

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ**  
**KHOA NÔNG NGHIỆP & SINH HỌC ỨNG DỤNG**  
**BỘ MÔN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**



**NGUYỄN THỊ KIỀU TRANG**

**SỬ DỤNG CÁC CHẾ PHẨM SINH HỌC**  
**TRONG SẢN XUẤT RƯỢU VANG MÍT**

**ĐỀ CƯƠNG LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP**  
**Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

Mã ngành: 08

Người hướng dẫn  
**LÝ NGUYỄN BÌNH**

NĂM 2007

## **LỜI CẢM ƠN**

Xin chân thành cảm ơn thầy LÝ NGUYỄN BÌNH giảng viên Bộ Môn Công Nghệ Thực Phẩm-Khoa Nông Nghiệp-Trường Đại Học Cần Thơ đã tận tình hướng dẫn và truyền đạt những kinh nghiệm quý báu giúp em hoàn thành luận văn tốt nghiệp này.

Xin chân thành cảm ơn quý thầy cô Trường Đại Học Cần Thơ đã giảng dạy và truyền đạt những kiến thức quý báu cho em trong những năm qua.

Chân thành cảm ơn các cán bộ phòng thí nghiệm Bộ Môn Công Nghệ Thực Phẩm. Cảm ơn các bạn sinh viên lớp Công Nghệ Thực Phẩm K28 đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian làm luận văn.

Xin chân thành cảm ơn giáo viên phản biện đã có những đóng góp quý báu để đề tài của em được hoàn thiện hơn.

TP. Cần Thơ, ngày 15 tháng 06 năm 2007

Sinh viên thực hiện

**Nguyễn Thị Kiều Trang**

## MỤC LỤC

<b>DANH SÁCH BẢNG .....</b>	<b>vii</b>
<b>DANH SÁCH HÌNH .....</b>	<b>ix</b>
<b>TÓM TẮT .....</b>	<b>x</b>
<b>Chương I. GIỚI THIỆU .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Đặt vấn đề .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Nội dung nghiên cứu .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương II. LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Sơ lược về nguyên liệu mít .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Nguồn gốc .....	2
2.1.2. Phân loại .....	3
2.1.3. Thành phần hóa học của mít .....	3
<b>2.2. Định nghĩa và giá trị của rượu vang .....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Định nghĩa .....	4
2.2.2. Thành phần và giá trị dinh dưỡng của rượu vang .....	4
<b>2.3. Quy trình sản xuất rượu vang mít .....</b>	<b>7</b>
2.3.1. Quy trình sản xuất chung .....	7
2.3.2. Thuyết minh quy trình .....	8
<b>2.4. Các chủng nấm men thường dùng trong sản xuất rượu vang .....</b>	<b>15</b>
2.4.1. <i>Saccharomyces vini</i> : .....	15
2.4.2. <i>Saccharomyces uvarum</i> .....	15
2.4.3. <i>Saccharomyces oviformis</i> .....	15
<b>2.5. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men .....</b>	<b>15</b>
2.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ .....	17
2.5.2. Ảnh hưởng của pH .....	17
2.5.3. Ảnh hưởng của ánh sáng .....	17
2.5.4. Ảnh hưởng của số lượng tế bào nấm men .....	17
2.5.6. Ảnh hưởng của nồng độ rượu .....	18
2.5.7. Ảnh hưởng của CO <sub>2</sub> .....	18
<b>2.6. Khái quát về enzyme pectinases .....</b>	<b>21</b>
2.6.1. Nguồn thu nhận .....	21
2.6.2. Phân loại và cơ chế tác dụng của enzyme pectinase .....	22
2.6.4. Ứng dụng của enzyme pectinase trong sản xuất rượu .....	29

2.6.5. Giới thiệu chế phẩm enzyme trong thương mại.....	32
2.6.6. Một số ứng dụng của enzyme pectinase.....	33
<b>Chương III. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Phương tiện.....</b>	<b>35</b>
3.1.1. Địa điểm nghiên cứu.....	35
3.1.2. Thời gian thực hiện.....	35
3.1.3. Thiết bị và dụng cụ.....	35
3.1.4. Nguyên liệu.....	35
3.1.5. Hóa chất.....	35
<b>3.2. Phương pháp nghiên cứu.....</b>	<b>35</b>
3.2.1. Phân tích thành phần nguyên liệu.....	35
3.2.2. Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng bổ sung chế phẩm enzyme glucoamylase và polygalactorunase đến độ trong của dịch đường hoá.....	36
3.2.3. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của glucoamylase và tỉ lệ enzyme polygalacturonase đến hàm lượng methanol sinh ra trong rượu thành phẩm.....	37
3.2.4. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và pH ban đầu đến quá trình lên men.....	38
<b>Chương IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Thành phần nguyên liệu.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng bổ sung chế phẩm enzyme glucoamylase và polygalacturonase đến độ trong của dịch đường hoá.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của enzyme glucoamylase và polygalacturonase đến hàm lượng methanol sinh ra trong rượu thành phẩm.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4. Theo dõi ảnh hưởng của độ Brix và giá trị pH đến hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men vang mít.....</b>	<b>44</b>
<b>Chương V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1. Kết luận.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2. Đề nghị.....</b>	<b>53</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>54</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>I</b>
<b>Phụ lục 1: Các phương pháp phân tích.....</b>	<b>I</b>
Phụ lục 1.1. Xác định hàm lượng chất khô hoà tan ( <sup>0</sup> Brix).....	I
Phụ lục 1.2. Xác định độ pH.....	I
Phụ lục 1.3. Xác định thành phần nguyên liệu mít.....	I
Phụ lục 1.4. Phương pháp kiểm tra độ cồn.....	II

<i>Phụ lục 1.5. Phân tích thành phần methanol</i> .....	II
<i>Phụ lục 1.6. Cách pha hoá chất tiến hành xác định hàm lượng metanol</i> .....	IV
<i>Phụ lục 1.7. Xác định độ hấp thụ của sản phẩm</i> .....	V
<i>Phụ lục 1.8. Xác định acid toàn phần của rượu</i> .....	VI
<i>Phụ lục 1.9. Xác định hàm lượng ester của rượu</i> .....	VI
<i>Phụ lục 1.10. Xác định hàm lượng Furfurol (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)</i> .....	VIII
<i>Phụ lục 1.11. Xác định hàm lượng đường trong thực phẩm (phương pháp BERTRAND)</i> .....	VIII
<i>Phụ lục 1.12. Xác định hàm lượng cồn etylic</i> .....	X
<i>Phụ lục 1.13. Xác định hàm lượng aldehyde</i> .....	X
<i>Phụ lục 1.14. Đánh giá cảm quan của sản phẩm</i> .....	XII
<b>Phụ lục 2: Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7045: 2002)</b> .....	<b>XV</b>
<b>2.1. Phạm vi áp dụng</b> .....	<b>XV</b>
<b>2.2. Tiêu chuẩn viện dẫn</b> .....	<b>XV</b>
<b>2.3. Định nghĩa</b> .....	<b>XVI</b>
<b>2.4. Yêu cầu kỹ thuật</b> .....	<b>XVI</b>
2.4.1. <i>Yêu cầu cảm quan</i> .....	XVI
2.4.2. <i>Chỉ tiêu hoá học</i> .....	XVI
2.4.3. <i>Giới hạn hàm lượng kim loại nặng</i> .....	XVI
2.4.4. <i>Chỉ tiêu vi sinh vật</i> .....	XVII
2.4.5. <i>Phụ gia thực phẩm</i> .....	XVII
<b>2.5. Phương pháp thử</b> .....	<b>XVII</b>
<b>2.6. Bao gói, ghi nhãn, bảo quản và vận chuyển</b> .....	<b>XVIII</b>
2.6.1. <i>Bao gói</i> .....	XVIII
2.6.2. <i>Ghi nhãn</i> .....	XVIII
2.6.3. <i>Bảo quản</i> .....	XVIII
2.6.4. <i>Vận chuyển</i> .....	XVIII
<b>Phụ lục 3: Các kết quả thí nghiệm</b> .....	<b>XIX</b>
3.1. <i>Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme polygalacturonase và pH đến độ trong của dịch đường hoá</i> .....	XIX
3.2. <i>Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra ở pH 4,5 và độ Brix 25</i> .....	XIX
3.3. <i>Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và giá trị pH đến hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men rượu vang mít</i> .....	XIX
<b>Phụ lục 4: Bảng phân tích kết quả thống kê</b> .....	<b>XX</b>

4.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase và pH đến độ trong của dịch đường hoá.....	XX
4.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra của rượu thành phẩm ở pH 4,5 và độ Brix 25 với các tỉ lệ enzyme khác nhau được sử dụng.....	XX
4.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase, pH và độ Brix đến hàm lượng methanol sinh ra trong rượu thành phẩm .....	XXI
4.4. Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và giá trị pH đến hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men rượu vang mít .....	XXII
4.5. Các chỉ tiêu cảm quan rượu.....	XXIII
4.5.1. Màu sắc.....	XXIII
4.5.2. Mùi.....	XXV
4.5.3. Vị.....	XXVI

**DANH SÁCH BẢNG**

Bảng 1. Thành phần quả mít.....	3
Bảng 2. Bảng thành phần hoá học của mít.....	4
Bảng 3. Thành phần của rượu mít theo Jazic và Zorec.....	5
Bảng 4. Nhiệt độ và pH tối thích của enzyme $\alpha$ – amylase.....	10
Bảng 5. Một số chế phẩm thương mại.....	32
Bảng 6. Thành phần hóa học của nguyên liệu.....	41
Bảng 7. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme polygalacturonase và pH đến độ trong của dịch đường hoá.....	42
Bảng 8. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra.....	43
Bảng 9. Sự thay đổi hàm lượng cồn theo thời gian lên men.....	44
Bảng 10. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến hàm lượng rượu sinh ra.....	45
Bảng 11. Ảnh hưởng của độ Brix đến hàm lượng rượu sinh ra theo thời gian.....	45
Bảng 12. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng rượu sinh ra theo thời gian.....	45
Bảng 13. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến chỉ tiêu đánh giá cảm quan về màu sắc và độ trong của các mẫu rượu thành phẩm.....	46
Bảng 14. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến chỉ tiêu đánh giá cảm quan về mùi của các mẫu rượu thành phẩm.....	47
Bảng 15. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến chỉ tiêu đánh giá cảm quan về vị của các mẫu rượu thành phẩm.....	47
Bảng 16. Kết quả đánh giá cảm quan các chỉ tiêu của rượu vang mít chưa nhân thêm hệ số quan trọng.....	48
Bảng 17. Kết quả đánh giá cảm quan rượu vang mít theo tiêu chuẩn Việt Nam.....	48
Bảng 18. Phân tích thành phần hóa học của sản phẩm.....	50
Bảng 19. Bảng điểm mô tả đánh giá cảm quan chỉ tiêu màu sắc-độ trong của rượu vang mít.....	XI
I	
Bảng 20. Bảng điểm mô tả đánh giá cảm quan chỉ tiêu mùi của rượu vang mít.....	XIII
Bảng 21. Bảng điểm mô tả đánh giá cảm quan chỉ tiêu vị của rượu vang mít.....	XIII
Bảng 22. Cơ sở phân cấp chất lượng sản phẩm dựa trên điểm chung có trọng lượng.....	XIV
Bảng 23. Yêu cầu về cảm quan của rượu vang.....	XVI
Bảng 24. Các chỉ tiêu hoá học của rượu vang.....	XVI

Bảng 25. Giới hạn tối đa hàm lượng kim loại nặng của rượu vang.....	XVII
Bảng 26. Các chỉ tiêu vi sinh vật của rượu vang.....	XVII
Bảng 27. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase và pH đến độ trong của dịch đường hoá.....	XIX
Bảng 28. Ảnh hưởng của tỉ lệ pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra ở pH 4,5 và độ Brix 25. ....	XIX
Bảng 29. Phân tích các chỉ tiêu hóa học của sản phẩm.....	XIX



## DANH SÁCH HÌNH

Hình 1. Trái mít.....	2
Hình 2. Mẫu mít nghệ cắt ngang.....	3
Hình 3. Quy trình sản xuất chung.....	6
Hình 4. Cơ chế tác dụng của amylase.....	8
Hình 5. Cơ chế của quá trình lên men.....	15
Hình 6. Công thức cấu tạo của pectin.....	23
Hình 7. Cơ chế tác dụng của Pectinesterase.....	24
Hình 8. Cơ chế tác dụng của Polygalacturonase.....	25
Hình 9. Cơ chế tác dụng của Pectinlyase.....	24
Hình 10. Cơ chế tác dụng của Pectatylase.....	24
Hình 11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme pectinase thu nhận từ thực vật.....	27
Hình 12. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme pectinase thu nhận từ nấm mốc.....	28
Hình 13. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzyme pectinase thu nhận từ thực vật.....	29
Hình 14. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzyme pectinase thu nhận từ nấm mốc.....	29
Hình 15. Cơ chế làm trong của enzyme pectinase.....	31
Hình 16. Nguyên liệu trái mít và múi mít.....	41
Hình 17. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme polygalacturonase và pH đến độ trong của dịch đường hoá.....	42
Hình 18. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra.....	43
Hình 19. Đồ thị biểu diễn sự thay đổi độ rượu theo thời gian lên men.....	45
Hình 20. Các mẫu rượu thành phẩm.....	47

## **TÓM TẮT**

Với mục đích tạo ra sản phẩm rượu mít có giá trị dinh dưỡng, giá trị cảm quan cao, đề tài được tiến hành trên cơ sở nghiên cứu các yếu tố quan trọng ở các công đoạn chính có ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm:

- ✓ Khảo sát khả năng bổ sung chế phẩm enzyme amylase và pectinase đến độ trong của dịch đường hoá.
- ✓ Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra của rượu thành phẩm ở pH 4,5 và độ Brix 25.
- ✓ Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và pH ban đầu đến quá trình lên men.

Sau thời gian nghiên cứu và tiến hành thí nghiệm, kết quả thu được như sau:

- ✓ Ở tỉ lệ enzyme 0,4ml/100gram đối với amylase và 0,04ml/100gram pure quả đối với enzyme pectinase với thời gian thủy phân một giờ cho dịch quả có độ trong tốt nhất.
- ✓ Theo khảo sát với việc sử dụng chế phẩm pectinase càng nhiều thì hàm lượng methanol sinh ra càng cao.
- ✓ Công đoạn phối chế khảo sát nhằm tạo ra tỉ lệ phối chế thích hợp để sản phẩm có màu sắc đẹp, mùi vị hài hòa. Qua đánh giá giá trị cảm quan, ở tỉ lệ 35% dịch quả, hàm lượng chất khô 23%, pH 3,5 thì sản phẩm được chấp nhận cao nhất.

## **Chương I. GIỚI THIỆU**

### **1.1 Đặt vấn đề**

Rượu vang là loại đồ uống được lên men trực tiếp từ nước quả, không qua chưng cất, có độ cồn thấp (10-18 độ). Việt Nam là đất nước cây trái bốn mùa, việc sản xuất rượu vang không những có ý nghĩa làm phong phú thêm thành phần đồ uống trong bữa ăn, có tác dụng bồi bổ sức khỏe, mà còn có ý nghĩa tăng thu nhập cho nông dân, góp phần tạo đầu ra thúc đẩy ngành nông nghiệp trồng cây ăn quả.

Tất cả các loại trái cây đều có thể dùng làm nguyên liệu để sản xuất rượu vang. Có thể sản xuất rượu vang từ dứa, mơ và nhiều loại quả, ta có rượu vang hỗn hợp của nhiều loại quả. Nhìn chung, nên sản xuất rượu vang từ các loại quả có mùi thơm, vị ngọt, chua, chát, như quả dứa, nho, táo, mơ, mận, dâu... hoặc hỗn hợp của các quả trên.

Trong sản xuất rượu vang có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng rượu. Độ trong là một trong những yếu tố đó, có thể làm trong rượu vang bằng nhiều cách như cơ học, hóa học hay sử dụng enzyme (*Multon, 1992*). Mỗi phương pháp đều có ưu điểm riêng của mình. Phương pháp tách cơ học tách được huyền phù nấm men, tiết kiệm thời gian nhưng khó tách được chất keo trong dung dịch. Phương pháp này thường được áp dụng trên quy mô lớn và đòi hỏi vốn đầu tư cao. Với điều kiện sản xuất thủ công, phương pháp làm trong này không phù hợp. Thay vào đó sử dụng enzyme pectinase để phá vỡ hệ keo tự nhiên trong dịch quả, tạo sự đồng tụ, kết lắng lôi kéo theo các huyền phù nấm men làm cho rượu trong hơn, giá thành rẻ và nhất là có thể áp dụng trong điều kiện sản xuất thủ công.

### **1.2 Nội dung nghiên cứu**

- Nhằm nâng cao chất lượng rượu vang, đáp ứng nhu cầu và thị hiếu người tiêu dùng, ta đề ra một số nội dung sau:
- Phân tích thành phần nguyên liệu
- Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và pH đến hiệu suất thu hồi rượu mít
- Khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung chế phẩm pectinase trong sản xuất rượu vang mít
- Phân tích đánh giá chất lượng thành phẩm.

## Chương II. LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU

### 2.1. Sơ lược về nguyên liệu mít

#### 2.1.1. Nguồn gốc



Hình 1. Trái mít

Mít là loại cây to, cây có thể cao đến 10-15m, cành non có nhiều lông ở ngọn, lá đơn nguyên. Lá dài 9-12cm, rộng 4-9cm, cuống dài 1-5cm. Hoa đơn tính cùng gốc, hoa cái tự mọc ngay trên thân hay trên cành, hoa dài 5-8cm, chiều ngang 2-5cm, hoa đực hình chày. Quả to, dài 30-60cm, mặt tua tủa nhiều gai ngắn. Khi chín vỏ vẫn giữ màu xanh lục hơi ngả sang màu vàng. Thịt quả chín màu vàng nhạt, vị ngọt rất thơm, quả có nhiều múi, mỗi

múi có một hạt (NXB Nông Nghiệp, 1994). Mít có nguồn gốc từ Ấn Độ, nó cũng được trồng nhiều ở Indônêxia,

Thái Lan, Philippin,...Ở Malaysia, mít được trồng nhiều ở tiểu bang Jahor, Pahang, Kedah.

Theo Vũ Công Hậu (2000), ở Việt Nam mít được trồng rộng rãi khắp cả nước từ Bắc chí Nam. Mít được trồng nhiều nhất ở các tỉnh miền Trung như: các vùng Đông Triều (Quảng Ninh), Quỳnh Lưu (Nghệ An), và các tỉnh Hà Bắc, Vĩnh Phú, được trồng thành vườn lớn dưới dạng vườn rừng, vườn đồi.

Cây mít chỉ ra trái ở những nhánh chính và ở thân cây mà thôi. Một trái mít có thể phát triển đến 40kg và đủ dùng cho cả gia đình. Gỗ cây mít rất bền chắc, có màu vàng đậm và thường được dùng để xây dựng nhà cửa, đặc biệt là để xây dựng những cung điện hoàng gia ở Bali và nhiều ngôi đền ở Việt Nam. Gỗ cây mít khi luộc chín sẽ cho ra một chất nhuộm màu vàng cam và trước đây rất lâu được những nhà sư dùng để nhuộm áo cà sa. Quả mít có giá trị dinh dưỡng rất cao, khoảng 40% carbohydrate, 6% protein và 0,4% chất béo. Ngoại trừ lớp vỏ gai, những phần còn lại của quả mít đều ăn được. Múi mít chín thường được ăn tươi, xơ mít có thể dùng muối chua như muối dưa (gọi là nhút), quả mít non còn được dùng như một loại rau củ để nấu canh, kho cá, trộn gỏi....Theo Đông y, mít còn có tác dụng như một vị thuốc. Lá mít có công dụng chữa một số bệnh như tưa lưỡi của trẻ em, bệnh hen suyễn, chữa mụn nhọt và được dùng như một vị thuốc lợi sữa cho sản phụ sau khi sinh. Vỏ cây mít có nhiều nhựa, cũng được dùng làm thuốc để chữa nhọt vỡ mủ. Gỗ mít tươi đem mài lên miếng đá nhám, cho thêm ít nước dùng để uống có tác dụng an thần, chữa huyết áp cao hay những trường hợp co quắp.

Hạt mít đem luộc, rang, nướng hay thổi với cơm ăn. Lượng protein và lipid của hạt mít khô tuy không cao bằng gạo nhưng hơn hẳn khoai, sắn, ngô. Trong dân gian thường cho rằng hạt mít có công dụng bổ trung ích khí, gây trung tiện, thông tiêu tiện. Múi mít chín được coi là một loại thức ăn bổ dưỡng và có tác dụng long đờm. (Vinamit.com.vn)

### 2.1.2. Phân loại

- Mít thuộc loại dâu tằm với tên khoa học là *Artorpus Heterophyllus*
- Theo *Việt Chương (2000)* thì mít có 2 loại: mít ướt và mít ráo nhưng có rất nhiều giống như mít mật, mít dừa, mít nghệ, mít nài, mít tổ nữ,...mỗi giống có một hương vị khác nhau.
- Theo *Phan Kim Hồng Phúc và Nguyễn Văn A (2000)* thì nước ta hiện nay có 3 giống mít chính:

- ✓ Mít nghệ: quả to, cây cho nhiều quả, dày cơm, rất ngon do nhiều mật.
- ✓ Mít tổ nữ: ngon không bằng mít nghệ nhưng do khi banh ra các múi dính vào cùi, nên được ưa chuộng, hơn nữa rất ráo, không dính tay, giá bán có khi bằng mít nghệ. Cây có nhiều quả, quả tương đối nhỏ (1-3kg).
- ✓ Mít dừa: quả to như mít nghệ, màu vàng nhạt, ăn giòn, dày cơm, ít ngọt, giá bán thấp hơn.



### 2.1.3. Thành phần hóa học của mít

- ✓ Theo *Nguyễn Công Dư (1976)* thành phần quần thể mít Hương Khê (Hà Tĩnh) được cho trong bảng sau:

Hình 2. Mẫu mít nghệ cắt ngang

Bảng 1. Thành phần quả mít

Thành phần	Khối lượng (kg)	Phần trăm (%)
Trái nặng trung bình	6,75	100
Vỏ và lõi	2,2	32
Sơ	1,62	25
Múi tươi	1,9	28
Hạt	1,06	15

- ✓ Trong múi mít khô có 11-15% đường, chủ yếu là fructose và glucose một ít tinh dầu thơm, 1,6% protein, 1-2% muối khoáng gồm 18mg% Canxi, 25mg% Phospho, 0,4mg% sắt, 0,14%mg carotene, 0,04mg% vitamin B2, 4mg% vitamin C (*Hậu, 2000*).
- ✓ Theo *Vinamit.com* quả mít có giá trị dinh dưỡng rất cao khoảng 40% cacbohydrat, 6% protein và 0,4% chất béo.

**Bảng 2. Bảng thành phần hoá học của mít**

<b>Thành phần</b>	<b>Giá trị trong 100g phần ăn được</b>	<b>Thành phần</b>	<b>Giá trị trong 100g phần ăn được</b>
Nước	73,23g	<b>Vitamins</b>	
Năng lượng	94 kcal	Vitamin C	6,7mg
Năng lượng	393 kJ	Thiamin	0,030mg
Protein	1,47g	Riboflavin	0,110mg
Béo	0,30g	Niacin	0,400mg
Khoáng, tro	1,00g	Vitamin B-6	0,108mg
Carbohydrate	24,01g	Folate, total	14mcg
Xơ	1,6g	Folate, food	14mcg
<b>Khoáng</b>		Folate, DFE	14mcg-DEF
Canxi, Ca	34mg	Vitamin A, IU	297IU
Iron, Fe	0,60mg	Vitamin A, RAE	15mcg-RAF
Magnesium, Mg	37mg	<b>Lipids</b>	
Phosphorus, P	36mg	<i>Các acid béo no bão</i>	0,063g
Potassium, K	303mg	<i>hoà</i>	
Sodium, Na	3mg	16:0	0,040g
Zinc, Zn	0,42mg	18:0	0,022g
Copper, Cu	0,187mg	<i>Các acid béo chưa no</i>	0,044g
Manganese, Mn	0,197mg	<i>chứa một nối đôi</i>	
Selenium, Se	0,6mcg	16:1	0,003g
		18:1	0,042g
		<i>Các acid chưa no</i>	
		<i>chứa nhiều nối đôi</i>	0,086g
		18:2	0,063g
		18:3	0,024g

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19 (2006)

## 2.2. Định nghĩa và giá trị của rượu vang

### 2.2.1. Định nghĩa

Danh từ rượu dùng để chỉ một dung dịch trong đó có cồn êtylic, công thức  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ . Độ cồn chỉ tỉ lệ cồn êtylic tính theo thể tích, so với toàn dung dịch cũng tính theo thể tích. Có rất nhiều loại rượu, để dễ phân biệt, có thể tạm chia làm 3 nhóm:

- Rượu cất hay rượu trắng
- Rượu lico hay rượu ngọt
- Rượu vang hay rượu lên men từ trái cây

### 2.2.2. Thành phần và giá trị dinh dưỡng của rượu vang

#### ❖ Thành phần

Theo Jazic và Zorec (Vũ Công Hậu, 1983), trong một lít rượu quả ở Ba Lan có các chất sau đây:

**Bảng 3. Thành phần của rượu mít theo Jazic và Zorec**

Nước	818-899g
Đường tổng số	62-132g
Chất hoà tan không phải đường	18-30g
Acid (tính ra acid malic)	5-7g
Acid bay hơi	0,65-1,1g
Tro	1,8-2,9g

Trong các số liệu trên đây chưa tính đến độ cồn êtylic, độ cồn từ 10-18 tức là trong một lít có 80-114g (Vũ Công Hậu, 1983).

✓ Cồn

Thành phần quan trọng nhất của rượu vang, vì cồn êtylic làm cho rượu mạnh, uống vào gây hiện tượng sinh lý gọi là say. Độ cồn tự nhiên khoảng 7 đến 16, cồn etylic có mùi thơm, vị hơi ngọt (Vũ Công Hậu, 1983).

✓ Acid

Là thành phần quan trọng của rượu vang ngang với cồn nó có vị chua nhưng cân đối với vị ngọt của cồn, của glycerin, vị chát của polyphenol, vị mặn của các chất muối. Acid hữu cơ trong rượu còn có tác dụng ngăn cản hoạt động của các vi khuẩn làm hư hỏng rượu như acid taric, malic, citric, oxalic...tuy nhiên cũng có các acid có tác dụng tiêu cực nếu có nhiều sẽ gây ra các bệnh rượu như: acid acetic, formic, propionic, butiric...(Vũ Công Hậu, 1983).

✓ Đường

Hàm lượng đường trong rượu rất cao chủ yếu là fructose, glucose, một ít galactose; đặc biệt khi rượu có hàm lượng methanol nhiều loại vi khuẩn yếm khí cũng như hiếu khí sẽ phá huỷ đường, chuyển thành acid lactic, dấm...(Vũ Công Hậu, 1983).

✓ Tro và các chất muối

Có nhiều muối khoáng trong rượu hoa quả, phổ biến nhất là P, K, S, Na, Ca, Mg, Si, Fe, Mn, Cl, Al....., mặc dù lượng tuyệt đối thấp. Trong một lít rượu chỉ có 1,5-3g tro nhưng chất muối trong tro giữ vai trò quan trọng:

- Làm tăng hương vị của rượu
- Tăng giá trị dinh dưỡng, có nhiều chất muối hết sức cần thiết cho cơ thể sống với một lượng rất nhỏ
- Những chất vi lượng như Fe hàm lượng trung bình chỉ vài mg/lít và Cu: 0,2-0,3 mg/lít
- Nếu chỉ tăng một vài mg trong một lít cũng gây kết tủa làm cho rượu đục, mất hương vị (Vũ Công Hậu, 1983).

### ✓ Chất gây mùi thơm

Chủ yếu là các chất có nguồn gốc pectin quyết định, nhưng đại bộ phận các chất này bị phá hủy và bị khí cacbonic kéo theo trong quá trình lên men. Trong quá trình lên men, nấm men cũng sản sinh ra những hợp chất có mùi thơm trong đó có cồn cao phân tử và ester của chúng. Trong quá trình rượu chín phát sinh mùi thơm đặc biệt gọi là bukê (bouquet) do các chất ôxy hoá - khử sinh ra, nhưng chỉ ở dạng khử thì có mùi thơm, vì vậy giữ rượu vang quả trong bình nút kín hoàn toàn không có oxy một thời gian dài thì có mùi thơm. Nếu trong bình có chỗ trống và nút không kín, oxy lọt vào thì mùi thơm bị phá hủy rất nhanh (*Vũ Công Hậu, 1983*).

### ✓ Vitamin

Nước quả có tiếng là giàu vitamin. Vấn đề là vitamin có bị phá huỷ trong quá trình lên men không? *Ribero Gayon, 1976* viết như sau: “Nói tóm lại lên men rượu điều chỉnh lại phần vitamin của nước quả, thực ra đó là một kỹ thuật tốt để giữ lại các vitamin đó” (*Vũ Công Hậu, 1983*).

### ✓ Polyphenol

Flavon làm cho rượu có màu vàng, tanin dễ kết bông với prôtein trong nước quả cũng dễ bị oxy hóa làm cho rượu tối lại (*Vũ Công Hậu, 1983*).

### ❖ Giá trị của rượu vang

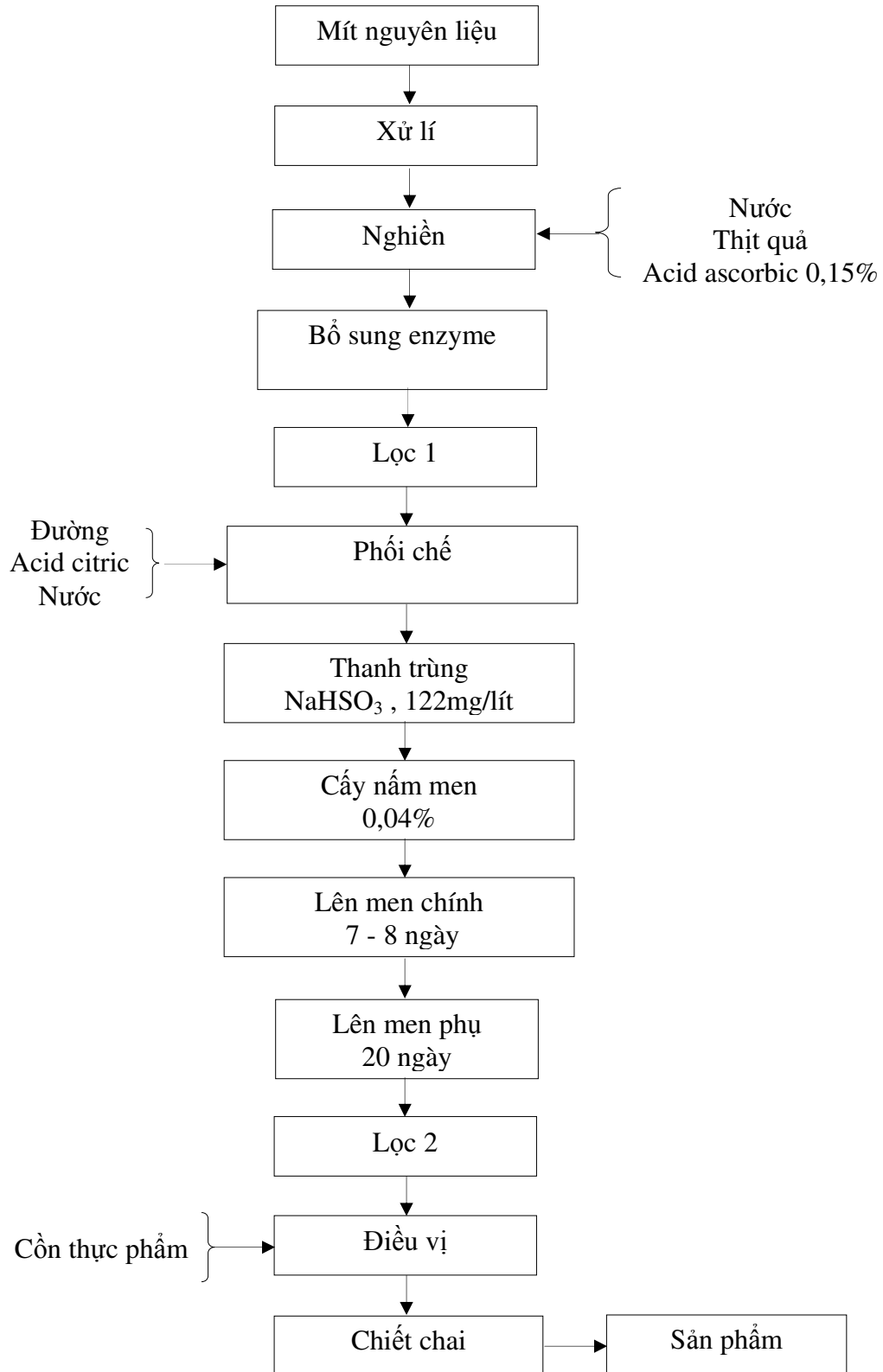
Đồ uống có cồn là một thức uống truyền thống của nhiều dân tộc, nếu uống không quá nhiều rượu thì có tác dụng kích thích, lợi cho sức khỏe. Rượu vang chứa cồn trung bình thích hợp cho nhiều người kể cả phụ nữ người già vì cồn lên men trong rượu vang là cồn tự nhiên không qua chưng cất. Cùng với cồn etylic, rượu vang chứa nhiều chất dinh dưỡng hơn các rượu khác, nó là một thực phẩm thực sự có thành phần cân đối và ổn định, giá trị dinh dưỡng cao, mùi thơm dịu của quả tươi và được sử dụng quanh năm.

Đứng về góc độ người trồng vườn, sản xuất quả, chế biến rượu vang là một hoạt động bổ sung, chống lãng phí, tăng thu nhập. Bước đầu chỉ là tự túc nếu nắm vững kỹ thuật sản xuất được rượu ngon tương đối rẻ thì có thể chuyển thành hàng hóa (*Vũ Công Hậu, 1983*).



### 2.3. Quy trình sản xuất rượu vang mít

#### 2.3.1. Quy trình sản xuất chung



Hình 3. Quy trình sản xuất chung

### 2.3.2. Thuyết minh quy trình

#### (a) Nguyên liệu

Một trong hai yếu tố có tính chất quyết định đến hiệu quả tác dụng của enzyme là nguyên liệu, nguyên liệu đem chế biến phải có độ chín kỹ thuật phù hợp. Độ chín kỹ thuật là giai đoạn chín của quả, đảm bảo tách dịch quả được tốt hơn với sự tích tụ tối đa các chất có giá trị dinh dưỡng cao và hương vị thích hợp.

Yêu cầu đầu tiên để sản xuất rượu vang là cần phải có một lượng đường thích hợp cho nấm men phát triển và lên men.

Nói chung, muốn có nguyên liệu tốt phải:

+ Chọn một loại quả thích hợp

+ Tạo điều kiện thuận lợi để quả có chất lượng cao

+ Kiểm tra bổ sung thành phần nước quả trước khi lên men. Rượu vang có giá trị dinh dưỡng cao nhưng là một loại thực phẩm đặc biệt khác với loại quả gốc của nó: đường biến thành cồn êtylic, mùi thơm quả tươi biến mất và thay thế bằng mùi thơm khác.

Ở nước ta nguyên liệu mít rất dồi dào, trong mít lại có hàm lượng đường cao, rất thích hợp cho quá trình lên men. Hơn nữa mít lại có màu sắc đẹp mắt, mùi thơm hấp dẫn, nên mít cũng là một nguyên liệu tốt cho quá trình sản xuất rượu vang.

#### (b) Xử lý nguyên liệu

Mít thu mua xong đem về rửa sạch, xẻ mít chỉ lấy phần thịt mít đem đi chế biến.

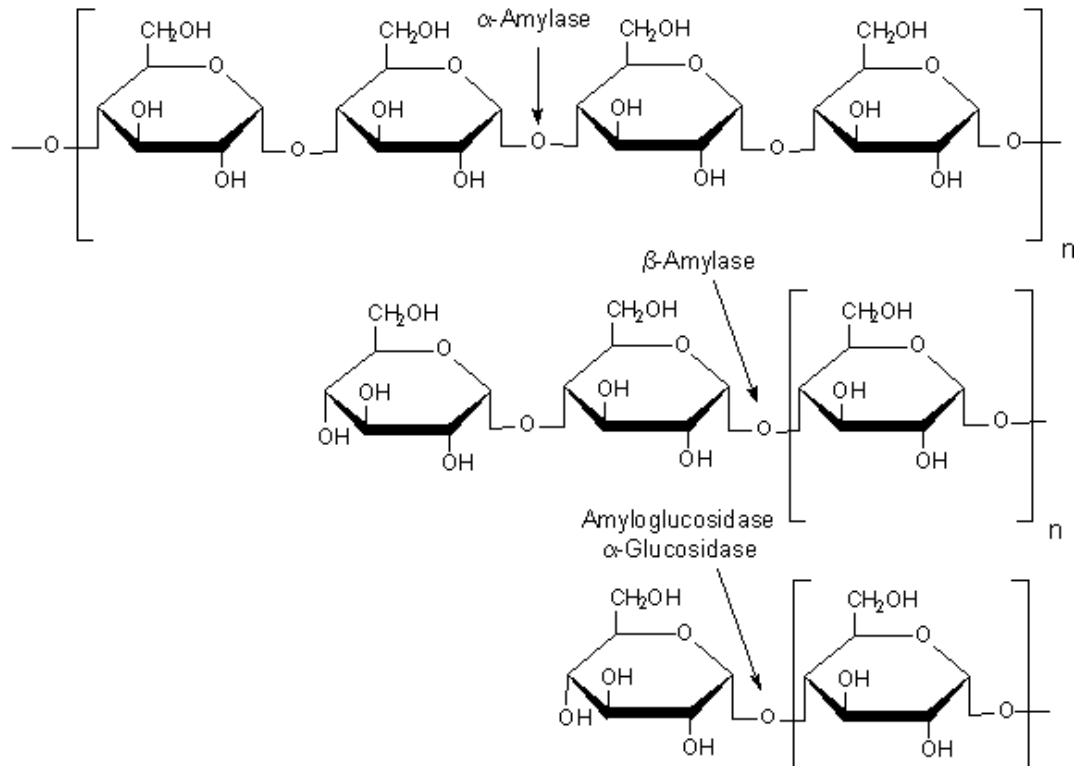
#### (c) Nghiền, xay

Theo *Nguyễn Đức Lượng (2004)* thì việc làm nhỏ nguyên liệu là khâu kỹ thuật rất quan trọng, quyết định đến hiệu quả tác động của enzyme và hiệu suất thu nhận dịch quả cũng như chất lượng dịch quả. Khi thực hiện một trong những phương pháp cơ học trên, một số tế bào sẽ bị phá hủy, mất tính chất bán thấm, do đó việc chọn lựa phương pháp cơ học làm nhỏ quả phù hợp với từng loại quả rất có ý nghĩa công nghệ. Nghiền, xay nhằm tạo điều kiện để tăng tốc độ quá trình lý học và hóa sinh học trong khi hòa thấm hạt vào nước, bảo đảm quá trình trích ly tối đa.

Mít càng nghiền nhỏ diện tích tiếp xúc với enzyme càng lớn, các enzyme phân hủy dễ dàng và chuyển thành dạng hòa tan trong nước một cách triệt để. Tuy nhiên mức độ nghiền nhỏ còn phụ thuộc vào thiết bị nghiền. Nghiền nhỏ còn có mục đích làm tăng cường tiếp xúc giữa nước và xác quả giúp hòa tan các chất màu, tanin chất có mùi thơm.

#### (d) Đường hóa

❖ **Hệ enzyme dùng trong quá trình đường hóa**



**Hình 4. Cơ chế tác dụng của amylase**

**+  $\alpha$  – Amylase**

- *Đặc tính*

Là một metalloenzyme, trong phân tử có ít nhất một phân tử  $\text{Ca}^{2+}$  có tác dụng làm bền cấu trúc bậc 2,3 của phân tử enzyme-amylase khá giàu tyrosine, tryptophan nhưng ít methionin.  $\alpha$  – amylase được hoạt hóa bởi ion đơn trị nếu chúng có nguồn gốc động vật và vi sinh vật. Nếu có nguồn gốc thực vật thì được hoạt hóa bởi ion hóa trị II. Hoạt hóa bởi ion hóa trị I như sau:  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ . chúng bị kìm hãm bởi ion kim loại nặng như  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,....  $\alpha$  – amylase kém bền trong môi trường acid nhưng khá bền nhiệt (bền nhất trong hệ enzyme amylase). Khả năng chịu nhiệt của  $\alpha$  – amylase phụ thuộc vào pH, hàm lượng muối calci, nồng độ cơ chất (Bùi Thị Quỳnh Hoa, 2001).

**Bảng 4. Nhiệt độ và pH tối thích của enzyme  $\alpha$  – amylase**

<b>Nguồn gốc</b>	<b>Nhiệt độ tối thích</b>	<b>pH tối thích</b>
Malt	72-75	5,5-5,7
Nấm mốc	50-60	5,0-6,0
Vi khuẩn	60-70	6,0-7,0

- **Cơ chế tác dụng lên mạch amylose và amylopectin**

$\alpha$  – amylase có khả năng phân cắt liên kết  $\alpha$  – 1,4 glucozid ở bất kì vị trí nào trên mạch tinh bột đã được hồ hóa. Do đó, được gọi là enzyme nội phân (endo enzyme).  $\alpha$  – amylase không chỉ có khả năng phân hủy hồ tinh bột mà còn có khả năng phân hủy cả hạt tinh bột nguyên vẹn.

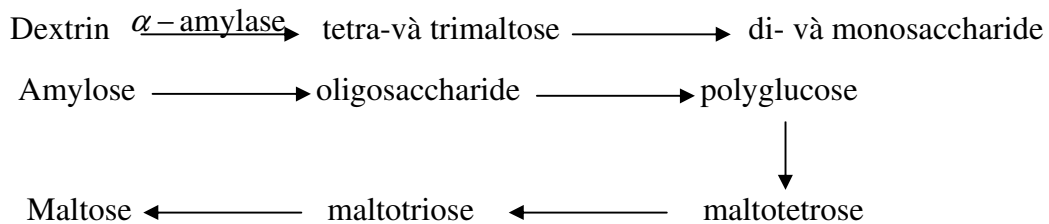
Dưới tác dụng của  $\alpha$  – Amylase, Amylose bị phân cắt thành oligosaccharide hay còn gọi là polyglucose (6-7 gốc glucose), sau đó các oligosaccharide này lại tiếp tục bị phân cắt nên chuỗi bị ngắn dần và tạo thành maltotetrose, maltotriose, maltose. Sau thời gian tác dụng dài, sản phẩm của quá trình thủy phân amylose là 13% glucose và 87% maltose. Tác dụng của amylase trên amylopectin cũng xảy ra tương tự và sản phẩm được tạo thành là 72% maltose và 19% glucose, ngoài ra còn có các dextrin phân tử thấp và isomaltose (8%) do  $\alpha$  – amylase không thể cắt được liên kết 1,6 glucosid ở mạch nhánh của phân tử amylopectin (Bùi Thị Quỳnh Hoa, 2001).

Các giai đoạn của quá trình thủy phân tinh bột của  $\alpha$  – Amylase

Giai đoạn dextrin hóa:

Tinh bột  $\xrightarrow{\alpha\text{-amylase}}$  dextrin phân tử lượng thấp

Giai đoạn đường hóa:



Khả năng dextrin hóa của  $\alpha$  – amylase rất cao do đó người ta còn gọi  $\alpha$  – amylase là enzyme dextrin hóa hay amylase dịch hóa (Lê Ngọc Tú, 1982).

**+  $\beta$  – amylase**

- *Đặc tính*

$\beta$ -amylase là một loại albumin. Tâm xúc tác của nó chứa gốc  $-SH$ ,  $-COOH$ , cùng với vòng imidazol của các gốc histidin.  $\beta$ -amylase chỉ phổ biến trong thực vật, đặc biệt có nhiều trong các hạt nảy mầm. Trong vi khuẩn không có  $\beta$ -Amylase. Sự tồn tại  $\beta$ -amylase trong nấm mốc cho đến nay vẫn chưa xác định. Amylase rất bền khi không có ion  $Ca^{2+}$ , bị kìm hãm bởi ion kim loại nặng như:  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , iodo, acetanic, iod, ozon. pH tối thích trong dung dịch bột thuần khiết là 4-6, trong dung dịch nấu là 5-5,6. Nhiệt độ tối thích trong tinh bột thuần khiết là  $40-50^{\circ}C$ . Trong dung dịch nấu  $60-65^{\circ}C$ ,  $\beta$ -amylase bị vô hoạt ở  $70^{\circ}C$ .

- *Cơ chế tác dụng lên mạch tinh bột*

$\beta$ -amylase xúc tác sự thủy phân các liên kết  $\alpha-1,4$  glucosid trong tinh bột, glycogen, polysaccharide đồng loại. Phân cắt tuần tự gốc maltose một ở đầu không khử. Maltose có cấu hình  $\beta$  được tạo thành,  $\beta$ -amylase được gọi là enzyme ngoại phân (exo-enzyme).

$\beta$ -amylase phân giải 100% amylose thành maltose. Phân giải 54-58% amylopectin thành maltose. Do mỗi nhánh của amylopectin có 20-25 phân tử glucose nên sau khi thủy phân tạo 10-12 phân tử maltose. Khi tới liên kết  $\alpha-1,4$  glucozit gắn với  $\alpha-1,6$  glucosid,  $\beta$ -amylase sẽ ngưng tác dụng, phần saccharide còn lại là dextrin phân tử lớn.

### **+ $\gamma$ - amylase**

- *Đặc tính*

So với  $\beta$ -amylase,  $\gamma$ -amylase bền với acid hơn nhưng lại kém bền dưới tác dụng của rượu etylic, acetone, không bền với ion kim loại nặng.  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  .....có trong nấm mốc và một vài loại vi khuẩn.

Hoạt động tốt ở  $50^{\circ}C$ . Hoạt lực tối đa trong vùng pH 3,5-5,5.

- *Cơ chế tác dụng lên amylose và amylosepectin*

Enzyme  $\gamma$ -amylase có khả năng xúc tác thủy phân cả liên kết  $\alpha-1,4$ ;  $1,6$  glucosid trong tinh bột, glycogen, polysaccharide kiểu maltose. Là enzyme ngoại phân exo enzyme. Nó thủy phân polysaccharide từ đầu không khử tuần tự từng gốc glucose một. Chúng không thủy phân được các dextrin vòng.

Khi thủy phân tinh bột, cùng với việc tạo thành glucose còn có thể được tạo thành oligosaccharide. Ngoài ra,  $\gamma$ -amylase còn có thể phân cắt cả liên kết  $\alpha-1,2$ ;  $1,3$  glucosid nữa.

Cho thêm enzyme amylase và pectinase vào nhằm cắt phân tử lớn như tinh bột, pectin tạo thành những phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ giúp ích cho quá trình lên men.

(e) Thanh trùng

– Có hai phương pháp thanh trùng trong sản xuất rượu vang:

❖ Phương pháp thanh trùng bằng nhiệt

Dịch quả được thanh trùng để diệt hết vi khuẩn, nấm men dại trước khi cấy nấm men chọn lọc vào. Vì nước quả có độ pH thấp nên chỉ cần thanh trùng ở 65-70<sup>0</sup>C.

- ✓ Ưu điểm: đơn giản, dễ làm, thuận tiện cho việc thanh trùng các dạng nguyên liệu có cấu trúc rắn chắc.
- ✓ Nhược điểm: dễ gây ra mất màu, mất hương vị tự nhiên của sản phẩm, làm thay đổi tính chất cảm quan, thành phần hóa học và hoạt tính của enzyme.

Tốn nhiều thời gian cho công đoạn thanh trùng, cũng như làm nguội.

❖ Phương pháp thanh trùng bằng NaHSO<sub>3</sub>

- ✓ Ưu điểm: tiêu diệt mạnh đối với hệ nấm men và nấm mốc dại trên mít. Có tính sát khuẩn mạnh đối với môi trường acid. Dễ bay hơi, không gây độc cho sản phẩm. Ổn định được vitamin C cho sản phẩm vì SO<sub>2</sub> có tính khử mạnh hơn, vừa chống oxy hoá tốt, vừa tiêu diệt được vi sinh vật và các quá trình lên men dại có trong nguyên liệu.
- ✓ Nhược điểm: là một hoá chất tương đối độc, nếu còn sót lại trong sản phẩm rất nguy hiểm.

Đối với rượu mít nên thanh trùng bằng NaHSO<sub>3</sub> là tốt nhất. Thông thường xông với lượng 122mg/lít và xông trong hai giờ để SO<sub>2</sub> bay hết nhằm tránh độc cho sản phẩm sau này. Các thí nghiệm cho thấy lượng anhydric sulfur 0,1% làm giảm hoạt tính chế phẩm enzyme, nếu hàm lượng 0,5% thì enzyme hoàn toàn bị ức chế.

(f) Phối chế

Mặc dù trái mít có hàm lượng đường cao nhưng trong sản xuất người ta vẫn cho thêm đường vào, để tất cả những dịch lên men sản xuất một loại rượu phải có cùng một lượng đường trong dịch lên men như nhau.

Công thức dùng trong bổ sung thêm đường như sau:

$$M = (a + x) / (100 + x)$$

M: độ khô cuối cùng của dịch quả

a: độ brix của dịch quả

x: hàm lượng đường cần bổ sung cho 100g dịch quả.

Thông thường, độ đường khoảng 200-220g đường/lít hay độ brix 20-22 là thích hợp.

Nếu dịch lên men có hàm lượng đường thấp, quá trình lên men sẽ dễ dàng, lượng đường sẽ chuyển hoá hết thành rượu, tuy nhiên độ cồn hình thành thấp chỉ đạt 7-8<sup>o</sup>, rượu nhạt.

Nếu dịch lên men có hàm lượng đường cao, quá trình lên men sẽ có trở ngại:

+ Một là: đường nhiều nấm men hoạt động khó đường chuyển thành cồn etylic với lượng thấp.

+ Hai là: đường còn tồn thì sẽ tạo điều kiện cho vi khuẩn lactic sẽ phát triển gây nên bệnh rượu.

Nếu bổ sung đường saccharose ở giai đoạn trước khi lên men thì toàn bộ đường saccharose sẽ bị thủy phân thành đường khử. Vậy nếu phát hiện saccharose trong rượu vang thành phẩm có nghĩa là có sự pha thêm đường saccharose.

Điều chỉnh độ chua: dùng pH kế hay giấy quỳ để xác định pH của dung dịch, pH tối ưu cho lên men là 4,5; có thể sử dụng acid citric hoặc calci carbonate để điều chỉnh pH của dịch lên men. Acid citric, CaCO<sub>3</sub> hầu như không có ảnh hưởng đến trung tâm hoạt động của nấm men.

– Acid citric (E330)

Acid citric làm tăng cường hoạt động của nhiều chất chống oxy hoá nhưng bản thân nó không là chất chống oxy hoá. Acid citric thường được dùng chủ yếu để hạ pH và cải thiện mùi vị của sản phẩm.

(g) Bổ sung men

Nấm men phải được hoạt hoá trước với nước ấm nhiệt độ 38-41<sup>o</sup>C. Sau 10-20 phút cho vào dung dịch và đem khuấy trộn. Lượng nấm men cho vào khoảng 1g/1gallon dung dịch (1gallon=4,54lít) (Cooke, 1988).

Theo thực nghiệm lượng nấm men cho vào khoảng 0,04% là tốt nhất. Sau đó khuấy trộn giúp nấm men phân bố đều hơn và cung cấp được nhiều oxy hơn nhằm giúp nấm men tăng sinh khối trong giai đoạn đầu.

Đậy nắp kín vì nấm men là vi sinh vật kỵ khí tùy tiện. Khi trong môi trường đủ lượng oxy, nấm men phân hủy đường làm nguồn năng lượng và cấu tạo tế bào tăng sinh khối. Trong điều kiện thiếu oxy, nấm men sử dụng phần oxy hòa tan trong môi trường để sinh trưởng và chủ yếu là lên men.

#### (h) Lên men chính

Quá trình lên men có thể tiến hành trong khoảng 18-32<sup>0</sup>C nhưng tốt nhất là 20-25<sup>0</sup>C. Sau khi lên men được 3-4 ngày, quá trình lên men đạt cường độ mạnh nhất, ghé tai vào thành thùng lên men có thể nghe thấy tiếng lạo xạo, là tiếng của bọt khí CO<sub>2</sub> giải phóng ra khỏi dịch. Cường độ lên men giảm dần ở ngày thứ 7-10 thì kết thúc lên men.

Trong quá trình lên men chính, lượng đường giảm nhanh, hàm lượng rượu tăng chậm rồi dừng lại. Vào cuối giai đoạn lên men chính nên bổ sung vào thùng lên men giống chủng *Saccharomyces oviformis* chịu được đường và cồn cao để lên men tiếp tục. Dịch lên men chính thường đạt 8-10% cồn.

#### (i) Lọc thô

Nhằm tách xác quả hoặc những chất không tan như cellulose, protien... ra khỏi rượu nhằm giúp cho rượu trong hơn và giúp ít cho quá trình lên men phụ ở giai đoạn tiếp theo.

Sau khi lên men chính kết thúc cần tách rượu vang non ra khỏi bã. Việc tách muộn có lợi làm tăng chất hoà tan trong rượu non, nhưng chúng đồng thời cũng làm tăng vị chát, đắng thô do các hợp chất còn sót lại trong xác quả, làm giảm chất lượng cảm quan của sản phẩm bởi vì càng chậm tách vang non ra khỏi bã thì càng thuận lợi cho sự oxy hoá các chất màu dẫn tới chỗ giảm mất một số chất màu. Vì vậy sau khi kết thúc quá trình lên men chính ta nên tách vang non ra khỏi bã càng sớm càng tốt.

Cần lưu ý rằng yếu tố nhiệt độ ở giai đoạn kết thúc lên men chính cũng sẽ quyết định việc tách rượu vang non ra khỏi bã sớm hay muộn. Khi nhiệt độ càng cao diễn biến của quá trình xảy ra trong buồng lên men càng mạnh thì càng phải sớm thực hiện việc tách bã ra khỏi rượu vang. Ngược lại, nhiệt độ càng thấp ta càng cần tiến hành chậm lại.

#### (j) Lên men phụ

Nhằm ổn định chất lượng rượu vang và làm tăng hương vị cho rượu. Lên men phụ được tiến hành ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ trong giai đoạn lên men chính. Người ta thường tiến hành lên men phụ ở nhiệt độ 15-18<sup>0</sup>C và kết hợp với các phương pháp làm trong bằng enzyme pectinase.

Trong quá trình lên men phụ sự tạo thành cồn chậm lại rất nhiều, thay vào đó là một loạt các quá trình chuyển hoá phụ để tạo thành các chất thơm. Quá trình lắng, làm trong rượu cũng xảy ra rất nhanh, các quá trình này giống như các quá trình xảy ra trong lên men phụ của công nghệ sản xuất bia.



**(k) Sản phẩm**

Sản phẩm tạo thành có màu vàng nhạt của mít và có hương thơm đặc trưng. Thông thường, rượu vang thành phẩm có độ cồn 11-15%, độ đường 3-5%, độ axit 0,3-0,4% và có vị chất đặc trưng tạo nên hương vị hài hoà.

**2.4. Các chủng nấm men thường dùng trong sản xuất rượu vang**

Theo *Luong Đức Phẩm (2004)* trong sản xuất rượu vang thường sử dụng các chủng nấm men sau:

**2.4.1. *Saccharomyces vin*:**

Đây là tên dùng phổ biến hiện nay, trước đây người ta gọi là *Saccharomyces vini* Meyer hay là *Saccharomyces ellipsoideus*, theo Lodder là *Saccharomyces cerevisiae* Hansen.

Trong quá trình lên men nước quả, nấm men này chiếm tới 80 % trong tổng số *Saccharomyces* có trong nước quả khi lên men. Chúng có nguồn dinh dưỡng cacbon là đường, cồn và acid hữu cơ; có tác nhân sinh trưởng là acid pantotenic, biotin, mezoizit, tiamin và piridoxin; ngoài ra chúng còn có các đặc tính riêng về khả năng tạo cồn, chịu sunfit, tổng hợp các cấu tử bay hơi và các sản phẩm thứ cấp cho rượu vang có mùi đặc trưng riêng biệt. Nhiều nòi của nấm men này trong lên men tạo được một lượng rượu chỉ đạt 8 -10 % so với thể tích

Ở giai đoạn cuối của quá trình lên men *Saccharomyces vini* kết lắng nhanh và làm trong rượu. Sau đó chúng thường bị già, không tiếp tục chuyển đường thành cồn và bị chết rất nhanh.

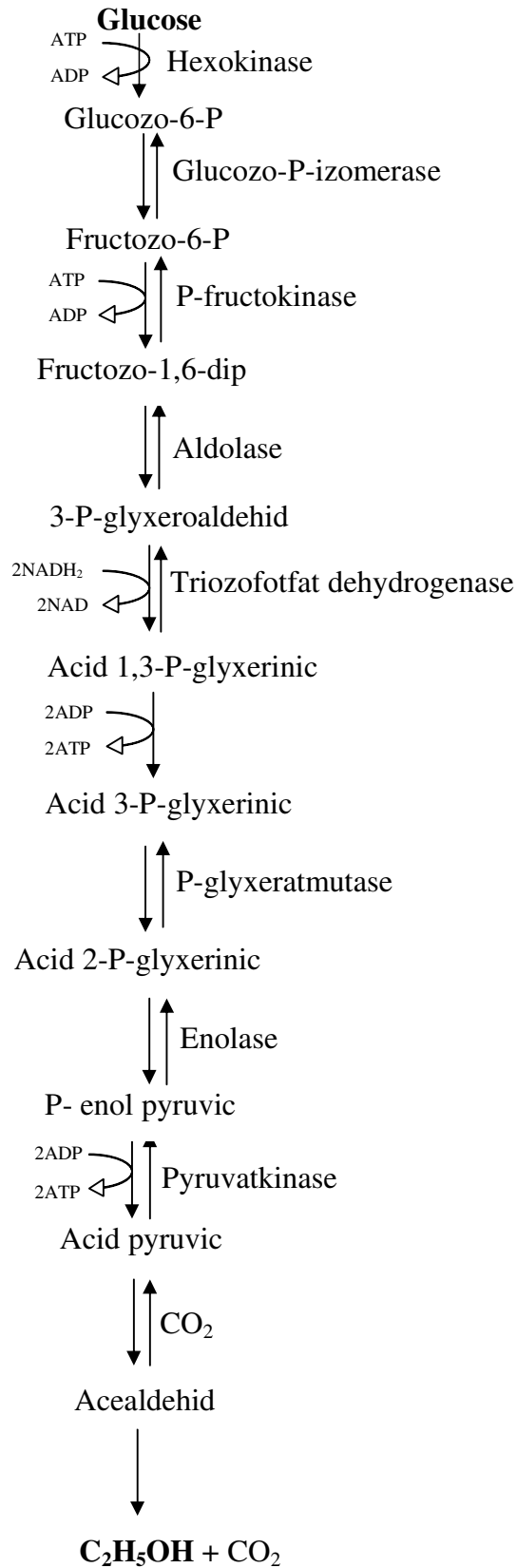
**2.4.2. *Saccharomyces uvarum***

Men này được tách từ nước nho, rượu và nước quả phức bồn tử lên men tự nhiên. Chúng có khả năng tạo được lượng cồn rất cao trong quá trình lên men (có thể đạt được lượng cồn trong dịch lên men là 12 – 13 %V ).

**2.4.3. *Saccharomyces oviformic***

Men này được tách từ nước nho tự lên men, có khả năng chịu được lượng đường và cồn cao, lên men kiệt đường và tạo ra lượng cồn tới 18°. Giống này lên men được glucose, fructose, manose, saccarose, maltose và 1/3 rafinose và không lên men được lactose, pectose.

**2.5. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men**



**Hình 5. Các phản ứng sinh hóa trong quá trình lên men**

Theo Bùi Ái (2000) thì các yếu tố sau đây có ảnh hưởng đến hoạt động của nấm men trong lên men rượu vang:

#### 2.5.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt động sống của nấm men, cụ thể là nấm men *Saccharomyces cerevisiae* trong quá trình lên men rượu. Nấm men phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 30-32<sup>0</sup>C, nhiệt độ tối đa 38<sup>0</sup>C, tối thiểu là 5<sup>0</sup>C. Nấm men được nuôi cấy ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối ưu, thường 17-22<sup>0</sup>C, có hoạt lực lên men rất lớn. Đối với quá trình lên men nấm men có thể chịu được nhiệt độ khá rộng 1-45<sup>0</sup>C, nếu nhiệt độ quá 50<sup>0</sup>C nấm men sẽ chết.

#### 2.5.2. Ảnh hưởng của pH

Nấm men có thể phát triển trong môi trường pH có chỉ số từ 2-8 nhưng thích hợp nhất là 4-4,5. Vi khuẩn bắt đầu phát triển ở pH 4,2 và cao hơn, khi thấp hơn mức này chỉ có nấm men có thể phát triển được. Vì vậy trong quá trình lên men rượu nên thực hiện ở pH 3,8-4,0. Tuy nhiên có những loài vi khuẩn do quen dần với độ pH thấp nên ngoài việc điều chỉnh pH thích hợp còn phải kết hợp sử dụng các chất sát trùng. Khi pH 8,0 thì nấm men phát triển kém, ngược lại vi khuẩn phát triển mạnh. Ở pH 3,8 nấm men phát triển mạnh thì hầu như vi khuẩn chưa phát triển.

Để tạo pH thích hợp trong môi trường nuôi cấy nấm men (kể cả lên men) người ta có thể bổ sung vào môi trường lên men bất cứ một loại acid nào, miễn là anion của acid không gây ảnh hưởng mạnh mẽ đến trung tâm hoạt động của nấm men.

#### 2.5.3. Ảnh hưởng của ánh sáng

Ánh sáng là yếu tố kìm hãm hoạt động của tế bào nấm men. Đặc biệt là các tia cực tím, ánh sáng sẽ giết chết tế bào nấm men, vì vậy quá trình lên men phụ thuộc vào thời tiết.

#### 2.5.4. Ảnh hưởng của số lượng tế bào nấm men

Số lượng tế bào nấm men cho vào dịch lên men ảnh hưởng rất lớn đến quá trình lên men. Nếu số lượng tế bào nấm men cho vào thích hợp thì quá trình lên men diễn ra tốt và hiệu suất thu hồi cao, chất lượng sản phẩm cũng tốt hơn. Nếu lượng tế bào nấm men cho vào quá ít thì tốc độ lên men chậm, sinh khối tế bào nấm men thấp tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển, số lượng tế bào nấm men quá nhiều thì môi trường dịch lên men không đủ cho nấm men phát triển, tế bào nấm men sẽ chết dần, sản phẩm sinh ra mùi lạ, vị lạ đồng thời phí đi một lượng đáng kể nấm men có ích.

### 2.5.6. Ảnh hưởng của nồng độ rượu

Quá trình nuôi cấy nấm men chủ yếu là tạo môi trường thích hợp cho nấm men phát triển sinh khối, đạt số lượng theo yêu cầu. Song nấm men cũng thực hiện một quá trình lên men rượu đáng kể.

Thường dịch nấm men có khoảng 4-6% rượu. Nồng độ rượu sinh ra có ảnh hưởng đến tốc độ và khả năng phát triển của nấm men. Điều này còn phụ thuộc vào thời gian, môi trường nuôi cấy, số lượng tế bào nấm men cho vào bằng nhau, điều kiện nuôi cấy giống nhau thì nồng độ rượu 1% có ảnh hưởng tốt đến tốc độ và khả năng phát triển của nấm men, từ 4-6% có ảnh xấu.

Sản phẩm chủ yếu của quá trình kỵ khí là ethanol, ethanol kìm hãm hoạt động của tế bào nấm men, tuy nhiên mức độ kìm hãm khác nhau đối với chủng, nòi nấm men khác nhau.

### 2.5.7. Ảnh hưởng của CO<sub>2</sub>

Hàm lượng CO<sub>2</sub> hình thành trong quá trình lên men thường hạn chế mạnh sự sinh sản của nấm men vang. Theo nghiên cứu của *Miuler-Thurrau*, khi:

+ Hàm lượng CO<sub>2</sub> trong rượu vang đạt 0,25% trọng lượng thì việc sinh sản của nấm men đình trệ.

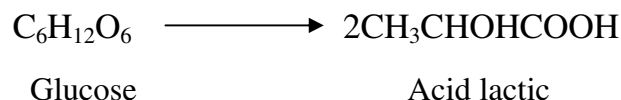
+ Hàm lượng CO<sub>2</sub> trong rượu vang đạt 1,5% trọng lượng thì nấm men không còn sinh sản được nữa.

+ Với hàm lượng CO<sub>2</sub> như trên, ở nhiệt độ 15<sup>0</sup>C thùng lên men sẽ có áp suất 7,7atm, nấm men vẫn sống và tiếp tục lên men kỵ khí.

#### ❖ Các hư hỏng thường gặp trong quá trình lên men

– Lên men lactic

Vi khuẩn lactic nhiễm vào thùng ủ sẽ lên men tạo thành acid lactic làm cho độ acid trong dịch lên men tăng lên, gây ức chế hoạt động của nấm men:



– Lên men butylic

Vi khuẩn butylic khi nhiễm vào thùng ủ sẽ lên men tạo thành acid butylic, tạo nhiều khí hydro, tuy nhiên độ acid không tăng cao.



– Lên men đại

Thường gặp là loại nấm men hình oval lớn, lên men rất nhanh, tạo độ acid cao và độ rượu sớm, làm ức chế hoạt động của nấm men nhà.

Các nguyên nhân làm cho rượu đục và biện pháp làm trong

❖ **Nguyên nhân làm cho rượu đục**

Dịch quả lên men có lẫn nhiều tạp chất nên rượu thu được sau quá trình lên men thường bị đục. Nếu các tạp chất chỉ là cuống quả, hạt, mảnh vỏ, xơ, ... thì chỉ lọc qua là trong. Tuy nhiên, trong dung dịch rượu còn có các phần tử nhỏ như cặn, đường, muối khoáng, ... và những phần tử lớn dạng keo như glycerin, chất pectic, protein,... nên không thể dùng các máy lọc thông thường mà phải dùng các máy siêu lọc (ultrafiltre). Thế nhưng rượu vẫn có thể bị đục lại và theo *Vũ Công Hậu (1983)* có hiện tượng như vậy là do nhiều nguyên nhân sau:

✓ **Kết tủa sắt**

Nếu trong rượu có 12-15mg/lít sắt tổng cộng, rượu vang lại có sẵn phosphat thì khi rượu tiếp xúc với không khí, môi trường thiếu oxy chuyển thành môi trường giàu oxy, sẽ hình thành hợp chất peric phosphat ( $\text{FePO}_4$ ) không hoà tan được, màu trắng ở vang trắng, màu xanh hoặc xanh ở vang đỏ.

Biện pháp phòng chống: giữ quả sạch, không lẫn những mảnh đất vụn trong đó có thành phần sắt, không cho nước quả hoặc rượu tiếp xúc với dụng cụ có sắt, trước khi chín cho bảo hoà oxy, nếu kết quả tủa sắt thì lọc để loại bỏ sắt thừa.

✓ **Kết tủa đồng**

Trong rượu vang bao giờ cũng có hợp chất lưu huỳnh. Nếu hàm lượng đồng trong rượu đạt nồng độ tối thiểu là 0,5mg/lít và trong điều kiện thiếu oxy (nút thật kín) thì sẽ hình thành sunfua đồng, kết tủa thành thứ bột nâu đỏ.

Biện pháp phòng chống: Không cho nước quả và rượu tiếp xúc với đồng. Nếu rượu chứa trên 0,5mg/lít đồng thì loại đồng đi bằng cách xử lý fero xianua Kali hoặc acid rubeanic.

✓ **Kết tủa bông protein**

Protein trong nước quả bị tiêu hủy một phần bởi nấm men, một phần nữa bị các chất tanin làm kết bông, nhưng vẫn có mặt trong rượu trẻ. Nếu lượng tanin trong rượu tăng lên (đựng trong thùng gỗ sồi), gây ra kết bông protein, dưới dạng những vẩn đục màu trắng sền sệt như bột gạo lỏng đem nấu chín. Rượu trắng ít tanin,

nhất là rượu trẻ hay bị đục vì lý do này. Đun nóng 70-80<sup>0</sup>C rồi để nguội lọc qua diatenit là biện pháp tốt để chống kết bông protein.

✓ Kết tủa màu

Chất màu trong vang đỏ một phần ở dạng keo. Gấp lạnh các chất keo này bị kết tủa thành cặn màu đỏ sẫm, tác hại: màu đỏ giảm đi 10-20%. Rượu càng già kết tủa càng dễ, vì vậy uống rượu trẻ phần nào tránh sự cố này.

✓ Kết tủa oxydase

Trong nước quả thường có enzyme oxydase hay polyphenoloxydase oxy hoá các chất polyphenol làm cho polyphenol chuyển màu, rượu bị đục. Ngay khi bắt đầu lên men rượu, oxydase đã hoạt động nhưng bị cản trở vì môi trường lên men rượu là môi trường thiếu oxy. Qua suốt quá trình gạn cặn, sau khi lên men xong, để chống oxy hoá người ta luôn giữ rượu trong tình trạng thiếu oxy, enzyme oxydase vẫn tồn tại và làm rượu đục và mất màu ở giai đoạn chín. Ngay cả khi rượu đã là thành phẩm, mỗi khi tiếp xúc một thời gian khá lâu với không khí rượu sẽ có nguy cơ kết tủa oxydase.

Cách phòng chống tốt nhất là xử lý ở nhiệt độ 60-70<sup>0</sup>C. Khi rượu bắt đầu chín, nếu để một cốc rượu trẻ ra không khí 10-14 giờ mà thấy hiện trạng kết tủa oxydase thì đem xử lý nhiệt.

✓ Kết tủa khác

Một số chất muối khác có thể kết tủa trong rượu như: kali bitartrat, canxi tartrat khi độ cồn tăng lên và nhiệt độ hạ thấp, ngoài ra cũng còn có các muối khác có thể kết tủa như: canxi oxalat.....

❖ **Các biện pháp làm trong rượu**

- Biện pháp cổ truyền: để lắng tự nhiên và gạn cặn
- Sử dụng protein tự nhiên: keo động vật (gelatin, lòng trắng trứng,....)
- Lọc
- Làm trong bằng các biện pháp vật lý: gia nhiệt hoặc làm lạnh, nhiệt không chỉ có tác dụng tiệt trùng mà còn có tác dụng ổn định rượu rất cao (Vũ Công Hậu, 1983)

Ví dụ: nhiều rượu trắng đem đun ở 80<sup>0</sup>C sau đó lọc, giữ trong chai không thay đổi sau hàng chục năm, có sự ổn định nhờ tác động vật lý như nhiệt phá huỷ các chất, oxydase oxy hoá rượu, gây kết bông những chất protein.

Đặc biệt có một phương pháp làm trong rượu mới đó là làm trong rượu bằng enzyme pectinase đang được chú ý.

## 2.6. Khái quát về enzyme pectinases

### 2.6.1. Nguồn thu nhận

Hiện nay người ta thu nhận pectinases chủ yếu từ vi sinh vật (thường là nấm mốc: *a.wamori*, *a.niger*). Có 2 phương pháp sản xuất pectinase:

#### (a) Thu nhận chế phẩm pectinase từ canh trường bề mặt

Môi trường sử dụng nuôi cấy vi sinh vật để thu nhận pectinase thường là cám gạo, hay cám mì, bã củ cải hoặc thóc mầm. Nguồn dinh dưỡng bổ sung thường là các muối ammonium, phosphate.... Độ ẩm môi trường phải nằm trong khoảng 60%. Sản phẩm sau lên men được sấy khô thành chế phẩm enzyme thô và đem tinh chế.

Để thu được pectinase tinh khiết chế phẩm enzyme thô phải được trích ly bằng phương pháp kết tủa nhờ dung môi hữu cơ hay muối ammonium sulfate. Dung môi hữu cơ được sử dụng để kết tủa enzyme pectinase có thể là rượu ethanol (72,5-75%) hoặc isopropanol (55-57%). Muối ammonium sunfate sử dụng có độ bão hòa 0,79. Khi kết tủa bằng rượu ethanol, chế phẩm enzyme thu được có độ tinh khiết khoảng 90%, còn nếu bằng muối thì độ tinh khiết đạt khoảng 75%, thời gian tiếp xúc với rượu càng ngắn càng tốt. Sau đó ly tâm để tách kết tủa khỏi dung dịch, sấy kết tủa trong thiết bị sấy chân không hay sấy thăng hoa rồi nghiền nhỏ và đem bảo quản.

#### (b) Thu nhận chế phẩm enzyme từ canh trường bề sâu

##### ❖ Phương pháp hiếu khí

Sự tích tụ enzyme trong môi trường được bắt đầu khi vi sinh vật gần đạt đến pha ổn định, khi môi trường bị acid hóa mạnh và khi lượng phospho vô cơ được sử dụng hoàn toàn. pH của môi trường nuôi cấy thường đạt 6-7,2 là thích hợp. Đối với nấm mốc, pH kiềm kìm hãm sự tổng hợp sinh khối và sự tích lũy enzyme pectinase, pH 4 ức chế hoàn toàn sự tích lũy enzyme pectinase. Khi pH dịch về phía acid, ngay cả khi pH nằm trong khoảng 4,5-5,0; tuy sự tạo thành sinh khối không ảnh hưởng nhưng sự tạo thành enzyme pectinase bị kìm hãm. Tuy nhiên, pH của môi trường nuôi cấy *A.niger* và *A.awamori* 16 có thể dịch về 3,5-3,8 và 2,9-3,2 theo thứ tự.

Vật liệu nuôi cấy thường là sợi nấm được ủ trong môi trường dinh dưỡng cho đến khi nứt nanh bào tử, thời gian ủ sơ bộ thường là 38-42 giờ, lượng sợi nấm đem cấy thường là 2 %.

Để thu được chế phẩm khô cần tách sợi nấm ra khỏi canh trường lỏng, cô đặc chân không canh trường lỏng khi hàm lượng chất khô đạt từ 5-8% rồi đem sấy phun, sau đó đem bao gói tránh hút ẩm.

Để thu được pectinase tinh khiết thì chế phẩm enzyme thô phải được trích ly bằng phương pháp kết tủa nhờ dung môi hữu cơ hay muối ammonium sulfate.

❖ Phương pháp yếm khí

Môi trường: bã củ cải: 2%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 0,75%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,1%;  $\text{CaCO}_3$ : 0,3%; nước chiết ngô: 0,5%; pH môi trường khoảng 6,5-7.

*Clostridium pectinofermentans* 15 có khả năng tổng hợp pectinase một cách mạnh mẽ ở pH tăng trưởng của quá trình sinh khối và tăng đồng thời với sự tích lũy sinh khối.

*Cl. Felsineum* cũng có thể được nuôi cấy yếm khí để thu pectinase. Thành phần môi trường gồm có: lactose: 2%; pectin củ cải: 1%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 0,4%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 0,7%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,3%;  $\text{NaCl}$ : 0,1%;  $\text{MgSO}_4$ : 0,025%;  $\text{FeSO}_4$ : dạng vệt;  $\text{CaCO}_3$ : 0,5%; dịch nấm men tự phân: 0,05%; acid ascorbic: 0,5%.

Có thể tiến hành thu chế phẩm từ dịch lọc canh trường bằng phương pháp kết tủa enzyme nhờ dung môi hữu cơ hay muối ammonium sulfate.

❖ Phương pháp hiện đại trong chuẩn bị chế phẩm enzyme pectinase thường theo các bước cơ bản sau đây:

- Khử muối bằng phương pháp lọc gel (Biogel Ploo)
- Tách protein bằng phương pháp trao đổi anion (PEAE Brogel A)
- Tách enzyme pectinase bằng alginate liên kết ngang
- Tinh sạch bằng FPLC
- Alginate liên kết ngang hoạt động bằng cách kết hợp ái lực, ảnh hưởng tĩnh điện và thay thế pectin liên kết ngang

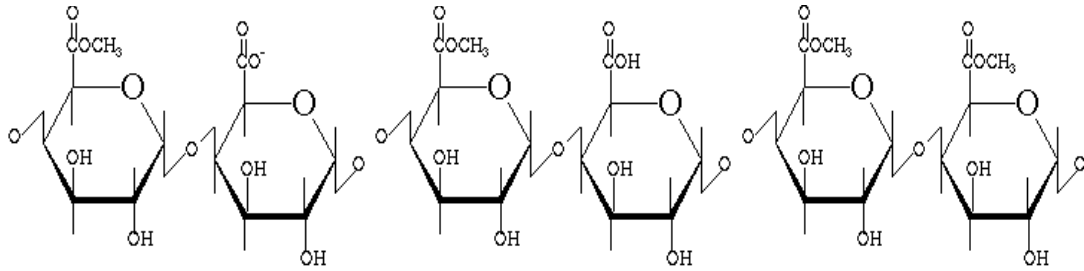
### 2.6.2. Phân loại và cơ chế tác dụng của enzyme pectinase

Pectin là cơ chất của enzyme pectinase. Pectin rất phổ biến trong thực vật, là hợp chất polyme tự nhiên tồn tại có 3 dạng: protopectin, pectin và acid pectinic.

Protopectin không tan có trong thực vật xanh, tạo cho rau quả xanh có độ cứng nhất định, bị thủy phân bởi acid hay nhiệt độ, enzyme sẽ chuyển protopectin thành pectin hòa tan (quá trình chín của quả có thể gọi là quá trình chuyển hóa này). Pectin là ester methyl của acid polygalacturonic. Tính chất quan trọng của pectin là dễ tạo gel ở nồng độ dịch đường cao 65% trong môi trường 1% acid. Acid pectinic là một polygalacturonic nhưng chỉ được este hóa một phần nhỏ bởi metanol. Còn acid pectic hay polypectic là acid được giải phóng khỏi nhóm methoxyl ( $-\text{OCH}_3$ ). Muối pectic tương ứng là pectinat và pectat. Liên kết chính trong pectin là  $\alpha$ -glucosid.



**Công thức cấu tạo của pectin**



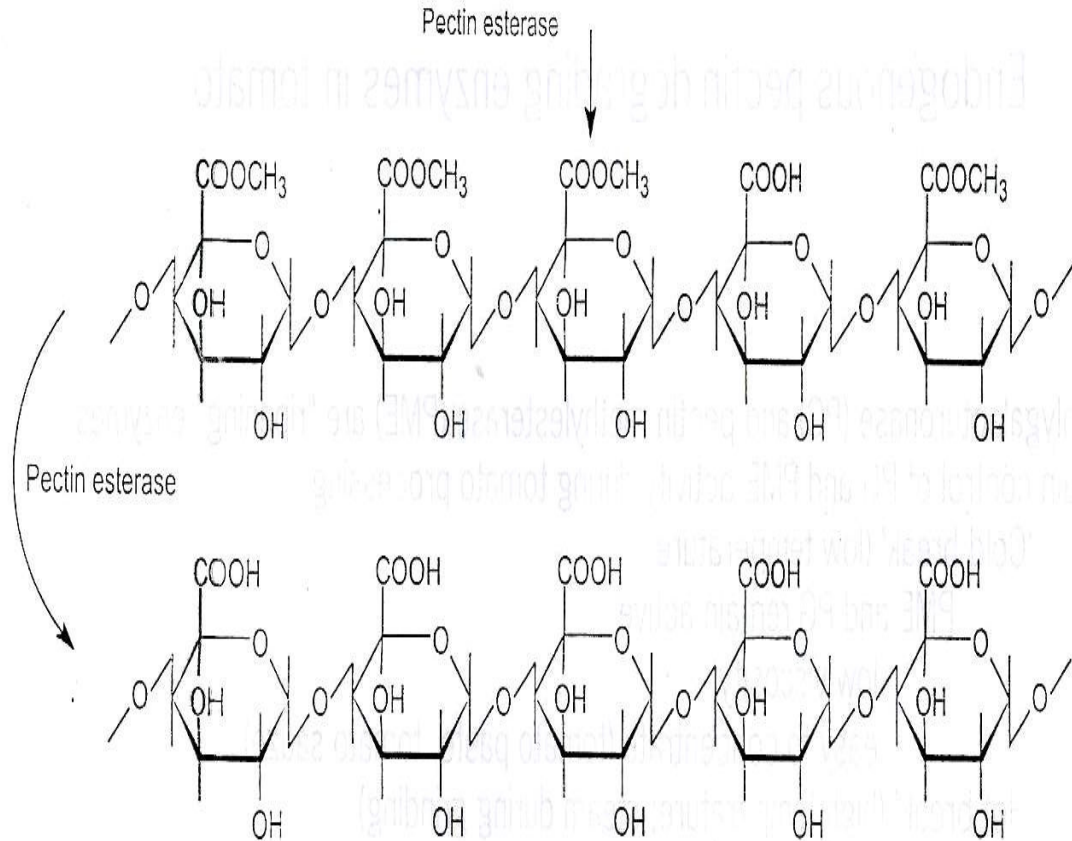
**Hình 6. Công thức cấu tạo của pectin**

Theo Lương Đức Phẩm (2004) thì đây là nhóm enzyme thủy phân pectin. Sản phẩm tạo thành là acid galacturonic, glucose, galactose,.... Pectinase có nhiều loại:

❖ Pectinesterase (PE) (còn được gọi là pectinmethylesterase (PME, EC 3.1.1.11))

Phân cắt liên kết giữa methanol và nhóm cacboxyl của acid galacturonic. PE chỉ phân cắt nhóm methoxyl đứng cạnh nhóm  $-COOH$  tự do.

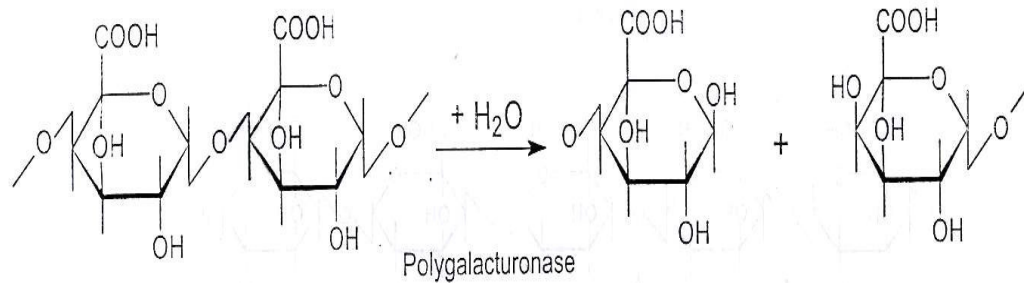
Pectinesterase sẽ thủy phân trước nhất là nhóm methylester nằm giữa 2 nhóm cacboxyl tự do, và sau đó sẽ thủy phân lần lượt các liên kết este dọc theo phân tử pectin. Kết quả là tạo thành acid pectinic, acid pectic và metanol.



**Hình 7. Cơ chế tác dụng của Pectinesterase**

pH và nhiệt độ tối ưu của pectinesterase phụ thuộc vào nguồn thu nhận. PE của vi sinh vật có pH tối ưu từ 4,5 đến 5,5 trong khi đó PE từ nguồn thực vật có pH tối ưu từ 5 đến 8. PE của nấm mốc có nhiệt độ tối ưu từ 30-45<sup>0</sup>C, bị vô hoạt ở 55-62<sup>0</sup>C, PE được hoạt hóa bởi Ca<sup>2+</sup> và Mg<sup>2+</sup>.

❖ Polygalacturonase (PG.EC 3.2.1.15, poly- $\alpha$  1,4-galacturonic glucanhydrolase)



**Hình 8. Cơ chế tác dụng của Polygalacturonase**

Enzyme này ít gặp trong thực vật, chủ yếu có trong vi khuẩn và nấm mốc. Đây là một phức hệ enzyme và thường có đặc hiệu cao đối với cơ chất. Là enzyme tác dụng lên pectin, acid pectinic và acid pectic. Các sản phẩm trung gian của quá trình thủy phân pectic bởi polygalacturonase có thể là các acid pen ta, tetra, tri và digalacturonic.

❖ Transeliminase

Đây là nhóm enzyme được tìm thấy ra cách đây không lâu lắm (khoảng 1960-1961) bao gồm protopectinaza xúc tác sự phân cắt araban, galactan khỏi protopectin để tạo thành pectin hòa tan và enzyme transeliminaza phân cắt phi thủy phân (không có sự tham gia của phân tử  $H_2O$  pectin để tạo ra các gốc galacturonic có nối kép giữa nguyên tử  $C_4$  và  $C_5$ . Phản ứng này xảy ra dễ dàng ở môi trường trung tính hay kiềm yếu.

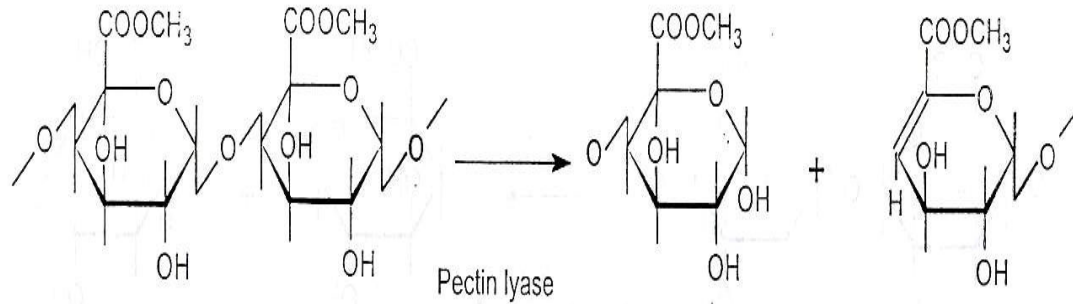
Transeliminase có khả năng cắt đứt liên kết  $\alpha$ -1,4 của phân tử pectin, kết quả là tạo ra các đơn phân galacturonic có chứa nối đôi.

Transeliminase tác dụng lên pectin cũng như acid pectic. Dựa vào tính đặc hiệu và cơ chế tác dụng, có thể phân thành những nhóm enzyme sau

+ Pectin transeliminase (Pectinlyase) là những enzyme tác dụng lên pectin và acid pectinic.

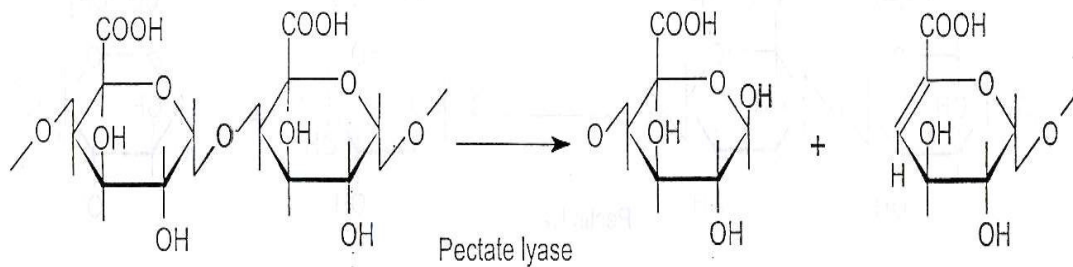
+ Polygalacturonat transeliminase (Pectatylase) là những enzyme tác dụng lên acid pectinic và acid pectic.

Transeliminase từ nguồn khác nhau thì có cơ chế tác dụng và thuộc tính khác nhau



**Hình 9. Cơ chế tác dụng của pectinlyase**

Pectinlyase của nấm mốc có pH tối ưu từ 5-6, phân cắt liên kết  $\alpha$ -1,4 phía trong mạch phân tử pectin, hoạt động không cần sự hoạt hoá của ion  $\text{Ca}^{2+}$



**Hình 10. Cơ chế tác dụng của pectatelyase**

Pectatelyase được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như: vi khuẩn, nấm mốc và thực vật. Pectatelyase có pH tối ưu từ 8-9,5; Khi hoạt động cần sự hoạt hoá của ion  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 2.6.3. Các yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính của enzyme pectinase

(a) Ảnh hưởng của thành phần hóa học của nguyên liệu

✓ Ảnh hưởng của chất lượng của pectin

Chất lượng pectin ảnh hưởng nhiều đến sự tạo nhớt và khả năng thủy phân của enzyme. Pectin có độ ester hoá càng cao hiệu quả tác dụng của polygalacturonase càng thấp. Đã có những số liệu chứng tỏ acid pectic bị phân giải nhanh gấp 17 lần so với pectin đã ester hoá một phần và pectin đã este hoá hoàn toàn.

✓ Ảnh hưởng của đường và acid

Đường và acid trong quả tạo với pectin thành các gel, làm độ nhớt của pectin tăng lên nhiều, nhưng trong lĩnh vực nước quả ít có nghiên cứu về vấn đề này. Độ nhớt tạo nên chỉ do đường và acid với nồng độ thường gặp trong quả, không đáng kể so

với độ nhớt của dung dịch pectin, vì vậy không thể đóng vai trò quyết định tạo nên độ nhớt quả. Chỉ có một số acid có tác dụng ức chế, chẳng hạn acid malic có tác dụng ức chế mạnh đối với enzyme polygalacturonase.

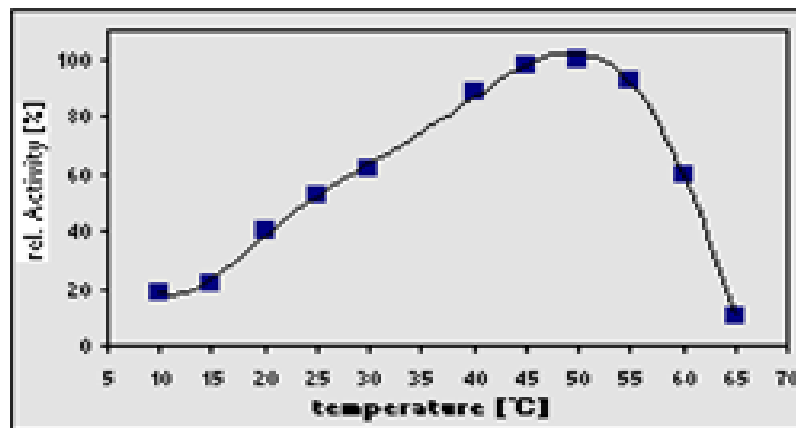
✓ Ảnh hưởng của chất chất

Tác dụng ức chế của các chất chất đối với các enzyme PE và PG đã được một số tài liệu đề cập đến. *Willamans (1995)* đã tách từ nước táo trước và sau khi oxy hoá, các hợp chất phenol khác nhau và nghiên cứu tính chất ức chế của chúng tới enzyme polygalacturonase. Tác dụng ức chế mạnh nhất biểu hiện với lencoantoxian oxy hóa và catesin oxy hóa, tác dụng yếu hơn là tanin với khối lượng phân tử lớn. Đã có các chứng minh tính chất ức chế của tanin trong nước lê và nước táo tới enzyme polygalacturonase. Các biện pháp khắc phục tác dụng xấu của tanin có tầm quan trọng để sử dụng có hiệu quả các chế phẩm từ enzyme pectinase trong sản xuất nước quả từ các loại quả có chứa một lượng lớn chất chất.

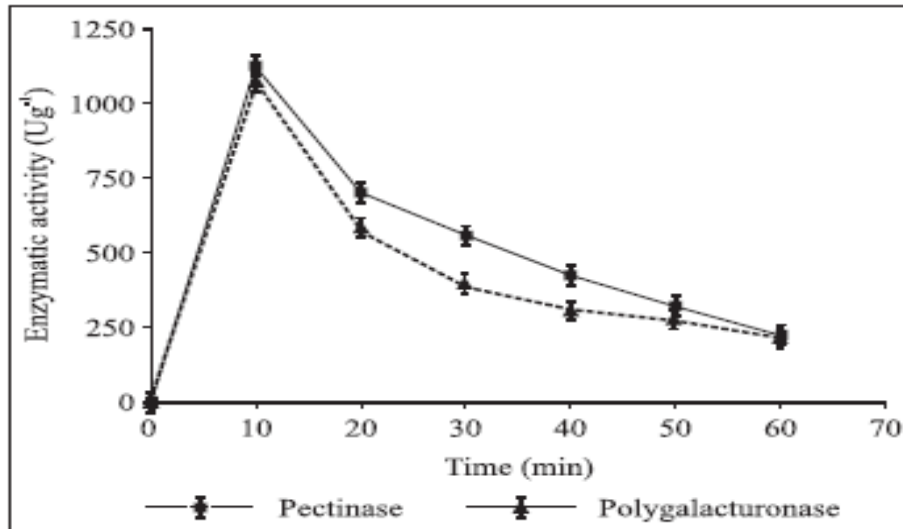
✓ Ảnh hưởng của thành phần khoáng và pH của nước quả

Theo nhiều tác giả các ion  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  có ảnh hưởng tới hiệu quả tác dụng của enzyme pectinase. Người ta thừa nhận rằng muối  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  gia tăng hoạt tính của enzyme còn các ion  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  và  $Cu^{2+}$  là nhân tố ức chế enzyme pectinase. Đã xác định rằng  $KCl$ ,  $HCl$ ,  $HgCl$ ,  $H_2O_2$  không có tác dụng đối với hoạt tính của enzyme pectinase trong cam. Acid ascorbic,  $NaHSO_3$  với nồng độ thấp, gia tăng hoạt độ của enzyme (*Kretovits, 1982*).

(b) Ảnh hưởng của nhiệt độ



Hình 11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme pectinase thu nhận từ thực vật



**Hình 12.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme pectinase thu nhận từ nấm mốc

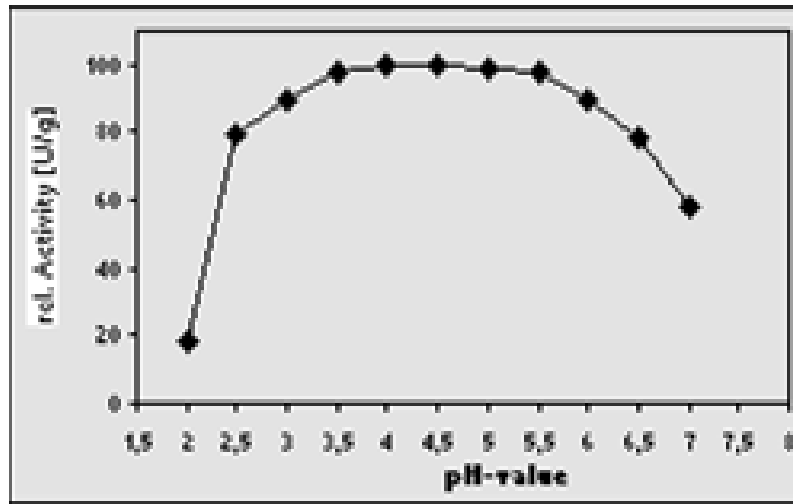
Giống như phản ứng hoá học, nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến phản ứng enzyme. Tốc độ phản ứng của enzyme không phải lúc nào cũng tỉ lệ thuận với nhiệt độ phản ứng. Tốc độ phản ứng chỉ tăng đến một nhiệt độ nhất định. Vượt quá nhiệt độ đó, tốc độ phản ứng của enzyme sẽ giảm và dẫn đến mức triệt tiêu. Nếu đưa nhiệt độ cao hơn mức nhiệt độ tối ưu, hoạt tính enzyme bị giảm. Khi đó enzyme không có khả năng phục hồi lại hoạt tính. Thông thường enzyme pectinase bị mất hoạt tính ở nhiệt độ trên 70<sup>0</sup>C.

Nhiệt độ ứng với vận tốc cực đại gọi là nhiệt độ tối thích. Nhiệt độ tối thích của enzyme pectinase trong khoảng 40 đến 50<sup>0</sup>C.

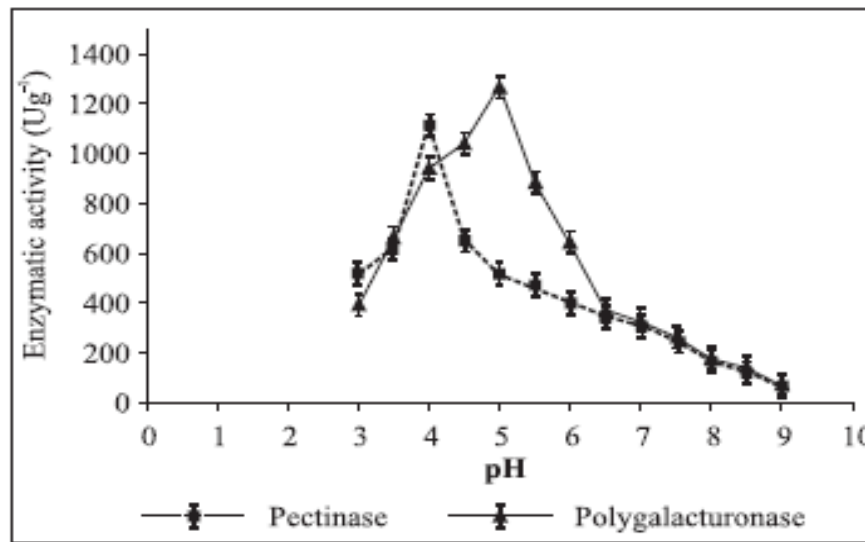
(c) Ảnh hưởng của nồng độ enzyme

Nồng độ enzyme càng lớn bao nhiêu thì lượng cơ chất bị biến đổi càng nhiều bấy nhiêu. Tuy nhiên nên lựa chọn nồng độ enzyme ở mức tối thiểu mà bảo đảm được những biến đổi cần thiết.

(d) Ảnh hưởng của pH



Hình 13. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzyme pectinase thu nhận từ thực vật



Hình 14. Ảnh hưởng của pH đến hoạt động của enzyme pectinase thu nhận từ nấm mốc

Các enzyme từ các nguồn khác nhau thì có pH tối thích khác nhau. Pectinesterase có nguồn gốc thực vật tác dụng mạnh trong pH từ 6,5 đến 9,5; pectinesterase của nấm mốc có khoảng pH tối thích 4,0-5,2, còn pectinesterase của vi khuẩn hoạt động mạnh nhất ở pH từ 7 đến 9, pH tối thích của enzyme không cố định, có thể thay đổi theo nguồn gốc. (Tú và ctv, 1982; Beldman, 2002).

2.6.4. Ứng dụng của enzyme pectinase trong sản xuất rượu

(a) Làm tăng hiệu suất trích ly

Sử dụng enzyme pectinase nhằm phá vỡ thành tế bào thực vật: Tế bào thực vật được cấu tạo bằng vỏ tế bào (thành tế bào). Vỏ tế bào như một lớp thành bảo vệ rất hữu hiệu và tạo hình cho tế bào. Ở vỏ tế bào thực vật có nhiều chất pectin, các chất pectin được xem như chất ciment gắn các tế bào với nhau. Phá vỡ sự gắn kết này sẽ tạo điều kiện cho các vật chất có trong tế bào thoát khỏi tế bào. Các chế phẩm enzyme có chứa không chỉ pectinase mà còn chứa các enzyme trong nhóm cellulases. Các loại enzyme này sẽ làm phá vỡ thành tế bào và giúp quá trình thu nhận dịch tế bào tốt hơn (Lê Ngọc Tú, 1977).

(b) Làm trong nước quả

Nước quả sau khi được tách khỏi tế bào thường chứa nhiều chất khác nhau. Trong đó chất pectin chiếm lượng đáng kể và pectin thường gây hiện tượng độ nhớt cao và gây đục nước quả.

Pectin chứa acid polygalacturonic, araban và galactan. Trong đó lượng acid polygalacturonic chiếm tới 40-60%. Khi bị thủy phân, pectin tách thành hai phần:

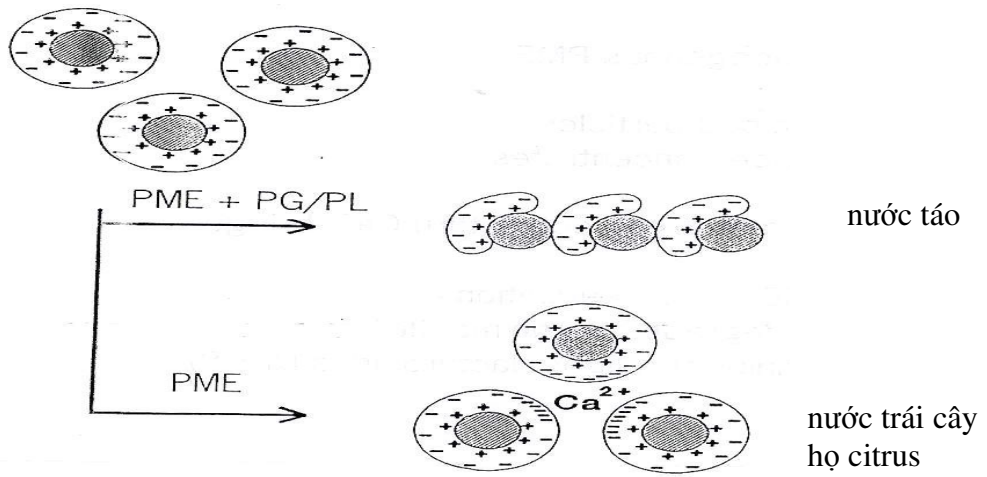
- Phần trung tính-phức chất galactanoaraban.
- Phần acid-acid pectic.

Trong tế bào tương, pectin nằm ở dạng hòa tan. Trong màng tế bào và gian bào, chúng nằm ở dạng không hòa tan gọi là protopectin. Protopectin ở màng gian bào có chứa lượng kim loại khá cao và một lượng nhóm methoxyl đủ để làm protopectin bền vững. Còn protopectin ở màng tế bào chứa một lượng kim loại không nhiều, có độ metocyl hóa cao. Vì thế tế bào thực vật có khả năng trương nở tốt.

Enzyme phân giải pectin ở gian bào sẽ làm các tế bào khó liên kết với nhau và thịt quả dễ dàng bị mềm ra. Pectin thường có mối liên kết hydro và liên kết nguyên tử yếu hơn so với cellulose. Tham gia phân hủy pectin gồm nhiều loại enzyme (Lê Ngọc Tú, 1977).



Cơ chế tác dụng làm trong :



Hình 15. Cơ chế làm trong của enzyme pectinase

### 2.6.5. Giới thiệu chế phẩm enzyme trong thương mại

#### (a) Đặc điểm:

Trong mỗi chế phẩm pectinase, ngoài các enzyme pectinase là chủ yếu còn có các enzyme hemicellulase, cellulase, protease.

Các enzyme tham gia trong chế phẩm pectinase phụ thuộc vào vai trò của chúng trong quá trình công nghệ mà được chia thành các nhóm:

- ✓ Enzyme quyết định hiệu quả tác dụng của chế phẩm.
- ✓ Enzyme có mặt trong chế phẩm cũng tốt nhưng không bắt buộc.
- ✓ Enzyme không cần thiết nhưng có thể cho phép có mặt ở một lượng không đáng kể trong chế phẩm.

Căn cứ vào đặc điểm của nguyên liệu mà lựa chọn chế phẩm enzyme thích hợp.

**Bảng 5. Một số chế phẩm thương mại**

Tên thương mại	Nơi sản xuất	Quốc gia
Panzyme	Ch.Boehringer Sohn	Ingelheim, West Germany
Ultrazym	Ciba-Geigy, A.G	Basel, Switzerland
Pectolase	Grinsteelvaeket	Aarhus, Denmark
Selase	Kikkoman Shoyu, Co	Tokyo, Japan
Pectinex	Schweizerische Ferment	Basel, Switzerland
Rapidase, Calarizyme	A.G	Seclin, France
Kleryme	Societe Rapidase, S.A	Desplaines, USA
Pectinol, Rohament	Rohm, Gmbh	Darmstadt, West Germany

(Kashyap và ctv,2002)

#### (b) Enzyme pectinase sử dụng trong nghiên cứu (pectinex)

Pectinex là chế phẩm công ty NOVO NORDISK FERMENT A.G, là enzyme pectolytic, còn có tên là Novoferm 14, có nguồn gốc từ nấm mốc *Aspergillus aculeatus*.

Pectinex Ultra SP-1 ở dạng dung dịch lỏng, có màu nâu và mùi nhẹ của sản phẩm lên men. Enzyme này hoạt động ở khoảng pH 4,5.

Khi tồn trữ enzyme này ở nhiệt độ 20<sup>0</sup>C có thể bảo quản hoạt tính enzyme trong thời gian 3 tháng. Tuy nhiên, nếu thời gian tồn trữ dài hơn thì khả năng hoạt động giảm từ 1-2% mỗi tháng. Và khi bảo quản ở nhiệt độ từ 0-10<sup>0</sup>C thì thời gian tồn trữ tối thiểu là 1 năm.

### 2.6.6. Một số ứng dụng của enzyme Pectinase

#### (a) Trong sản xuất nước quả

Có các mặt hàng nước quả trong, nước quả đục, nước quả có thịt quả, tất cả đều được sản xuất bằng nước ép (chiết rút) của quả. Do đó hiệu suất thu dịch quả phụ thuộc vào tính chất nguyên liệu quả (độ chín, cấu tạo, thành phần định tính và định lượng pectin trong quả, phương pháp ép, chiết rút).

Khi chế biến nước quả trong thì chế phẩm pectinase phải có endo và exo polygalacturonase (endo PG-II và exo PG-IV). Enzyme Pectinesterase và proteinase. Hai loại enzyme đều là giảm độ nhớt của dịch quả, còn PE góp phần vào tác dụng của enzyme này, còn proteinase thủy phân vỏ quả protein của thực vật làm cho dịch quả dễ thoát ra, cặn và bã dễ lắng hơn. Với các loại quả nhiều protopectin như táo, lê, ổi thì chế phẩm không được phép chứa protopetinase vì nếu có sẽ thủy phân protopectin làm mềm hóa mô quả, tăng độ nhớt của dịch quả nên làm giảm hiệu suất lấy nước quả trong. Ngoài ra nước quả không được phép chứa các enzyme oxy hóa (ascorbatoxydase, polyphenoloxydase, peroxydase) làm tổn hao vitamin C và sẫm màu, biện pháp sử dụng nhiệt hoặc đun nóng sẽ vô hiệu hóa enzyme này.

Để thu được nước quả với hiệu suất cao người ta thường nghiền thịt quả, xử lý bằng enzyme pectinase, sau đó mới đem vắt, ly tâm hay ép. Chẳng hạn xử lý táo nghiền bằng 0,03% chế phẩm pectinase (200 đơn vị hoạt độ) PMG (gram) sau 2-4 giờ sẽ tăng hiệu suất thu dịch quả từ 20-25%. Khi ép nho mà không sử dụng chế phẩm pectinase thì hiệu suất ép là 65% nhưng nếu nghiền quả và xử lý 0,02% pectinase trong 3 giờ ở 45<sup>0</sup>C sẽ nâng hiệu suất ép lên cao 77-82% (Nguyễn Trọng Căn, 1998).

Dùng pectinase còn có tác dụng làm trong do sự phá hủy hệ keo trong nước quả, vị của quả tốt hơn và ít bị đục trở lại.

#### (b) Trong y học

Các dược liệu có nguồn gốc thực vật trong thực phẩm ngoài các hoạt chất thì luôn có pectin. Từ trước đến nay để thu được các thành phần hoạt chất trong dược liệu (để trị các bệnh cấp thời ngay lúc đó), để điều chế dạng cồn (rượu), thuốc (uống và xoa bóp), để điều chế dung dịch thuốc tiêm và dịch truyền từ các vị thuốc đông y các thực phẩm chức năng (functional food), người ta dùng các phương pháp chiết rút bằng nước nhiệt (còn gọi là sắc thuốc và đây là phương pháp phổ biến nhất), bằng cồn (ngâm rượu thuốc), trích ly bằng dung môi thích hợp (axeton lạnh). Do có thành phần pectin nên quá trình sắc thuốc khó khăn, không trích ly được triệt để hoạt chất sau một thời gian ngắn.

Để khắc phục được những khó khăn này, người ta dùng chế phẩm enzyme pectinase để phân giải các mô thực vật, để các hoạt chất được giải phóng ra dễ dàng và triệt để hơn khi sắc thuốc. Tuy nhiên, vì sử dụng cho mục đích sản xuất thuốc và chữa bệnh nên khi dùng chế phẩm enzyme phải có độ tinh khiết rất cao để không mang theo những hoạt chất lạ vào thuốc, phải có hoạt tính cao để chỉ dùng với một lượng tối thiểu (Nguyễn Trọng Cần, 1998).

(c) Trong chăn nuôi

Khẩu phần ăn gia súc, gia cầm thường chứa một lượng thức ăn thô, thức ăn xanh nhất định (rơm rạ, cỏ, thân cây, cam,...) trong khi đó đường tiêu hóa của chúng lại thiếu các enzyme phân giải cellulose, hemicellulose, pectin. Chỉ có những động vật nhai lại có dạ cỏ phát triển đầy đủ (trên 6 tháng tuổi) hay gia cầm có manh tràng dài (ngỗng, đà điểu) mới có hệ vi sinh vật sống cộng sinh trong dạ cỏ là có khả năng sinh ra các hệ enzyme để giúp động vật tiêu hóa một phần các chất dinh dưỡng này, tuy vậy khoảng 1/3 nhóm chất này không được đồng hóa. Để nâng cao khả năng tiêu hóa hấp thụ, người ta có thể thêm vào thức ăn chăn nuôi các chế phẩm enzyme có hoạt tính pectinase, cellulase và hemicellulase cao. Đối với các động vật nhai lại (trâu, bò, dê, cừu,...) do có hệ vi sinh vật sống trong dạ cỏ tham gia tích cực vào quá trình tiêu hóa thức ăn. Khi thêm chế phẩm enzyme Pectinase và cellulase ở độ pH 6-7 sẽ có lợi làm tăng độ tiêu hao của thức ăn. Đối với ngỗng và ngang (vịt, xiêm): đây là 2 loài gia cầm nuôi lấy thịt, đặc biệt là có loài sản xuất ra gan béo (gan nguyên liệu để sản xuất ra mặt hàng patê gan rất nổi tiếng). Hai loài này có năng lực sinh trưởng rất cao và thời gian ngắn (ở độ tuổi gia cầm non tuổi có giá trị thương phẩm cao). Muốn như vậy người ta nuôi vỗ béo bằng cách nhồi thức ăn có sử dụng pectawamori 0,04% so với khẩu phần (Nguyễn Trọng Cần, 1998).

### **Chương III. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **3.1. Phương tiện**

##### *3.1.1. Địa điểm nghiên cứu*

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Công Nghệ Thực Phẩm, Khoa Nông Nghiệp – Sinh Học Ứng Dụng, Trường Đại Học Cần Thơ.

##### *3.1.2. Thời gian thực hiện*

- Đề tài được thực hiện từ ngày 26/2 đến 25/5/2007.

##### *3.1.3. Thiết bị và dụng cụ*

- pH kế
- Bếp điện
- Máy xay sinh tố
- Cân phân tích
- Khúc xạ kế
- Thiết bị chưng cất rượu
- Cồn kế
- Các bình lên men
- Máy so màu UV – VIS

##### *3.1.4. Nguyên liệu*

- Mít nghệ
- Đường saccharose
- Nấm men thuần *Saccharomyces cerevisiae*
- Các chế phẩm enzyme thương mại : *Novo Glucomylase* và *Polygalacturonase*

##### *3.1.5. Hóa chất*

Các hóa chất cần thiết dùng để phân tích: đường tổng, furfural, aldehyde, ester, acid toàn phần như: NaOH 0,1N, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, phenolphtalein, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,....

#### **3.2. Phương pháp nghiên cứu**

##### *3.2.1. Phân tích thành phần nguyên liệu*

- Mục đích: phân tích thành phần hóa học của nguyên liệu làm cơ sở để xây dựng phương pháp chế biến các thí nghiệm tiếp theo.

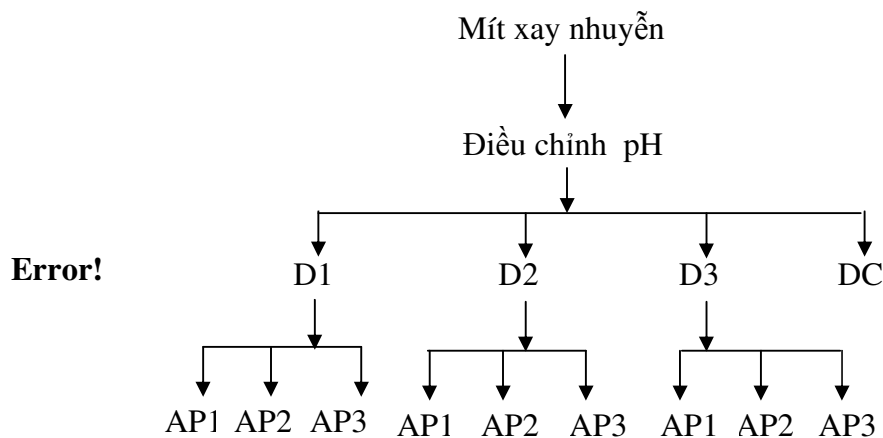
– Chỉ tiêu cần phân tích:

- Ẩm độ: xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy khô ở nhiệt độ 105<sup>0</sup>C đến khối lượng không đổi
- Acid toàn phần: xác định bằng phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,1N
- Đường tổng số: định lượng bằng phương pháp Bertrand
- pH: sử dụng máy đo pH
- Hàm lượng chất khô hòa tan: chiết quang kế

3.2.2. *Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng bổ sung chế phẩm enzyme glucoamylase và polygalactorunase đến độ trong của dịch đường hoá.*

– Mục đích: Xem độ trong của dịch đường hoá sau khi bổ sung enzyme và hàm lượng methanol sinh ra trong rượu thành phẩm.

– Sơ đồ bố trí thí nghiệm:



D: pH của nguyên liệu

pH=3,5; pH=4,0; pH=4,5

A tỉ lệ enzyme glucoamylase tối ưu

P tỉ lệ enzyme polygalactorunase

P=0,02%; P=0,04%; P=0,06%

DC: mẫu đối chứng không chứa enzyme

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại.

– Phương pháp thí nghiệm:

Mỗi mẫu cân 350g thịt mít xay nhuyễn, bổ sung enzyme glucoamylase ở tỉ lệ tối ưu thích hợp (0,4%). Sau đó cho enzyme pectinase vào ở 3 tỉ lệ khác nhau và cho thủy phân ở 65<sup>0</sup>C trong thời gian một giờ đã được xác định ở các thí nghiệm trước.

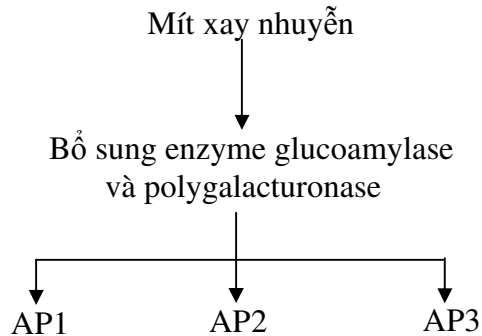
Sau khi thủy phân xong tiến hành đem lọc trong dịch thủy phân và đem đo dịch lọc trên máy so màu.

– Chỉ tiêu theo dõi:

Độ trong của dịch thủy phân được xác định bằng cách đo độ hấp thụ của dịch lọc với bước sóng 316 nm, lấy kết quả so sánh với mẫu đối chứng.

3.2.3. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của glucoamylase và tỉ lệ enzyme polygalacturonase đến hàm lượng methanol sinh ra trong rượu thành phẩm.

– Sơ đồ thí nghiệm:



A tỉ lệ enzyme glucoamylase tối ưu

P nồng độ enzyme pectinase

P=0,02%; P=0,04%; P=0,06%

Mẫu đối chứng không chứa enzyme

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 lần lặp lại

– Phương pháp thí nghiệm

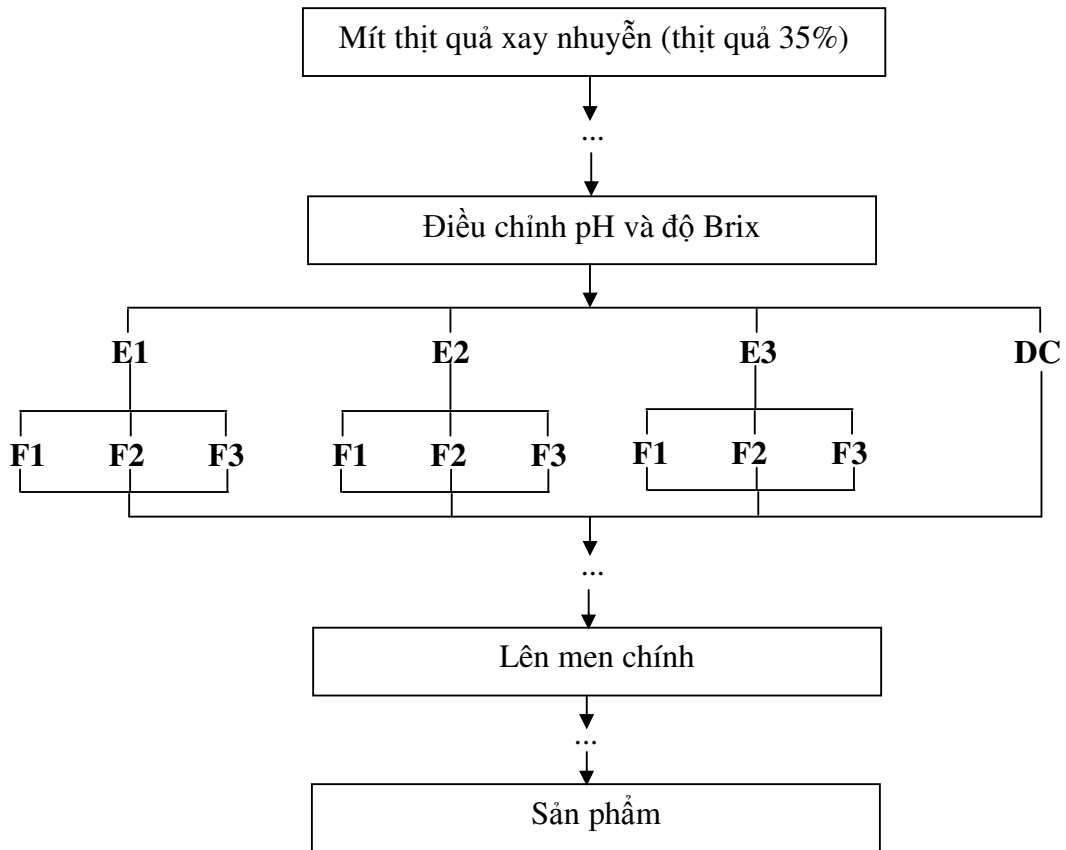
Mỗi mẫu cân 350g thịt mít xay nhuyễn, nhiệt độ tối ưu và bổ sung enzyme amylase ở nồng độ tối ưu thích hợp. Sau đó cho enzyme pectinase vào ở 3 nồng độ khác nhau và cho thủy phân ở 60<sup>0</sup>C trong thời gian một giờ. Sau khi thủy phân xong thì bổ sung nước đường, điều chỉnh độ Brix 25 và pH 4,5. Sau khi cấy chủng nấm men vào, khuấy đều và đậy kín nắp lại. Quan sát quá trình lên men khoảng 8-9 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau đó tiến hành lọc thô rồi đem lên men phụ khoảng 20 ngày.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Hàm lượng methanol.

3.2.4. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và pH ban đầu đến quá trình lên men.

- Mục đích: tìm được phương pháp tối ưu thuận lợi cho quá trình lên men và thu được thành phẩm đạt chất lượng cao.
- Sơ đồ bố trí thí nghiệm:



Thí nghiệm được tiến hành ngẫu nhiên với 2 nhân tố, 1 lần lặp lại

Nhân tố E: giá trị Brix (3 mức độ)

E1 = 21<sup>0</sup>Brix; E2 = 23<sup>0</sup>Brix; E3 = 25<sup>0</sup>Brix

Nhân tố F: giá trị pH (3 mức độ)

F1 = 3,8; F2 = 4,0; F3 = 4,5

DC là mẫu đối chứng không có bổ sung enzyme



- Phương pháp tiến hành:
  - Chọn nguyên liệu: mít được mua ở phường Long Xuyên-quận Bình Thủy-TPCT, chọn múi chín – vàng – thơm;
  - Dem rửa sạch, rồi xay nhuyễn với tỉ lệ thịt quả 35%
  - Bổ sung enzyme: glucoamylase và polygalacturonase với nồng độ tối ưu đã được xác định ở các thí nghiệm trước
  - Tiến hành thủy phân với điều kiện nhiệt độ, pH và thời gian được xác định ở thí nghiệm trước
  - Sau khi thủy phân tiến hành lọc, sau đó mỗi mẫu lấy 3500g dịch quả
  - Bổ sung nước đường, chỉnh nồng độ Brix ở 3 mức độ thí nghiệm
  - Chỉnh pH theo 3 mức độ thí nghiệm
  - Cấy nấm men giống tỉ lệ 0,04 %
  - Sau khi cấy chủng nấm men vào, khuấy đều và đậy kín nắp lại. Quan sát quá trình lên men khoảng 9 ngày ở nhiệt độ phòng. Ở giai đoạn này, hàng ngày ta tiến hành khảo sát một lần, mỗi lần khảo sát đồng thời 10 mẫu đến khi quá trình lên men chính kết thúc (không còn thấy bọt khí CO<sub>2</sub> xuất hiện di chuyển từ dưới lên bề mặt)
  - Kết thúc quá trình lên men chính ta tiến hành lọc thô bằng vải lọc, sau đó tiến hành lên men phụ 20 ngày
  - Tiến hành lọc lại và ổn định rượu.
- Chỉ tiêu theo dõi:
  - Hàm lượng ethanol sinh ra, xác định bằng phương pháp chưng cất rượu.
    - ✓ Chỉ tiêu cảm quan:
      - Độ trong
      - Màu sắc
      - Mùi vị
    - ✓ Phân tích các chỉ tiêu hóa học
      - Xác định nồng độ ethanol trong sản phẩm
      - Định tính furfurool
      - Hàm lượng đường tổng số

- Hàm lượng acid toàn phần
- Hàm lượng ester
- Hàm lượng aldehyde
- Hàm lượng methanol.

## Chương IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1. Thành phần nguyên liệu

- ❖ Thành phần chính của nguyên liệu như glucid, acid, đường, nước... ảnh hưởng đến quá trình lên men. Cần thiết phải xác định thành phần chính của nguyên liệu để bảo đảm tính ổn định giữa các thí nghiệm.
- ❖ Lựa chọn nguyên liệu mít chín tiến hành xử lý chỉ lấy phần thịt rồi đem đi phân tích hàm lượng đường, acid, độ ẩm.



Hình 16. Nguyên liệu trái mít và múi mít

Bảng 6. Thành phần hóa học của nguyên liệu

Chỉ tiêu	Giá trị
pH	5,33
Hàm lượng chất khô tổng số (%)	23,48
Độ ẩm (%)	66,25%
Hàm lượng đường tổng (%)	28,00
Hàm lượng acid tính theo acid acetic (mg/g)	1,95

Ghi chú: giá trị trong bảng là kết quả của 3 lần lặp lại

- ❖ Kết quả phân tích thành phần hóa học của nguyên liệu được thể hiện ở Bảng 6 pH của dịch quả tương tối cao trung bình khoảng 5,33. Giá trị pH cao như vậy sẽ hạn chế hoạt động của nấm men và là điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn phát triển, làm sản phẩm dễ hư hỏng. Do đó, phải điều chỉnh pH dịch quả để cho quá trình lên men diễn ra thuận lợi bằng cách bổ sung acid citric, vì thông thường khoảng pH thích hợp cho hoạt động của nấm men là 3,5 – 4,5.
- ❖ Mít nguyên liệu có hàm lượng chất khô hoà tan cao là điều kiện tốt cho quá trình lên men.

### 4.2.Thí nghiệm 1: Khảo sát khả năng bổ sung chế phẩm enzyme glucoamylase và polygalacturonase đến độ trong của dịch đường hoá

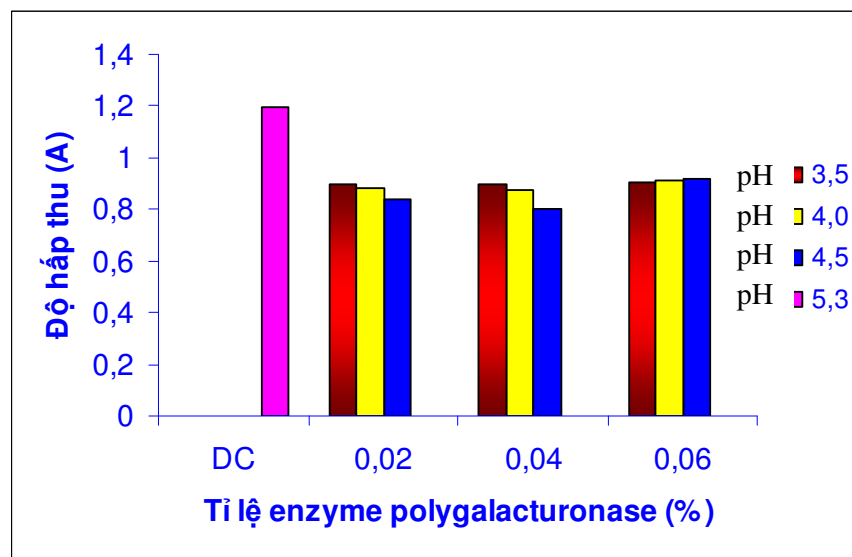
- ❖ Trong sản xuất rượu vang, độ trong có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng của sản phẩm tạo thành quyết định chất lượng cảm quan của sản phẩm. Có

thể làm trong rượu vang bằng nhiều phương pháp, sử dụng chế phẩm enzyme là một trong phương pháp tốt nhất. Chúng tôi khảo sát khả năng làm trong của enzyme ở giai đoạn kết thúc quá trình đường hóa.

**Bảng 7. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme polygalacturonase và pH đến độ trong của dịch đường hoá**

pH	Tỉ lệ enzyme polygalacturonase (%)			
	DC	0,02	0,04	0,06
3,5		0,896 <sup>cd</sup>	0,895 <sup>cd</sup>	0,906 <sup>cd</sup>
4,0	1,195 <sup>e</sup>	0,883 <sup>cd</sup>	0,872 <sup>bc</sup>	0,915 <sup>d</sup>
4,5		0,840 <sup>b</sup>	0,803 <sup>a</sup>	0,917 <sup>d</sup>

Ghi chú: giá trị trong bảng là kết quả của 2 lần lặp lại



**Hình 17. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme polygalacturonase và pH đến độ trong của dịch đường hoá**

Nhận xét:

- ✓ Độ hấp thụ (A) thể hiện khả năng hấp thụ ánh sáng của các chất có trong hỗn hợp, hay nói cách khác có hai yếu tố ảnh hưởng đến độ hấp thụ của hỗn hợp là các chất hấp thụ màu và các chất lơ lửng cản sáng. Kết quả ở **Bảng 7** và **hình 17** nhận thấy rằng độ hấp thụ của 4 mẫu khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ngay sau khi kết thúc quá trình đường hóa. Điều này được giải thích như sau

Tinh bột, pectin trong dịch quả và huyền phù nấm men là các tác nhân làm cho sản phẩm có độ đục khó được chấp nhận. Pectin hiện diện với vai trò là chất tạo keo đã làm cản trở quá trình lắng trong. Vì vậy, qua quá trình đường

hoá thì sản phẩm ở mẫu đối chứng có độ trong không tốt, mật độ quang khá cao (1,195).

Với mẫu có sử dụng enzyme amylase và pectinase thì độ hấp thụ thấp. Do enzyme amylase chuyển hoá tinh bột thành đường tác động một phần đến quá trình lắng trong sản phẩm còn pectinase đã phá vỡ các hệ keo và làm giảm độ nhớt của dịch quả ngay trong giai đoạn đường hóa, nên sản phẩm thu được có độ trong tương đối tốt.

- ✓ Theo kết quả từ **Bảng 7** có sự khác biệt có ý nghĩa về độ trong giữa các mẫu được xử lí ở các chế độ enzyme và pH khác nhau. Ở mẫu được xử lí ở tỉ lệ enzyme 0,04ml/100g ở pH 4,5 thì độ trong của dịch đường hoá là cao nhất.

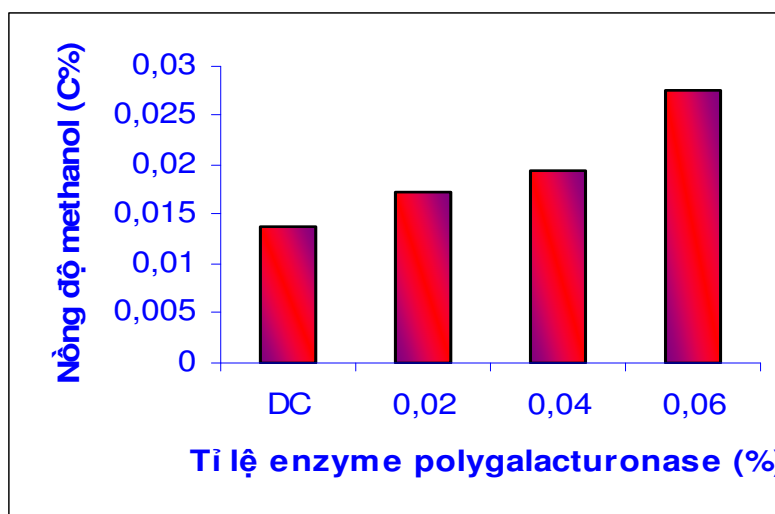
#### 4.3. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của enzyme glucoamylase và polygalacturonase đến hàm lượng methanol sinh ra trong rượu thành phẩm

Bên cạnh yếu tố tích cực là làm trong rượu thì enzyme pectinase có thể tạo methanol do chúng cắt đứt liên kết este tạo methanol trong rượu, nếu hỗn hợp rượu có hàm lượng methanol cao sẽ gây ngộ độc cho người tiêu dùng.

**Bảng 8.** Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra

Tỉ lệ enzyme polygalacturonase (%)	Nồng độ methanol sinh ra (C%)
DC	0,0138 <sup>a</sup>
0,02	0,0172 <sup>b</sup>
0,04	0,0194 <sup>c</sup>
0,06	0,0276 <sup>d</sup>

Ghi chú: giá trị trong bảng là kết quả của 2 lần lặp lại



**Hình 18.** Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra

Nhận xét:

Thống kê từ **Bảng 8** cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu được xử lí ở các chế độ enzyme khác nhau. Khi tăng nồng độ enzyme thì hàm lượng methanol sinh ra nhiều. Đến tỉ lệ enzyme polygalacturonase 0,06ml/100g thì hàm lượng methanol sinh ra cao nhất. Qua thí nghiệm cho thấy khi sử dụng chế phẩm enzyme polygalacturonase ở tỉ lệ càng thấp thì hàm lượng methanol sinh ra càng ít.

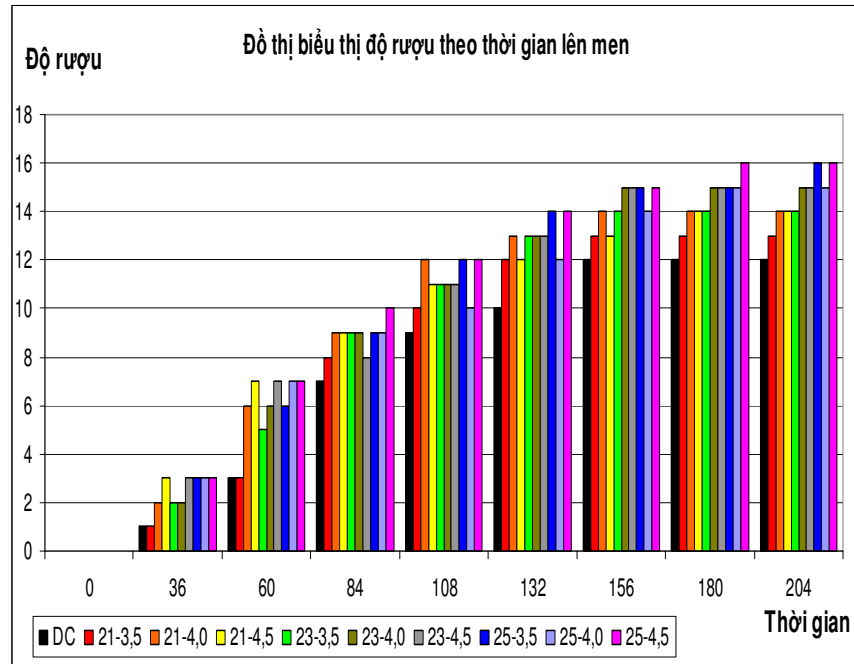
*4.4. Theo dõi ảnh hưởng của độ Brix và giá trị pH đến hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men vang mít.*

Trong quá trình lên men, nấm men sử dụng chất dinh dưỡng trong dịch lên men để tăng sinh khối và tạo ra rượu. Hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men là rất quan trọng. Nếu hàm lượng rượu sinh ra thấp thì trong quá trình lên men và trong thời gian bảo quản rượu sẽ dễ bị hư hỏng. Bởi vì khi hàm lượng rượu trong sản phẩm thấp thì không đủ để ức chế các loại vi khuẩn và nấm mốc gây hại. Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và giá trị pH đến hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men.

Kết quả thí nghiệm được ghi nhận trong **Bảng 9**

**Bảng 9. Sự thay đổi hàm lượng cồn theo thời gian lên men**

pH, Brix	Sự thay đổi độ cồn theo thời gian (giờ) lên men (% thể tích)								
	0	36	60	84	108	132	156	180	204
DC	0	1	3	7	9	10	12	12	12
21-3,5	0	1	3	8	10	12	13	13	13
21-4,0	0	2	6	9	12	13	14	14	14
21-4,5	0	3	7	9	11	12	13	14	14
23-3,5	0	2	5	9	11	13	14	14	14
23-4,0	0	2	6	9	11	13	15	15	15
23-4,5	0	3	7	8	11	13	15	15	15
25-3,5	0	3	6	9	12	14	15	15	15
25-4,0	0	3	7	9	10	12	14	15	15
25-4,5	0	3	7	10	12	14	15	16	16



Hình 19. Đồ thị biểu diễn sự thay đổi độ rượu theo thời gian lên men

Bảng 10. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến hàm lượng rượu sinh ra

Brix	pH			Trung bình (Brix)
	3,5	4,0	4,5	
21	8,111	9,333	9,222	8,889 <sup>c</sup>
23	9,111	9,556	9,667	9,444 <sup>b</sup>
25	9,889	9,444	10,333	9,889 <sup>a</sup>
<b>Trung bình (pH)</b>	9,037 <sup>b</sup>	9,444 <sup>a</sup>	9,741 <sup>a</sup>	

Bảng 11. Ảnh hưởng của độ Brix đến hàm lượng rượu sinh ra theo thời gian

pH	Số giờ lên men (giờ)								
	0	36	60	84	108	132	156	180	204
21	0	2,000	5,333	8,667	11,000	12,333	13,333	13,667	13,667
23	0	2,333	6,000	8,667	11,000	13,000	14,667	14,667	14,667
25	0	3,000	6,667	9,333	11,333	13,333	14,667	15,333	15,333
<b>Σ</b>	0	2,444 <sup>f</sup>	6,000 <sup>e</sup>	8,889 <sup>d</sup>	11,111 <sup>c</sup>	12,889 <sup>b</sup>	14,222 <sup>a</sup>	14,556 <sup>a</sup>	14,556 <sup>a</sup>

Bảng 12. Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng rượu sinh ra theo thời gian

giờ	pH								
	0	36	60	84	108	132	156	180	204
3,5	0	2,000	4,667	8,667	11,000	13,000	14,000	14,000	14,000
4,0	0	2,333	6,333	9,000	11,000	12,667	14,333	14,667	14,667
4,5	0	3,000	7,000	9,000	11,333	13,000	14,333	15,000	15,000
<b>Σ</b>	0	2,444 <sup>f</sup>	6,000 <sup>e</sup>	8,889 <sup>d</sup>	11,111 <sup>c</sup>	12,889 <sup>b</sup>	14,222 <sup>a</sup>	14,556 <sup>a</sup>	14,556 <sup>a</sup>

Các số liệu có cùng chữ cái đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ ý nghĩa 5 %.

- ✓ Theo kết quả thống kê trong **Bảng 10** ta có nhận định: Trong khoảng giá trị pH và độ Brix mà thí nghiệm khảo sát, pH và độ Brix có ảnh hưởng đến hàm lượng rượu sinh ra. Khi pH tăng thì hàm lượng rượu sinh ra tăng, khi xét về mặt ý nghĩa thống kê thì hàm lượng rượu sinh khi khảo sát lên men ở giá trị pH 4,0 và 4,5 không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.
- ✓ Đối với độ Brix, khi tăng giá trị hàm lượng chất khô hòa tan của dịch lên men thì hàm lượng rượu sinh ra tăng. Khi xét về mặt ý nghĩa thống kê thì hàm lượng rượu sinh ra khi khảo sát dịch lên men ở các giá trị độ Brix 21%; 23% và 25% có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.
- ✓ Theo kết quả thống kê trong các **Bảng 11** và **Bảng 12** ta nhận thấy hàm lượng rượu sinh ra tăng theo thời gian lên men. Dựa trên đồ thị trong **Hình 19** ta thấy hàm lượng rượu sinh ra tăng nhanh trong khoảng thời gian từ giờ lên men thứ 36 đến sau 132 giờ lên men và tốc độ lên men yếu dần từ giờ lên men thứ 156. Quá trình lên men chính kết thúc sau 204 giờ lên men.
- ✓ Trong các mẫu lên men, thì mẫu có hàm lượng rượu cao nhất sau khi lên men là mẫu lên men ở độ Brix 25% và pH 4,5 với độ rượu 16% thể tích. Và mẫu có hàm lượng cồn thấp nhất là mẫu DC với độ rượu chỉ đạt 12% thể tích.

**Bảng 13. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến chỉ tiêu đánh giá cảm quan về màu sắc và độ trong của các mẫu rượu thành phẩm**

Brix	pH	3,5	4,0	4,5	Trung bình (Brix)
	21		4,7	4,5	4,3
23		4,6	4,1	4,0	4,233 <sup>a</sup>
25		3,8	4,2	3,7	3,900 <sup>b</sup>
<b>Trung bình (pH)</b>		4,36667 <sup>a</sup>	4,26667 <sup>ab</sup>	4,0 <sup>b</sup>	





Hình 20. Các mẫu rượu thành phẩm

Bảng 14. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến chỉ tiêu đánh giá cảm quan về mùi của các mẫu rượu thành phẩm

Brix \ pH	3,5	4,0	4,5	Trung bình (Brix)
21	3,4	4,4	3,7	3,833 <sup>ns</sup>
23	4,0	3,5	3,8	3,767 <sup>ns</sup>
25	3,6	3,4	3,6	3,533 <sup>ns</sup>
<b>Trung bình (pH)</b>	3,667 <sup>ns</sup>	3,767 <sup>ns</sup>	3,700 <sup>ns</sup>	

Bảng 15. Ảnh hưởng của pH và độ Brix đến chỉ tiêu đánh giá cảm quan về vị của các mẫu rượu thành phẩm

Brix \ pH	3,5	4,0	4,5	Trung bình (Brix)
21	3,5	3,5	3,0	3,333 <sup>ns</sup>
23	3,9	3,1	2,9	3,300 <sup>ns</sup>
25	3,3	4,1	3,5	3,633 <sup>ns</sup>
<b>Trung bình (pH)</b>	3,567 <sup>a</sup>	3,567 <sup>a</sup>	3,133 <sup>b</sup>	

- ✓ Dựa theo số liệu phân tích thống kê của chỉ tiêu cảm quan về chỉ tiêu màu sắc và độ trong của sản phẩm trong **Bảng 13** ta thấy không có sự khác biệt ý nghĩa giữa các mẫu lên men ở pH: 3,5 và 4,0; 4,0 và 4,5. Các mẫu rượu lên men ở pH 3,5 có giá trị cảm quan về màu sắc tốt nhất.
- ✓ Theo số liệu thống kê của **Bảng 14**, các mẫu rượu khi đánh giá cảm quan về chỉ tiêu mùi thì không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.
- ✓ Theo số liệu phân tích thống kê của chỉ tiêu đánh giá cảm quan về chỉ tiêu vị, các mẫu rượu lên men ở pH 3,5 và 4,0 được ưa thích không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

**Bảng 16. Kết quả đánh giá cảm quan các chỉ tiêu của rượu vang mít chưa nhân thêm hệ số quan trọng**

Mẫu	Màu sắc-độ trong	Mùi	Vị
DC	2,1	3,2	2,4
21-3,5	4,7	3,4	3,5
21-4,0	4,5	4,4	3,5
21-4,5	4,3	3,7	3,0
23-3,5	4,6	4,0	3,9
23-4,0	4,1	3,5	3,1
23-4,5	4,0	3,8	2,9
25-3,5	3,8	3,6	3,3
25-4,0	4,2	3,4	4,1
25-4,5	3,7	3,6	3,5

**Bảng 17. Kết quả đánh giá cảm quan rượu vang mít theo tiêu chuẩn Việt Nam**

Mẫu	Màu sắc-độ trong	Mùi	Vị	Điểm chung
DC		2,56	4,32	9,82
21-3,5		2,72	6,30	15,60
21-4,0		3,52	6,30	16,12
21-4,5		2,96	5,40	14,38
23-3,5		3,20	7,02	16,66
23-4,0		2,80	5,58	14,12
23-4,5		3,04	5,22	13,86
25-3,5		2,88	5,94	14,14
25-4,0		2,72	7,38	15,98
25-4,5		2,88	6,30	14,36

Ghi chú: bảng điểm đánh giá cảm quan các chỉ tiêu đã nhân thêm hệ số quan trọng (hệ số quan trọng lần lượt của màu sắc-độ trong; mùi; vị là: 0,8; 1,4; 1,8)

- ✓ Dựa theo số liệu kết quả đánh giá cảm quan trong **Bảng 17** và cơ sở phân cấp chất lượng sản phẩm thực phẩm dựa trên điểm chung có trọng lượng của **Bảng 21** ta có nhận xét: các mẫu rượu được lên men ở điều kiện độ Brix-pH: 23-3,5 và 25-4,0 có mức điểm chung lớn hơn 15,2 và có điểm trung bình chưa nhân hệ số quan trọng của chỉ tiêu cảm quan vị lớn hơn 3,8. Do vậy chỉ có hai mẫu rượu được lên men ở điều kiện độ Brix-pH: 23-3,5 và 25-4,0 được xếp loại khá.

*Phân tích thành phần hóa học của sản phẩm*

- ✓ Trong đề tài “sử dụng các chế phẩm sinh học trong sản xuất rượu vang mít” này, chúng tôi sử dụng hai chế phẩm enzyme AMG 300L và chế phẩm enzyme Pectinex nhằm mục đích thủy phân tinh bột và phân cắt các phân tử pectin cải thiện màu sắc và độ trong cho sản phẩm. Vì vậy, trong sản phẩm

rượu vang mít có methanol, đây là một chất độc đối với cơ thể con người. Vì thế, để sản phẩm rượu vang mít được chấp nhận, chúng tôi tiến hành phân tích các thành phần hóa học có trong sản phẩm. Kết quả phân tích được ghi nhận trong **Bảng 18**

**Bảng 18. Phân tích thành phần hóa học của sản phẩm**

<b>Mẫu</b>	<b>Độ cồn %(V/V)</b>	<b>Đường tổng (số %)</b>	<b>Acid toàn phần (g/l)</b>	<b>Ester (g/l)</b>	<b>Aldehyde (g/l)</b>	<b>Methanol (g/l)</b>
<b>DC</b>	12	0,12	0,471	0,343	0,097	0,138
<b>21-3,5</b>	13	0,24	0,414	0,348	0,176	0,179
<b>21-4,0</b>	14	0,21	0,357	0,361	0,185	0,182
<b>21-4,5</b>	14	0,21	0,285	0,370	0,260	0,213
<b>23-3,5</b>	14	0,54	0,408	0,620	0,110	0,189
<b>23-4,0</b>	15	0,48	0,357	0,537	0,176	0,172
<b>23-4,5</b>	15	0,22	0,294	0,334	0,183	0,197
<b>25-3,5</b>	15	0,81	0,411	0,623	0,132	0,169
<b>25-4,0</b>	15	2,18	0,348	0,581	0,132	0,185
<b>25-4,5</b>	16	1,11	0,285	0,488	0,084	0,188

Theo kết quả phân tích trong Bảng và tiêu chuẩn Việt Nam về sản phẩm rượu vang chúng tôi nhận thấy:

- ✓ Hàm lượng methanol thấp hơn từ 10-15 lần so với giới hạn cho phép (3 g/l)
- ✓ Độ cồn trong sản phẩm từ 13-16% thể tích đáp ứng được yêu cầu chất lượng của rượu vang
- ✓ Hàm lượng acid tổng số (tính theo acid acetic) nằm trong khoảng giới hạn cho phép
- ✓ Hàm lượng đường tổng số trong sản phẩm còn rất ít vì vậy đảm bảo được yêu cầu bảo quản sản phẩm.

## **CHƯƠNG V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

### **5.1. Kết luận**

Qua quá trình thực hiện các thí nghiệm “sử dụng các chế phẩm sinh học trong sản xuất rượu vang mít” với hai chế phẩm enzyme AMG 300L và pectinex, chúng tôi rút ra kết luận sau:

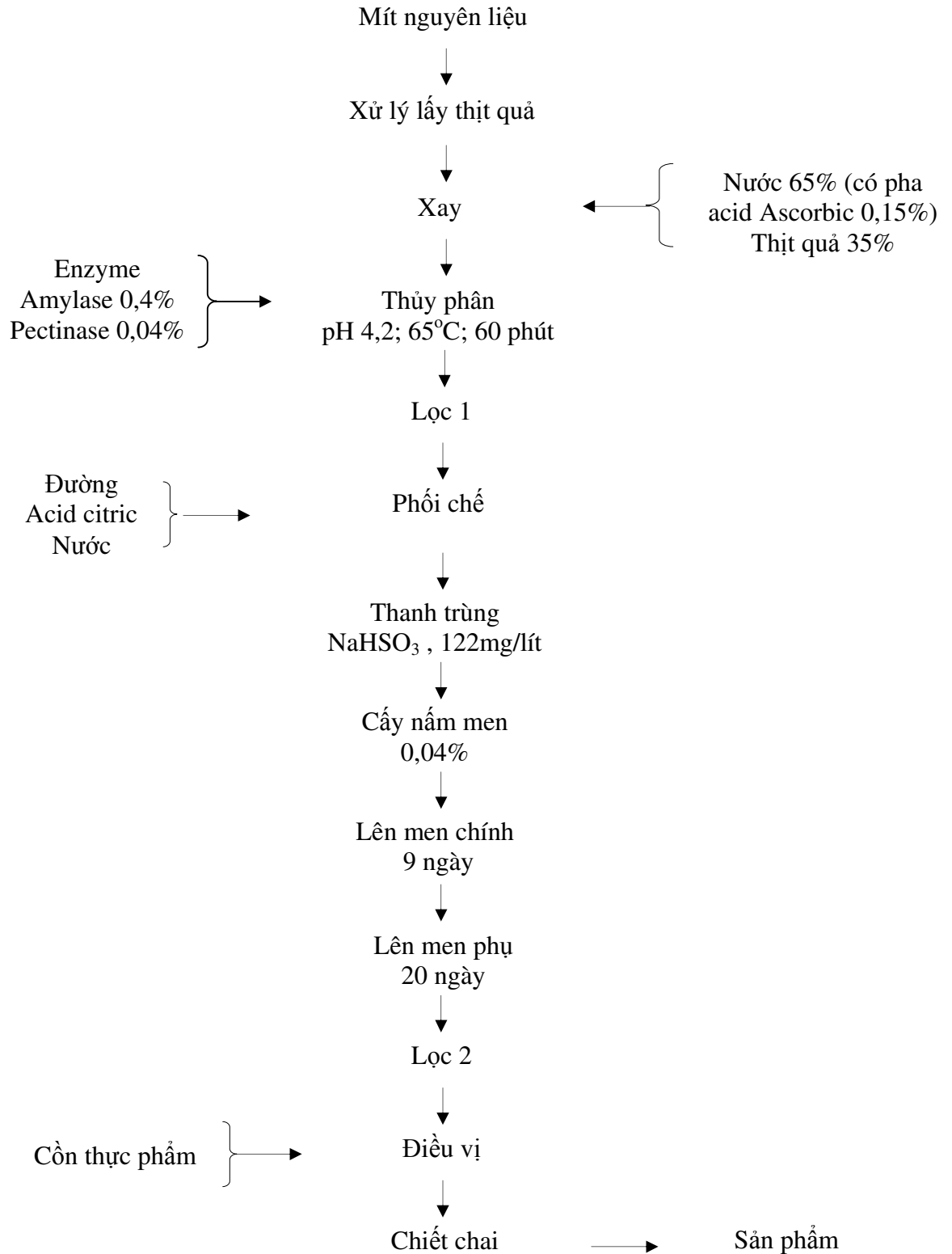
Các điều kiện thích hợp cho hoạt tính của enzyme trong quá trình đường hóa là: nhiệt độ 65°C; pH 4,2; nồng độ enzyme amylase là 0,4% và thời gian thủy phân là 60 phút

Để giúp cho quá trình lắng trong của rượu cần bổ sung enzyme Pectinase với nồng độ 0,04% trong quá trình đường hóa

Hàm lượng chất khô và pH của dịch lên men thích hợp là 23 độ Brix và pH 3,5

Thời gian kết thúc quá trình lên men chính là 9 ngày.

Từ kết quả thí nghiệm trên, quy trình sản xuất rượu vang mít được đề nghị:



## **5.2. Đề nghị**

Vì thời gian có hạn và điều kiện trang thiết bị còn hạn chế chúng tôi không thể khảo sát tất cả các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm mà chỉ khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm.

Trong điều kiện tốt hơn chúng tôi đề nghị dựa trên các thông số tối ưu đã tìm được tiếp tục khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất và chất lượng sản phẩm

- 1/ Khảo sát tỉ lệ nấm men ở các giá trị khác nhau
- 2/ Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men
- 3/ Nghiên cứu các quá trình biến đổi trong rượu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cần, Nguyễn Trọng, 1998, công nghệ enzyme, NXB Nông Nghiệp TPHCM.
2. Dũng, Nguyễn Lâm, 1987, Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập III- NXB khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
3. Tú, Lê Ngọc, 1977, hóa sinh công nghiệp NXB và THCN.
4. Tú, Lê Ngọc, 1982, enzyme vi sinh vật, tập I, II – NXBKH và kỹ thuật, Hà Nội.
5. Lượng, Nguyễn Đức, công nghệ enzyme, NXB ĐH Quốc Gia TPHCM.
6. Hậu, Vũ Công, sản xuất rượu vang trong gia đình, NXB Nông Nghiệp.
7. Hà, Nguyễn Công, 1999, giáo trình kỹ thuật lên men rượu, bia.ĐHCT.
8. Amerine, M.A, 1995, Technology of Wine making, Chapman and Hall.
9. Thương, Nguyễn Đình, 2001, công nghệ sản xuất cồn etylic, NXB khoa học và kỹ thuật.
10. Ngạch, Trần Xuân, công nghệ enzyme.
11. Hoa, Bùi Thị Huỳnh, 2001, Công Nghệ sản xuất rượu bia và nước giải khát.
12. Bình, Lý Nguyễn, phụ gia trong chế biến thực phẩm.
13. [http://www.biopract.de/images-prod\\_d\\_enzymePic020\\_gif.htm](http://www.biopract.de/images-prod_d_enzymePic020_gif.htm)
14. [http://www.adisseonorthamerica.com-rovabioguide-images-versatile\\_9\\_gif.htm](http://www.adisseonorthamerica.com-rovabioguide-images-versatile_9_gif.htm)
15. [http://www.biopract.de/images-prod\\_d\\_enzymePic019\\_gif.htm](http://www.biopract.de/images-prod_d_enzymePic019_gif.htm)
16. [http://www.scielo.br/img-revistas-bjm-v36n1-a13fig02\\_gif.htm](http://www.scielo.br/img-revistas-bjm-v36n1-a13fig02_gif.htm)
17. [http://www.novozymes.com/cn-images-biotime-Pectinase-1-030526\\_jpg.htm](http://www.novozymes.com/cn-images-biotime-Pectinase-1-030526_jpg.htm)



## **PHỤ LỤC**

### **Phụ lục 1: Các phương pháp phân tích**

*Phụ lục 1.1. Xác định hàm lượng chất khô hoà tan (<sup>o</sup>Brix)*

- Sử dụng chiết quang kế cầm tay

*Phụ lục 1.2. Xác định độ pH*

- Sử dụng pH kế cầm tay

*Phụ lục 1.3. Xác định thành phần nguyên liệu mít*

#### **❖ Xác định độ ẩm**

- Nguyên lý

Dùng nhiệt độ làm bay hơi nước tự do trong thực phẩm đến khối lượng không đổi. Cân trọng lượng trước và sau khi sấy khô từ đó tính phần trăm nước có trong thực phẩm.

- Dụng cụ

Tủ sấy có nhiệt độ điều chỉnh lớn hơn hoặc bằng 105 °C

Cân phân tích chính xác 0,0001g

Bình hút ẩm

Chén cân

- Cách tiến hành

Cân chính xác 3–5 g mẫu thử đã chuẩn bị sẵn, nghiền nhỏ và cho vào chén cân (chén cân đã sấy cùng nhiệt độ đến khối lượng không đổi và đã cân xác định khối lượng). Sau đó đặt cốc vào tủ sấy đã đạt nhiệt độ 105 °C và bắt đầu tính thời gian. Sau một giờ ta lấy cốc ra đặt vào bình hút ẩm và đem cân. Ta cứ tiến hành cân cho đến khi khối lượng cốc không đổi và ghi nhận số liệu.

*Tính kết quả*

$$\text{Âm độ ( \% )} = (m_1 - m_2) * 100 / (m_1 - m)$$

Trong đó:

m: khối lượng chén cân (g)

m<sub>1</sub>: khối lượng chén cân và mẫu trước khi sấy (g)

m<sub>2</sub>: khối lượng chén cân và mẫu sau khi sấy (g)

100: hệ số tính ra %

*Phụ lục 1.4. Phương pháp kiểm tra độ cồn*

– Nguyên lý

Muốn xác định ta phải chưng cất để tách rượu ra khỏi các chất hoà tan

– Dụng cụ

Bình định mức 50ml

Bình tam giác 500ml

Cồn kế

Ống đong

Bếp điện

– Tiến hành

Lấy 50 ml dung dịch rượu cho vào bình A có dung tích khoảng 500 ml, rồi cho tiếp thêm vào bình 150 ml nước cất. Sau đó nối bình với hệ thống chưng cất, và tiến hành đun bình A cho tới khi nước ngưng tụ ở bình định mức đủ 50 ml thì kết thúc quá trình chưng cất. Dịch thu được ở bình định mức được làm lạnh tới 20°C sau đó cho vào ống đong 50 ml và tiến hành đo nồng độ rượu.

Phương pháp đo: từ từ nhúng cồn kế vào, buông tay để thước nổi tự do và khi ổn định rồi đọc kết quả. Đọc 2 đến 3 lần để lấy kết quả trung bình. Khi đọc phải đặt mắt ngang tầm mức chất lỏng và không đọc ở phần lồi hoặc phần lõm.

*Phụ lục 1.5. Phân tích thành phần methanol*

– Rượu mẫu và rượu trắng chưa qua chưng cất

• Tiến hành chưng cất

• Đo độ cồn

• Điều chỉnh mẫu về độ cồn 12,5<sup>o</sup>. Nếu mẫu có độ cồn thấp thì thêm cồn tinh khiết để điều chỉnh về độ cồn 12,5<sup>o</sup>, nếu mẫu có độ cồn cao thì thêm nước cất để điều chỉnh về độ cồn 12,5<sup>o</sup>.

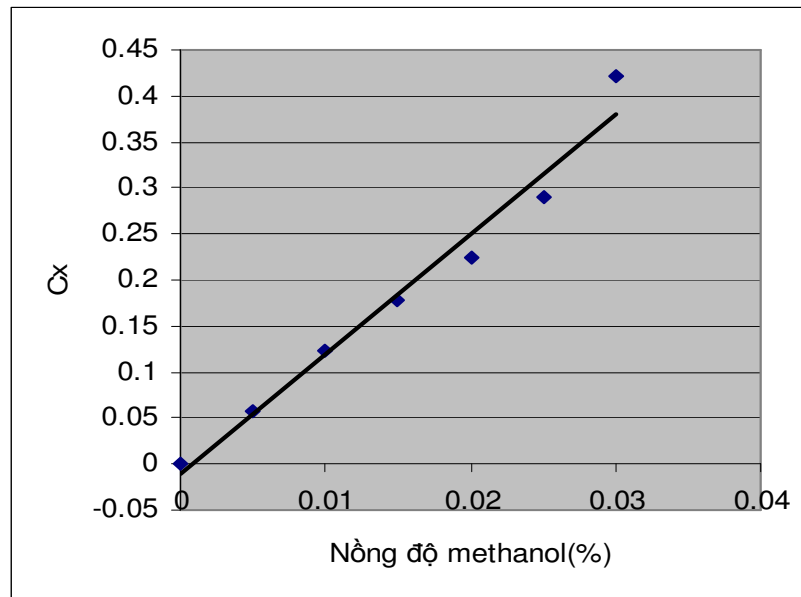
• Ghi nhận độ pha loãng

– Tiến hành so mẫu

– Cho vào 8 bình định mức dung tích 50ml, lần lượt như sau:

	Bình 1	Bình 2	Bình 3	Bình 4	Bình 5	Bình 6	Bình 7	Bình 8
Dung dịch KMnO <sub>4</sub>	2	2	2	2	2	2	2	2
Làm lạnh bằng nước đá có muối								
Côn 12,5 <sup>0</sup> không có anđehyde	1	0	0	0	0	0	0	0
Dung dịch methanol chuẩn								
0.005%	0	1	0	0	0	0	0	0
0.010%	0	0	1	0	0	0	0	0
0.015%	0	0	0	1	0	0	0	0
0.020%	0	0	0	0	1	0	0	0
0.025%	0	0	0	0	0	1	0	0
0.03%	0	0	0	0	0	0	1	0
Rượu thử điều chỉnh về 12,5 <sup>0</sup> cồn	0	0	0	0	0	0	0	1
Lắc đều và làm lạnh bằng nước đá có muối								
NaHSO <sub>3</sub> khan và lắc đều đến khi dung dịch mất màu hoàn toàn								
Acid crommotropic	1	1	1	1	1	1	1	1
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đặc (ml)	15	15	15	15	15	15	15	15
Lắc đều và đặt trong nước ấm (60 <sup>0</sup> -75 <sup>0</sup> ) trong 15 phút								
Đề nguội về nhiệt độ phòng thêm nước cất vừa đủ 50ml								

- Đem đo ngay trên máy UV-VIS ở bước sóng 575 nm
- Tính kết quả
- Vẽ đồ thị liên hệ giữa nồng độ và độ hấp thu đo được.



Phát hiện nồng độ % methanol trong mẫu rượu thử (Cx) ở 12,5<sup>0</sup> nhờ đồ thị chuẩn.

Nồng độ % methanol trong mẫu rượu được tính theo công thức sau:

$$C_A(\%) = C_x * n * R$$

Trong đó:

R: hệ số thu hồi sau cất mẫu (chỉ áp dụng đối với rượu chưa qua chưng cất)

n: độ pha loãng

$C_x$ : % methanol trong rượu thử 12,5<sup>0</sup>

Nồng độ % methanol trong rượu thử quy về độ cồn 1000 được tính theo công thức sau:

$$C(\%) = (C_A * 100)/12,5$$

Ví dụ: Dựa vào đồ thị tính được  $C_x = 0,01\%$

Độ thu hồi của quá trình chưng cất 87% nên  $R = 100/87 = 1,149$

Độ pha loãng  $n = 50/100 = 0,5$  (50 là số ml mẫu lúc đầu đem đo, 100 là sau khi điều chỉnh mẫu về độ cồn 12,5<sup>0</sup>).

$$C_A = 0,5 * 0,01 * 1,149 = 0,0057 (\%)$$

Nồng độ % methanol trong mẫu rượu thử quy về độ cồn 1000 được tính theo công thức sau:

$$C(\%) = (0,0057 * 100)/12,5 = 0,045$$

*Phụ lục 1.6. Cách pha hoá chất tiến hành xác định hàm lượng metanol*

– **Dung dịch kali pemanganat 3%**

Hoà tan 3g  $KMnO_4$  vào 15ml  $H_3PO_4$  đặc trong nước cất đến khi tan hoàn toàn, để về nhiệt độ phòng, thêm nước cất vào vừa đủ 100ml. Bảo quản trong lọ thủy tinh có nút mài.

– **Dung dịch acid cromotropic 5%**

- Hoà tan 5g acid cromotropic trong nước cất đến khi tan hoàn toàn, để về nhiệt độ phòng, vừa đủ 100ml bằng nước cất (chỉ pha khi dùng).

– **Dung dịch methanol chuẩn (chỉ pha khi dùng)**

- Hút chính xác 1ml methanol tinh khiết vào bình định mức dung tích 100ml và thêm cồn 12,5<sup>0</sup> không có aldehyde đến vạch định mức (được cồn methanol %)
- Cho vào 6 bình định mức dung tích 100ml lần lượt như sau:

	Bình 1	Bình 2	Bình 3	Bình 4	Bình 5	Bình 6
Cồn 12,5 <sup>0</sup> không có andehyt	2 phần 3 thể tích bình					
Cồn methanol 1% [ml]	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Cồn 12,5 <sup>0</sup> không có andehyde	Vừa đủ 100ml cho tất cả các bình					
Nồng độ cồn methanol 1% (ml)	0,005	0,010	0,015	0,020	0,025	0,030

– *Phương pháp chưng cất để lấy mẫu*

Lấy 100ml mẫu cho vào bình cầu có dung tích 300-500ml của dụng cụ cất và vài viên đá bọt. Tiến hành chưng cất với tốc độ đều cho đến khi bình hứng được

khoảng 70ml trong thời gian 40-60 phút. Để cồn bay hơi ra không bị mất, cho đầu ống sừng bò cắm vào trong 20ml nước cất và ống sinh hàn dài được làm lạnh bằng nước lạnh và đặt bình hứng trong chậu thuỷ tinh chứa hỗn hợp nước đá để làm lạnh. Để nguội về nhiệt độ phòng và thêm nước cho vừa đủ 100ml.

#### Bảng điều chỉnh nhiệt độ cồn

số mlcồn 99,8 cần thêm vào 100ml mẫu để qui về độ cồn 12,5<sup>0</sup>

<b>Độ cồn đo được</b>	12,0	11,5	10,0	9,5	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0
<b>Cồn 99,8 thêm vào</b>	0,6	1,1	1,7	2,3	2,9	3,4	4,0	4,6	5,2	5,7	6,3

#### Phụ lục 1.7. Xác định độ hấp thụ của sản phẩm

Phương pháp so màu chỉ là một phần của phương pháp quang phổ hấp thụ. Trong phương pháp này, nồng độ của hợp chất màu được xác định bằng cách đo cường độ màu của dung dịch chứa hợp chất màu. Cường độ màu của dung dịch có thể được xác định bằng cách đo cường độ ánh sáng hấp thụ bởi hợp chất màu có trong dung dịch.

Theo định luật *LAMBERT – BEER*, nếu ánh sáng đơn sắc xuyên qua một dung dịch màu thì cường độ ánh sáng hấp thụ sẽ phụ thuộc vào độ dài đường ánh sáng qua dung dịch và nồng độ của chất tan hấp thụ ánh sáng. Mối liên hệ này được biểu diễn bằng phương trình:

$$A = \log I_0/I = k \cdot c \cdot l$$

Trong đó

$I_0$ : cường độ của ánh sáng tới

$I$ : cường độ của ánh sáng đi ra

$K$ : hệ số hấp thụ phân tử, lít/mol.cm

$c$ : nồng độ dung dịch, mol/lít

$l$ : chiều dài của ánh sáng qua dung dịch, cm

$\log I_0/I$  được gọi là mật độ quang (OD: optical density) hay khả năng hấp thụ hoặc độ hấp thụ ( $A$ : absorbance)

$I_0/I$  được gọi là truyền quang ( $T$ : transmittance)

$T = I_0/I$  (%)

Các giá trị này được đọc trực tiếp từ máy đo quang phổ

Được đo bằng máy quang phổ

**Phụ lục 1.8. Xác định acid toàn phần của rượu****– Nguyên tắc**

Trong rượu vang chứa rất nhiều loại acid khác nhau, đều tạo thành trong quá trình lên men hoặc được sử dụng trong quá trình điều chỉnh pH của dịch lên men, nhưng chủ yếu là acid acetic. Vì thế, người ta thường biểu diễn độ acid trong rượu vang theo acid acetic.

**– Dụng cụ**

Ống sinh hàn

Ống đong

Bình tam giác

Pipet

Buret

**– Hóa chất**

NaOH 0,1N

Phenolphthalein 0,5%

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N

**Tiến hành thử**

Lấy 100ml rượu cho vào bình tam giác 250ml. Nối với hệ thống ống sinh hàn, đun sôi 15 phút để đuổi hết CO<sub>2</sub> rồi sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng, cho vào 3-4 giọt phenolphthalein rồi dung dịch NaOH 0,1N chuẩn đến màu hồng nhạt.

**Kết quả**

$$A_x = \frac{V * 6 * 1000}{v} \text{ (mg/l)}$$

Trong đó:

V số ml dung dịch NaOH 0,1N tiêu hao khi định phân

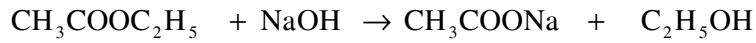
v số ml rượu lấy để chuẩn độ

6 số mg acid acetic tương ứng với 1ml NaOH 0,1N

1000 hệ số chuyển đổi thành lít

**Phụ lục 1.9. Xác định hàm lượng ester của rượu****– Nguyên tắc**

Sau khi xác định xong acid ta tiếp tục xác định hàm lượng ester trên cơ sở:



Xác định lượng NaOH đã tác dụng với ester ta suy ra được lượng ester trong rượu

– **Dụng cụ**

Ống sinh hàn

Ống đong

Bình tam giác

Pipet

Buret

– **Hóa chất**

NaOH 0,1N

Phenolphthalein 0,5%

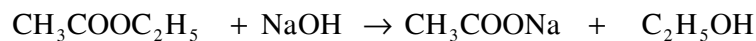
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N

– **Tiến hành thử**

Lấy 100ml rượu cho vào bình tam giác 250ml.

Trung hòa rượu bằng NaOH 0,1N (tiến hành giống như chuẩn acid)

Sau khi chuẩn acid xong ta thêm vào hỗn hợp 5ml NaOH 0,1N rồi nối bình tam giác với hệ thống ống sinh hàn và đun sôi trong 1 giờ để tạo điều kiện cho phản ứng:



Đun xong đem làm nguội đến nhiệt độ phòng, sau đó cho đúng 5ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N vào bình và lắc đều, tiếp đó chuẩn lại lượng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dư bằng dung dịch NaHO 0,1N tới xuất hiện màu hồng nhạt.

– **Kết quả**

Hàm lượng ester (tính theo ester của acid acetic) trong rượu được tính:

$$E = \frac{V * 8,8 * 1000}{v} \text{ (mg/l)}$$

Trong đó:

V: số ml dung dịch NaOH 0,1N tiêu hao khi định phân

v: số ml rượu lấy để chuẩn độ

8,8: số mg ester etylic tương ứng với 1ml NaOH 0,1N

1000: hệ số chuyển đổi thành lít

*Phụ lục 1.10. Xác định hàm lượng Furfurol ( $C_5H_4O_2$ )*

– **Nguyên tắc**

Nếu cồn chứa furfurol thì khi phản ứng với anilin trong môi trường acid có màu hồng- da cam. Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng furfurol.

– **Hóa chất**

Dung dịch HCl (d=1,19)

Anilin tinh khiết

– **Tiến hành**

Lấy ống nghiệm hoặc ống đong 25ml có nút nhám, dùng ống hút nhỏ 10 giọt anilin tinh khiết vào ống đong và 3 giọt HCl (d=1,19). Tiếp theo đó cho 10ml cồn rồi lắc đều và để yên. Nếu sau 10 phút hỗn hợp phản ứng vẫn không màu thì cồn được xem là đạt tiêu chuẩn, nếu xuất hiện màu hồng thì xem như cồn có chứa furfurol nghĩa là không đạt.

*Phụ lục 1.11. Xác định hàm lượng đường trong thực phẩm (phương pháp BERTRAND)*

– **Nguyên lý**

Dựa vào phản ứng của đường nghịch đảo khử Cu trong dung dịch Fehling thành  $Cu_2O$  (màu đỏ gạch)

Hoá chất xác định

NaOH 30%, 10%, 1N

$Pb(CH_3COO)_2$  30%

$Na_2SO_4$  bão hoà 30%

Metyl xanh 1% trong nước

Fehling A	CuSO <sub>4</sub> tinh thể	69,28g
	Nước cất đến	1000ml

Fehling A	Kalinatritartrate	346g
	NaOH	100g
	Nước cất đến	1000ml

Phenolphthalein 1% trong cồn



Định nghĩa là những hợp chất hữu cơ, trong phân tử có C, H, O, N kết hợp với nhau trong đó có nhiều nhóm aldehyde hay ceton tự do kết hợp với các nhóm chức khác saccharose, tinh bột.

– Tiến hành:

Thuỷ phân mẫu

Cân m gam mẫu phân tích

50 ml nước cất

5 ml HCl

✓ Thời gian thuỷ phân

Đường saccharose: 7 phút (2 phút nâng nhiệt, 5 phút giữ ở nhiệt độ  $68 \div 70^\circ\text{C}$ )

Tinh bột, dextrin: 3 giờ

Đường glucose: không thuỷ phân

Đường lactose: sôi 30 phút

Sau khi thuỷ phân làm lạnh ngay

Trung hoà bằng NaOH với nồng độ giảm dần 30%, 10%, 1N (dùng phenolphtalein làm chất chỉ thị)

Khử tạp chất bằng 7ml  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Để yên 5 phút đến khi thấy xuất hiện một lớp chất lỏng trong suốt bên trên lớp cặn thì coi như đã khử tạp chất xong.

Kết tủa muối  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  dư bằng  $18 \div 20$  ml  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  hoặc  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Lọc pha loãng khi sử dụng. Tùy hàm lượng đường trong thực phẩm mà ta có HSPL khác nhau. Ví dụ: hàm lượng đường 60% cân 1 gam pha loãng 2-3 lần.

Hút 5 ml dung dịch Fehling A + Fehling B + 15ml dung dịch lọc. Đem đốt trên bếp và chuẩn độ. Mỗi lần chuẩn 1ml dung dịch chuẩn đến màu đỏ gạch không còn ánh xanh. Thử lại bằng cách một giọt methyl xanh vào dung dịch đang sôi thấy mất màu xanh trở về màu đỏ gạch.

Đọc kết quả và tra bảng tính hàm lượng đường

ml dd đường đã sử dụng	mg đường nghịch chuyển	ml dd đường đã sử dụng	mg đường nghịch chuyển	ml dd đường đã sử dụng	mg đường nghịch chuyển	ml dd đường đã sử dụng	mg đường nghịch chuyển
15	336	24	213,3	33	156,06	42	124,2
16	316	25	204,8	34	152,2	43	121,4
17	298	26	197,4	35	147,09	44	118,7
18	282	27	190,4	36	143,9	45	116,1
19	267	28	183,7	37	140,2	46	113,7
20	254,5	29	177,6	38	136,6	47	111,4
21	242,9	30	171,7	39	133,3	48	109,2
22	231,8	31	166,3	40	130,1	49	107,1
23	222,2	32	161,2	41	127,1	50	105,1

– Công thức tính toán:

$$\text{Hàm lượng đường} = \frac{\text{Số tra bảng*HSPL*100}}{\text{Khối lượng mẫu*1000}} (\%)(\text{mg}/100\text{ml})$$

*Phụ lục 1.12. Xác định hàm lượng cồn etylic*

Để xác định hàm lượng cồn trong rượu etylic trong rượu ta dùng phương pháp chưng cất.

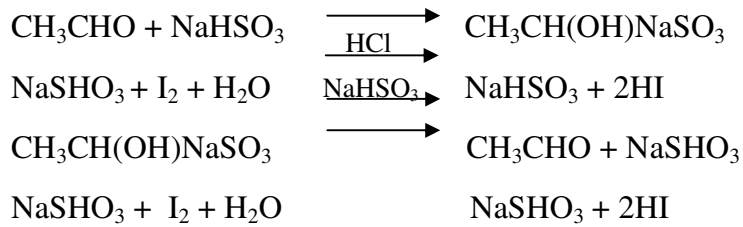
Cơ sở khoa học của quá trình chưng cất rượu là phân tách hỗn hợp chất lỏng có nhiệt độ sôi khác nhau (do vậy chúng cũng có nhiệt độ sôi khác nhau). Ở áp suất thường nhiệt độ của rượu là 78,3<sup>0</sup>C và nước là 100<sup>0</sup>C. Khi chưng cất rượu, rượu sẽ bốc hơi sớm và nhanh hơn nước, do vậy mà tách được rượu ra khỏi nước. (Đông Thị Thanh Thu, 1995).

Độ rượu được xác định bằng cách sử dụng cồn kế để đo.

*Phụ lục 1.13. Xác định hàm lượng aldehyde*

Trong cồn chứa chủ yếu aldehyt axetic. Để xác định ta có thể dùng nhiều phương pháp khác nhau. Ở đây giới thiệu xác định hàm lượng aldehyt theo phương pháp iod.

**Nguyên tắc**



– **Dụng cụ - hoá chất**

- Bình tam giác, ống đong, pipet, buret
- Dung dịch NaHSO<sub>3</sub> 1,2%
- Dung dịch NaHSO<sub>3</sub> 1N (42g/l)
- Dung dịch HCl 1N
- Dung dịch iod 0,1N và 0,01N
- Dung dịch tinh bột 0,5%

– **Tiến hành**

- Lấy 50ml rượu hoặc cồn đã pha loãng (≈50%), cho vào bình tam giác 250 ml. Sau đó thêm vào 25 ml NaHSO<sub>3</sub> 1,2% lắc đều và để 1 giờ. Tiếp theo cho vào 5–7ml dung dịch HCl 1N và dùng dung dịch I<sub>2</sub> 0,1N để oxy hoá lượng NaHSO<sub>3</sub> dư với chỉ thị là dung dịch tinh bột 0,5% (cuối giai đoạn nên dùng I<sub>2</sub> 0,01N để lượng I<sub>2</sub> không dư nhiều). Lượng dung dịch I<sub>2</sub> 1N và 0,01N tiêu hao trong giai đoạn này không tính đến. Tiếp theo ta thêm vào bình phản ứng 25ml NaHSO<sub>3</sub> để giải phóng lượng NaHSO<sub>3</sub> và aldehyde. Sau 1 phút ta dùng dung dịch I<sub>2</sub> 0,01N để chuẩn độ NaHSO<sub>3</sub> vừa được giải phóng do kết hợp với aldehyde lúc ban đầu. Phản ứng được xem là kết thúc khi xuất hiện màu tím nhạt.
- Song song với thí nghiệm thực, ta làm một thí nghiệm kiểm chứng, thấy 50 ml rượu bằng 50 ml nước cất.

– **Kết quả**

Hàm lượng aldehyt tính theo mg/l được xác định theo công thức:

$$A_d = \frac{(V - V_0) \cdot 0,22 \cdot 1000 \cdot 100}{50 \cdot C} \quad , \text{ mg/l}$$

Trong đó:

V và  $V_0$  - số ml dung dịch  $I_2$  0,01N tiêu hao trong thí nghiệm thực và kiểm chứng  
0,22 - số mg aldehyde acetic tương ứng với 1ml dung dịch  $I_2$  0,01N.

Ví dụ: khi tiến hành thí nghiệm ta nhận được  $V_1 = 18\text{ml}$ ,  $V_2 = 0,3\text{ml}$ .

Nồng độ rượu bằng 50%.

Hàm lượng aldehyde acetic trong 1lít cồn tuyệt đối sẽ là;

$$\frac{(1,8*0,22*1000*10)}{50*50} = 13,2\text{mg/l}$$

*Phụ lục 1.14. Đánh giá cảm quan của sản phẩm*

**Bảng 19. Bảng điểm mô tả đánh giá cảm quan chỉ tiêu màu sắc-độ trong của rượu vang mít**

Điểm	Yêu cầu
5	Trong suốt, không có vật thể nhỏ, có màu vàng giống như màu đặc trưng của mít. Bạn rất thích màu này của sản phẩm.
4	Trong suốt, không có vật thể nhỏ, có màu vàng đặc trưng của mít nhưng màu vàng nhạt hơn. Bạn thích màu này của sản phẩm.
3	Trong suốt, không có vật thể nhỏ, có màu vàng của mít nhưng màu rất nhạt. Bạn chấp nhận màu này của sản phẩm.
2	Đục nhẹ, có ít cặn nhỏ, có màu hơi khác biệt so với màu vàng đặc trưng của mít. Bạn không thích màu này của sản phẩm.
1	Sản phẩm đục, màu sản phẩm khác biệt so với màu của mít, có hiện tượng bị hoá nâu. Bạn không chấp nhận màu này của sản phẩm.
0	Sản phẩm đục, sản phẩm có sự phân lớp rắn lỏng, màu sản phẩm rất xấu.

**Bảng 20. Bảng điểm mô tả đánh giá cảm quan chỉ tiêu mùi của rượu vang mít**

<b>Điểm</b>	<b>Yêu cầu</b>
5	Sản phẩm có mùi đặc trưng của mít và thơm mùi rượu etylic đặc trưng. Mùi sản phẩm thơm, hấp dẫn và hài hòa.
4	Sản phẩm có mùi thơm nhẹ đặc trưng của mít, thơm nhẹ mùi rượu etylic. mùi sản phẩm dễ chịu và hài hòa.
3	Sản phẩm có mùi thơm của mít nhưng mùi rất nhẹ, mùi rượu etylic hơi nồng. Mùi sản phẩm có mùi hơi chua
2	Mùi thơm đặc trưng của mít bị mùi cồn etylic lấn át. Sản phẩm có mùi chua và mùi men nặng
1	Sản phẩm không còn mùi thơm của mít, có mùi chua khó chịu.
0	Sản phẩm không có mùi thơm của mít, có mùi chua giống như mùi của dấm

**Bảng 21. Bảng điểm mô tả đánh giá cảm quan chỉ tiêu vị của rượu vang mít**

<b>Điểm</b>	<b>Yêu cầu</b>
5	Sản phẩm có vị thơm ngon. Rượu có vị hơi the của cồn đặc trưng và tinh khiết. Vị của sản phẩm hài hòa giữa vị chát nhẹ và vị chua. Sau khi uống, rượu có cảm giác hậu vị ngọt và thanh, rất hấp dẫn.
4	Sản phẩm có vị đặc trưng, có vị hơi the của cồn trung và tinh khiết, dễ uống. Nhưng chưa thật sự hòa hợp giữa vị ngọt thanh của mít và vị the của rượu và vị chát nhẹ.
3	Sản phẩm có vị đặc trưng ít và chưa tinh khiết, vị the của cồn yếu và có vị chua hơi gắt.
2	Sản phẩm có vị đặc trưng rất ít, không tinh khiết, có lưu vị chua gắt, vị men mạnh.
1	Sản phẩm không còn vị đặc trưng của rượu vang, có vị chua mạnh.
0	Sản phẩm có vị lạ và rất khó chịu.

**Bảng 22. Cơ sở phân cấp chất lượng sản phẩm dựa trên điểm chung có trọng lượng**

Cấp chất lượng	Điểm chung	Yêu cầu về điểm trung bình chưa có trọng đối với các chỉ tiêu
Loại tốt	18,6 - 20,0	Các chỉ tiêu quan trọng nhất lớn hơn hoặc bằng 4,7
Loại khá	15,2 - 18,5	Các chỉ tiêu quan trọng nhất lớn hơn hoặc bằng 3,8
Loại trung bình	11,2 - 15,1	Mỗi chỉ tiêu lớn hơn hoặc bằng 2,8
Loại kém (không đạt mức chất lượng qui định trong tiêu chuẩn nhưng còn khả năng bán được)	7,2 - 11,1	Mỗi chỉ tiêu lớn hơn hoặc bằng 1,8
Loại rất kém (không có khả năng bán được nhưng sau khi tái chế thích hợp còn sử dụng được)	4,0 - 7,1	Mỗi chỉ tiêu lớn hơn hoặc bằng 1,0
Loại hỏng (không còn sử dụng được)	0 - 3,9	

## **Phụ lục 2: Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7045: 2002)**

### **Rượu vang – Qui định kỹ thuật**

*Wine – Specification*

#### **2.1. Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các sản phẩm rượu vang.

#### **2.2. Tiêu chuẩn viện dẫn**

Quyết định 3742/2001/QĐ-BYT: "Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm".

Quyết định 178/1999/QĐ - TTg: "Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu".

TCVN 378 : 1986 Rượu trắng. Phương pháp thử.

TCVN 3217 : 1979 Rượu. Phân tích cảm quan. Phương pháp cho điểm.

TCVN 4830-89 (ISO 6888 : 1983) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung về phương pháp đếm vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

TCVN 4882 : 2001 (ISO 4831 : 1991) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung về định lượng *Coliform*. Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất.

TCVN 4991-89 (ISO 7937 : 1985) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung về phương pháp đếm *Clostridium perfringens*. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc.

TCVN 5165 : 1990 Sản phẩm thực phẩm. Phương pháp xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí.

TCVN 5166 : 1990 Sản phẩm thực phẩm. Phương pháp xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc.

TCVN 5563 : 1991 Bia – Phương pháp xác định hàm lượng cacbon đioxit (CO<sub>2</sub>)

TCVN 5989 : 1995 (ISO 5666/1 : 1983) Chất lượng nước. Xác định thủy ngân tổng số bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa. Phương pháp sau khi xử lý với tia cực tím.

TCVN 6193 : 1996 (ISO 8288 : 1996) Chất lượng nước. Xác định niken, coban, đồng, kẽm, cadimi và chì. Phương pháp trắc phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa.

TCVN 6626 : 2000 (ISO 11969 : 1996) Chất lượng nước. Xác định hàm lượng arsen. Phương pháp đo phổ hấp thụ nguyên tử.

TCVN 6846 : 2001 (ISO 7251 : 1993) Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung về định lượng *E.Coli* giả định. Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất.

### 2.3. Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

Rượu vang (Wine): Loại đồ uống có cồn được sản xuất bằng phương pháp lên men từ các loại trái cây và không qua chưng cất.

### 2.4. Yêu cầu kỹ thuật

#### 2.4.1. Yêu cầu cảm quan

Các chỉ tiêu cảm quan của rượu vang được quy định trong (Bảng 23).

**Bảng 23. Yêu cầu về cảm quan của rượu vang**

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu
1. Màu sắc	Đặc trưng cho từng loại vang
2. Mùi	Thơm đặc trưng của nguyên liệu và sản phẩm lên men, không có mùi lạ
3. Vị	Chua chát, có hoặc không có vị ngọt, không có vị lạ
4. Trạng thái	Trong, không vẩn đục

#### 2.4.2. Chỉ tiêu hoá học

Các chỉ tiêu hóa học của rượu vang được quy định trong Bảng 24.

**Bảng 24. Các chỉ tiêu hoá học của rượu vang**

Tên chỉ tiêu	Mức
1. Hàm lượng etanol (cồn) ở 20 <sup>0</sup> C, % (V/V)	6 ÷ 18
2. Hàm lượng metanol trong 1 l etanol 100 <sup>0</sup> , g/l, không lớn hơn	3,0
3. Hàm lượng axit bay hơi, tính theo axit axetic, g/l, không lớn hơn	1,5
4. Hàm lượng SO <sub>2</sub> , mg/l, không lớn hơn	350
5. Xianua và các phức xianua+, mg/l, không lớn hơn	0,1
6. Hàm lượng CO <sub>2</sub>	Theo tiêu chuẩn đã được công bố của nhà sản xuất

#### 2.4.3. Giới hạn hàm lượng kim loại nặng

Giới hạn tối đa hàm lượng kim loại nặng của rượu vang được quy định trong Bảng 25.



**Bảng 25. Giới hạn tối đa hàm lượng kim loại nặng của rượu vang**

Tên kim loại	Giới hạn tối đa (mg/l)
1. Asen (As)	0,1
2. Chì (Pb)	0,2
3. Thủy ngân (Hg)	0,05
4. Cadimi (Cd)	1,0
5. Đồng (Cu)	5,0
6. Kẽm (Zn)	2,0

#### 2.4.4. Chỉ tiêu vi sinh vật

Các chỉ tiêu vi sinh vật của rượu vang được quy định trong **Bảng 26**.

**Bảng 26. Các chỉ tiêu vi sinh vật của rượu vang**

Chỉ tiêu	Giới hạn tối đa
1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, số khuẩn lạc trong 1 ml sản phẩm	10 <sup>2</sup>
2. <i>E.Coli</i> , số vi khuẩn trong 1 ml sản phẩm	0
3. <i>Coliforms</i> , số vi khuẩn trong 1 ml sản phẩm	10
4. <i>Cl. perfringens</i> , số vi khuẩn trong 1 ml sản phẩm	0
5. <i>S. aureus</i> , số vi khuẩn trong 1 ml sản phẩm	0
6. Tổng số nấm men – nấm mốc, số khuẩn lạc trong 1 ml sản phẩm	10

#### 2.4.5. Phụ gia thực phẩm

Phụ gia thực phẩm: theo "Qui định danh mục các chất phụ gia được phép sử dụng trong thực phẩm" ban hành kèm theo Quyết định số 3742/2001/QĐ-BYT.

### 2.5. Phương pháp thử

Xác định các chỉ tiêu cảm quan của rượu theo TCVN 3217 : 1991.

Xác định hàm lượng metanol, theo TCVN 378 : 1986.

Xác định hàm lượng etanol, theo TCVN 378 : 1986.

Xác định hàm lượng axit, theo TCVN 378 :1986.

Xác định hàm lượng cacbon dioxit, theo TCVN 5563 : 1991.

Xác định hàm lượng asen, theo TCVN 6626 : 2000 (ISO 11969 : 1996).

Xác định thủy ngân tổng số, theo TCVN 5989 : 1995 (ISO 5666/1 : 1983).

Xác định đồng, kẽm, cadimi và chì, theo TCVN 6193 : 1996 (ISO 8288 : 1996).

Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, theo TCVN 5165 : 1990.

Xác định coliform, theo TCVN 4882 : 2001 (ISO 4831 : 1991).

Xác định E.coli, theo TCVN 6846 : 2001 (ISO 7251 : 1993).

Xác định Staphylococcus aureus, theo TCVN 4830-89 (ISO 6888 : 1983).

Xác định *Clostridium perfringens*, theo TCVN 4991-89 (ISO 7937 : 1985).

Xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc, theo TCVN 5166 : 1990.

## **2.6 . Bao gói, ghi nhãn, bảo quản và vận chuyển**

### *2.6.1. Bao gói*

Rượu vang phải được đựng trong các bao bì kín, chuyên dùng cho thực phẩm và không ảnh hưởng đến chất lượng của rượu.

### *2.6.2. Ghi nhãn*

Theo "Qui chế ghi nhãn hàng hoá lưu thông trong nước và hàng hoá xuất khẩu, nhập khẩu" ban hành kèm theo Quyết định số 178/1999/QĐ - TTg.

### *2.6.3. Bảo quản*

Rượu vang được bảo quản ở điều kiện đảm bảo an toàn vệ sinh, không ảnh hưởng đến chất lượng của rượu và tránh ánh nắng trực tiếp.

### *2.6.4. Vận chuyển*

Phương tiện vận chuyển rượu vang phải khô, sạch, không có mùi lạ và không ảnh hưởng đến chất lượng của rượu.

**Phụ lục 3: Các kết quả thí nghiệm**

3.1. *Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme polygalacturonase và pH đến độ trong của dịch đường hoá.*

**Bảng 27. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase và pH đến độ trong của dịch đường hoá**

pH	Tỉ lệ enzyme polygalacturonase (%)							
	0,02		0,04		0,06		DC	
	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2	lần 1	lần 2
3,5	0,894	0,898	0,893	0,896	0,9	0,912		
4,0	0,885	0,880	0,87	0,873	0,918	0,912	1,195	1,195
4,5	0,845	0,875	0,845	0,760	0,929	0,911		

3.2. *Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra ở pH 4,5 và độ Brix 25.*

**Bảng 28. Ảnh hưởng của tỉ lệ pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra ở pH 4,5 và độ Brix 25.**

Tỉ lệ enzyme pectinase (%)	Độ hấp thụ (A)	
	lần 1	lần 2
DC	0,020	0,0201
0,02	0,028	0,027
0,04	0,033	0,035
0,06	0,045	0,043

3.3. *Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và giá trị pH đến hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men rượu vang mít.*

**Bảng 29. Phân tích các chỉ tiêu hóa học của sản phẩm**

pH, Brix	Độ cồn	Furfurol	Đường tổng số	Acid toàn phần	Este	Aldehyde	Methanol
DC	12	Không	0,1215	471	343,2	96,8	0,138321
21-3,5	13	Không	0,2435	414	347,6	176	0,178812
21-4,0	14	Không	0,2095	357	360,8	184,8	0,181936
21-4,5	14	Không	0,2135	285	369,6	259,6	0,212551
23-3,5	14	Không	0,5445	408	620,4	110	0,188934
23-4,0	15	Không	0,4845	357	536,8	176	0,172306
23-4,5	15	Không	0,218	294	334,4	182,6	0,197368
25-3,5	16	Không	0,806	411	622,6	132	0,169173
25-4,0	15	Không	2,1775	348	580,8	132	0,184837
25-4,5	16	Không	1,113	285	488,4	83,6	0,187545

**Phụ lục 4: Bảng phân tích kết quả thống kê**

**4.1. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase và pH đến độ trong của dịch đường hoá.**

Analysis of Variance for LUONG METHANOL SINH RA - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:PH VA ENZYME	0.277105	9	0.0307894	113.90	0.0000
RESIDUAL	0.0029735	11	0.000270318		

Multiple Range Tests for DO TRONG CUA DICH DUONG HOA by PH VA NONG DO ENZYME PECTINASE

Method: 95.0 percent LSD

PH VA ENZYME	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
4.5-0.04%PE	2	0.8025	X
4.5-0.02%PE	2	0.84	X
4.0-0.04%PE	2	0.8715	XX
4.0-0.02%PE	2	0.8825	XX
3.5-0.04%PE	2	0.8945	XX
3.5-0.02%PE	2	0.896	XX
3.5-0.06%PE	2	0.906	XX
4.0-0.06%PE	2	0.915	X
4.5-0.06%PE	2	0.9165	X
DC	3	1.195	X

**4.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase đến hàm lượng methanol sinh ra của rượu thành phẩm ở pH 4,5 và độ Brix 25 với các tỉ lệ enzyme khác nhau được sử dụng.**

Analysis of Variance for NONG DO METHANOL SINH RA - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:NONG DO ENZYME P	0.000207878	3	0.0000692928*****		0.0000
RESIDUAL	0.0	4	0.0		
TOTAL (CORRECTED)	0.000207878	7			

Multiple Range Tests for NONG DO METHANOL SINH RA by NONG DO ENZYME PECTINASE

-----

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
DC	2	0.0136977	X
0.02%	2	0.0172306	X
0.04%	2	0.0193587	X
0.06%	2	0.0275689	X

-----

Contrast	Difference	+/- Limits
0.02% - 0.04%	*-0.00212817	1.61611E-10
0.02% - 0.06%	*-0.0103383	1.61611E-10
0.02% - DC	*0.00353287	1.61611E-10
0.04% - 0.06%	*-0.00821018	1.61611E-10
0.04% - DC	*0.00566104	1.61611E-10
0.06% - DC	*0.0138712	1.61611E-10

-----

### 4.3. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme pectinase, pH và độ Brix đến hàm lượng methanol sinh ra trong rượu thành phẩm

Analysis of Variance for NONG DO METHANOL SINH RA - Type III Sums of Squares

-----

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:BRIX VA PH	0.0000685123	9	0.00000761247	7.61	0.0019
RESIDUAL	0.0000100077	10	0.00000100077		
TOTAL (CORRECTED)	0.0000785199	19			

-----

Multiple Range Tests for NONG DO METHANOL SINH RA by BRIX VA PH

-----

Method: 95.0 percent LSD

BRIX VA PH	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
DC	2	0.0138327	X
25-3.5	2	0.0169173	X
23-4.0	2	0.0172306	X
21-3.5	2	0.0178812	XX
21-4.0	2	0.0181936	XX
25-4.0	2	0.0184837	XX
25-4.5	2	0.0187538	XX
23-3.5	2	0.0188934	XX
23-4.5	2	0.0197368	XX
21-4.5	2	0.0212551	X

-----

**4.4. Khảo sát ảnh hưởng của độ Brix và giá trị pH đến hàm lượng rượu sinh ra trong quá trình lên men rượu vang mít**

Analysis of Variance for do ruou - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:brix	13,5556	2	6,77778	23,61	0,0000
B:pH	6,74074	2	3,37037	11,74	0,0001
C:thoi gian	2160,67	8	270,083	940,94	0,0000
INTERACTIONS					
AB	6,59259	4	1,64815	5,74	0,0013
AC	5,33333	16	0,333333	1,16	0,3473
BC	7,48148	16	0,467593	1,63	0,1173
RESIDUAL	9,18519	32	0,287037		
TOTAL (CORRECTED)	2209,56	80			

Multiple Range Tests for do ruou by brix

Method: 95,0 percent LSD

brix	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
21	27	8,88889	X
23	27	9,44444	X
25	27	9,88889	X

Multiple Range Tests for do ruou by pH

Method: 95,0 percent LSD

pH	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
----	-------	---------	--------------------

---

35	27	9,03704	X
40	27	9,44444	X
45	27	9,74074	X

---

Multiple Range Tests for do ruou by thoi gian

Method: 95,0 percent LSD

---

thoi gian	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
0	9	0,0	X
36	9	2,44444	X
60	9	6,0	X
84	9	8,88889	X
108	9	11,1111	X
132	9	12,8889	X
156	9	14,2222	X
204	9	14,5556	X
180	9	14,5556	X

---

#### 4.5. Các chỉ tiêu cảm quan rượu

##### 4.5.1. Màu sắc

Analysis of Variance for Mau sac - Type III Sums of Squares

---

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Brix	5,42222	2	2,71111	8,04	0,0007
B:pH	2,15556	2	1,07778	3,20	0,0461
INTERACTIONS					
AB	2,11111	4	0,527778	1,57	0,1913
RESIDUAL	27,3	81	0,337037		

-----  
 TOTAL (CORRECTED)                      36,9889              89  
 -----

Multiple Range Tests for Mau sac by Brix

-----  
 Method: 95,0 percent LSD

Brix	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
------	-------	---------	--------------------

25	30	3,9	X
23	30	4,23333	X
21	30	4,5	X

-----

Multiple Range Tests for Mau sac by pH

-----  
 Method: 95,0 percent LSD

pH	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
----	-------	---------	--------------------

4,5	30	4,0	X
4,0	30	4,26667	XX
3,5	30	4,36667	X

-----



### 4.5.2. Mùi

Analysis of Variance for Mui - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
MAIN EFFECTS					
A:Brix	1,48889	2	0,744444	1,50	0,2293
B:pH	0,155556	2	0,077778	0,16	0,8552
INTERACTIONS					
AB	6,64444	4	1,66111	3,35	0,0138
RESIDUAL	40,2	81	0,496296		
-----					

Multiple Range Tests for Mui by Brix

-----			
Method: 95,0 percent LSD			
Brix	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-----			
25	30	3,53333	X
23	30	3,76667	X
21	30	3,83333	X
-----			

Multiple Range Tests for Mui by pH

-----			
Method: 95,0 percent LSD			
pH	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-----			
3,5	30	3,66667	X
4,5	30	3,7	X
4,0	30	3,76667	X
-----			

### 4.5.3. Vi

Analysis of Variance for Vi - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Brix	2,02222	2	1,01111	1,90	0,1568
B:pH	3,75556	2	1,87778	3,52	0,0342
INTERACTIONS					
AB	6,97778	4	1,74444	3,27	0,0154
RESIDUAL	43,2	81	0,533333		

Multiple Range Tests for Vi by Brix

Method: 95,0 percent LSD

Brix	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
23	30	3,3	X
21	30	3,33333	X
25	30	3,63333	X

Multiple Range Tests for Vi by pH

Method: 95,0 percent LSD

pH	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
4,5	30	3,13333	X
4,0	30	3,56667	X
3,5	30	3,56667	X