

Tối ưu hóa điều kiện xử lý enzyme pectinase và lên men rượu vang mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L.)

Optimization of conditions for pectinase enzyme treatment and wine fermentation from soursop (*Annona muricata* L.)

Luu Minh Châu¹, Dương Thị Thảo Vân¹, Lý Thị Thùy Duyên¹,
Nguyễn Ngọc Thanh¹, Huỳnh Xuân Phong^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: hxphong@ctu.edu.vn

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.17.1.1998.2022

Ngày nhận: 16/07/2021

Ngày nhận lại: 11/08/2021

Duyệt đăng: 16/08/2021

Từ khóa:

enzyme pectinase; lên men
rượu vang; mãng cầu xiêm; tối
ưu hóa

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm mục tiêu xác định điều kiện xử lý enzyme pectinase thích hợp và xác định các điều kiện lên men tối ưu để sản xuất rượu vang mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) thông qua các mô hình thống kê. Lên men dịch quả mãng cầu xiêm (đã được xử lý enzyme pectinase 0.3% trong một giờ) với 11 dòng nấm men thử nghiệm cho thấy dòng nấm men FBY009 có khả năng lên men tốt nhất với hàm lượng ethanol là 12.71% v/v và được đánh giá cảm quan tốt. Ảnh hưởng của 06 nhân tố đến quá trình lên men của dòng nấm men FBY009 đối với quá trình lên men được thực hiện theo mô hình Plackett-Burman đã xác định được 02 nhân tố, bao gồm độ Brix và hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, có tác động có ý nghĩa đến hàm lượng ethanol được hình thành. Tối ưu hóa điều kiện lên men bằng cách bổ sung 0.96g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và điều chỉnh ở 23.77°Brix cho sản phẩm rượu vang mãng cầu xiêm có hàm lượng ethanol ở mức 12.88% v/v. Kết quả từ nghiên cứu cho thấy khả năng phát triển sản phẩm rượu vang từ mãng cầu xiêm và là tiền đề để sản xuất ở quy mô thử nghiệm.

ABSTRACT

This study aimed to determine the appropriate concentration of pectinase enzyme for fruit juice processing and to determine the optimal conditions for soursop wine fermentation through statistical models. The result of the fermentation of soursop juice (pectinase enzyme-treated 0.3% for 01 hour) using 11 selected yeast strains showed that strain FBY009 had the best fermentation ability with an ethanol content of 12.71% v/v and high in sensory score. Investigating factors affecting fermentation of strain FBY009 based on PBD model. Among 6 experimental factors, there were 02 factors (Brix and content $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) that have a significant impact on the process of creating ethanol. Optimizing fermentation conditions by adding 0.96g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and adjusting to 23.77°Brix, soursop wine has the highest ethanol content of 12.88% v/v. The results reveal the promising of the wine product from soursop and as the premise for larger-scale production.

Keywords:

enzyme pectinase; wine
fermentation; soursop;
optimization

1. Đặt vấn đề

Mãng cầu xiêm (*Annona muricata* L.) là một loại trái cây có hương vị thơm ngon và hấp dẫn. Mãng cầu xiêm thuộc cây nhiệt đới, cho trái liên tục quanh năm, tùy theo vùng trồng mà chúng có mùa chín khác nhau (Pinto & ctg., 2005). Ngoài ra, mãng cầu xiêm còn được biết đến là loại trái cây có hàm lượng dinh dưỡng cao, nhiều chất xơ, chống oxy hóa, chất khoáng và nhiều dạng vitamin C, B1 và B2 (Lima & Alves, 2011). Nhờ có nhiều dưỡng chất cũng như các hợp chất có hoạt tính sinh học nên mãng cầu xiêm như có khả năng chống ung thư, chống đái tháo đường, giảm cholesterol, giúp tiêu hóa và làm chậm quá trình lão hóa (Téllez, González, Yahia, & Vázquez, 2018). Tuy nhiên, mãng cầu xiêm dễ bị hư hỏng, dập nát nên phải xử lý cẩn thận. Sau thu hoạch, nếu không có các biện pháp bảo quản thì quả chỉ giữ được ở nhiệt độ phòng khoảng vài ngày (Lima & Alves, 2011). Với các đặc tính quý giá cùng với vấn đề hư hỏng nhanh nên hiện nay mãng cầu xiêm được tận dụng để tạo ra nhiều dòng sản phẩm khác nhau nhưng vẫn giữ được giá trị dinh dưỡng như trái cây sấy, mứt dẻo, kem, sirô, ... Trong đó, sản xuất rượu vang từ mãng cầu xiêm là phương pháp để sử dụng nguồn nguyên liệu này một cách hiệu quả. Tuy vậy, trong quá trình sản xuất rượu vang từ dịch trái cây, nước ép từ các loại trái cây thường hay bị vẩn đục và xảy ra tình trạng lắng dẫn đến tách lớp trong quá trình bảo quản, làm mất cảm quan và suy giảm chất lượng sản phẩm. Một trong những nguyên nhân dẫn đến hiện tượng dịch ép trái cây bị đục do thành phần pectin (một polysaccharide có nhiều trong dịch quả). Do đó, enzyme pectinase có thể được sử dụng để xúc tác sự thủy phân liên kết ester hoặc liên kết glucoside có trong mạch polymer của pectin. Không chỉ vậy, ứng dụng enzyme pectinase trong quá trình sản xuất còn giúp tăng tỉ lệ dịch chiết, góp phần làm giảm độ nhớt, lọc dịch một cách dễ dàng và hỗ trợ cho quá trình làm trong (Lanzarini & Pifferi, 1989). Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu để xác định được nồng độ enzyme thích hợp sử dụng trong quá trình xử lý dịch quả đồng thời tối ưu hóa các điều kiện lên men sản xuất rượu vang mãng cầu xiêm. Từ đó có thể tận dụng được nguồn nguyên liệu, đa dạng hóa sản phẩm và kết hợp các lợi ích của cả mãng cầu xiêm và rượu vang trong cùng một sản phẩm.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Quả mãng cầu xiêm được thu mua tại vườn và vận chuyển về phòng thí nghiệm để chín và sử dụng làm nguyên liệu sản xuất rượu vang. Mười một chủng nấm men đã được tuyển chọn và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Môi trường YPD gồm 0.5% yeast extract, 0.5% peptone và 2.0% D-glucose; môi trường YPD agar được bổ sung thêm agar với hàm lượng 1.5g/L (Limtong, Sringiew, & Yongmanitchai, 2007); enzyme pectinase (ICFood, Việt Nam), tetracyclin, agar, sucrose (Việt Nam), NaHSO₃, Na₂CO₃, acid citric (Xilong, Trung Quốc).

2.2. Xác định nồng độ enzyme pectinase thích hợp để xử lý dịch quả

Quả mãng cầu xiêm được gọt vỏ, tách hạt và xay nhuyễn. Mẫu được dùng trong ngày hoặc trữ trong tủ lạnh (ở nhiệt độ 4°C). Enzyme pectinase với các nồng độ 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6% w/w được bổ sung vào dịch quả mãng cầu xiêm và ủ ở 40°C. Xác định hàm lượng đường khử bằng phương pháp DNS (Miller, 1959) sau 01, 02, 03, 04, 05 và 06 giờ.

2.3. Tuyển chọn nấm men có khả năng lên men dịch mãng cầu xiêm

Các dòng nấm men thử nghiệm được nuôi cấy sử dụng môi trường YPD ở 30°C trong 24 giờ. Dịch quả mãng cầu xiêm được xử lý với enzyme pectinase ở nồng độ và thời gian được

chọn từ nội dung 2.2. Phối chế dịch quả mãng cầu bằng đường sucrose đến 25°Brix, điều chỉnh pH về 4 và thanh trùng bằng NaHSO₃ (140mg/L) trong 02 giờ. Bổ sung 1mL dịch nấm men với mật số ban đầu là 10⁸ tế bào/mL vào bình tam giác có chứa 99mL dịch quả đã được xử lý enzyme. Lắc đều và đậy kín bằng waterlock.

Sau khi kết thúc lên men, rượu vang được phân tích để ghi nhận các chỉ tiêu hóa lý bao gồm pH, Brix và hàm lượng ethanol. Sản phẩm được đánh giá cảm quan với các chỉ tiêu như độ trong, màu sắc, mùi, vị và ý thích theo tiêu chuẩn quốc gia về rượu vang (TCVN 7045:2013, Vietnam Ministry of Science and Technology, 2013) bằng phương pháp cho điểm theo TCVN 3217:79 (Vietnam Ministry of Science and Technology, 1979) thông qua Hội đồng đánh giá cảm quan gồm 15 thành viên (độ tuổi từ 22 đến 50, thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ).

2.4. Khảo sát các nhân tố tác động đến quá trình lên men

Các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu vang được xác định dựa trên mô hình thống kê Plackett-Burman Design (PBD). Thử nghiệm được thực hiện với 06 nhân tố bao gồm mật số tế bào nấm men (tb/mL), pH, Brix (°Brix), peptone (g/L), yeast extract (g/L) và (NH₄)₂SO₄ (g/L). Mỗi nhân tố được thiết kế với 02 giá trị là thấp nhất (-1) và cao nhất (+1) theo mô hình PBD với 12 nghiệm thức (Bảng 1). Bố trí thí nghiệm lên men theo thiết kế của mô hình đề xuất với 03 lần lặp lại. Khi kết thúc quá trình lên men, ghi nhận các giá trị pH, Brix và hàm lượng ethanol. Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Design Expert 7.0 để xác định các nhân tố có tác động có ý nghĩa đến quá trình lên men.

Bảng 1

Các nhân tố thử nghiệm và nồng độ tương ứng theo PBD

Nhân tố	Đơn vị	Mức thấp (-1)	Mức cao (+1)
Mật số giống	tb/mL	1×10 ⁴	1×10 ⁷
Độ Brix	Brix	18	28
pH		4.0	6.0
Peptone	g/L	0	6.0
Yeast extract	g/L	0	6.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	0.03	3.0

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

2.5. Tối ưu hóa các nhân tố tác động đến quá trình lên men

Các nhân tố có tác động ý nghĩa đến quá trình lên men sẽ được xác định sau khi xử lý thống kê dựa trên mô hình PBD. Các nhân tố này sẽ được tối ưu hóa theo mô hình Central Composite Design (CCD) từ phần mềm Design Expert 7.0. Mỗi nhân tố được xác định với 05 giá trị (-α, -1, 0, +1, +α) và thực hiện ở 03 lần lặp lại.

2.6. Thử nghiệm xác nhận các điều kiện tối ưu

Từ kết quả thống kê của mô hình tối ưu hóa, các điều kiện tối ưu hóa được đề xuất từ phần mềm Design Expert 7.0 được lựa chọn để thực hiện thử nghiệm xác nhận với 03 nghiệm thức dự đoán cho kết quả hàm lượng ethanol cao nhất. Mỗi thử nghiệm được thực hiện lặp lại 03 lần để lấy kết quả trung bình.

2.7. Phân tích và xử lý số liệu

Kết quả được thu thập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Dữ liệu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ) và Design Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., Hoa Kỳ).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định nồng độ enzyme pectinase thích hợp để xử lý dịch quả

Hàm lượng đường khử trong mẫu dịch quả được xử lý bằng enzyme pectinase với các nồng độ (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 và 0.6%) và ủ ở 40°C trong các mốc thời gian khác nhau (0, 01, 02, 03, 04, 05 và 06 giờ) được tổng hợp ở Bảng 2. Một cách tổng quát, hàm lượng đường khử sinh ra tỷ lệ thuận với lượng enzyme được thêm vào. Tuy nhiên, khi nồng độ enzyme tăng lên đến một ngưỡng nhất định thì hàm lượng đường khử sẽ không tăng lên nữa mà có chiều hướng giảm. Cụ thể, sau 01 giờ bổ sung enzyme, lượng đường khử tăng lên và đạt cao nhất ở nồng độ 0.3% với 79.36g/L và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nồng độ thử nghiệm đã bố trí. Tương tự, trong các mốc thời gian xử lý tiếp theo thì hàm lượng đường khử cũng tăng lên, đạt giá trị cao nhất ở mức nồng độ enzyme trong khoảng từ 0.2 đến 0.3% với 71.45g/L sau 02 giờ, 70.97g/L sau 03 giờ và 69.71g/L sau 04 giờ.

Bảng 2

Hàm lượng đường khử sau khi xử lý enzyme pectinase của dịch mãng cầu xiêm

Tỷ lệ enzyme (%)	Hàm lượng đường khử (g/L) theo thời gian lên men (giờ)						
	0	1	2	3	4	5	6
0	59.43 ^b	59.46 ^d	56.71 ^c	61.35 ^c	57.93 ^b	56.79 ^c	58.37 ^c
0.1	61.88 ^{ab}	67.39 ^{bc}	66.28 ^b	64.75 ^b	66.57 ^a	66.33 ^a	66.26 ^a
0.2	64.15 ^a	72.05 ^b	74.19 ^a	70.97 ^a	69.71 ^a	63.54 ^{ab}	64.91 ^{bc}
0.3	63.70 ^a	79.36 ^a	71.45 ^a	68.89 ^a	68.94 ^a	60.11 ^{bc}	59.98 ^{bc}
0.4	64.51 ^a	71.53 ^b	64.99 ^b	65.02 ^b	60.93 ^b	61.48 ^{abc}	60.11 ^{bc}
0.5	62.25 ^a	67.52 ^{bc}	60.30 ^c	65.20 ^b	60.43 ^b	60.67 ^{abc}	61.99 ^{abc}
0.6	61.96 ^{ab}	66.04 ^c	60.11 ^c	64.07 ^{bc}	61.06 ^b	62.49 ^{abc}	62.93 ^{abc}

Ghi chú: Giá trị trung bình trong bảng là kết quả của các thí nghiệm được lặp lại 03 lần; các số liệu trên cùng một cột có các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa với độ tin cậy là 95% ($p < 0.05$)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Nhìn chung, hàm lượng đường khử trong dịch quả có xu hướng giảm khi nồng độ enzyme thấp hoặc cao hơn nồng độ thích hợp. Khi enzyme được bổ sung càng nhiều và thời gian thủy phân được kéo dài thì quá trình phân cắt càng diễn ra sẽ triệt để hơn, giải phóng dịch quả nhiều hơn, giúp làm tăng hiệu quả thu hồi. Tuy nhiên, đến một giới hạn nhất định thì nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất, lúc này vận tốc phản ứng cũng không thay đổi khi tăng nồng độ enzyme (N. T. M. Nguyen & Truong, 2006). Kết quả nghiên cứu của P. N. M. Nguyen, Ly, Chau, và Che (2011) và H. T. T. Nguyen, Tran, và Nguyen (2019) cũng cho thấy có sự tương đồng. Việc kéo dài thời gian cho enzyme hoạt động là cần thiết để tạo ra lượng dịch quả

cũng như lượng đường khử nhiều hơn. Tuy nhiên, càng kéo dài thời gian thì cũng không tạo ra lượng đường khử trong sản phẩm nhiều hơn mà có thể mất nhiều thời gian, dịch quả bị chua do sự tấn công của các loài vi sinh vật khác và gây ảnh hưởng xấu đến giai đoạn lên men rượu sau này (Jacob, 2009). Như vậy, nồng độ enzyme pectinase được bổ sung để xử lý dịch quả mãng cầu xiêm trong 01 giờ là 0.3%.

3.2. Tuyển chọn nấm men có khả năng lên men dịch mãng cầu xiêm

Bảng 3 trình bày kết quả lên men dịch mãng cầu xiêm sử dụng 11 chủng nấm men với các giá trị về độ Brix, pH và hàm lượng ethanol của rượu vang mãng cầu xiêm. Khi kết thúc lên men, Brix của dịch quả ở tất cả các nghiệm thức đều giảm. Cụ thể, nghiệm thức lên men với chủng FBY002 và FBY009 có độ Brix giảm mạnh nhất, từ 25°Brix ban đầu xuống còn 8.0°Brix và 8.17°Brix, có khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với các nghiệm thức còn lại. Bên cạnh đó, 02 chủng nấm men này cũng có lượng ethanol sinh ra cao nhất với hàm lượng ethanol đạt được lần lượt là 13.61% và 12.71% v/v. Ở các nghiệm thức lên men với các chủng nấm men thử nghiệm khác, độ Brix cũng giảm và hàm lượng ethanol khá cao, trong khoảng 11.15% đến 11.91% (v/v). Riêng đối với chủng FBY006 và FBY011, hàm lượng ethanol tạo ra tương đối thấp (chỉ ở mức 9.54% và 9.20% v/v). Kết quả này cho thấy độ Brix còn lại sau quá trình lên men càng thấp thì lượng ethanol càng tăng, chứng tỏ nấm men đã chuyển hóa một lượng lớn nguồn carbohydrate có trong dịch quả để làm nguồn dinh dưỡng cho sự phát triển sinh khối và hình thành ethanol cùng một số sản phẩm phụ khác.

Bảng 3

Giá trị Brix, pH và hàm lượng ethanol của 11 dòng nấm men

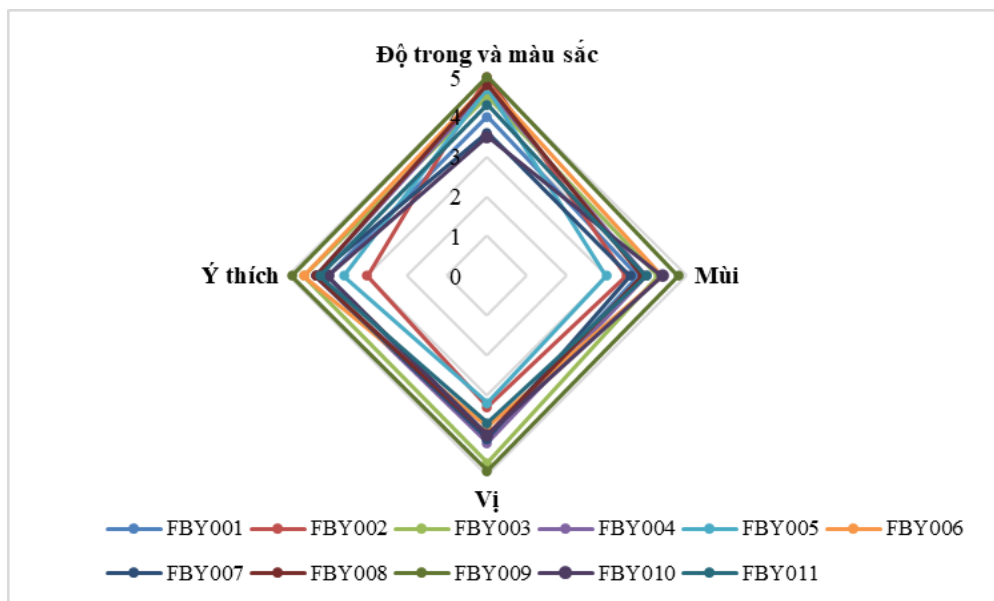
Dòng	Các chỉ tiêu sau lên men		
	Brix (°Brix)	pH	Ethanol (% v/v)
FBY001	10.67 ^c	3.79 ^{bc}	11.47 ^d
FBY002	8.0 ^a	3.98 ^f	13.61 ^a
FBY003	10.33 ^c	3.75 ^b	11.36 ^{cd}
FBY004	9.0 ^b	3.86 ^d	12.31 ^{bc}
FBY005	8.17 ^a	3.96 ^f	11.86 ^{bcd}
FBY006	10.83 ^c	3.78 ^b	9.54 ^e
FBY007	9.0 ^b	3.87 ^d	11.68 ^{bcd}
FBY008	9.5 ^b	3.83 ^{cd}	11.91 ^{bcd}
FBY009	8.17 ^a	3.92 ^e	12.71 ^{ab}
FBY010	10.83 ^c	3.77 ^b	11.15 ^{cd}
FBY011	13.33 ^d	3.7 ^a	9.20 ^e

Ghi chú: Giá trị trung bình trong bảng là kết quả của các thí nghiệm được lặp lại 03 lần; các số liệu trên cùng một cột có các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa với độ tin cậy là 95% ($p < 0.05$)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Hàm lượng ethanol đạt được sau lên men khi sử dụng các chủng nấm men phân lập cho kết quả tương đối tốt so với kết quả từ nghiên cứu của V. V. Nguyen và Nguyen (2018) khi lên men rượu vang dâu Hạ Châu với chủng CB1.1 và lượng ethanol thu được ở mức 12.71% (v/v). Nghiên cứu lên men rượu vang từ dưa hấu của Ngo, Ly, và Huynh (2011) với chủng nấm men Y04 cho hàm lượng ethanol đạt 12.00% (v/v). Hàm lượng ethanol sinh ra các từ quá trình lên men khác nhau phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu lên men, dòng nấm men và môi trường lên men (Jackisch, 1985).

Hàm lượng ethanol là một tiêu chí quan trọng để đánh giá khả năng lên men. Bên cạnh đó, chất lượng của rượu vang quả còn được thể hiện qua chất lượng cảm quan sau lên men. Rượu trong, có mùi hòa hợp, vị đặc trưng cho sản phẩm và hiệu quả tốt, êm dịu cũng là một tiêu chí khá quan trọng để đánh giá sản phẩm rượu vang. Với kết quả trình bày ở Bảng 3, chủng FBY002 cho sản phẩm rượu vang có lượng ethanol đạt giá trị cao nhất (13.61% v/v) và khác biệt không có ý nghĩa so với chủng nấm men FBY009 (12.71% v/v). Tuy nhiên, với kết quả cảm quan được thể hiện ở Hình 1 thì rượu vang được lên men với chủng FBY002 có vị hơi đắng và mùi thơm chưa hài hòa, không đặc trưng cho sản phẩm nên điểm cảm quan về ý thích chỉ đạt 3.0/5 điểm, mùi và vị chỉ đạt mức điểm tương ứng ở mức 3.5/5 và 3.3/5. Rượu vang lên men từ chủng FBY009 được đánh giá cao hơn với sự hài hòa về mùi (4.8/5) và vị (4.9/5) nên điểm ý thích gần như đạt mức tối đa là 4.9/5. Cả hai sản phẩm có hàm lượng ethanol khá cao nên độ trong và màu sắc được đánh giá tốt, cùng đạt điểm 5/5. Như vậy, dòng FBY009 được tuyển chọn để ứng dụng trong lên men để sản xuất rượu vang từ mãng cầu xiêm.



Hình 1. Biểu đồ cảm quan rượu mãng cầu xiêm của 11 dòng nấm men

3.3. Các yếu tố tác động ý nghĩa đến quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm

Chủng FBY009 có hoạt tính lên men cao và có độ cảm quan tốt nhất nên được chọn để thực hiện thử nghiệm này. Dựa trên đề xuất của phần mềm Design Expert 7.0, các nghiệm thức lên men được thực hiện để ghi nhận hàm lượng ethanol (Bảng 4). Các nhân tố có tác động đến lượng ethanol sinh ra được xử lý thống kê dựa trên mô hình PBD. Kết quả tổng hợp ở Bảng 5 cho thấy mô hình thử nghiệm có ý nghĩa thống kê (giá trị p-value là 0.0007) với CV% chỉ ở mức 4.99%. Trong 06 nhân tố khảo sát thì có 02 nhân tố có tác động ý nghĩa đến quá trình lên men là độ Brix và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với giá trị p-value tương ứng là < 0.0001 và 0.0032. Giá trị R^2 của mô hình ở mức 0.975 cho thấy mô hình thử nghiệm có độ tin cậy cao.

Bảng 4

Các nhân tố tác động đến quá trình lên men theo mô hình Placket-Burman Design

Mật số (Tb/mL)	Brix	pH	Peptone (g/L)	Yeast extract (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	pH sau	Brix sau	Ethanol (% v/v)
10 ⁴	18	4	0	0	0.03	3.83	7.83	7.28
10 ⁴	18	6	0	6	3.0	4.15	7.0	9.29
10 ⁷	18	6	6	6	0.03	4.48	6.8	6.99
10 ⁴	25	4	6	6	0.03	3.82	8.0	11.99
10 ⁴	18	4	6	0	3.0	3.58	6.67	8.91
10 ⁴	25	6	6	0	0.03	4.30	9.33	10.78
10 ⁴	25	6	0	6	3.0	4.39	9.0	12.45
10 ⁷	25	4	6	6	3.0	3.76	8.83	12.86
10 ⁷	25	6	0	0	0.03	4.69	15.0	10.98
10 ⁷	25	4	0	0	3.0	3.42	12.0	11.72
10 ⁷	18	6	6	0	3.0	4.61	8.0	8.99
10 ⁷	18	4	0	6	0.03	3.95	6.0	7.10

Ghi chú: Giá trị trung bình trong bảng là kết quả của các thí nghiệm được lặp lại 03 lần

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Bảng 5

Xử lý thống kê dựa trên mô hình PBD

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	P-value
Model	48.96	6	8.16	33.11	0.0007
A-Cell	0.35	1	0.35	1.43	0.2853
B-Brix	41.13	1	41.13	166.89	< 0.0001
C-pH	0.013	1	0.013	0.053	0.8267
D-Pepton	0.24	1	0.24	0.97	0.3709
E-Yeast extract	0.34	1	0.34	1.39	0.2909
F-(NH ₄) ₂ SO ₄	6.89	1	6.89	27.94	0.0032
Residual	1.23	5	0.25		
Cor Total	50.20	11			
Std. Dev.	0.50			R ²	0.9755
Mean	9.95			Adj R ²	0.9460
C.V. %	4.99			Pred R ²	0.8586

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Nấm men được biết là có khả năng sử dụng nhiều loại hợp chất chứa nitơ làm nguồn nitơ duy nhất và cũng có thể đồng hóa nitơ từ các nguồn khác nhau, chẳng hạn như amonium, urea, allantoin hoặc acid amin. Lượng rượu cao hơn được hình thành phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó có liên quan đến hàm lượng nitơ ban đầu của môi trường lên men (Ferreira, Barbosa, Falco, Leão, & Faia, 2009). Trong 02 nhân tố có tác động ý nghĩa thì nhân tố (NH₄)₂SO₄ chủ yếu cung cấp nguồn nitơ để thực hiện quá trình lên men. Hàm lượng nitơ được cho là có liên quan đến quá trình lên men rượu chậm hay thậm chí là bị dừng lại. Nguyên nhân được cho là, khi môi trường

bị cạn kiệt nitơ, hoạt động vận chuyển đường đã giảm đáng kể dẫn đến hoạt động lên men cũng bị giảm (Salmon, Vincent, Mauricio, Bely, & Barre, 1993). Ngoài những vấn đề này, nồng độ nitơ cũng có tác động đến sự hình thành một số sản phẩm phụ như acid béo, rượu bậc cao (Ferreira & ctg., 2009) và ester (Torrea, Fraile, Garde, & Ancín, 2003). Bên cạnh đó, cũng ảnh hưởng đến các đặc tính hóa học và cảm quan của rượu (Gump, Zoecklein, Fugelsang, & Whiton, 2002). Ngoài nhân tố $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thì độ Brix cũng có vai trò khá quan trọng, được sử dụng trong các quá trình lên men sản xuất rượu vang. Độ Brix được xem là đại diện cho nguồn cung cấp carbon để nấm men sử dụng và thực hiện các quá trình chuyển hóa để tạo thành rượu nên hàm lượng ethanol sinh ra sẽ bị ảnh hưởng bởi lượng đường ban đầu có trong môi trường lên men (Attri, 2009).

3.4. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu vang

Kết quả thí nghiệm tối ưu hóa hai nhân tố được chọn là độ Brix và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ theo mô hình tối ưu CCD được tổng hợp ở Bảng 6. Độ Brix của các nghiệm thức đều giảm, Brix giảm mạnh nhất ở nghiệm thức 5, 3 và 1. Mặc dù độ Brix ở các nghiệm thức giảm mạnh nhưng chỉ có hàm lượng ethanol ở nghiệm thức 11 cao nhất (12.84% v/v). Ở các nghiệm thức 9, 10, 11 và 12, hàm lượng ethanol lần lượt là 12.18%, 12.09%, 12.84% và 12.09% v/v nhưng độ Brix giảm không mạnh (khoảng 9 - 17°Brix). Kết quả thống kê cho thấy độ Brix bằng 26.50°Brix và hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng 1.50g/L sẽ cho hàm lượng ethanol cao nhất (nghiệm thức 9, 10, 11 và 12). Tuy nhiên, ở nghiệm thức 13 cũng có độ Brix và hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng các nghiệm thức trên nhưng độ cồn chỉ đạt 10.77% v/v. So với nghiệm thức có hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.50g/L và 35°Brix, cho hàm lượng ethanol thấp nhất (4.3% v/v), là do lượng đường thích hợp trong dịch quả để chế biến vang là 20 - 25°Brix, dòng nấm men không hoạt động tốt trong điều kiện Brix cao dẫn đến lượng đường sót lại cao làm ức chế quá trình hình thành rượu. Tương tự, các nghiệm thức có độ Brix trên 30°Brix (nghiệm thức 2, 4 và 6) cho lượng ethanol thấp hơn các nghiệm thức với độ Brix thấp hơn 30°Brix.

Bảng 6

Kết quả tối ưu hóa các nhân tố tác động dựa trên mô hình tối ưu CCD

Nghiệm thức	Độ Brix (°Brix)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	pH	Brix (°Brix)	Ethanol (% v/v)
1	20.49	0.44	4.33 ^a	8.5 ^{abc}	12.01 ^{ab}
8	26.50	3.00	3.79 ^f	9.0 ^{abc}	11.79 ^{ab}
6	35.00	1.50	4.01 ^d	28.0 ^g	4.3 ^h
3	20.49	2.56	3.93 ^e	6.8 ^{ab}	10.44 ^{cd}
13	26.50	1.50	3.64 ^h	11.0 ^c	10.77 ^{bc}
5	18.00	1.50	4.1 ^c	6.0 ^a	8.68 ^{fg}
11	26.50	1.50	3.7 ^{gh}	11.0 ^c	12.84 ^a
10	26.50	1.50	3.68 ^h	10.0 ^{bc}	12.09 ^a
9	26.50	1.50	3.76 ^{fg}	9 ^{abc}	12.18 ^a
12	26.50	1.50	3.76 ^{fg}	14.0 ^d	12.09 ^a
7	26.50	0.00	4.19 ^b	19.5 ^{df}	11.87 ^{ab}
4	32.51	2.56	4.19 ^b	21.5 ^f	9.47 ^{df}
2	32.51	0.44	4.25 ^b	17.3 ^d	8.22 ^g

Ghi chú: Giá trị trung bình trong bảng là kết quả của các thí nghiệm được lặp lại 03 lần; các số liệu trên cùng một cột có các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa với độ tin cậy là 95% ($p < 0.05$)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

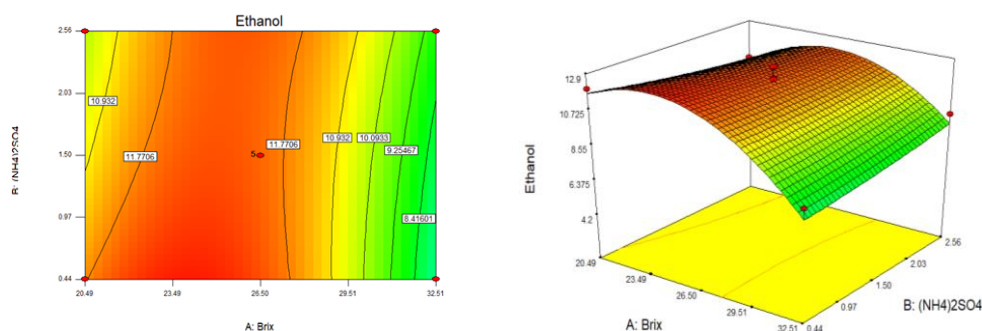
Dựa vào kết quả thống kê theo mô hình CCD ở Bảng 7, có thể thấy rằng các nhân tố thử nghiệm chọn đều tác động ý nghĩa đến quá trình hình thành ethanol của rượu vang mãng cầu xiêm với giá trị p-value ở mức 0.0004 và hệ số biến động CV là 7.24%. Trong đó, nhân tố độ Brix tác động có ý nghĩa nhất đối với quá trình tối ưu hóa với giá trị p-value = 0.0014. Giá trị $R^2 = 0.9396$ cho thấy mô hình thống kê có độ tin cậy cao.

Bảng 7

Kết quả xử lý thống kê dựa trên mô hình CCD

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Value	P-value	
Model	63.20	5	12.64	21.79	0.0004	significant
A-Brix	15.00	1	15.00	25.86	0.0014	
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	0.023	1	0.023	0.040	0.8464	
AB	1.99	1	1.99	3.43	0.1066	
A ²	44.64	1	44.64	76.96	< 0.0001	
B ²	0.13	1	0.13	0.22	0.6502	
Residual	4.06	7	0.58			
Lack of Fit	1.79	3	0.60	1.06	0.4606	not significant
Pure Error	2.27	4	0.57			
Cor Total	67.26	12				
Std. Dev.	0.76			R ²	0.9396	
Mean	10.52			Adj R ²	0.8965	
C.V. %	7.24			Pred R ²	0.7577	

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu



Hình 2. Sự tác động giữa Brix và (NH₄)₂SO₄ đến sự hình thành ethanol

3.5. Thử nghiệm xác nhận các điều kiện tối ưu

Từ 30 nghiệm thức được thiết kế sẵn, 03 nghiệm thức được chọn gồm nghiệm thức số 1, 10 và 30, đây là những nghiệm thức có lượng ethanol sinh ra cao nhất để xác nhận kết quả tối ưu hóa (Bảng 8). Hàm lượng ethanol thực tế và lý thuyết với sự khác biệt không đáng kể với khoảng chênh lệch chỉ ở mức 0.17 - 0.56%. Nghiệm thức 10 (ethanol lý thuyết 12.38% v/v, ethanol thực tế 11.64% v/v) có hàm lượng ethanol thực tế thấp hơn hàm lượng ethanol lý thuyết. Nghiệm thức 5 và 30 có hàm lượng ethanol thực tế cao hơn hàm lượng ethanol dự đoán của mô hình CCD. Từ kết quả thực tế cho thấy dự đoán của mô hình với các nghiệm thức đề xuất có độ tin cậy để có thể áp dụng trong nghiên cứu tối ưu hóa quá trình lên men sản xuất rượu vang từ mãng cầu xiêm. Cuối cùng, nghiệm thức tối ưu nhất được lựa chọn là nghiệm thức 5 với hàm lượng (NH₄)₂SO₄ được xác định là 0.96g/L và độ Brix là 23.77°Brix.

Bảng 8

Hàm lượng ethanol theo CCD và thực tế sau 07 ngày lên men

Nghiem thức	Độ Brix (°Brix)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Ethanol lý thuyết (% v/v)	Ethanol thực tế (% v/v)
5	23.77	0.96	12.32	12.88
10	24.02	0.87	12.38	11.64
30	24.29	0.85	12.40	12.57

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

4. Kết luận

Dịch quả mãng cầu xiêm được bổ sung enzyme pectinase với nồng độ 0.3% trong 01 giờ và chủng nấm men FBY009 được chọn do có khả năng lên men cho sản phẩm rượu vang mãng cầu xiêm có cảm quan thích hợp. Nghiên cứu đã xác định được hai nhân tố có tác động ý nghĩa đến quá trình lên men là Brix và (NH₄)₂SO₄. Kết quả tối ưu hóa thông qua mô hình CCD đã xác định các thông số tối ưu cho quy trình lên men sản xuất rượu vang mãng cầu xiêm với dịch quả được điều chỉnh 23.77°Brix và bổ sung 0.96g/L (NH₄)₂SO₄. Sản phẩm rượu vang có hàm lượng ethanol đạt 12.88% v/v. Kết quả nghiên cứu có thể ứng dụng để góp phần phát triển đa dạng hóa các sản phẩm rượu vang, đặc biệt là từ các nguồn trái cây ở vùng Đồng bằng Sông Cửu Long.

Tài liệu tham khảo

- Attri, B. L. (2009). Effect of initial sugar concentration on the physico-chemical characteristics and sensory qualities of cashew apple wine. *Natural Product Radiance*, 8(4), 374-379.
- Ferreira, A. M., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C., & Faia, A. M. (2009). Hydrogen sulphide and other aroma compounds production by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(4), 571-583.
- Gump, B. H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., & Whiton, R. S. (2002). Comparison of analytical methods for prediction of prefermentation nutritional status of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(4), 325-329.
- Jackisch, P. (1985). *Modern winemaking*. New York, NY: Cornell University Press.
- Jacob, N. (2009). Pectinolytic enzymes. In P. S. Nigam & A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for Agro-industrial Residues utilization* (pp. 383-396). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Lanzarini, G., & Pifferi, P. G. (1989). Enzymes in the fruit juice industry. In C. Cantarelli & G. Lanzarini (Eds.), *Biotechnology application in beverage production* (pp. 189-222). Essex, UK: Elsevier Science Publishers Ltd.
- Lima, M. A. C. D., & Alves, R. E. (2011). Soursop (*Annona muricata* L.). In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 363-392). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Limtong, S., Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated. *Kluyveromyces marxianus*, *Bioresources Technology*, 98(17), 3367-3374.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

- Ngo, D. T. P., Ly, H. H. L., & Huynh, P. X. (2011). Phân lập, tuyển chọn nấm men và xác định điều kiện ảnh hưởng quy trình lên men rượu vang dưa hấu [Isolation, selection of yeasts and determination of factors affecting watermelon wine fermentation]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 18(b), 137-145.
- Nguyen, H. T. T., Tran, T. M., & Nguyen, H. T. (2019). Ảnh hưởng của xử lý enzyme và chế độ thanh trùng đến chất lượng sản phẩm nước ép dưa lưới [Effects of pectic enzymes and pasteurization on melon (*Cucumis melo* L.) juice quality]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(2), 241-249.
- Nguyen, N. T. M., & Truong, T. T. C. (2006). Nghiên cứu xử lý dịch ép một số loại trái cây Việt Nam [Study on the treatment conditions for juice production from fruits in Vietnam]. *Tạp chí Hoạt động khoa học*, 3, 38-39.
- Nguyen, P. N. M., Ly, B. N., Chau, A. T. D., & Che, H. V. (2011). Tác động enzyme pectinase đến khả năng trích ly dịch quả và các điều kiện lên men đến chất lượng rượu vang xoài sau thời gian lên men chính [Effect of pectinase enzyme treatment to juice yield and fermentation conditions to the quality of mango wine (*Mangifera indica*)]. *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ*, 20(a), 127-136.
- Nguyen, V. V., & Nguyen, T. V. (2018). Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang dâu hạ châu (*Baccaurea ramiflora* L.) [Isolation, selection and identification of yeast strain for *Baccaurea ramiflora* wine fermentation]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(7), 22-32.
- Pinto, A. D. Q., Cordeiro, M. C. R., Andrade, S. R. M. D., Ferreira, F. R., Filgueiras, H. D. C., Alves, R. E., & Kinpara, D. I. (2005). *Annona species*. Southampton, UK: International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton.
- Salmon, J. M., Vincent, O., Mauricio, J. C., Bely, M., & Barre, P. (1993). Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(1), 56-64.
- Téllez, A. V. C., González, E. M., Yahia, E. M., & Vázquez, E. N. O. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662-691.
- Torrea, D., Fraile, P., Garde, T., & Ancín, C. (2003). Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control*, 14(8), 565-571.
- Vietnam Ministry of Science and Technology. (1979). *Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3217:79: Đánh giá cảm quan - Phương pháp cho điểm* [Vietnam National Standard 3217:79: Sensory analysis - Methodology test by means of marking]. Hanoi, Vietnam: Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Vietnam Ministry of Science and Technology. (2013). *Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7045:2013 về Rượu vang* [Vietnam National Standard 7045:2013 - Wine]. Hanoi, Vietnam: Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

