

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN RƯỢU VANG THANH TRÀ SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG

*Nguyễn Minh Thủy¹, Bùi Thanh Trúc²,
Nguyễn Thành Thu³, Ngô Văn Tài⁴*

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) được sử dụng để phân tích các điều kiện lên men bao gồm nồng độ chất khô hòa tan ban đầu, pH và mật số nấm men ban đầu đối với hàm lượng ethanol sinh ra trong quá trình sản xuất rượu vang thanh trà sử dụng dòng nấm men phân lập *Saccharomyces cerevisiae* (5.5A). Các thí nghiệm được thiết kế theo mô hình Box-Behnken nhằm thiết lập các điều kiện tối ưu để cải thiện chất lượng rượu vang thanh trà. Kết quả cho thấy các giá trị dự đoán từ kết quả tối ưu hóa quá trình lên men rượu vang thanh trà phù hợp với dữ liệu thử nghiệm. Sử dụng dòng nấm men phân lập 5.5A lên men rượu ở điều kiện pH 4.0, tổng chất khô hòa tan ban đầu là 24⁰Brix và mật độ nấm men ban đầu là 105 tế bào/mL, cho sản phẩm có nồng độ cồn là 13,52%Vol. Chất lượng rượu vang thanh trà (hàm lượng methanol, aldehyde và hydrogen cyanic) đạt tiêu chuẩn Việt Nam đã được công bố (TCVN 7045: 2013).

Từ khóa: *Chất lượng, nấm men phân lập, rượu vang thanh trà, tối ưu hóa, %Vol, Đại học Cần Thơ.*

I. MỞ ĐẦU

Thanh trà (*Bouea macrophylla* Griffith) là loại trái cây phổ biến ở vùng nhiệt đới, trồng nhiều ở Malaysia, Thái Lan và các nước ASEAN khác. Trái thanh trà mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người vì trong trái chứa chín và chín có chứa các hợp chất chống oxy hoá, β -carotene, lượng vitamin C cao giúp cải thiện hệ miễn dịch và các bệnh mãn tính khác (Rajan và Bhat, 2016). Subhadrabandhu (2001) cho rằng thanh trà là một loại trái có tiềm năng kinh tế trong tương lai và là một trong những loại trái cây mang

lại nguồn thu nhập cao cho nhà vườn ở Thái Lan. Ở Việt Nam, trái thanh trà tập trung chủ yếu ở các tỉnh Vĩnh Long, An Giang và Kiên Giang. Trái thanh trà chín cũng dễ bị hư hỏng, khó vận chuyển và bảo quản. Trong số các sản phẩm chế biến từ thanh trà, nước quả có thể được kiểm soát chất lượng và chế biến thành rượu vang. Phương pháp sản xuất rượu vang từ chủng nấm men thuần khiết có rất nhiều triển vọng do thời gian lên men nhanh, quá trình lên men không dừng lại giữa chừng, hàm lượng đường trong dịch quả được lên men triệt để, nồng độ cồn thu được

¹PGS.TS. Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành CNTP Đại học Cần Thơ

³Sinh viên ngành CNTP Đại học Cần Thơ

⁴KS. Đại học Cần Thơ

Email: vantai@ctu.edu.vn và nmthuy@ctu.edu.vn

Ngày gửi bài: 1/9/2019

Ngày phản biện đánh giá: 20/11/2019

Ngày đăng bài: 30/12/2019

trong vang cao hơn lên men tự nhiên là với độ rượu cao hơn 0,1–1% Vol., vang sáng màu hơn, có thể cho hương vị thanh khiết hơn (Lương Đức Phẩm, 2006). Tuy nhiên các chủng nấm men thuần khiết có sự khác nhau về tốc độ sinh trưởng, nhiệt độ thích hợp để lên men, khả năng tạo cồn và chịu cồn, khả năng chịu được pH thấp và khả năng kết lắng (tạo thành dạng bông hoặc dạng bụi).

Để phát triển mạnh và tăng hoạt tính trong quá trình lên men, mật độ nấm men cần được đảm bảo bên cạnh việc cung cấp nguồn chất dinh dưỡng (đường) và thành phần pH dịch quả... Các thông số này được điều chỉnh để thúc đẩy một môi trường hoạt động tốt nhất cho nấm men. Việc sử dụng các chủng khác nhau của nấm men đóng góp lớn cho sự đa dạng của rượu vang, ngay cả trong cùng một giống nguyên liệu (Robinson, 2006). Nấm men thuần chủng và phân lập từ chính nguyên liệu (trái thanh trà) sử dụng cho quá trình lên men rượu vang có thể là một trong những yếu tố quan trọng góp phần nâng cao chất lượng thành phẩm. Do vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của các thành phần tham gia vào quá trình lên men (nồng độ chất khô hòa tan, pH của dịch lên men và mật độ nấm men thuần chủng thích hợp) nhằm nâng cao chất lượng vang thanh trà. Hơn nữa, hoàn thiện chất lượng rượu vang thanh trà trên cơ sở sử dụng chính nguồn nấm men phân lập và các thông số tối ưu sẽ góp phần đa dạng hóa sản phẩm, nâng cao giá trị nguyên liệu sẵn có và gia tăng lợi ích kinh tế cho người trồng ở địa phương.

II. NGUYÊN LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Dịch quả thanh trà: Trái thanh trà chua được thu hoạch ở ấp Đông Hưng 2, xã Đông Thành, thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Chọn trái có mức độ chín nhất (màu vàng sậm) cho tiến trình nghiên cứu. Trái được rửa sạch bên ngoài và cho vào thiết bị chà (Pulper Finisher, Nhật Bản), tách vỏ và hạt, thu pu-rê thanh trà. Quá trình lên men rượu được thực hiện trên pu-rê thanh trà được pha loãng với nước theo tỷ lệ là 1:3.

Giống nấm men: Dòng nấm men *S. cerevisiae* 5.5A được phân lập từ trái thanh trà trồng tại thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long (đã được định danh bằng phương pháp giải trình tự với sự tương đồng với giống nấm men *S. cerevisiae* 99%) có hoạt tính và khả năng lên men cao nhất (Nguyen Minh Thuy et al., 2019). Trước khi sử dụng nấm men cho quá trình lên men rượu, nấm men được nhân giống trên môi trường dinh dưỡng. Dung dịch được phân phối vào bình tam giác đáy bằng nút gòn, khử trùng ở 121⁰C trong 15 phút, cấy men giống ủ ở 30⁰C trên máy lắc 140 vòng/phút (Lương Đức Phẩm, 2006).

2.2. Bố trí thí nghiệm

Sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM – Response Surface Methodology) để thiết kế thí nghiệm và bố trí tối ưu hóa các nhân tố khảo sát bao gồm độ tổng chất khô hòa tan (độ Brix), X1 (%): 22-26, pH, X2: 3.5-4.5 và mật độ nấm men (MĐNM), X3 (log tế bào/mL): 3-7. Thí nghiệm được thiết kế theo mô hình Box-Behken, mỗi nhân tố được mã hóa với 3 mức độ (-1; 0; 1) với tổng số ng-

hiệm thức là 18, bao gồm 6 điểm tâm. Dịch quả thanh trà thu được sau khi ép được điều chỉnh lần lượt về các độ Brix, pH, mật số nấm men theo bố trí thí nghiệm. Sau đó, hỗn hợp được thanh trùng bằng Na₂S₂O₅ với nồng độ 140 mg/L trong 2 giờ. Cho hỗn hợp dung dịch đã được thanh trùng vào bình, chủng nấm men với các mật số được bố trí. Lên men khoảng 10 ngày ở nhiệt độ khí quyển (28±2⁰C). Tất cả các mẫu được phân tích độ rượu (%) sau khi lên men kết thúc.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng mô hình tương quan giữa các điều kiện lên men và độ cồn của sản phẩm rượu vang thanh trà

Tối ưu hóa các điều kiện lên men được thực hiện bằng phương pháp bề mặt đáp ứng sử dụng mô hình Box-Behken. Kết quả phân tích thống kê thể hiện ở **Bảng 1** cho thấy ảnh hưởng của từng biến độc lập riêng lẻ (X₁, X₂, X₃), giá trị bậc

hai (X₁₂, X₂₂, X₃₂) và biến tương tác (X₁X₂, X₂X₃) đều thể hiện có ý nghĩa (p < 0,05). Hệ số xác định tương quan R² khá cao (R² = 86,58%). Guan và Yao (2008) cho rằng mô hình tương quan được đánh giá tốt khi hệ số xác định tương quan R² lớn hơn 0,8. Đồng thời, đánh giá sự thiếu phù hợp của mô hình (Lack-of-fit) được xác định với giá trị P ≥ 0,05, do đó có thể khẳng định rằng mô hình phù hợp với dữ liệu được thu thập ở mức tin cậy 95,0%. Mô hình hồi quy đa chiều mô tả mối quan hệ giữa các biến độc lập và nồng độ cồn sản phẩm rượu vang thanh trà sau khi lên cũng được thiết lập (**phương trình 1**).

$$Y = -253,084 + 16,498X_1 + 26,642X_2 + 2,356X_3 - 0,305X_{12} - 0,125X_{1X2} - 0,14X_{1X3} - 3,28X_{22} + 0,625X_{2X3} - 0,1392X_{32} \quad (1)$$

Trong đó: Y là nồng độ cồn sản phẩm rượu vang thanh trà sau khi lên men (%), X₁ là độ Brix ban đầu (%), X₂ là pH, X₃ là MSNM [(log tế bào)/mL].

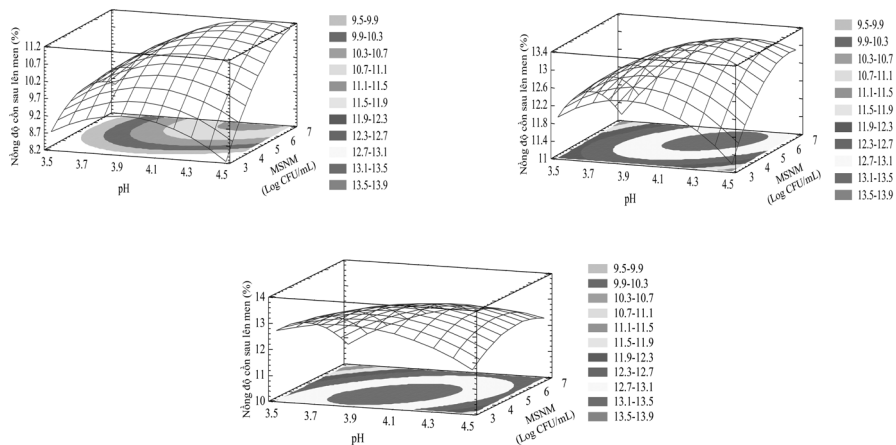
Bảng 1: Kết quả phân tích thống kê mức độ ý nghĩa của các hệ số hồi quy cho mô hình tương tác giữa điều kiện lên men và nồng độ cồn của sản phẩm

Nguồn	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Giá trị P	Nguồn	Bình phương trung bình	Tỷ số F	Giá trị P
X ₁	40,56	131,01	0,0000	X ₁ X ₃	3,74	12,08	0,0012
X ₂	1,50	4,85	0,0334	X ₂₂	8,82	28,49	0,0000
X ₃	1,40	4,53	0,0394	X ₂ X ₃	4,69	15,14	0,0004
X ₁₂	19,51	63,02	0,0000	X ₃₂	4,02	12,99	0,0008
X ₁ X ₂	0,19	0,61	0,4409	Lack-of-fit	0,46	1,48	0,2355

Nồng độ cồn là chỉ tiêu quan trọng nhất trong việc đánh giá khả năng lên men rượu của nấm men, chất lượng rượu cũng như điều kiện bảo quản. Kết quả cho thấy, nồng độ cồn của sản phẩm rượu vang thanh trà đạt giá trị cao trung bình khoảng 12-14% Vol. Khi độ Brix ban đầu là 24 (**Hình 1**). Khi nồng độ đường càng tăng thì rượu tạo

thành cũng tăng. Tuy nhiên đến một mức độ nào đó chúng không tăng nữa mà giảm dần, thậm chí ngừng hẳn quá trình lên men do tạo thành một lực thẩm thấu lớn gây phá vỡ tế bào nấm men, ảnh hưởng xấu đến hiệu quả lên men, hàm lượng đường sót sẽ tăng (Lương Đức Phẩm, 2006). Nấm men có thể hoạt động trong dịch đường có nồng độ 25 đến 30%, nhưng chậm (Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng, 2007). Dựa vào đồ thị và dữ liệu cho thấy tại pH=4,0 thì độ Brix sau lên men lại thấp hơn so với pH phối chế là 4,5; điều này có thể là do khoảng pH=4,0 là khoảng pH tối thích để nấm men phát triển và tiến hành lên men rượu. Lương

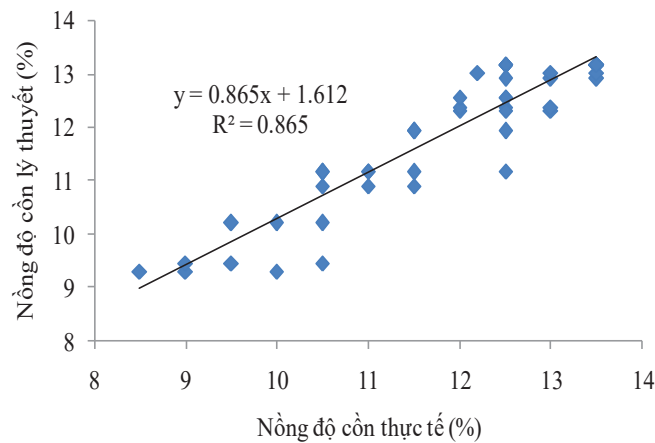
Đức Phẩm (2006) cho rằng pH sau lên men có thể giảm do sự hoạt động của nấm men trong quá trình lên men kỵ khí sinh ra CO₂ và một số acid hữu cơ làm giảm pH của dịch lên men. pH sau lên men càng thấp (3,5÷3,8) sẽ cải thiện được độ ổn định của rượu, ức chế được sự phát triển của vi khuẩn và cũng tạo điều kiện tốt cho quá trình lên men đường. Ở khoảng pH ≥4,2÷4,5 sẽ tạo điều kiện cho vi khuẩn phát triển nhanh chóng và dẫn đến quá trình lên men không mong muốn, rượu vang có chất lượng kém và màu sắc xấu (Kurtzman và Fell, 1998; Ribéreau-Gayon et al., 2006).



Hình 1: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa pH và MSNM đến nồng độ cồn của sản phẩm ở độ Brix ban đầu a. 22% b. 24% và c. 26%

Lương Đức Phẩm (2006) cho rằng nếu lượng tế bào nấm men cho vào thích hợp thì quá trình lên men diễn ra tốt, hiệu suất thu hồi cao và 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 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 vị lạ, đồng thời hao phí một lượng men đáng kể. Lý thuyết này giải thích được vì sao mẫu lên men với mật số tế bào 105 CFU/mL lại cho kết quả tốt hơn.



Hình 2: Tương quan giữa độ cồn thực tế và độ cồn tính toán từ mô hình

Sự tương thích cao giữa dữ liệu thực nghiệm và lý thuyết được thiết lập theo phương trình 2: $y = 0,865x + 1,612$, với hệ số xác định tương quan $R^2 = 86,5\%$ [với y (%) là nồng độ cồn của sản phẩm tính toán từ mô hình và x (%) là dữ liệu đo đặc nồng độ cồn thực tế của sản phẩm sau khi lên men] (Hình 2). Kết quả thu nhận lần nữa đã khẳng định mô hình tìm được phù hợp để dự đoán nồng độ cồn của sản phẩm rượu vang thanh trà.

3.2. Kiểm định giá trị tối ưu và thực nghiệm

Kết quả tối ưu hóa cho thấy, độ Brix phối chế ban đầu 25,04⁰Brix, pH 4,06 và MSNM 5,05 log tế bào/mL cho sản phẩm có độ cồn cao nhất (13,52%) (dữ

liệu được tính toán từ mô hình). Kiểm định T-test được thực hiện cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa giữa các giá trị tối ưu và thực nghiệm (Bảng 2). Đồng thời các giá trị sinh học của sản phẩm thực nghiệm cũng được phân tích (Bảng 3). Như vậy từ kết quả cho thấy, môi trường có nồng độ chất khô ban đầu là 24 độ Brix, pH =4, mật độ tế bào nấm men giống ban đầu là 105 CFU/mL trong dịch lên men thì dòng nấm men 5.5A cho độ cồn cao và hàm lượng đường sót thấp (1,72 g/L) khi quá trình lên men kết thúc. Ngoài ra các thông số chất lượng của sản phẩm cũng đạt yêu cầu của Tiêu chuẩn Việt Nam đã được công bố (TCVN 7045:2013) (Bảng 4).

Bảng 2: Kiểm định giá trị tối ưu đạt được từ mô hình so với thực nghiệm.

	Độ Brix	pH	MSNM	Độ cồn sản phẩm (%Vol.)
Giá trị từ mô hình	25,04	4,06	5,05	13,52 ^a
Giá trị thực nghiệm	25	4	5	14±0,5 ^b

Bảng 3: Hàm lượng các hợp chất sinh học trong sản phẩm rượu vang thanh trà

Chỉ tiêu	Giá trị
Hàm lượng polyphenol tổng (mgGAE/g)	10,84±0,24
Hàm lượng flavonoid (mgQE/g)	4,25±0,03
Hàm lượng tannin (mgTAE/g)	0,95±0,01
Hàm lượng β -carotene (μ g/100g)	0,47±0,02

Bảng 4: Các thông số chất lượng sản phẩm rượu vang thanh trà sau khi lên men

Chỉ tiêu thử nghiệm	Kết quả
Hàm lượng methanol (mg/lít ethanol)*	121,1
Aldehyde (theo axetaldehyd) (mg/l ethanol)*	20,4
HCN (mg/L)**	Không phát hiện (MDL = 0,006)

*Kết quả được phân tích tại công ty Sắc Ký Hải Đăng, TP. Cần Thơ; **Kết quả được phân tích tại trung tâm CASE, TP. Hồ Chí Minh

IV. KẾT LUẬN

Giống nấm men *Saccharomyces cerevisiae* 5.5A được phân lập từ trái thanh trà được sử dụng tốt cho quá trình lên men sản phẩm rượu vang. Phương pháp bề mặt đáp ứng được áp dụng theo mô hình Box-Behnken đã xác định được các thông số tối ưu (pH 4, nồng độ chất khô phối chế ban đầu là 24 độ Brix và mật số nấm men 105 CFU/mL) cho quá trình lên men tối ưu rượu vang thanh trà. Với các thông số tối ưu này, nồng độ cồn của sản phẩm đạt khoảng 13,52%Vol. và các thông số chất lượng của sản phẩm đều đạt yêu cầu theo TCVN 7045:2013.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Guan X. and Yao H. 2008. *Optimization of viscozyme L assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. Food Chemistry*, 106, 345-351.
2. Kurtzman C.P., Fell J.W., 1998. *The yeast a taxonomic study. Elsevier Science B.V.*, 133-121.
3. Lương Đức Phẩm. 2006. *Nấm men công nghiệp. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.*
4. Nguyễn Đình Thuởng, Nguyễn Thanh Hằng, 2007. *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn ethylic. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.* 281 trang.

5. Nguyen Minh Thuy, Nguyen Van Thanh, Ngo Van Tai. 2019. *Isolation, characterization and identification of yeast strains from maprang (Bouea macrophylla Griffith) from Vinh Long, Viet Nam for wine making. International Journal of Engineering Sciences and Research Technology (IJESRT). Vol. 8 (7), 111-121*
6. Rajan, N. S. and Bhat, R., 2016. *Antioxidant compounds and antioxidant activities in unripe and ripe kundang fruits (Bouea macrophylla Griffith). Fruits, 71(1): 41-47.*
7. Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. 2006. *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications (Volume 1, 2).* Great Britain by Antony Rowe Ltd, Chippennham, Wiltshire.
8. Robinson J. (ed), 2006. *The Oxford Companion to Wine. Third Edition.* Oxford University Press. ISBN 0-19-860990-6.
9. Subhadrabandhu, S., 2001. *Under-utilized tropical fruits of Thailand.* RAP Publication.

Summary

OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS FOR MAPRANG WINE PRODUCTION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Response surface methodology (RSM) was employed for analysis of fermentation conditions of total soluble solid content, pH and initial yeast density on ethanol content produced during maprang wine production by isolated yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* (5.5A). The experiments were carried out according to the Box-Behnken design to establish the optimum conditions for improving the quality of maprang wine. The results showed that the predicted values for optimization process conditions were in good agreement with experimental data. Using isolated yeast strain 5.5A for the wine fermentation at pH 4.0, total soluble solid content of 24% and yeast density of 105 cells/mL, the alcohol content produced was reached at 13.52% Vol and the wine had favorable color and flavor. The quality of Thanh Tra wine (methanol, aldehyde and hydrogen cyanic contents) has reached the published Vietnamese standard (TCVN 7045: 2013).

Keywords: *Isolated yeast, maprang wine, optimization, quality, %Vol.*

