở nồng độ sulfite từ 100 – 150mg/l.

Tác hại của men dại trong sản xuất rượu:

Làm giảm hàm lượng rượu vì chúng dùng rượu làm năng lượng cho quá trình hô hấp. Sản phẩm trung gian của quá trình này là acid acetic, aldehyd, acid pyruvic và esterethylic. Sau khi dùng hết rượu chúng tiếp tục oxy hóa acetic.

Làm giảm chất hòa tan trong vang do kết quả chúng phá hủy acid bay hơi và glyxêryl.

❖ **Vi khuẩn**

- ✓ *Acetobacter*: trong vang thường thấy 20 loại khác nhau. Chúng có khả năng phát triển ở nồng độ cồn 14% thể tích. Khi phát triển trong vang chúng tạo thành một lớp màng mỏng, oxy hóa rượu thành acid acetic, tạo cho vang có mùi khó chịu. Nồng độ acid acetic khoảng 1mg/l thì thích hợp với vang ngon, nếu quá 2mg/l thì không thích hợp cho việc sử dụng.
- ✓ *Micrococcus*: nhiệt độ tối ưu phát triển là 26⁰C, chúng có thể sống trong dịch có nồng độ cồn dưới 12% thể tích cồn, loài này có khả năng lên men đường thành acid lactic và CO₂, gây đục rượu và ức chế sự phát triển của nấm men.
- ✓ *Lactobacterium*: thường gặp nhất là loại *lactobacterium manitopeum*, chúng có thể tồn tại với nồng độ cồn dưới 14%, gây đục vang .
- ✓ *Bacterium tartarphorum*: loài này oxy hóa acid vini, muối của chúng và glyxêryl.

❖ **Nấm mốc**

Thường gặp trong vang là các loại như: *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Khi gặp điều kiện thuận lợi chúng phát triển mạnh và gây hỏng vang. Chúng phát triển nhiều trên các thiết bị, bề mặt hoa quả, làm nhiễm bản bầu không khí lên men.

=> **Những phương pháp chống nhiễm và chống gây bệnh cho rượu:**

- ✓ Đối với nấm mốc phải thường xuyên kiểm tra không khí trong phòng làm việc, thiết bị cần phải vệ sinh, thanh trùng và sấy khô định kỳ.
- ✓ Đối với nấm men dại cần phòng ngừa bằng cách đổ đầy dịch lên men. Như thế sẽ hạn chế sự phát triển của nấm men tạo màng.
- ✓ Với loài *Mycoderma*, hạn chế sự xâm nhập của không khí từ môi trường bên ngoài thùng lên men và xông SO₂ vào trong thùng.
- ✓ Vi khuẩn *lactic*, cần sulfite hóa vang ở nồng độ SO₂ từ 50 – 70ppm hoặc thanh trùng pasteur 5 – 15phút ở 60 – 70⁰C.

Phần 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ 06/02/2006 – 18/06/2006 tại phòng thí nghiệm Vi Sinh khoa Công Nghệ Thực Phẩm trường Đại Học Nông Lâm.

3.2. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

Nguyên liệu

Địa điểm thu mua Sabôchê: chợ Tân Phú, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, Tp.HCM. Sabôchê được chọn là giống Sabôchê quả dài, quả phải chín đều, không bị hư hỏng, dập nát.

Giống vi sinh vật

Chủng *Saccharomyces sp* phân lập từ dịch quả Sabôchê (*S.Sabôchê*).

Chủng *Saccharomyces cerevisiae* 28 – phòng thí nghiệm Vi sinh Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM.

Chủng *Saccharomyces cerevisiae* F43 – Viện bảo tàng giống vi sinh vật Hà Nội.

Hoá chất

❖ Hóa chất phân tích hóa lý

Hoá chất định lượng acid tổng số: NaOH 0,1N, phenolphtalein...

Nhóm hóa chất định lượng đường tổng, đường khử: Ferricyanure $K_3Fe(CN)_6$, NaOH 2,5N, HCl 5%, dung dịch glucose 0,5%,...

Chất điều chỉnh vật chất khô: đường saccharose.

❖ Môi trường kiểm tra chỉ tiêu vi sinh

Môi trường kiểm tra *TSVKHK*: NA (Nutrion Agar).

Môi trường kiểm tra *TSNMNM*: PGA (Potato Glucose Agar).

Môi trường kiểm tra *Coliforms*: BGBL (Brilliant Green Bile Lactose).

Môi trường kiểm tra *E.coli*: EMB (Eosin Methylene Bleu Agar).

Thiết bị

- ✓ Autoclave.
- ✓ Thiết bị chung cất.
- ✓ Khúc xạ kế Atago từ 0 – 32%.
- ✓ Máy đo pH Metrohm 744.
- ✓ Bộ chung cất rượu, cồn kế.

- ✓ Dụng cụ chuẩn độ acid, chuẩn độ xác định đường tổng, đường khử.
- ✓ Tủ ẩm.
- ✓ Các thiết bị cần thiết khác.

3.3. Nội dung và phương pháp tiến hành

3.3.1. Khảo sát thành phần nguyên liệu

Bảng 3.1. Thành phần nguyên liệu được khảo sát

STT	Thành phần	Đơn vị
1	Nồng độ chất khô hòa tan	%
2	Độ pH	
3	Độ acid (theo acid citric)	%
4	Đường tổng	%
5	Đường khử	%

3.3.2. Phương pháp xác định các chỉ tiêu

3.3.2.1. Chỉ tiêu hóa lý

Bảng 3.2. Phương pháp xác định chỉ tiêu hóa lý

STT	Chỉ tiêu hóa lý	Phương pháp xác định
1	Nồng độ chất khô	Khúc xạ kế Atago 0 – 32%
2	pH	Máy đo pH Metrohm 744
3	Chuẩn độ acid tổng số	Dùng dung dịch chuẩn NaOH 0,1N với chỉ thị màu là phenolphthalein (phụ lục 1.1)
4	Đường tổng, đường khử	Phương pháp Ferricyanure (phụ lục 1.2)
5	Độ rượu	Dùng rượu kế có vạch đo độ rượu và nhiệt độ quy về độ cồn chuẩn ở 15 ⁰ C (phụ lục 1.3)

3.3.2.2. Chỉ tiêu vi sinh

Kiểm tra *TSVKHK*: bằng phương pháp đổ đĩa, đếm khuẩn lạc mọc trên môi trường NA sau thời gian nuôi cấy ở 37⁰C trong 24giờ (phụ lục 2.1).

Kiểm tra *TSNM*: bằng phương pháp đổ đĩa, đếm khuẩn lạc mọc trên môi trường PGA sau 24giờ nuôi cấy ở 37⁰C (phụ lục 2.2).

Kiểm tra *Coliforms*: bằng phương pháp MPN: cho vào các ống nghiệm có chứa dung dịch BGBL một lượng mẫu xác định cần kiểm tra. Dựa trên những ống cho kết quả (+), lập một chỉ số rồi tra bảng Mac Crady để định lượng vi sinh vật/đơn vị thể tích hoặc khối lượng (phụ lục 2.3).

Kiểm tra *E.coli*: kiểm tra *Coliforms* ở 44,5⁰C cho khuẩn lạc nghi ngờ và có phản ứng IMViC phù hợp (phụ lục 2.4).

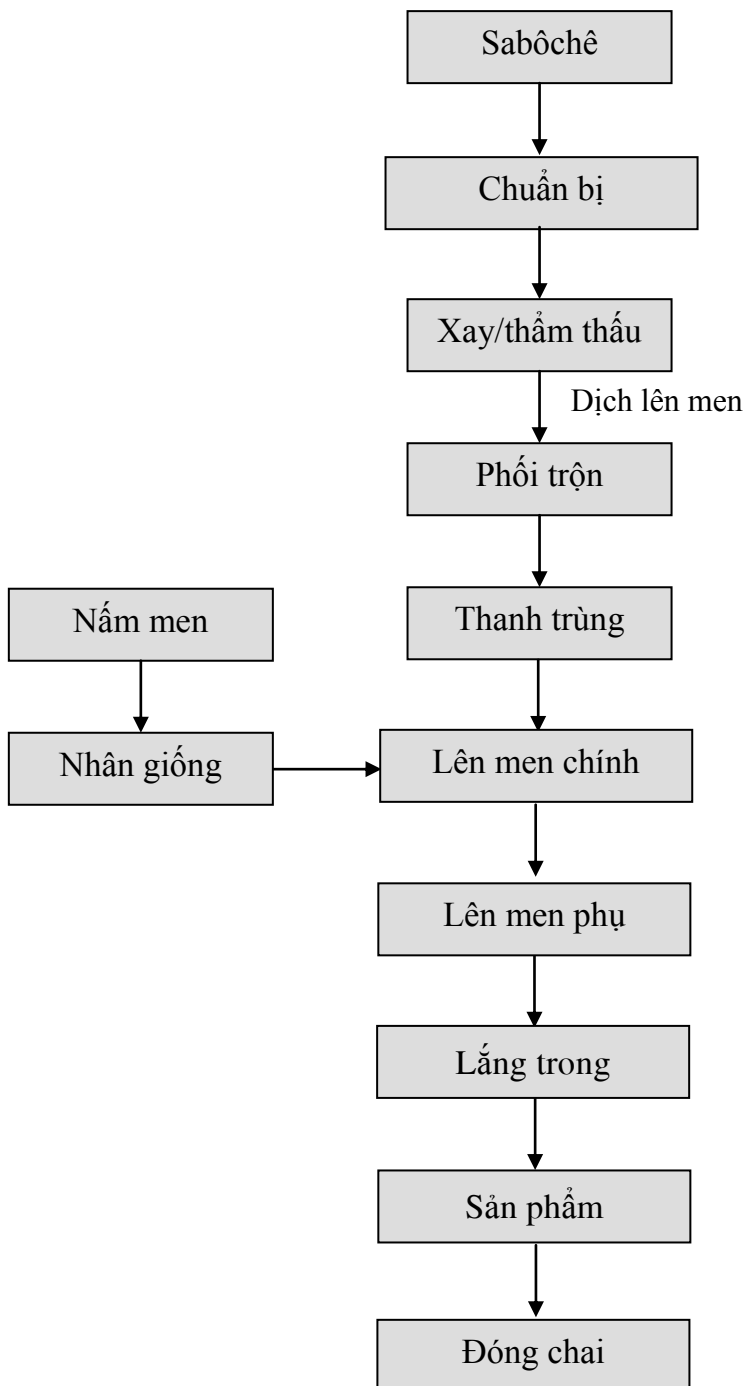
3.3.2.3. Chỉ tiêu cảm quan

Đánh giá các chỉ tiêu theo phép thử so hàng và phép thử cho điểm theo TCVN 3215 – 79 và Ngô Thị Hồng Thư (1989) (phụ lục 4 và 5).

Trong đề tài này, thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức được lập lại ba lần, quá trình lên men diễn ra ở nhiệt độ phòng (30 – 33⁰C). pH của dịch quả Sabôchê trước khi lên men là 3,5 – 3,6, mật độ nấm men nuôi cấy là 5x10⁶ tb/ml.

Các thí nghiệm được tiến hành trên cơ sở chọn các nghiệm thức tối ưu của thí nghiệm trước làm cơ sở cho các thí nghiệm sau.

Các thí nghiệm được tiến hành theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 3.1. Quy trình tiến hành thí nghiệm

3.3.2.4. Thí nghiệm 1: thử nghiệm các phương pháp chiết xuất dịch quả

Thí nghiệm khảo sát hai phương pháp lấy dịch quả: phương pháp xay và phương pháp thẩm thấu.

❖ Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1 yếu tố, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 2 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (3 hũ thủy tinh), mỗi hũ chứa 300ml dịch thu hồi.

Phương pháp chiết xuất Chỉ tiêu theo dõi	Phương pháp xay	Phương pháp thẩm thấu
Nồng độ chất khô (%)		
pH		
Độ cồn (%V)		
Lượng dịch thu hồi (ml)		

Tổng đơn vị thí nghiệm $2 \times 3 = 6$ (hũ).

❖ Cách tiến hành

- ✓ Phương pháp xay: Sabôchê đã chuẩn bị, cắt nhỏ 3 – 4cm cho vào máy xay sinh tố trong 30 giây. Tỷ lệ Sabôchê : nước thêm vào trong quá trình xay là 1 : 3. Dịch quả thu được sau khi xay đem đi để phối trộn.
- ✓ Phương pháp thẩm thấu: Sabôchê được chuẩn bị, cắt nhỏ 3 – 4cm, bổ sung 50% đường theo khối lượng Sabôchê, trộn đều và để cho dịch thoát ra trong khoảng 4 giờ, dịch quả thu được đem đi để phối trộn. Dịch quả thu được bằng cách lọc qua vải.

❖ Các yếu tố cố định

- ✓ Hàm lượng vật chất khô của dịch trước khi lên men: 20%.
- ✓ Thời gian lên men: 4 ngày.
- ✓ Nấm men sử dụng: *Saccharomyces cerevisiae* 28.
- ✓ Tỷ lệ nấm men: 10% so với dịch lên men.

❖ Chỉ tiêu theo dõi

Chỉ tiêu hóa lý: hàm lượng vật chất khô, pH, độ cồn sau khi lên men, lượng dịch thu hồi.

- ❖ **Mục đích:** xác định phương pháp lấy dịch quả tốt nhất cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.2.5. Thí nghiệm 2: khảo sát ảnh hưởng của các chủng nấm men lên quá trình lên men dịch quả

❖ Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1 yếu tố, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (3 ống nghiệm), mỗi ống chứa 30ml dịch lên men.

Chủng nấm men Chỉ tiêu theo dõi	Sc.28	S.Sabôchê	Sc.F43	S.Sabôchê + Sc.28	S.Sabôchê + Sc.F43
Nồng độ chất khô (%)					
pH					
Độ cồn (%V)					

Chú thích:

Sc.28: Saccharomyces cerevisiae 28

S.Sabôchê: Saccharomyces sp phân lập từ dịch quả (S. Sabôchê)

Sc.F43: Saccharomyces cerevisiae F43

S.Sabôchê + Sc.28: Saccharomyces sp Sabôchê + Saccharomyces cerevisiae 28

S.Sabôchê + Sc.F43: Saccharomyces sp Sabôchê + Saccharomyces cerevisiae F43

Tổng đơn vị thí nghiệm $3 \times 5 = 15$ (ống)

❖ **Cách tiến hành**

Các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae 28*, *Saccharomyces sp Sabôchê*, *Saccharomyces cerevisiae F43*, *Saccharomyces sp Sabôchê + Saccharomyces cerevisiae 28*, *Saccharomyces cerevisiae F43 + Saccharomyces sp Sabôchê* được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy trong môi trường lỏng, sau 24h, khi các chủng có mật độ 5×10^6 tb/ml thì được thu hồi canh khuẩn để tiến hành thí nghiệm. Pha chế nước quả sau khi thu hồi ở thí nghiệm trên với hàm lượng chất khô hòa tan là 20% đã thanh trùng. Phân phối dung dịch lên men và men giống vào trong ống nghiệm đã vô trùng với tỷ lệ men giống là 10% và nồng độ đường như trên.

❖ **Các yếu tố cố định**

Hàm lượng vật chất khô của dịch trước khi lên men: 20%.

Thời gian lên men: 4 ngày.

Tỷ lệ nấm men: 10% so với dịch lên men.

Nhiệt độ của quá trình lên men: 30°C.

❖ **Chỉ tiêu theo dõi**

- ✓ Chỉ tiêu hóa lý: hàm lượng vật chất khô, pH, độ cồn sau khi lên men.
- ✓ Tốc độ lên men, khả năng sinh CO₂ được ghi nhận bằng mắt.

- ❖ **Mục đích:** xác định chủng nấm men có khả năng lên men tốt nhất, cho giá trị cảm quan cao nhất để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.2.6. Thí nghiệm 3: khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men lên chất lượng của dịch lên men

❖ **Bố trí thí nghiệm**

Thí nghiệm 1 yếu tố, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (3 ống nghiệm), mỗi ống chứa 30ml dịch lên men.

Tỷ lệ nấm men (%)	5	10	15
Chỉ tiêu theo dõi			
Nồng độ chất khô (%)			
pH			
Độ cồn (%V)			

Tổng đơn vị thí nghiệm $3 \times 3 = 9$ (ống)

❖ **Cách tiến hành**

Sử dụng chủng nấm men và nồng độ chất khô hòa tan thích hợp nhất được chọn từ các thí nghiệm trên. Phân phối dịch lên men có nồng độ chất hòa tan và chủng nấm men đã được chọn vào các ống nghiệm vô trùng với tỷ lệ nấm men thay đổi là 5%, 10%, 15%.

❖ **Yếu tố cố định**

Thời gian lên men: 4 ngày.

Hàm lượng vật chất khô của dịch trước khi lên men: được chọn từ thí nghiệm 3.

Chủng nấm men: được chọn từ thí nghiệm 2.

Nhiệt độ của quá trình lên men: 30⁰C.

❖ **Chỉ tiêu theo dõi**

- ✓ Chỉ tiêu hóa lý: pH, độ cồn sau khi lên men.
- ✓ Tốc độ lên men, khả năng sinh CO₂ được ghi nhận bằng mắt.

- ❖ **Mục đích:** chọn được tỷ lệ men thích hợp nhất cho sản phẩm lên men.

3.3.2.7. Thí nghiệm 4: khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất khô lên quá trình lên men

❖ Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1 yếu tố, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại (3 ống nghiệm), mỗi ống chứa 30ml dịch lên men.

Nồng độ chất khô (%)	15	20	25	30
Chỉ tiêu theo dõi				
pH				
Độ cồn (%V)				

Tổng đơn vị thí nghiệm $3 \times 4 = 12$ (ống)

❖ Cách tiến hành

Dịch quả sau khi thu hồi được pha chế ở các nồng độ chất khô hòa tan là 15%, 20%, 25%, 30% được cho vào các ống nghiệm đã vô trùng, sau đó bổ sung vào 10% chủng nấm men đã được chọn từ thí nghiệm 2 với mật độ là 5×10^6 tb/ml.

❖ Các yếu tố cố định

- ✓ Thời gian lên men: 4 ngày.
- ✓ Chủng nấm men: được chọn từ thí nghiệm 2.
- ✓ Tỷ lệ nấm men: 10% so với dịch lên men.
- ✓ Nhiệt độ của quá trình lên men: 30°C .

❖ Chỉ tiêu theo dõi

- ✓ Chỉ tiêu hóa lý: pH, độ cồn sau khi lên men.
- ✓ Tốc độ lên men, khả năng sinh CO_2 được ghi nhận bằng mắt.

❖ **Mục đích:** xác định được nồng độ chất khô thích hợp cho quá trình lên men.

3.4. Kiểm tra chất lượng sản phẩm

Sản phẩm cuối cùng được tạo thành bằng cách chọn các yếu tố tối ưu của các thí nghiệm trên. Sản phẩm được kiểm tra chỉ tiêu vi sinh và đánh giá cảm quan bằng phương pháp cho điểm theo TCVN.

3.5. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý trên chương trình STAGRAPHIC 7.0

Phần 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Khảo sát thành phần nguyên liệu

Chọn những quả Sabôchê chín đồng đều, không hư hỏng, dập nát, đem nghiền nát, thu dịch quả, đem dịch quả đi tiến hành phân tích các chỉ tiêu hóa lý. Chúng tôi thu được các kết quả sau:

Bảng 4.1. Thành phần dịch quả Sabôchê

STT	Thành phần	Hàm lượng
1	Nồng độ chất khô hòa tan (%)	17,8
2	Độ pH	3.51
3	Độ acid (theo acid citric) (g/l)	0,55 ± 0,02
4	Đường khử (%)	5.36 ± 0,50
5	Đường tổng (%)	6,25 ± 0,50

Kết quả từ bảng 4.1 cho thấy độ acid và độ pH của nguyên liệu tương đối phù hợp với khả năng lên men của nấm men. Hàm lượng chất khô hòa tan tương đối cao (17,8%) và lượng đường tổng, đường khử tương đối thấp tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lên men.

4.2. Thử nghiệm các phương pháp chiết xuất dịch quả

Trong quy trình sản xuất các loại nước quả lên men, người ta có thể sử dụng nhiều phương pháp để thu hồi dịch quả như các phương pháp nghiền, chà, ép. Dịch quả sau khi thu hồi được bổ sung thêm đường, men giống để tiến hành lên men. Cách này sẽ rút ngắn giai đoạn lên men chính và thường thực hiện trên các loại quả mọng, mềm.

Sabôchê cũng thuộc loại quả có thịt mềm, vỏ rất mỏng nên có thể dễ dàng thu hồi dịch quả bằng các phương pháp trên. Tuy nhiên, để nâng cao hiệu suất thu hồi, chúng tôi thử nghiệm việc thu hồi dịch quả Sabôchê bằng hai phương pháp: phương pháp xay và phương pháp thẩm thấu. Kết quả thu được như sau:

Bảng 4.2. Các chỉ tiêu của dịch Sabôchê

Chỉ tiêu (trung bình) \ Phương pháp chiết xuất	Phương pháp xay	Phương pháp thẩm thấu
Nồng độ chất khô (%)	8,533 ^a	8,500 ^a
pH	3,460 ^a	3,497 ^a
Độ cồn (%V)	6,307 ^a	6,327 ^a
Lượng dịch thu hồi	381,333 ^b	139,600 ^a

Ghi chú:

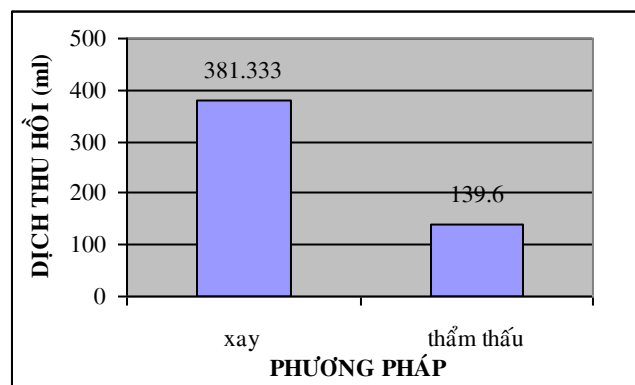
X^a, Y^b: khác biệt có ý nghĩa.

X^a, Y^a: khác biệt không có ý nghĩa.

Qua bảng 4.2, hàm lượng cồn trung bình của các nghiệm thức thay đổi từ 6,307% đến 6,327%, pH trung bình thay đổi từ 3,460 đến 3,497, nồng độ chất khô hòa tan thay đổi từ 8,533% đến 8,500%. Tuy nhiên, theo kết quả thống kê (phụ lục 7.1, 7.2, 7.3) ta thấy sự chênh lệch giữa các giá trị của nồng độ chất khô hòa tan, độ cồn và các giá trị pH của 2 phương pháp là không đáng kể.

=> Như vậy, phương pháp lấy dịch quả không ảnh hưởng tới chất lượng sản phẩm.

Tuy nhiên, kết quả xử lý thống kê (phụ lục 7.4) cho thấy lượng dịch thu hồi từ hai phương pháp rất khác biệt ($P < 0,05$). Khoảng biến thiên tỷ lệ thu hồi sản phẩm từ 139,6ml đến 318,33ml trên 100g nguyên liệu. Trong đó, phương pháp xay cho lượng dịch gấp 3 lần so với phương pháp thẩm thấu (bảng 4.2).

**Hình 4.1****So sánh dịch thu hồi giữa hai phương pháp chiết xuất**

Sự khác biệt này là do trong phương pháp thẩm thấu, khả năng ly trích dịch chưa triệt để, chưa tận dụng hết lượng dịch trong quả. Trong khi đó, ở phương pháp xay,

toàn bộ quả được sử dụng và quá trình lên men gồm cả xác quả. Sau khi lên men, dịch quả dễ dàng được lọc khỏi dịch lên men.

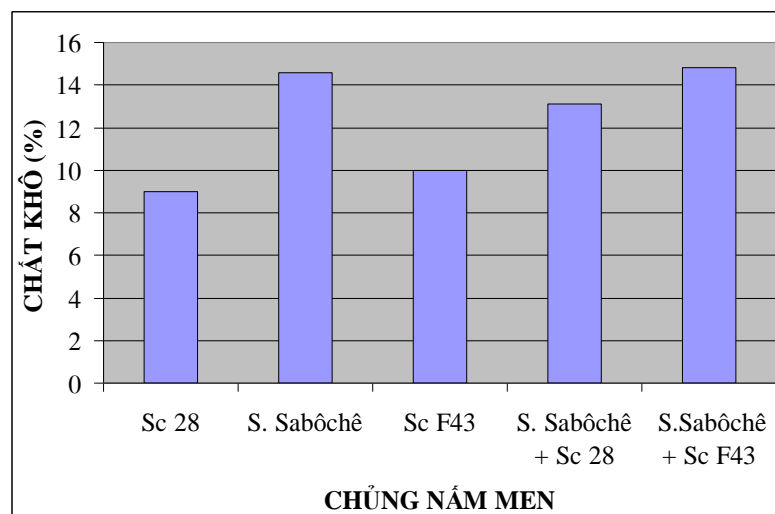
=> Phương pháp xay là phương pháp được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

4.3. Khảo sát ảnh hưởng của các chủng nấm men lên quá trình lên men dịch quả

Bảng 4.3. Ảnh hưởng của chủng nấm men đến quá trình lên men

Chỉ tiêu (trung bình)	Chủng nấm men <i>Sc.28</i>	<i>S.Sabôchê</i>	<i>Sc.F43</i>	<i>S.Sabôchê</i> + <i>Sc.28</i>	<i>S.Sabôchê</i> + <i>Sc.F43</i>
Nồng độ chất khô (%)	9 ^a	14,60 ^d	10,00 ^b	13,13 ^c	14,80 ^d
pH	3,45 ^a	3,44 ^a	3,45 ^a	3,45 ^a	3,44 ^a
Độ cồn (%V)	6,05 ^d	2,97 ^a	5,50 ^c	3,78 ^b	2,86 ^a

Bảng ANOVA và trắc nghiệm LSD (phụ lục 8) cho thấy ảnh hưởng của các chủng nấm men lên quá trình lên men của dịch quả là có ý nghĩa với độ tin cậy 95%. Tuy nhiên, không có khác biệt thống kê đối với các giá trị pH (phụ lục 8.2). Điều này cho thấy, sự thay đổi giá trị pH không phụ thuộc vào các chủng nấm men mà chỉ phụ thuộc vào hàm lượng chất khô hòa tan ban đầu và các loại acid hữu cơ sinh ra sau quá trình lên men.

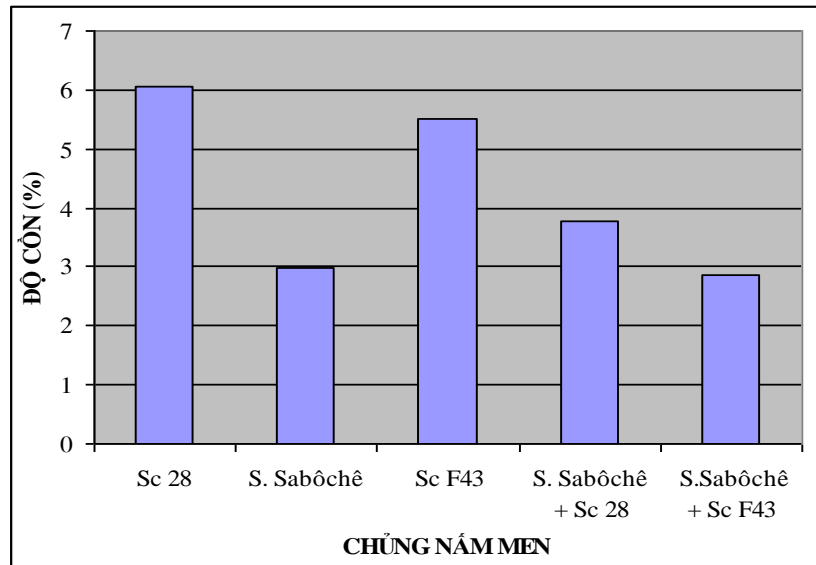


Hình 4.2

Thay đổi nồng độ chất khô của các chủng nấm men

Số liệu trong bảng 4.3 cho thấy: nhìn chung sau 4 ngày lên men, khả năng phân giải đường của các chủng nấm men *S.Sabôchê* + *Sc.F43*, *S.Sabôchê*, *S.Sabôchê* + *Sc.28*

là khá yếu nên hàm lượng chất khô hòa tan còn lại trong dịch lên men khá cao từ 14,8%, 14,6% đến 13,13%. Do đó, độ cồn sau khi lên men của các chủng nấm men này tương đối thấp. Sự khác biệt về khả năng sử dụng đường cũng như khác biệt về nồng độ cồn giữa các dịch sau lên men của các chủng nấm men có thể là do sự khác biệt về hoạt lực cũng như khả năng lên men của các loại men và khả năng thích nghi môi trường của các loại nấm men không giống nhau.



Hình 4.3. Thay đổi độ cồn của các chủng nấm men

Theo dõi diễn biến của quá trình lên men chúng tôi nhận thấy khả năng sinh khí của chủng nấm men S.Sabôchê + Sc.28 tương đối cao, lớp bọt trên bề mặt dịch lên men không quá mỏng, khả năng kết lắng cũng tương đối cao. Ngoài ra, sự kết hợp giữa hai chủng nấm men này làm cho dịch sau khi lên men có mùi thơm dịu, có hương vị đặc trưng của Sabôchê và độ cồn của dịch sau lên men cũng khá cao.

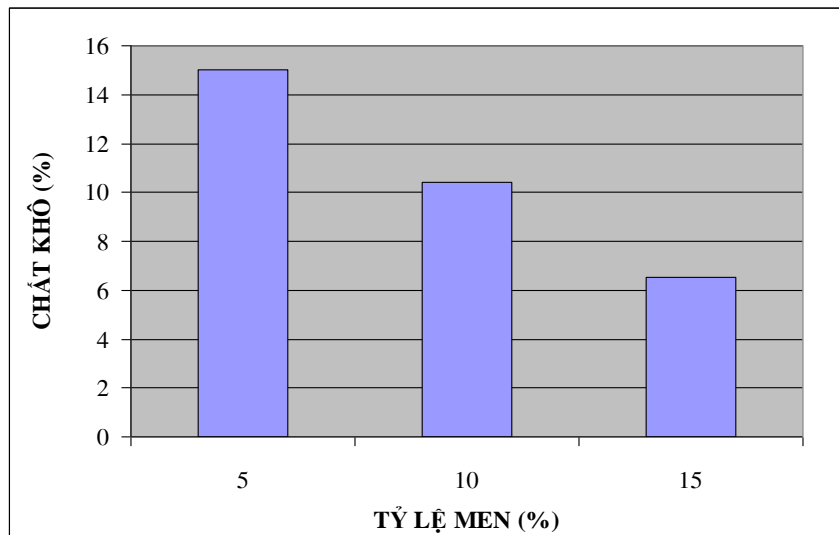
=> Chúng tôi chọn kết hợp hai chủng nấm men này làm yếu tố nấm men cho thí nghiệm sau.

4.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men lên chất lượng của dịch lên men

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men đến quá trình lên men được thực hiện ở các tỷ lệ: 5%, 10%, 15%. Sau khi kết thúc quá trình lên men tiến hành khảo sát nồng độ chất khô, pH và nồng độ cồn như bảng 4.4

Bảng 4.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men lên nồng độ chất khô, độ cồn và pH

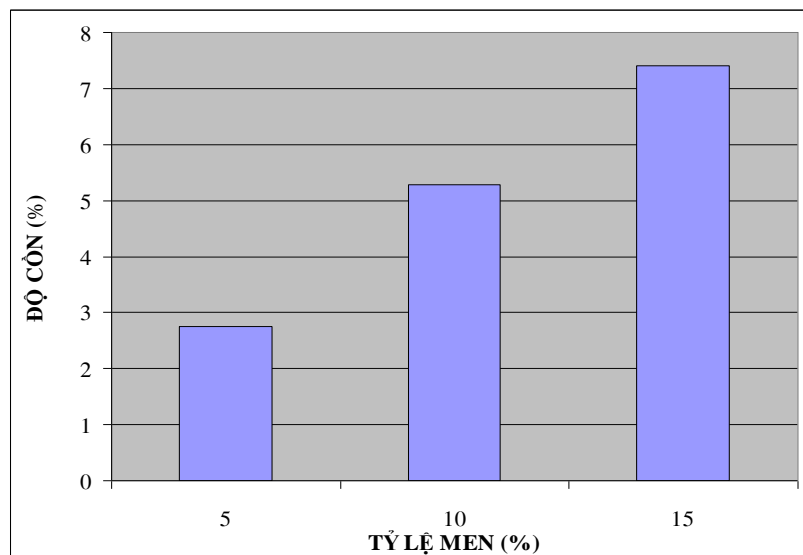
Chỉ tiêu (trung bình)	Tỷ lệ chủng nấm men (%) Mật độ tế bào 5×10^6 tb/ml	5	10	15
	Nồng độ chất khô (%)		15 ^c	10,40 ^b
pH		3,43 ^a	3,45 ^a	3,45 ^a
Độ cồn (%V)		2,75 ^a	5,28 ^b	7,41 ^c

**Hình 4.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ men giống đến sự thay đổi chất khô**

Bảng 4.4 cho thấy khi lượng giống cấy là 15% thể tích dịch lên men thì nồng độ chất khô và độ cồn đạt được trong dịch lên men thành phẩm là 6,53% và 7,41%V. Trong khi đó ở tỷ lệ men giống 5% và 10% thì nồng độ chất khô và nồng độ cồn lần lượt là 15%; 2,75%V và 10,4%; 5,28%V. Sự khác biệt này hoàn toàn có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$) (phụ lục 9.1 và 9.3). Sự khác biệt này được giải thích như sau:

Khi lượng giống cấy ban đầu là 5% thể tích dịch lên men thì độ cồn của rượu thành phẩm thấp. Do khi lượng giống nấm men quá ít, lượng tế bào nảy chồi không đạt lượng tối đa cần thiết, nấm men cần nhiều thời gian để thiết lập cân bằng động giữa quần thể nấm men và môi trường lên men. Mặt khác, do phải tăng sinh khối lên nhiều, nấm men tiêu thụ nhiều chất dinh dưỡng cho việc xây dựng tế bào mới. Đến khi đạt được lượng sinh khối cần thiết để lên men thì lượng đường trong môi trường đã giảm đáng kể nên mức độ lên men tạo cồn thấp.

Khi lượng giống nấm men ban đầu tăng lên 10% và 15% thể tích dịch lên men thì độ cồn của rượu tăng lên, nồng độ chất khô còn sót lại giảm (10,4% và 6,53%). Điều này có nghĩa là hàm lượng đường lên men, tiêu thụ để chuyển hóa thành rượu tăng lên. Thời gian cần thiết để thiết lập cân bằng động ngừng lại, nấm men nhanh chóng sinh trưởng và lớn lên đạt đến độ cồn cực đại. Đồng thời mật độ nấm men ban đầu đủ lớn thì tỷ lệ nấm men nảy chồi thấp, tốc độ sinh sản tế bào mới tương đối bé, chất dinh dưỡng ít bị tiêu hao cho việc xây dựng tế bào mới cũng như trao đổi chất cho tế bào con mới hình thành.



Hình 4.5

Ảnh hưởng của tỷ lệ men giống đến sự thay đổi độ cồn

Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng lượng giống đến một mức nào đó thì độ cồn thành phẩm thu được sẽ có xu hướng giảm xuống. Hiện tượng này là do mật độ nấm men ban đầu quá cao thì chúng sẽ sử dụng nhiều đường hơn để cạnh tranh dinh dưỡng và tăng sinh khối. Khi đó lượng sinh khối nấm men tăng đồng nghĩa với việc giảm lượng đường nên độ rượu tạo thành thấp.

Theo dõi quá trình lên men chúng tôi thấy rằng tốc độ lên men và khả năng sinh khí của dịch lên men tăng tỷ lệ với nồng độ nấm men được gieo cấy ban đầu (khả năng sinh CO₂ tăng dần từ 5%, 10% đến 15%). Tuy nhiên, theo thống kê sơ bộ, chúng tôi thấy rằng mặc dù nghiệm thức 10% tỷ lệ men ban đầu có khả năng sinh khí tương đối mạnh và độ cồn thu được không quá cao nhưng sản phẩm sau khi lên men lại được nhiều người ưa thích, có mùi thơm đặc trưng của quả Sabôchê và không quá đắng.

=> Do đó, chúng tôi chọn tỷ lệ nấm men là 10% làm tỷ lệ nấm men cho thí nghiệm sau.

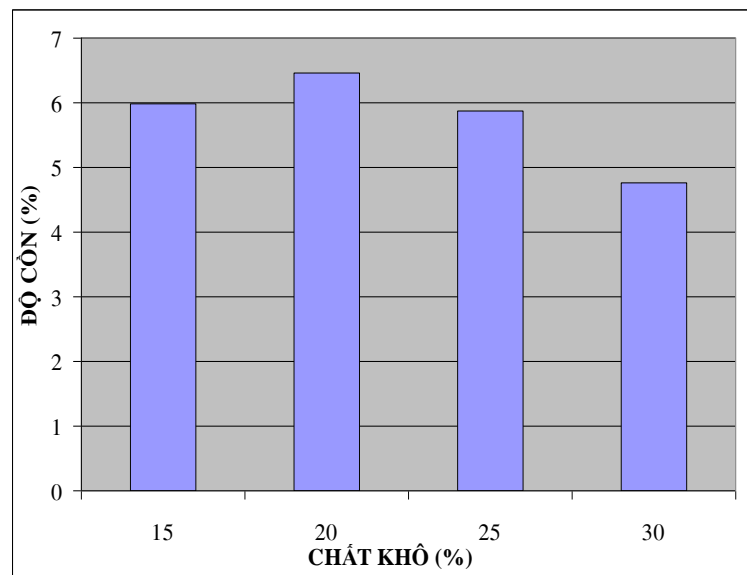
4.5. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất khô lên chất lượng của dịch lên men

Mỗi loại nước quả có hàm lượng đường khác nhau do đó để lên men hiệu quả cần bổ sung một lượng đường nhất định. Lượng đường bổ sung còn tùy thuộc vào khả năng chịu đựng áp suất thẩm thấu của nấm men để cân bằng áp suất bên trong tế bào với bên ngoài môi trường.

Ảnh hưởng của 4 nồng độ chất khô (15%, 20%, 25%, 30%) lên quá trình lên men dịch quả Sabôchê được trình bày qua bảng 4.5 và biểu đồ 4.6.

Bảng 4.5. Ảnh hưởng của nồng độ chất khô của dung dịch lên men lên sự thay đổi của pH và độ cồn

Nồng độ chất khô	15%	20%	25%	30%
Chỉ tiêu (trung bình)				
Nồng độ chất khô sau lên men (%)	4,13	8,26	14,33	21,33
pH	3,443 ^a	3,442 ^a	3,440 ^a	3,437 ^a
Độ cồn (%V)	5,977 ^b	6,453 ^c	5,867 ^b	4,767 ^a



Hình 4.6

Ảnh hưởng của nồng độ chất khô lên sự thay đổi của độ cồn

Trước khi lên men, nồng độ chất khô của 4 lô thí nghiệm là 15%, 20%, 25%, 30%, bảng 4.5 cho thấy sau 4 ngày lên men, nồng độ chất khô trung bình còn lại

tương ứng là 4,13%; 8,26%; 14,33%; 21,33%. Như vậy, nồng độ chất khô của 4 lô thí nghiệm giảm đi lần lượt là 10,86%; 11,74%; 10,67%; 8,67%. Đây chính là độ đường cần tiêu hao trong quá trình lên men. Lượng đường này được nấm men sử dụng vào 2 mục đích:

- ✓ Quá trình sinh sản và phát triển của chúng.
- ✓ Quá trình lên men đường thành cồn và một số sản phẩm khác.

Từ bảng 4.5 cũng cho thấy nếu nồng độ đường sử dụng ban đầu cao thì nồng độ còn lại cũng cao. Như vậy, trong khoảng thời gian lên men chính, ngoài lượng đường tiêu thụ cho quá trình sinh sản và phát triển, nấm men chỉ có thể lên men một lượng đường nhất định.

Theo kết quả xử lý thống kê, nồng độ cồn hình thành ở 4 lô thí nghiệm có sự khác biệt nhau và độ cồn ở các nồng độ 15% và 25% có sự giống nhau ($5,977^b$ và $5,867^b$). Sự khác biệt này hoàn toàn có ý nghĩa ($P < 0,05$). Với nồng độ chất khô ban đầu tăng dần như trong thí nghiệm có thể nhận thấy nồng độ cồn cũng tăng theo. Tuy vậy, đối với từng loại nấm men riêng biệt có khả năng chịu đựng áp suất thẩm thấu khác nhau. Khi tăng nồng độ đường trong môi trường lên men sẽ kéo dài thời gian lên men và hiệu suất tạo rượu từ một đơn vị đường sẽ giảm, lượng rượu tạo ra không đáng kể.

Cũng từ bảng 4.5 ta thấy pH trong dịch lên men giảm nhẹ (tỷ lệ nghịch với nồng độ đường ban đầu). Hiện tượng này là do khi tăng dần hàm lượng chất khô trong dịch lên men sẽ có một số acid hữu cơ được hình thành do đó, hàm lượng acid trong dịch lên men tăng dần và từ đó làm giảm pH của dịch lên men.

Bendensvin đã làm thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường lên sự lên men và nhận thấy rằng bắt đầu từ nồng độ đường tối ưu 30^0Bx thì khả năng lên men bắt đầu giảm, với nồng độ đường quá cao thì quá trình dừng lại ở 5 – 6% thể tích cồn. Nguyên nhân là phần lớn các tế bào nấm men đã chết do hiện tượng co nguyên sinh (Nguyễn Thanh Tiến, 2004). Như vậy, với nồng độ chất khô ban đầu trong khoảng 20 – 25% là phù hợp cho dịch lên men.

Kết quả thí nghiệm đã chứng minh rằng, với dịch quả Sabôchê có pH là 3,51; sự kết hợp 2 chủng nấm men *S.Sabôchê* + *Sc.28* với tỷ lệ giống nấm men bổ sung là 10% thể tích dịch lên men, thời gian lên men là 4 ngày thì nồng độ đường thích hợp nhất để lên men là 20%.

4.6. Kiểm tra chất lượng sản phẩm

Sản phẩm cuối cùng được thực hiện dựa trên các yếu tố tối ưu nhất được chọn ra từ các thí nghiệm trên, sản phẩm tạo thành có hàm lượng đường khử là 1,37%, độ cồn 13, độ chua 3,84 hoàn toàn đạt tiêu chuẩn chất lượng rượu vang. Sau đó, sản phẩm được tiến hành kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh và đánh giá cảm quan, kết quả kiểm tra như sau:

Bảng 4.6. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu vi sinh dịch sau lên men

Tên chỉ tiêu	Số lượng	Tiêu chuẩn
TSVKHK (cfu/ml)	70	100
<i>Coliforms</i> (MPN/ml)	0	0
TSNMNM (cfu/ml)	0	0
<i>E.coli</i> (cfu/ml)	0	0

Qua bảng kiểm tra chỉ tiêu vi sinh chúng tôi nhận thấy kết quả thu được đều nằm trong giới hạn cho phép của Tiêu chuẩn Nhà nước (TCVN 6096 – 1995, TCVN 5042 – 1994) (phụ lục 3).

Hội đồng cảm quan được thành lập gồm có 7 thành viên của lớp CNSH 28 và CBTP 28 có khả năng cảm quan, chúng tôi thu được kết quả đánh giá cảm quan của sản phẩm như sau:

Bảng 4.7. Kết quả đánh giá cảm quan sản phẩm rượu vang Sabôchê theo phương pháp cho điểm

Chỉ tiêu	Điểm của các thành viên							Tổng số điểm	Điểm trung bình	Hệ số quan trọng	Điểm có trọng lượng
	1	2	3	4	5	6	7				
Màu sắc, độ trong	5	5	5	4	5	4	4	32	4,57	0,8	3,66
Mùi	4	5	4	5	5	4	3	30	4,29	1,2	5,15
Vị	4	3	5	4	3	4	3	26	3,71	2	7,42
Tổng											16,23

Dựa vào kết quả trong bảng 4.7 và bảng phân loại danh hiệu chất lượng đối với sản phẩm không dùng danh hiệu hạng ưu theo TCVN 3215 – 79 (Trương Thục Tuyên, 2004) thì sản phẩm nước Sabôchê lên men có điểm trung bình 16,23 đạt loại khá. Nhưng theo yêu cầu tối thiểu về điểm trung bình chưa có trọng lượng đối với các chỉ tiêu thì vị của rượu vang Sabôchê chưa đạt 3,8; do đó, danh hiệu bị hạ đi một bậc: đạt tiêu chuẩn. Điều này có thể là do sản phẩm chỉ được theo dõi trong một thời gian ngắn (1 tháng) nên vị còn chua, nồng, chưa hài hòa mặc dù màu sắc và độ trong của sản phẩm rất đẹp được đánh giá cao.



Hình 4.7. Rượu vang sabôchê

Phần 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Sau khi tiến hành nghiên cứu thử nghiệm chế biến nước Sabôchê lên men, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Phương pháp chiết xuất dịch quả không ảnh hưởng lên các chỉ tiêu hóa lý của dịch lên men trong điều kiện thí nghiệm này. Về lượng dịch thu hồi, ta thấy được sự khác biệt có ý nghĩa giữa 2 phương pháp, trong đó, phương pháp xay cho lượng dịch cao hơn (gấp 3 lần phương pháp thẩm thấu). Do vậy, phương pháp xay được chọn làm phương pháp để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.
- Sự thay đổi các chủng nấm men có ảnh hưởng rất nhiều lên nồng độ chất khô hòa tan, độ cồn nhưng không làm thay đổi đáng kể độ pH. Sự kết hợp giữa 2 chủng nấm men *Saccharomyces sp* phân lập từ dịch quả (S.Sabôchê) + *Saccharomyces cerevisiae* 28 (Sc.28) cho ra sản phẩm được đánh giá cao nhất. Do đó, nghiệm thức được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo là chủng nấm men kết hợp giữa 2 chủng *Saccharomyces sp* phân lập từ dịch quả (S.Sabôchê) + *Saccharomyces cerevisiae* 28 (Sc.28).
- Tỷ lệ nấm men thích hợp nhất để bổ sung vào dịch lên men và cho sản phẩm sau lên men được ưa thích là 10% thể tích dịch lên men với mật độ tế bào nấm men là 5×10^6 tb/ml.
- Nồng độ chất khô ban đầu của dịch lên men cho hiệu suất lên men tốt nhất là 20%.
- Quá trình lên men chính kết thúc sau 4 ngày lên men, rượu non có lượng chất khô hòa tan là 7,25 và độ cồn là 8,2.
- Sau thời gian theo dõi (1 tháng), sản phẩm cuối cùng có độ cồn là 13 được đánh giá đạt tiêu chuẩn với điểm tổng là 16,23.

5.2. Đề nghị

Thí nghiệm được tiến hành ở quy mô phòng thí nghiệm do đó chúng tôi chỉ khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất rượu vang Sabôchê như: nồng độ chất khô, giống nấm men và tỷ lệ men giống. Để có một kết quả hoàn thiện hơn về quá trình lên men các loại dịch quả nói chung cũng như một quy trình sản xuất dịch quả Sabôchê lên men hoàn chỉnh hơn, chúng tôi có một số đề nghị như sau:

- Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên men lên chất lượng sản phẩm
- Nghiên cứu độ pH thích hợp nhất cho quá trình lên men.
- Tìm ra tỷ lệ phối trộn thích hợp nhất giữa 2 chủng nấm men *Saccharomyces sp* phân lập từ dịch quả (*S.Sabôchê*) và *Saccharomyces cerevisiae* 28 (*Sc.28*) để cho sản phẩm lên men đạt kết quả cao nhất.
- Nghiên cứu nhiệt độ và thời gian tồn trữ thích hợp nhất cho sản phẩm sau khi tiến hành lên men chính để thu được sản phẩm cho đánh giá cảm quan cao nhất.
- Sản xuất trên quy mô lớn để đánh giá hiệu quả kinh tế việc sản xuất rượu vang từ Sabôchê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

❖ TIẾNG VIỆT

1. Bùi Ái, 2003. *Công nghệ lên men ứng dụng trong công nghệ thực phẩm*. NXB Đại Học Quốc Gia Tp. HCM.
2. Hà Thị Hạnh, 2005. *Thử nghiệm sản xuất và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng rượu vang nho mật ong*. Luận văn tốt nghiệp, khoa Công Nghệ Sinh Học trường Đại học Mở Bán Công, Tp. HCM.
3. Vũ Công Hậu, 1983. *Chế biến rượu vang trái cây trong gia đình*. NXB Nông nghiệp.
4. Lâm Thanh Hiền, 2004. *Bài giảng chế biến nước giải khát*. Khoa Công nghệ Thực Phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
5. Vương Thị Việt Hoa, 2000. *Giáo trình thực tập vi sinh thực phẩm*. Khoa Công nghệ Thực Phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
6. Hồ Thị Mỹ Hương, 2005. *Nghiên cứu thử nghiệm chế biến vang sơ ri*. Luận văn tốt nghiệp, khoa Công nghệ Thực Phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
7. Nguyễn Đức Lượng, 2002. *Vi sinh vật công nghiệp*. NXB Đại Học Quốc Gia Tp. HCM.
8. Nguyễn Đức Lượng, 2002. *Thực phẩm lên men truyền thống*. NXB Đại Học Quốc Gia Tp. HCM.
9. Tiêu Chuẩn Việt Nam – TCVN 3215 – 79. *Sản phẩm thực phẩm – phân tích cảm quan, phương pháp cho điểm*.
10. Lương Đức Phẩm, 2002. *Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
11. Trần Quý Thắng, 1999. *Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của nấm men dùng để lên men vang quả điều*. Luận án tiến sĩ sinh học. Đại học Sư Phạm Hà Nội.
12. Đồng Thị Thanh Thu, 2002. *Sinh hóa ứng dụng*. NXB Đại Học Quốc Gia.
13. Ngô Thị Hồng Thư, 1989. *Kiểm nghiệm thực phẩm bằng phương pháp cảm quan*. NXB Khoa học và Kỹ thuật

14. Trần Linh Thuớc, 2005. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. NXB Giáo Dục.
15. Lê Ngọc Tú và ctv, 2002. *Hóa sinh công nghiệp*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
16. Trương Thục Tuyên, 2004. *Bài giảng đánh giá cảm quan thực phẩm*. Khoa Công nghệ Thực Phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

❖ TIẾNG ANH

1. Bourgeois C.M et Larpent J.P, 1989. *Microbiologie alimentaire*, tome 2: Les fermentations alimentaires. Paris: Technique et Documentation – Lavoisier & Apria, p. 84 – 90.
2. COABC: BC Organic Certification Standards, 2003. *Wine processing standards*. <http://www.Beer/role%20of%20year%20in%20production%20of%20alcoholic%20be>.
3. David Arthey; Philip. R. Ashurst, 2001. *Fruit processing, nutrition, products, and quality management*. Second edition, Maryland.
4. Dhandhania Arun, 1998. *Process of preparing a saffron flavoured beverage in particular*. Patent number EP 0875561.
5. L.P. Semogyi; H.S. Ramaswamy; Y.H. Hui, 1996. *Biology, principles, and applications technomic*. Publishing co. INC.
6. RAINTREE nutrition. *Barbados malpigia glabra*, 22/6/2006, <http://www.wq=cache:9UUUUTXjRioJ:www.rain-tree.com/acerola.html+Barbados+Malipigia+glabra&hl=vi>

❖ MỘT SỐ TRANG WEB

- www.crfg.org/pubs/ff/sapodilla.html, tham khảo ngày 15/4/2006.
- www.tradewindsfruit.com/sapodilla.htm, tham khảo ngày 25/4/2006.
- www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/sapodilla.html, tham khảo ngày 27/4/2006.
- www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/V3-439.html, tham khảo ngày 1/5/2006.
- www.bonsaiweb.com/care/faq/manilkara.html, tham khảo ngày 15/6/2006.
- www.tropicalfruitnursery.com/sapodilla/index.htm, tham khảo ngày 20/6/2006.
- www.capetrib.com.au/sapodilla.htm, tham khảo ngày 3/7/2006.

<http://www.amthucvietnam.com/health/>, tham khảo ngày 10/7/2006.

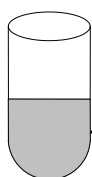
PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Phương pháp xác định chỉ tiêu hóa lý

1.1. Xác định độ acid tổng số

Nguyên tắc: độ chua toàn phần được xác định dựa vào đặc tính acid hữu cơ (acid yếu) dễ hòa tan trong nước và các dung dịch của chúng dễ phản ứng với kiềm nên dễ dàng chuẩn độ bằng kiềm (NaOH 0,1N hay KOH 0,1N), với chỉ thị màu là phenoltalein.

Tiến hành: hút 10ml mẫu cho vào bình định mức 100ml và định đến vạch định mức. Sau đó hút trong bình định mức 10ml cho vào erlen, định phân bằng dung dịch NaOH 0,1N với phenoltalein cho đến khi dung dịch chuyển từ không màu sang màu hồng nhạt bền.



10ml dung dịch bình định mức + 1,2 giọt phenoltalein

Tính kết quả:

$$X = \frac{k * a * 100 * 1000}{V * 10}$$

Trong đó:

X: độ acid toàn phần quy về acid malic (g/l).

a: thể tích NaOH 0,1 N dùng để định phân (ml).

V: thể tích dung dịch dùng để định phân (ml).

k: 0,0067 lượng acid malic tương ứng với 1ml NaOH 0,1N.

Nếu quy về :

Acid citric k = 0,0064.

Acid tactric k = 0,0075.

Acid H₂SO₄ k = 0,0049.

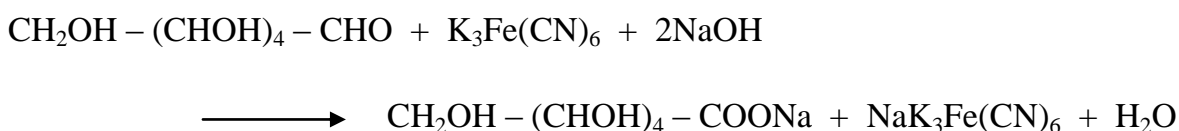
Acid malic k = 0,0067.

1.2. Xác định đường tổng, đường khử (Bộ môn Công nghệ thực phẩm, 2000)

1.2.1. Nguyên tắc

Với một lượng nhất định Ferricyanure $K_3Fe(CN)_6$ phản ứng với đường khử, có mặt dung dịch NaOH, sản phẩm thu được là Ferricyanure của đường khử. Dựa vào lượng Ferricyanure đã dùng, có thể suy ra lượng đường khử có mặt trong dung dịch cần xác định. Việc chuẩn độ được tiến hành trong môi trường kiềm NaOH, khi đun nóng với chỉ thị Metylen blue.

Phương trình phản ứng:



Phương pháp này đơn giản hơn phương pháp dùng dung dịch kiềm của sulfat đồng do không tạo tủa và phản ứng kết thúc rõ ràng. Kết quả tính toán không phụ thuộc vào phương trình lý thuyết, mà chỉ dựa vào công thức thực nghiệm.

1.2.2. Dụng cụ – hóa chất

Dụng cụ

- ✓ Bếp điện, kẹp, lưới amiang, nồi cách thủy.
- ✓ Phễu lọc, ống đong, bình định mức 100ml, becher, erlen, burette, pipette.

Hóa chất

$K_3Fe(CN)_6$ 1%; đường glucose 0,5%; NaOH 5%; 2,5N; HCl 5%; Metylen blue; Methyl red, phenolphtalein.

1.2.3. Cách tiến hành

1.2.3.1. Chuẩn bị dung dịch thí nghiệm

- ✓ Lấy 50ml dung dịch cần xác định cho vào bình định mức, đun cách thủy ở $75 - 80^{\circ}C$ trong 35 – 40phút.
- ✓ Để yên trong 10phút, thêm nước cất tới vạch định mức 100ml, lọc qua giấy lọc vào cốc hoặc bình khô. Nước đã được lọc được dùng làm đường khử.
- ✓ Để xác định đường tổng, lấy vào bình định mức 100ml chính xác 50ml dung dịch xác định đường khử. Thêm 20ml dung dịch HCl 5%, đun cách thủy hỗn hợp trong 30 – 45phút.

- ✓ Làm nguội nhanh, trung hòa hỗn hợp bằng dung dịch NaOH 2,5N hoặc dung dịch Na_2CO_3 bão hòa tới pH 6,5 – 7 với chỉ thị Phenolphthalein (không màu – hồng) hay với chỉ thị Methyl red (đỏ – vàng).
- ✓ Định mức tới vạch định mức 100ml.

Chú ý: đối với nguyên liệu giàu acid hữu cơ, trong quá trình đun khi chiết đường, saccharose có thể bị thủy phân một phần do sự có mặt của lượng acid hữu cơ. Do đó, khi cần xác định riêng đường tổng và đường saccharose, trước khi đun cách thủy hỗn hợp phải trung hòa acid hữu cơ bằng dung dịch NaOH 5% hay Na_2CO_3 bão hòa tới pH 6,5 – 7.

1.2.3.2. Tiến hành chuẩn độ

- ✓ Cho vào bình nón 10ml dung dịch $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% và 2,5ml dung dịch NaOH 2,5N, thêm vào 1giọt Metylen blue.
- ✓ Đun sôi và chuẩn độ ngay trên bếp bằng dung dịch đường khử hoặc đường tổng từ burette, cho từng giọt một, lắc mạnh.
- ✓ Dung dịch ban đầu có màu vàng chanh của Ferricyanure. Điểm dừng chuẩn độ khi xác định màu vàng chanh biến mất, dung dịch trong suốt không màu trong khoảng 30giây rồi chuyển sang màu vàng rom rất nhạt của Ferrocyanure. Trong trường hợp khó nhận biết điểm chuyển màu, có thể kiểm tra điểm kết thúc bằng cách nhỏ một giọt chỉ thị Metylen blue và một giọt đường thừa đầu tiên sẽ làm mấtmàu xanh cho biết phản ứng đã kết thúc.
- ✓ Kết quả chuẩn độ lần đầu tiên chỉ có giá trị tham khảo cho lần chuẩn độ thứ hai. Lần này, sau khi đun sôi dung dịch Ferricyanure, xả nhanh lượng đường (theo kết quả lần chuẩn độ trước), chỉ để lại khoảng dưới 1ml để chuẩn độ tiếp tìm chính xác điểm cuối.
- ✓ Kết quả tính toán chỉ sử dụng từ lần chuẩn độ thứ hai trở đi.
- ✓ Thí nghiệm tương tự đối với dung dịch đường chuẩn là dung dịch glucose 0,5%.

1.2.4. Tính kết quả

Trong thí nghiệm, V_k ml dung dịch mẫu và V_g ml dung dịch glucose 0,5% cùng phản ứng với một dung dịch Ferricyanure ở một nồng độ xác định. Như vậy, V_k ml

dung dịch mẫu tương ứng với V_g ml dung dịch glucose 0,5% có $(0,5 \times V_g)/100g$ glucose.

1.2.4.1. Lượng đường khử

Được tính bằng công thức:

$$X_k = \frac{0,5 * V_g * V * 100}{100 * V_k * m}$$

Trong đó:

X_k : lượng đường khử (g/100g hay g/100ml).

V_g : thể tích dung dịch glucose 0,5% cho chuẩn độ (ml).

V_k : thể tích dung dịch đường khử cho chuẩn độ (ml).

V : thể tích bình định mức (ml).

m : lượng mẫu thí nghiệm (g hoặc ml).

1.2.4.2. Hàm lượng đường tổng

Được tính bằng công thức:

$$X_t = \frac{0,5 * V_g * V_1 * V_2 * 100}{100 * V_t * 50 * m}$$

Trong đó:

X_t : hàm lượng đường tổng (%).

V_g : thể tích dung dịch glucose 0,5% cho chuẩn độ (ml).

V_t : thể tích dung dịch đường tổng cho chuẩn độ (ml).

V_1 : thể tích bình định mức của dung dịch xác định đường khử (ml).

V_2 : thể tích bình định mức của dung dịch xác định đường tổng (ml).

m : lượng mẫu cân thí nghiệm (g hoặc ml).

1.3. Xác định độ cồn (Phạm Văn Sở và Bùi Thị Như Thuận, 1975)

1.3.1. Nguyên tắc

Độ cồn là số ml rượu etylic nguyên chất trong 100ml rượu thử, ở nhiệt độ đúng $+15^{\circ}\text{C}$. Nếu rượu có tinh cặn ít hơn 0,5g/lít độ cồn có thể đo thẳng độ rượu bằng rượu kế. Nếu rượu có tinh cặn lớn hơn 0,5g/lít, phải cất lấy dung dịch cồn và đo độ cồn trên dịch cất. Độ cồn được quy định ở nhiệt độ $+15^{\circ}\text{C}$, nếu đo ở nhiệt độ khác, tra bảng quy về độ cồn ở $+15^{\circ}\text{C}$.

1.3.2. Dụng cụ

- ✓ Bộ chưng cất rượu: bếp điện, bình cầu chưng cất rượu, ống sinh hàn bóng, bình định mức 250ml và nhiệt kế.
- ✓ Ống đong hình trụ thủy tinh.
- ✓ Rượu kế có vạch đo rượu và nhiệt độ.

1.3.3. Cách tiến hành

Lấy chính xác 250ml rượu cần thử, tốt nhất là ở $+15^{\circ}\text{C}$, nếu không, phải đo nhiệt độ và ghi chép để sau này các thao tác đều làm ở cùng một nhiệt độ. Cho vào bình cầu của dụng cụ chưng cất và cất lấy ít nhất là khoảng 200ml. chú ý đừng để cho cồn bay hơi ra bị mất, bằng cách cho đầu ống sinh hàn cắm vào trong 10ml nước cất và ống sinh hàn dài được làm lạnh bằng nước lạnh không quá $+20^{\circ}\text{C}$. Để cho dịch cất trở lại nhiệt độ bằng nhiệt độ của rượu lúc đầu. Cho thêm nước cất cùng ở nhiệt độ ấy vào đủ 250ml.

Cho dịch cất vào một ống đong không có mỏ, đường kính to gấp 2 đường kính chỗ to nhất của rượu kế. Thả rượu kế vào, đọc độ cồn và nhiệt độ. Chú ý đừng để rượu kế sát vào thành ống đong. Tra bảng để đưa độ cồn thật về độ cồn chính xác ở $+15^{\circ}\text{C}$.

Phụ lục 2: Phương pháp xác định chỉ tiêu vi sinh

(Vương Thị Việt Hoa, 2002 – 2003)

2.1. Phương pháp xác định TSVKHK

2.1.1. Cách tiến hành

Pha loãng mẫu phân tích bằng nước muối sinh lý theo tỷ lệ 1/9 tới các độ pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Với mỗi mẫu phải tiến hành nuôi cấy ít nhất 3 độ pha loãng liên tiếp. Mỗi độ pha loãng nuôi cấy 2 đĩa. Lật úp đĩa và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian nuôi cấy 24 giờ trên môi trường NA, các tế bào vi khuẩn hiếu khí sẽ phát triển thành khuẩn lạc trên các đĩa thạch.

2.1.2. Công thức tính

$$X = \frac{C}{(n_1 + 0,1n_2) * d}$$

Trong đó: X: tổng số khuẩn lạc ở 1ml dung dịch mẫu.

$\sum C$: tổng số khuẩn lạc trên tất cả các đĩa petri ở 2 nồng độ pha loãng liên tiếp được đếm.

n_1 : số lượng đĩa ở độ pha loãng thứ nhất được đếm.

n_2 : số lượng đĩa ở độ pha loãng thứ hai được đếm.

d: hệ số pha loãng ứng với độ pha loãng thứ nhất được đếm.

2.2. Phương pháp xác định TSNM

2.2.1. Cách tiến hành

Pha loãng mẫu phân tích giống như phương pháp đếm TSVKHK. Mỗi mẫu phải tiến hành nuôi cấy ít nhất 3 độ pha loãng liên tiếp. Mỗi độ pha loãng nuôi cấy 2 đĩa vào môi trường PGA. Lắc đều đĩa sang phải và sang trái rồi ủ ở nhiệt độ 25°C – 30°C trong 3 ngày.

2.2.2. Đọc kết quả

Đếm tất cả các khuẩn lạc nấm mốc mọc trên môi trường nuôi cấy. Tính số khuẩn lạc có trong 1ml dung dịch mẫu theo công thức như đếm TSVKHK.

2.3. Phương pháp kiểm tra Coliforms

Đặc điểm hình thái: *Coliforms* là nhóm những trực khuẩn đường ruột Gram âm (G⁻), không sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy nghi, có khả năng sinh acid, sinh hơi do lên men lactose ở 37⁰C/24giờ.

Đếm tổng số *Coliforms* theo phương pháp MPN (Most probable Number) còn gọi là phương pháp pha loãng tới hạn hay phương pháp chuẩn độ, dùng để đánh giá lượng vi khuẩn theo số có xác suất lớn nhất của lượng vi sinh vật có thể có trong một đơn vị thể tích mẫu. Phương pháp này dựa trên kỹ thuật nuôi cấy vi sinh vật cần định lượng trong một môi trường lỏng thích hợp.

2.3.1. Cách tiến hành

- ✓ Cấy mẫu theo nồng độ quy định (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ...) vào 9 ống môi trường BGBL (có đặt ống chuông để xác định hiện tượng sinh hơi) mỗi nồng độ cấy 3 ống.
- ✓ Để ở tủ ấm 37⁰C trong 24 – 48giờ. Nồng độ pha loãng được quy định tùy theo tình trạng nhiễm khuẩn của mẫu.

2.3.2. Đọc kết quả

- ✓ Quan sát các ống dương tính, căn cứ vào khả năng lên men đường lactose và sinh hơi.
- ✓ Ống âm tính môi trường không đục và không sinh hơi.
- ✓ Xác định ống dương tính ở từng nồng độ pha loãng.
- ✓ Lập một chỉ số các ống nghiệm dương tính ở mỗi nồng độ pha loãng (theo thứ tự giảm dần của nồng độ), tra chỉ số trên theo bảng MPN của Mac Crady để xác định số lượng gần đúng của vi sinh vật trong một đơn vị thể tích.

2.4. Phương pháp kiểm tra E.coli

❖ Kiểm tra về mặt định tính

Sự hiện diện của *E.coli* thể hiện qua các đặc tính sau:

- ✓ Ống tăng sinh dương: môi trường EC đục và sinh hơi ở 44,5⁰C.
- ✓ Khi phân lập trên môi trường (EMB, ENDO) thì có xuất hiện khuẩn lạc đỏ ánh kim (khuẩn lạc điển hình).

- ✓ Nhuộm Gram và cấy sang môi trường KIA để thử phản ứng sinh hóa IMVic = ($\pm + - -$).

❖ **Kiểm tra về mặt định lượng**

Dựa vào kết quả ống dương tính ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp để chọn ra chỉ số ống dương tính, tra bảng Mac Crady để suy ra chỉ số MPN, từ đó tính tổng số *E.coli* có trong 1 đơn vị thể tích mẫu.

Công thức tính tổng số *E.coli*:

$X_{E.coli/ml} = \text{số MPN} * 10^{n-1}$ (n: số nguyên chỉ độ pha loãng thấp nhất trong dãy ống nghiệm thử).

Phụ lục 3: Các chỉ tiêu vi sinh vật trong nước giải khát có cồn

(Trần Linh Thuốc, 2005)

Tiêu chuẩn Nhà nước (TCVN 6096 – 1995, TCVN 5042 – 1994) quy định về mức vi sinh vật của dạng nước giải khát có cồn như sau:

STT	Chỉ tiêu	Mức tối đa cho phép	
		Không đóng chai	Đóng chai
1	Tổng vi khuẩn hiếu khí (CFU/ml)	10^3	10^2
2	<i>E.coli</i> (CFU/1000ml)	0	0
3	<i>Clostridium perfringens</i>	0	0
4	Vi khuẩn gây đục (quan sát bằng mắt)		0
5	Nấm men – nấm mốc (CFU/ml)	10^2	0
6	<i>S.areus</i> / vi khuẩn gây bệnh đường ruột	0	0

Phụ lục 4: Mẫu phiếu đánh giá cảm quan

4.1. Mẫu phiếu đánh giá cảm quan theo phép thử so hàng

PHIẾU ĐÁNH GIÁ CẢM QUAN

Tên sản phẩm: Rượu vang Sabôchê

Ngày thử:

Họ và tên cảm quan viên:

Ký tên:

Các mẫu rượu vang Sabôchê được mã hóa. Anh (chị) quan sát kỹ màu sắc, độ trong, ngửi mùi, nếm thử một ít.

Anh (chị) hãy xếp chúng theo thứ tự giảm dần mức độ ưa thích. Mẫu thích nhất được xếp thứ 1, mẫu ít thích nhất được xếp sau cùng.

Thứ tự: 1 2 3 4 5 6

Mẫu:

Bình luận:

Chân thành cảm ơn sự hợp tác của anh (chị).

4.2. Mẫu phiếu đánh giá cảm quan theo phép thử so hàng

PHIẾU ĐÁNH GIÁ CẢM QUAN

Tên sản phẩm: Rượu vang Sabôchê

Ngày thử:

Họ và tên cảm quan viên:

Ký tên:

Với mẫu rượu vang Sabôchê được trình bày, anh (chị) hãy quan sát kỹ màu sắc, độ trong, ngửi mùi và thử nếm một ít để đánh giá mùi, vị rồi cho điểm dựa vào bảng mô tả hướng dẫn cho điểm các chỉ tiêu (đính kèm). Điểm cho theo thang điểm từ 0 – 5.

Các chỉ tiêu	Điểm
Màu sắc, độ trong	
Mùi	
Vị	

Bình luận:

Chân thành cảm ơn sự hợp tác của anh (chị).

**Phụ lục 5: Bảng điểm đánh giá chất lượng sản phẩm rượu vang
sabôchê (TCVN 3217 – 79)**

Chỉ tiêu	Điểm chưa có trọng lượng	Cơ sở đánh giá
Độ trong và màu sắc	5	Chất lỏng trong suốt, không vẩn đục và vật thể lạ nhỏ, màu hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
	4	Chất lỏng trong suốt, không vẩn đục, ít vật thể lạ nhỏ, màu đặc trưng cho sản phẩm.
	3	Chất lỏng trong, có tương đối nhiều vật thể lạ nhỏ, màu hơi khác một ít so với màu đặc trưng của sản phẩm.
	2	Chất lỏng hơi đục, có khá nhiều vật thể thô trầm trọng, thô, màu không đặc trưng cho sản phẩm.
	1	Chất lỏng đục nhiều lắng cặn, có nhiều vật thể lạ nhỏ trầm trọng, thô, màu không đặc trưng cho sản phẩm.
	0	Vẩn đục, màu bẩn, sản phẩm bị hỏng.
Mùi	5	Hòa hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
	4	Chưa hoàn toàn hòa hợp, thơm đặc trưng cho sản phẩm nhưng hơi khó nhận thấy.
	3	Hơi nồng, thoảng mùi phụ, ít đặc trưng cho sản phẩm.
	2	Nồng, thoảng mùi lạ, rất ít đặc trưng cho sản phẩm.
	1	Nồng, hăng, mùi lạ rõ, không đặc trưng cho sản phẩm.
	0	Có mùi lạ khó chịu của sản phẩm hỏng.
Vị	5	Hòa hợp, yêm dịu, hậu vị tốt, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
	4	Chưa hoàn toàn hòa hợp, hậu vị vừa phải, hoàn

		toàn đặc trưng cho sản phẩm bình thường.
	3	Chưa hòa hợp, hơi gắt và sốc, hậu vị yếu, ít đặc trưng cho sản phẩm.
	2	Đắng, sốc, thoảng vị lạ, ít đặc trưng cho sản phẩm.
	1	Đắng, sốc, không đặc trưng cho sản phẩm.
	0	Có vị lạ khó chịu của sản phẩm hỏng.

**Phụ lục 6: Bảng phân loại danh hiệu chất lượng sản phẩm theo TCVN 3217
– 79 đối với sản phẩm không dùng danh hiệu hạng ưu**

Danh hiệu chất lượng	Điểm chung	Yêu cầu tối thiểu về điểm TB chưa có trọng lượng đối với các chỉ tiêu
Loại tốt	18,6 – 20,0	Mùi: 4,7; Vị: 4,7
Loại khá	15,2 – 18,5	Mùi: 3,8; Vị: 3,8
Đạt tiêu chuẩn	11,2 – 15,1	Mùi: 2,8; Vị: 2,8
Loại kém	7,2 – 11,1	Mỗi chỉ tiêu 1,8
Loại rất kém	4,0 – 7,1	Mỗi chỉ tiêu 1,0
Loại hỏng	0,0 – 3,9	Mỗi chỉ tiêu 1,0

Phụ lục 7: Kết quả phân tích thống kê thí nghiệm 1

7.1. Phân tích ảnh hưởng hàm lượng chất khô hòa tan của thí nghiệm 1

One-Way Analysis of Variance

 Data: TN1.chatkho
 Level codes: TN1.NT
 Labels:
 Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.0016667	1	.0016667	.002	.9707
Within groups	4.2466667	4	1.0616667		

 Total (corrected) 4.2483333 5
 0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN1.chatkho by TN1.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	8.5333333	.3527668	.5948856	7.3650140 9.7016526
2	3	8.5000000	.7637626	.5948856	7.3316807 9.6683193
Total	6	8.5166667	.4206476	.4206476	7.6905402 9.3427932

Multiple range analysis for TN1.chatkho by TN1.NT

 Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
2	3	8.5000000	X
1	3	8.5333333	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	0.03333	2.33664

* denotes a statistically significant difference.

7.2. Phân tích ảnh hưởng pH của thí nghiệm 1

One-Way Analysis of Variance

 Data: TN1.pH
 Level codes: TN1.NT
 Labels:
 Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.0020167	1	.0020167	6.368	.0651
Within groups	.0012667	4	.0003167		
Total (corrected)	.0032833	5			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN1.pH by TN1.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	3.4600000	.0115470	.0102740	3.4398224 3.4801776
2	3	3.4966667	.0088192	.0102740	3.4764891 3.5168442
Total	6	3.4783333	.0072648	.0072648	3.4640656 3.4926010

Multiple range analysis for TN1.pH by TN1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

1	3	3.4600000	X
2	3	3.4966667	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	-0.03667	0.04036

* denotes a statistically significant difference.

7.3. Phân tích ảnh hưởng độ cồn của thí nghiệm 1

One-Way Analysis of Variance

Data: TN1.docon

Level codes: TN1.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.0006000	1	.0006000	.002	.9681
Within groups	1.2901333	4	.3225333		
Total (corrected)	1.2907333	5			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN1.docon by TN1.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
-------	-------	--------------------	-----------------------	---------------------	-----------------------------

1	3	6.3066667	.1940218	.3278889	5.6627128	6.9506205
2	3	6.3266667	.4211624	.3278889	5.6827128	6.9706205
Total	6	6.3166667	.2318524	.2318524	5.8613225	6.7720108

Multiple range analysis for TN1.docon by TN1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

1	3	6.3066667	X
2	3	6.3266667	X

contrast	difference +/- limits
1 - 2	-0.02000 1.28791

* denotes a statistically significant difference.

7.4. Phân tích ảnh hưởng lượng dịch thu hồi của thí nghiệm 1

One-Way Analysis of Variance

Data: TN1.dichthuhoi

Level codes: TN1.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	7652.507	1	87652.507	3242.586	.0000
Within groups	108.127	4	27.032		

Total (corrected) 87760.633 5

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN1.dichthuhoi by TN1.NT

Level	Count	Average	(internal)	Std. Error (pooled)	Std. Error intervals	95 % LSD
1	3	381.33333	4.0960686	3.0017587	375.43806	387.22861
2	3	139.60000	1.1150486	3.0017587	133.70473	145.49527
Total	6	260.46667	2.1225640	2.1225640	256.29808	264.63525

Multiple range analysis for TN1.dichthuhoi by TN1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

2	3	139.60000	X
1	3	381.33333	X

contrast	difference +/- limits
1 - 2	241.733 11.7905 *

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 8: Kết quả phân tích thống kê thí nghiệm 2

8.1. Phân tích ảnh hưởng hàm lượng chất khô hòa tan của thí nghiệm 2

One-Way Analysis of Variance

 Data: TN2.chatkho
 Level codes: TN2.NT
 Labels:
 Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	85.242667	4	21.310667	319.660	.0000
Within groups	.666667	10	.066667		

 Total (corrected) 85.909333 14
 0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN2.chatkho by TN2.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	9.000000	.0000000	.1490712	8.765071 9.234929
2	3	14.600000	.3055050	.1490712	14.365071 14.834929
3	3	10.000000	.0000000	.1490712	9.765071 10.234929
4	3	13.133333	.0666667	.1490712	12.898404 13.368262
5	3	14.800000	.1154701	.1490712	14.565071 15.034929
Total		15	12.306667	.0666667	.0666667

 12.201603 12.411730

Multiple range analysis for TN2.chatkho by TN2.NT

 Method: 95 Percent LSD
 Level Count Average Homogeneous Groups

1	3	9.000000	X
3	3	10.000000	X
4	3	13.133333	X
2	3	14.600000	X
5	3	14.800000	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	-5.60000	0.46986 *
1 - 3	-1.00000	0.46986 *
1 - 4	-4.13333	0.46986 *
1 - 5	-5.80000	0.46986 *
2 - 3	4.60000	0.46986 *
2 - 4	1.46667	0.46986 *
2 - 5	-0.20000	0.46986
3 - 4	-3.13333	0.46986 *
3 - 5	-4.80000	0.46986 *
4 - 5	-1.66667	0.46986 *

* denotes a statistically significant difference.

8.2. Phân tích ảnh hưởng pH của thí nghiệm 2

One-Way Analysis of Variance

Data: TN2.pH

Level codes: TN2.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.0003067	4	7.66667E-005	.411	.7972
Within groups	.0018667	10	1.86667E-004		
Total (corrected)	.0021733	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN2.pH by TN2.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	3.4466667	.0033333	.0078881	3.4342354 3.4590979
2	3	3.4433333	.0088192	.0078881	3.4309021 3.4557646
3	3	3.4500000	.0115470	.0078881	3.4375687 3.4624313
4	3	3.4466667	.0088192	.0078881	3.4342354 3.4590979
5	3	3.4366667	.0033333	.0078881	3.4242354 3.4490979
Total	15	3.4446667	.0035277	.0035277	3.4391072 3.4502261

Multiple range analysis for TN2.pH by TN2.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

5	3	3.4366667	X
2	3	3.4433333	X
1	3	3.4466667	X
4	3	3.4466667	X
3	3	3.4500000	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	0.00333	0.02486
1 - 3	-0.00333	0.02486
1 - 4	0.00000	0.02486
1 - 5	0.01000	0.02486
2 - 3	-0.00667	0.02486
2 - 4	-0.00333	0.02486
2 - 5	0.00667	0.02486
3 - 4	0.00333	0.02486
3 - 5	0.01333	0.02486
4 - 5	0.01000	0.02486

* denotes a statistically significant difference.

8.3. Phân tích ảnh hưởng độ cồn của thí nghiệm 2

One-Way Analysis of Variance

Data: TN2.docon

Level codes: TN2.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	25.785907	4	6.4464767	319.660	.0000
Within groups	.201667	10	.0201667		
Total (corrected)	25.987573	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN2.docon by TN2.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	6.0500000	.0000000	.0819892	5.9207890 6.1792110
2	3	2.9700000	.1680278	.0819892	2.8407890 3.0992110
3	3	5.5000000	.0000000	.0819892	5.3707890 5.6292110
4	3	3.7766667	.0366667	.0819892	3.6474557 3.9058777
5	3	2.8600000	.0635085	.0819892	2.7307890 2.9892110
Total	15	4.2313333	.0366667	.0366667	4.1735484 4.2891183

Multiple range analysis for TN2.docon by TN2.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

5	3	2.8600000	X
2	3	2.9700000	X
4	3	3.7766667	X
3	3	5.5000000	X
1	3	6.0500000	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	3.08000	0.25842 *
1 - 3	0.55000	0.25842 *
1 - 4	2.27333	0.25842 *
1 - 5	3.19000	0.25842 *
2 - 3	-2.53000	0.25842 *
2 - 4	-0.80667	0.25842 *
2 - 5	0.11000	0.25842
3 - 4	1.72333	0.25842 *
3 - 5	2.64000	0.25842 *
4 - 5	0.91667	0.25842 *

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 9: Kết quả phân tích thống kê thí nghiệm 3

9.1. Phân tích ảnh hưởng hàm lượng chất khô hòa tan của thí nghiệm 3

One-Way Analysis of Variance

 Data: TN3.chatkho
 Level codes: TN3.NT
 Labels:
 Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	107.79556	2	53.897778	932.846	.0000
Within groups	.34667	6	.057778		

 Total (corrected) 108.14222 8
 0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN3.chatkho by TN3.NT

Level	Count	Stnd. Error Average	Stnd. Error (internal)	95 % LSD (pooled s) intervals for mean
1	3	15.000000	.0000000	.1387777 14.759810 15.240190
2	3	10.400000	.0000000	.1387777 10.159810 10.640190
3	3	6.533333	.2403701	.1387777 6.293143 6.773523
Total	9	10.644444	.0801234	.0801234 10.505771 10.783118

Multiple range analysis for TN3.chatkho by TN3.NT

 Method: 95 Percent LSD

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

3	3	6.533333	X
2	3	10.400000	X
1	3	15.000000	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	4.60000	0.48038 *
1 - 3	8.46667	0.48038 *
2 - 3	3.86667	0.48038 *

* denotes a statistically significant difference.

9.2. Phân tích ảnh hưởng pH của thí nghiệm 3

One-Way Analysis of Variance

 Data: TN3.pH
 Level codes: TN3.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.0005556	2	2.77778E-004	.676	.5437
Within groups	.0024667	6	4.11111E-004		
Total (corrected)	.0030222	8			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN3.pH by TN3.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	3.4333333	.0066667	.0117063	3.4130727 3.4535940
2	3	3.4500000	.0115470	.0117063	3.4297393 3.4702607
3	3	3.4500000	.0152753	.0117063	3.4297393 3.4702607
Total	9	3.4444444	.0067586	.0067586	3.4327469 3.4561420

Multiple range analysis for TN3.pH by TN3.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

1	3	3.4333333	X
2	3	3.4500000	X
3	3	3.4500000	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	-0.01667	0.04052
1 - 3	-0.01667	0.04052
2 - 3	0.00000	0.04052

* denotes a statistically significant difference.

9.3. Phân tích ảnh hưởng độ cồn của thí nghiệm 3**One-Way Analysis of Variance**

Data: TN3.docon

Level codes: TN3.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	32.608156	2	16.304078	932.846	.0000
Within groups	.104867	6	.017478		

 Total (corrected) 32.713022 8
 0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN3.docon by TN3.NT

 Stnd. Error Stnd. Error 95 % LSD
 Level Count Average (internal) (pooled s) intervals for mean

 1 3 2.7500000 .0000000 .0763278 2.6178956 2.8821044
 2 3 5.2800000 .0000000 .0763278 5.1478956 5.4121044
 3 3 7.4066667 .1322035 .0763278 7.2745622 7.5387711

 Total 9 5.1455556 .0440678 .0440678 5.0692850 5.2218261

Multiple range analysis for TN3.docon by TN3.NT

 Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

 1 3 2.7500000 X
 2 3 5.2800000 X
 3 3 7.4066667 X

contrast difference +/- limits
 1 - 2 -2.53000 0.26421 *
 1 - 3 -4.65667 0.26421 *
 2 - 3 -2.12667 0.26421 *

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 10: Kết quả phân tích thống kê thí nghiệm 4

10.1. Phân tích ảnh hưởng pH của thí nghiệm 4

One-Way Analysis of Variance

Data: TN4.pH
 Level codes: TN4.NT
 Labels:
 Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.0001333	3	4.44444E-005	.055	.9818
Within groups	.0064667	8	8.08333E-004		
Total (corrected)	.0066000	11			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN4.pH by TN4.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	3.4433333	.0120185	.0164148	3.4165601 3.4701066
2	3	3.4426667	.0176383	.0164148	3.4098934 3.4634399
3	3	3.4403333	.0120185	.0164148	3.4165601 3.4701066
4	3	3.4366667	.0218581	.0164148	3.4098934 3.4634399
Total	12	3.4400000	.0082074	.0082074	3.4266134 3.4533866

Multiple range analysis for TN4.pH by TN4.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

2	3	3.4426667	X
4	3	3.4366667	X
1	3	3.4433333	X
3	3	3.4403333	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	0.00667	0.05355
1 - 3	0.00000	0.05355
1 - 4	0.00667	0.05355
2 - 3	-0.00667	0.05355
2 - 4	0.00000	0.05355
3 - 4	0.00667	0.05355

* denotes a statistically significant difference.

10.2. Phân tích ảnh hưởng độ cồn của thí nghiệm 4

One-Way Analysis of Variance

Data: TN4.docon

Level codes: TN4.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	4.5768250	3	1.5256083	48.806	.0000
Within groups	.2500667	8	.0312583		
Total (corrected)	4.8268917	11			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TN4.docon by TN4.NT

Level	Count	Std. Error Average	Std. Error (internal)	95 % LSD (pooled s)	95 % LSD intervals for mean
1	3	5.9766667	.0366667	.1020757	5.8101764 6.1431570
2	3	6.4533333	.0733333	.1020757	6.2868430 6.6198236
3	3	5.8666667	.1833333	.1020757	5.7001764 6.0331570
4	3	4.7666667	.0366667	.1020757	4.6001764 4.9331570
Total	12	5.7658333	.0510378	.0510378	5.6825882 5.8490785

Multiple range analysis for TN4.docon by TN4.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

4	3	4.7666667	X
3	3	5.8666667	X
1	3	5.9766667	X
2	3	6.4533333	X

contrast	difference	+/- limits
1 - 2	-0.47667	0.33298 *
1 - 3	0.11000	0.33298
1 - 4	1.21000	0.33298 *
2 - 3	0.58667	0.33298 *
2 - 4	1.68667	0.33298 *
3 - 4	1.10000	0.33298 *

* denotes a statistically significant difference.