

TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH LÊN MEN NƯỚC GIẢI KHÁT CIDER DÂU BẰNG PHƯƠNG PHÁP BỀ MẶT ĐÁP ỨNG BỐN YẾU TỐ OPTIMIZING FERMENTATION BEVERAGE CIDER STRAWBERRY BY FOUR-FACTORS RESPONSE SURFACE

Bùi Văn Tú

Trường Đại học Sao Đỏ

Tóm tắt

Cider là đồ uống có cồn được lên men từ các dịch ép trái cây, thường là từ nguyên liệu táo và có độ cồn 4,0-6,0%. Mục đích của nghiên cứu này là tìm các điều kiện tối ưu của quá trình lên men dịch ép dâu (Morus Alba.L) bằng chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Quả dâu được lựa chọn, xử lý bằng enzyme pectinase (0,25g/l) trước khi thực hiện quá trình thanh trùng bằng phương pháp sunfit hóa (30mg/l SO₂) và lên men trong điều kiện nhiệt phòng (25±1°C). Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình toán thể hiện mối quan hệ của hai hàm mục tiêu là điểm chất lượng cảm quan (Y₁), độ cồn (Y₂) với các biến: Z₁- độ Bx (18÷24 °Bx); Z₂- tỷ lệ nấm men (200÷400 mg/l); Z₃- pH của dịch lên men (3,0÷5,0); Z₄-Thời gian lên men (3÷5 ngày). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trực tâm quay (Rotatable Central Composite Design) và ma trận thí nghiệm được xây dựng và phân tích bằng phần mềm Design Expert 11.0. Kết quả đã xác định được các giá trị tối ưu để thực hiện quá trình lên men như sau: Độ Bx của dịch lên men, 23,4; Tỷ lệ nấm men, 353,6mg/l; pH, 4,1; Thời gian, 4,4 (ngày). Độ cồn thu được ở thí nghiệm tối ưu là 6,0. Sản phẩm nước cider dâu được hội đồng đánh giá cảm quan theo thang điểm 20, hệ số quan trọng 4 đánh giá được 18,9 điểm, đạt loại tốt.

Từ khóa: cider; dâu tằm; nấm men; pectinase.

Astract

Cider is an alcoholic beverage fermented from fruit juices, usually from apple ingredients and has an alcohol content of 4.0-6.0%. The purpose of this study was to find the optimal conditions for fermentation of mulberry juice (*Morus Alba.L*) with *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain. Strawberry was selected, treated with pectinase enzyme (0.25 g/l) before the pasteurization process by sulphization (30mg/l SO₂) and fermented under room temperature (25±1°C). The study has built a mathematical model showing a new relationship of two objective functions: sensory quality score (Y₁), alcohol content (Y₂) with variables: Z₁-degree Bx (15 ÷ 24°Bx); Z₂ - rate of yeast (200 ÷ 400 mg/l); Z₃- pH of fermentation (3.0 ÷ 5.0); Z₄-Time of fermentation (3 ÷ 5 days). The experiment is arranged in a rotating center (Rotatable Central Composite Design) and a test matrix is built and analyzed by Design Expert 11.0 software. The results have determined the optimal values to carry out the fermentation process as follows: Degree Bx of fermentation, 23.4; Rate of yeast, 353,6mg/l; pH, 4.1; Time, 4.4 (days). The alcohol content obtained at the optimum experiment was 6.0. Strawberry water cider products are rated by the sensory council on the scale of 20, the important factor 4 is rated at 18.9 points, achieving good grades.

Keywords: cider; *Morus alba L.*; *Saccharomyces cerevisiae*; pectinase.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là một nước nhiệt đới có nền nông nghiệp phát triển. Trong những năm gần đây, nhu cầu về đồ uống có cồn từ trái cây ở nước ta ngày một tăng cao. Để giải quyết vấn đề đầu ra cho một số mặt hàng nông sản cũng như đáp ứng nhu cầu đa dạng hóa sản phẩm đồ uống trên thị trường thì định hướng ưu tiên nghiên cứu các sản phẩm đồ uống từ nguồn nguyên liệu sẵn có ở Việt Nam là cần thiết. Sản phẩm nước quả lên men có độ cồn thấp là một sản phẩm mới có giá trị dinh dưỡng cao đồng thời có lợi cho sức khỏe. Sản phẩm này hiện đang là một loại đồ uống giải khát rất được ưa chuộng trên thị trường thế giới, đặc biệt là các

nước Anh, Pháp, Mỹ. Người tiêu dùng yêu thích sản phẩm này không chỉ bởi có giá trị dinh dưỡng của nó mà nó còn là một loại đồ uống giá rẻ, thích hợp với mọi lứa tuổi, đặc biệt là phụ nữ và trẻ em. Hàm lượng cồn không cao trong sản phẩm tạo nên sự kích thích tiêu hóa, khiến bữa ăn trở nên ngon miệng mà không gây say như một số sản phẩm đồ uống có cồn khác.

Chi Morus bao gồm 150 loài, trong đó *Morus alba L.* là một loài chiếm ưu thế (Srivastava et al., 2006) [6]. Quả dâu chứa nhiều chất dinh dưỡng như vitamin, amino acid và nhiều khoáng chất, các chất sinh học, anthocyanins, rutin, quercetin, chlorogenic acid, và

polysaccharides. Đỗ Tất Lợi (2004) quả dâu có chứa 84,71% nước; 9,19% đường; 1,80% acid; 0,36% protit, tanin, vitamin C, caroten. Trong acid có acid malic, acid succinic. Trong đường có glucoza, fructoza [A3]. Ercisli and Orhan (2007) đã báo cáo về chất phenolics, tổng flavonoids và ascorbic acid trong quả dâu tươi tương ứng là 181 mg/100 g, 29 mg/100 g (Bae and Suh, 2007; Zadernowski et al., 2005) [2] [9]. Quả dâu là một loại trái cây ăn được truyền thống của Việt Nam. Quả dâu được dùng hiệu quả trong việc chữa sốt, bảo vệ gan từ tổn thương, tăng cường các khớp, lợi tiểu và hạ huyết áp. Quả dâu tằm giàu anthocyanins và ancaloit, có tính chất dược lý, chẳng hạn như chất chống oxy hóa, chống tiểu đường, chống xơ vữa động mạch, chống béo phì, và các hoạt động hepatoprotective [3]. Anthocyanin trong quả dâu tằm (MAE) có những lợi ích tiềm năng về bảo vệ tế bào gan chống lại stress oxy hóa trong quá trình tăng đường huyết trong các tế bào HepG2 và cải thiện rối loạn chức năng ở chuột bị tiểu đường [4]. Trong thời gian gần đây, sản phẩm từ quả dâu chiếm một vị trí quan trọng trong thị trường nước giải khát. Các nghiên cứu cho thấy quả dâu có tác dụng đáng kể trong việc chống oxy hóa, làm giảm mức độ LDL, trì hoãn lão hóa và làm đẹp da (Halliwell, 1992; Tomoyuki et al., 2006; Wang et al., 2011) [5] [7] [8].

Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) là phương pháp thống kê sử dụng dữ liệu định lượng dựa trên việc thu thập đầy đủ số liệu thí nghiệm để xác định đồng thời mức độ ảnh hưởng của các yếu tố và phản ánh bằng phương trình đa biến. Phương pháp này đã được sử dụng rộng rãi để tối ưu hóa trong lĩnh vực hóa học và sinh học, thực phẩm và các quá trình khác. Trong nghiên cứu này, quả dâu được sử dụng để thực hiện quá trình lên men cider. Chúng tôi xác định bốn các yếu tố cụ thể là độ Bx, tỷ lệ nấm men, pH, thời gian lên men theo phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để đạt được điều kiện lên men tối ưu.

2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1. Quả dâu: Tên khoa học là *Morus Alba.L.* Họ: *Moraceae*. Bộ: *Rosales*. Lớp: Thực vật hai lá mầm. Ngành: Thực vật hạt kín. Chi: *Morus*. Tên tiếng Anh: *White mulberry*. Tên gọi khác: dâu ta, dâu trắng, dâu cang. Nguyên liệu dâu tằm được thu mua tại Nam Sách - Hải Dương, quả dâu được lựa chọn, loại bỏ những quả dập nát, hư hỏng, không đồng nhất. Quả dâu

được rửa dưới vòi nước và đem đi cấp đông ở -25°C đến khi sử dụng.



Hình 1. Nguyên liệu quả dâu (*Morus Alba.L.*)

2.2. Đường saccharose: Đường được sử dụng là đường kính của công ty cổ phần mía đường Biên Hòa. Địa chỉ: Khu công nghiệp Biên Hòa 1, phường An Bình, Thành phố Biên Hòa, Tỉnh Đồng Nai. Đảm bảo tiêu chuẩn TCVN 6958:2001. Tinh thể màu trắng, kích thước đồng đều, tơi khô không vón cục, không có mùi vị lạ.

2.3. Nước: Sử dụng nước ở xưởng nước khoa Thực phẩm và Hóa học, trường Đại học Sao Đỏ. Đạt QCVN 6-1:2010/BYT đối với nước khoáng thiên nhiên và nước khoáng đóng chai.

2.4. Rượu: Sản xuất tại công ty cổ phần Cồn Rượu Hà Nội. Địa chỉ: 94 Lò Đúc, Phạm Đình Hồ, Hai Bà Trưng, Hà Nội. Đảm bảo theo QCVN 6-3:2010/BYT.

2.5. Môi trường đệm: $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ Dung dịch được pha theo TCVN 4320-86, đủ điều kiện dùng trong thực phẩm.

2.6. Enzyme pectinase: Sử dụng enzyme *pectinase* do tập đoàn Angel cung cấp. Hoạt tính của chế phẩm 4.000 đơn vị polygalacturonase/mL. Phạm vi hoạt động từ pH đến 3,0 đến 5,0; pH tối ưu là từ pH 3,5 đến 4,0. Nhiệt độ hiệu dụng từ 25 đến 65°C, phạm vi nhiệt độ tối ưu là từ 40 đến 55°C.



Hình 2. Enzyme pectinase

2.7. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae*: Sử dụng nấm men khô của tập đoàn Angel, loại men RV100.



Hình 3. Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thiết kế thí nghiệm xác định tỷ lệ nấm men

Nguyên liệu dâu đem đi phân loại nhằm loại bỏ cành, lá, quả hư hỏng. Sau đó rửa 2-3 lần bằng nước sạch, để ráo 5 phút. Bổ sung 0,25g/l enzyme pectinase, đem đi ủ ở 40°C trong 60 phút. Thu dịch bằng phương pháp ép, phối đường Saccharose để dịch lên men có độ Bx là 22°. Thanh trùng dịch lên men bằng natri metabisunfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) trong thời gian khoảng 2 giờ nhằm ức chế và tiêu diệt các vi sinh vật không có lợi cho quá trình lên men rượu (nồng độ 30mg/l tính theo SO_2). Đồng thời chống oxy hóa các chất anthocyanin. Để xác định tỷ lệ nấm men bổ sung tiến hành 5 thí nghiệm ở các nồng độ 100, 200, 300, 400, 500 mg/l (tương ứng với nồng độ tế bào nấm men là 10^5 , 2.10^5 , 3.10^5 , 4.10^5 , 5.10^5 tế bào/ml). Lên men ở nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, trong 4 ngày. Lắng, lọc nhằm loại bỏ sinh khối nấm men, tiến hành xác định độ cồn và đánh giá chất lượng cảm quan.

3.2. Thiết kế thí nghiệm xác định tỷ lệ nước/dịch ép

Nguyên liệu dâu đem đi phân loại nhằm loại bỏ cành, lá, quả hư hỏng. Sau đó rửa 2÷3 lần bằng nước sạch, để ráo 5 phút. Bổ sung nước theo tỉ lệ (v/v): 1/1,6, 1/1,8, 1/2,0, 1/2,2 trong mỗi lần thí nghiệm. Bổ sung 0,25g/l enzyme pectinase, đem đi ủ ở 40°C trong 60 phút. Thu dịch bằng phương pháp ép, phối đường Saccharose để dịch lên men có độ Bx là 22°. Thanh trùng dịch

lên men bằng natri metabisunfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) trong thời gian khoảng 2 giờ nhằm ức chế và tiêu diệt các vi sinh vật không có lợi cho quá trình lên men rượu (nồng độ 30mg/l tính theo SO_2). Bổ sung nấm men ở tỷ lệ tối ưu. Lên men ở nhiệt độ $28 \div 30^\circ\text{C}$, trong 4 ngày. Lắng, lọc nhằm loại bỏ sinh khối nấm men, tiến hành xác định độ cồn và đánh giá chất lượng cảm quan.

3.3. Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện lên men

Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology) được lựa chọn để tối ưu hóa điều kiện lên men. Bốn thông số quan trọng của quá trình chiết được nghiên cứu bao gồm: Z₁- độ Bx của dịch lên men: $18 \div 24$ °Bx; Z₂- tỷ lệ nấm men: 200÷400 mg/l; Z₃- pH của dịch lên men: 3,0÷5,0; Z₄-Thời gian lên men: 3÷5 ngày. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trục tâm quay (Rotatable Central Composite Design) và ma trận thí nghiệm được xây dựng bằng phần mềm Design Expert 11.0. Trong các nghiên cứu thăm dò, chúng tôi đã xác định được giá trị biên của các nhân tố chiết như trình bày trong bảng 1. Trong số 27 thí nghiệm được tiến hành (Bảng 4), 16(2⁴) thí nghiệm ở hai mức (trên và dưới), 8 (2 × 4) thí nghiệm ở điểm sao và 3 thí nghiệm ở tâm. Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba lần và lấy kết quả trung bình. Mô hình toán học mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập đối với biến phụ thuộc có dạng hàm đa thức bậc hai có dạng tổng quát như sau:

$$Y_k = B_0 + \sum_{j=1}^4 B_j X_j + \sum_{i,j=1}^4 B_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^4 B_{ij} B_j^2$$

Trong đó:

Y_k : Biến phụ thuộc ($k = 1 \div 4$)

$X_{i,j}$: Nhân tố mã hóa của biến độc lập ảnh hưởng đến Y_k

B_0 : Hệ số hồi qui bậc 0

B_j : Hệ số hồi qui bậc 1 mô tả ảnh hưởng của biến X_j đến Y_k

B_{ij} : Hệ số ảnh hưởng đồng thời của biến X_i và X_j đến Y_k

B_{ij} : Hệ số hồi qui bậc hai mô tả ảnh hưởng của biến X_{2j} đến Y_k

Bảng 1. Ma trận bố trí thí nghiệm mã hóa các biến độc lập

Tên biến	Mức nghiên cứu					
Biến thực	Biến mã	- α	- 1	0	+ 1	+ α
Z1: Độ Bx	x_1	15	18	21	24	27
Z2: Tỷ lệ nấm men (mg/l)	x_2	100	200	300	400	500
Z3: pH lên men	x_3	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Z4: Thời gian lên men (ngày)	x_4	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0

Ghi chú: $\alpha = 2$, x_{max} , x_{min} là giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập, $x_0 = (x_{min} + x_{max})/2$ là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.

3.4. Các phương pháp phân tích, đánh giá:

Xác định hàm lượng axit tổng số bằng phương pháp chuẩn độ; Xác hàm lượng đường tổng số bằng phương pháp Bertrand; Xác hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl; Xác hàm lượng etanol bằng phương pháp chưng cất; Phương pháp xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, tổng coliform bằng phương pháp đổ đĩa.

Đánh giá cảm quan theo TCVN 3215- 79: Tiêu chuẩn sử dụng hệ 20 điểm xây dựng trên một thang thống nhất có 6 bậc (từ 0-5) và điểm 5 là điểm cao nhất cho một chỉ tiêu. Các chỉ tiêu được lựa chọn là Màu sắc (hệ số quan trọng 1,2), mùi (hệ số quan trọng 1,0), vị (hệ số quan trọng 1,0), trạng thái (hệ số quan trọng 0,8).

3.5. Thiết bị phục vụ nghiên cứu

Thiết bị phân tích: Brix kế; Máy đo pH; Tủ ẩm; Nồi thanh trùng; Kính hiển vi điện tử; Nhiệt kế; Thiết bị lên men:



Hình 4. Thiết bị lên men yếm khí

Hệ thống được thiết kế đảm bảo về độ kín nhờ gioăng cao su (2). Khí vô trùng được nạp vào thông qua bộ phận khử trùng (3) và được bơm đẩy vào hệ thống. Trước mỗi mẻ lên men, thiết bị được khử trùng thông qua bộ sục hơi nước nóng. Việc bơm dịch lên men vào thiết bị được thực hiện thông qua bơm HF8367 (5) để đảm bảo dịch lên men không bị tạp nhiễm bởi dụng cụ chứa đựng và không khí chứa vi sinh vật. Quá trình lên men yếm khí bởi nấm men có lượng khí CO₂ thoát ra nhiều, lượng khí này cần được thoát ra một cách tự động để đảm bảo tính liên tục nhờ van khóa khí tự động (1). Quá trình này khắc phục được sự lây nhiễm bởi nấm mốc, vi khuẩn. Hệ thống được thiết kế van lấy mẫu (4) để kiểm tra chất lượng sản phẩm.

3.6. Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPSS 20.0 (SPSS Inc.) để phân tích ANOVA, thiết kế, xử lý và tối ưu hóa dữ liệu thống kê được thực hiện trên phần mềm Design Expert 11.0 (Stat-Ease, Inc.)

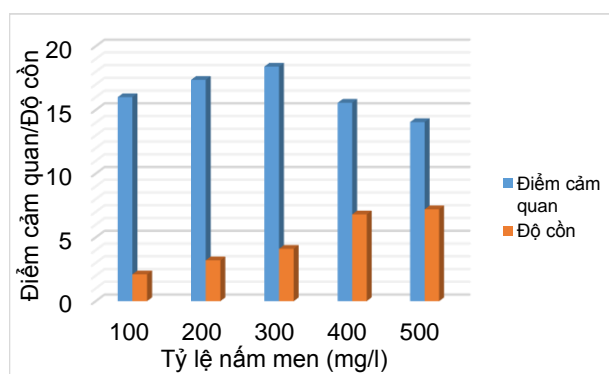
4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả xác định tỷ lệ nấm men

Kết quả xác định tỷ lệ nấm men bổ sung được trình bày tại bảng 2 và hình 5.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu xác định tỷ lệ nấm men bổ sung

Tỷ lệ nấm men (mg/l)	Điểm cảm quan	Độ cồn (%v/v)
100	16,00	2,1
200	17,36	3,2
300	18,40	4,1
400	15,56	6,8
500	14,04	7,2



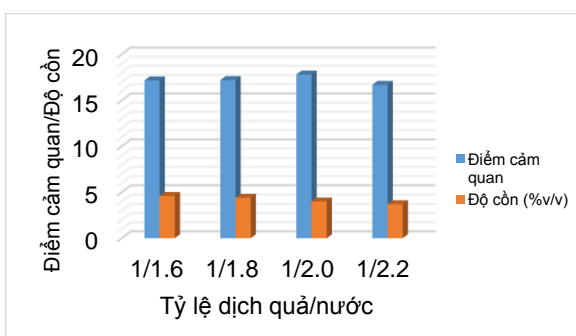
Hình 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men đến chất lượng cảm quan và độ cồn

Ở các thí nghiệm thực hiện bổ sung 100÷500mg/l nấm men và lên men ở nhiệt độ 25±1^oC, trong 4 ngày thì độ cồn tăng lên tương ứng từ 2,1÷7,2^o. Điều này có nghĩa là lượng nấm men cho vào dịch lên ảnh hưởng rất lớn đến quá trình lên men. Khi lượng nấm men bổ sung cho vào thích hợp thì quá trình lên men diễn ra tốt hơn và hiệu suất thu hồi cao, chất lượng sản phẩm tốt hơn, nếu lượng nấm men càng thấp thì thời gian lên men càng lâu, dễ bị nhiễm khuẩn ngược lại nếu lượng nấm men càng cao thì thời gian lên men càng nhanh, hạn chế được khả năng nhiễm khuẩn do sự áp đảo của nấm men. Tuy nhiên, lượng nấm men quá cao làm cho sản phẩm có mùi vị lạ, điểm chất lượng cảm quan giảm xuống dưới mức chấp nhận (ở tỷ lệ 500ml/l điểm cảm quan tương ứng là 14,04). Kết quả xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS với độ tin cậy 95% cho thấy độ cồn và điểm cảm quan ở các thí nghiệm có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($\alpha=0,05$). Vì vậy, theo khảo sát chọn tỷ lệ nấm men bổ sung thích hợp là 300mg/l.

4.2. Kết quả xác định tỷ lệ dịch quả

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu xác định tỷ lệ dịch quả/nước

Tỷ lệ dịch quả/ nước (v/v)	Điểm cảm quan	Độ cồn (%v/v)
1/1,6	17,16	4,6
1/1,8	17,20	4,4
1/2,0	17,80	4,0
1/2,2	16,68	3,7



Hình 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch quả/ nước (v/v) đến chất lượng cảm quan và độ cồn

Bảng 4. Kết quả bố trí thí nghiệm đầy đủ theo phương pháp bề mặt đáp ứng

TT	Biến mã hóa				Biến thực				Y ₁ : Điểm cảm quan	Y ₂ : Độ cồn
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Z ₁ :Độ (Bx)	Z ₂ :Tỷ lệ nấm men (mg/l)	Z ₃ :pH	Z ₄ :Thời gian (ngày)		
1	-1	-1	-1	-1	18	200	3	3	13,5	2,7
2	1	-1	-1	-1	24	200	3	3	14,1	4,1
3	-1	1	-1	-1	18	400	3	3	16,6	5,4
4	1	1	-1	-1	24	400	3	3	17,5	4,6
5	-1	-1	1	-1	18	200	5	3	14,4	4,0
6	1	-1	1	-1	24	200	5	3	17,3	5,4
7	-1	1	1	-1	18	400	5	3	17,0	5,1
8	1	1	1	-1	24	400	5	3	17,7	5,6
9	-1	-1	-1	1	18	200	3	5	16,7	5,1
10	1	-1	-1	1	24	200	3	5	17,8	5,3
11	-1	1	-1	1	18	400	3	5	18,6	5,9
12	1	1	-1	1	24	400	3	5	18,7	4,8
13	-1	-1	1	1	18	200	5	5	18,1	5,8
14	1	-1	1	1	24	200	5	5	18,5	5,8
15	-1	1	1	1	18	400	5	5	18,3	5,8

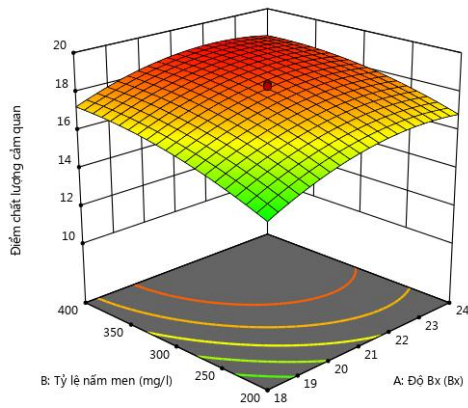
Tỷ lệ dịch quả/nước ảnh hưởng trực tiếp đến màu sắc sản phẩm đồng thời làm thay đổi nồng độ chất dinh dưỡng trong dịch lên men ảnh hưởng trực tiếp đến quá sự phát triển của nấm men. Ở tỷ lệ dịch quả/nước là 1/1,6; 1/1,8 (v/v) màu sắc của sản phẩm khá đậm tác động đến chất lượng chung. Ở tỷ lệ này tốc độ phát triển của nấm men khá tốt (tổng độ Bx là 22^o), sau 4 ngày lên men độ cồn đạt tương ứng là 4,6^o, 4,4^o. Điều này là do khi thêm ít nước vào thì nồng độ các chất dinh dưỡng còn cao, khả năng trao đổi chất ở nấm men diễn ra thuận lợi. Ở các tỷ lệ 1/2,0; 1/2,2 (v/v) nấm men vẫn phát triển tương đối tốt, độ cồn đạt được là 4,0 và 3,7^o, lúc này điểm chất lượng cảm quan đạt được tốt hơn (17,80 ở tỷ lệ 1/2,0 v/v) là do màu sắc, mùi vị phù hợp với tiêu chí chất lượng của sản phẩm.

4.3. Kết quả xác định ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình lên men

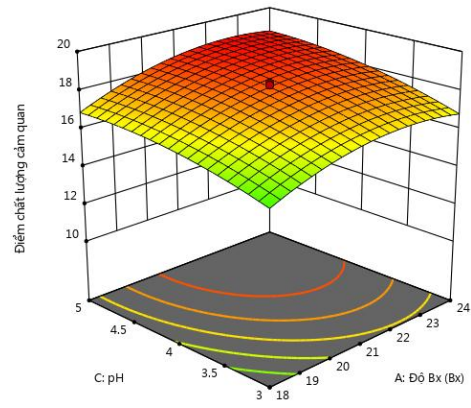
Ảnh hưởng của các nhân tố, Z₁- độ Bx của dịch lên men, Z₂- tỷ lệ nấm men, Z₃- pH của dịch lên men, Z₄-Thời gian lên men được trình bày ở bảng 4 và hình 7.

16	1	1	1	1	24	400	5	5	18,7	5,6
17*	-2	0	0	0	15	300	4	4	11,0	1,5
18*	2	0	0	0	27	300	4	4	17,0	4,8
19*	0	-2	0	0	21	100	4	4	12,5	2,6
20*	0	2	0	0	21	500	4	4	18,0	5,7
21*	0	0	-2	0	21	300	2	4	12,2	2,7
22*	0	0	2	0	21	300	6	4	18,9	5,9
23*	0	0	0	-2	21	300	4	2	17,1	5,3
24*	0	0	0	2	21	300	4	6	18,7	6,0
25 ^t	0	0	0	0	21	300	4	4	18,0	6,0
26 ^t	0	0	0	0	21	300	4	4	18,4	6,0
27 ^t	0	0	0	0	21	300	4	4	18,1	5,9
28 ^t	0	0	0	0	21	300	4	4	18,3	6,3
29 ^t	0	0	0	0	21	300	4	4	18,1	6,0
30 ^t	0	0	0	0	21	300	4	4	18,3	5,9

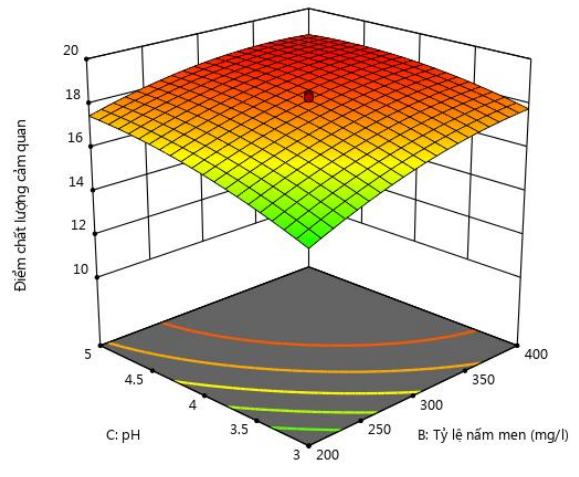
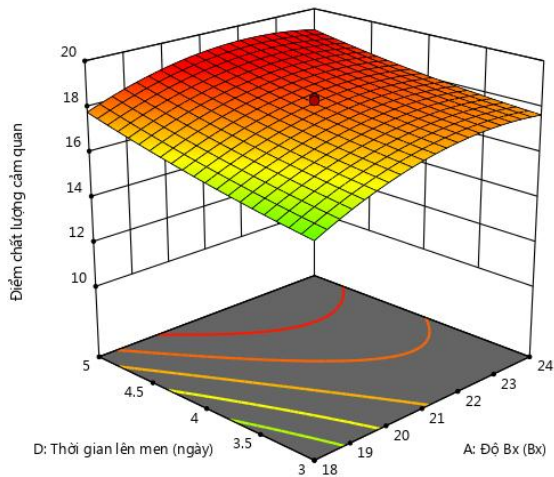
Ghi chú: (*) thí nghiệm được tiến hành ở điểm sao; (t) thí nghiệm được tiến hành ở điểm tâm.



Actual Factors
C: pH = 4
D: Thời gian lên men = 4

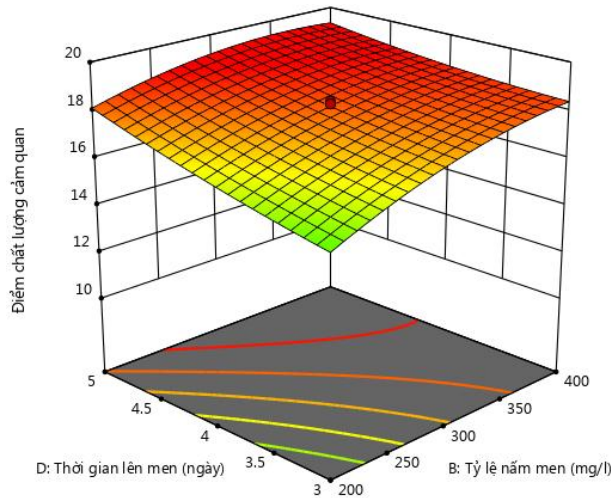


Actual Factors
B: Tỷ lệ nấm men = 300
D: Thời gian lên men = 4



Actual Factors

B: Tỷ lệ nấm men = 300
C: pH = 4

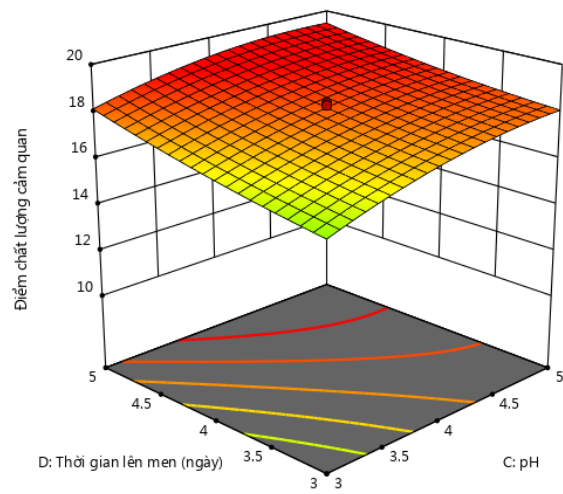


Actual Factors

A: Độ Bx = 21
C: pH = 4

Actual Factors

A: Độ Bx = 21
D: Thời gian lên men = 4



Actual Factors

A: Độ Bx = 21
B: Tỷ lệ nấm men = 300

Hình 7. Ảnh hưởng tương tác của các yếu tố (Z_1, Z_2, Z_3, Z_4) đến hàm mục tiêu

Tiến hành xử lý bằng phần mềm Design Expert 11.0 thu được mô hình toán học như sau:

Với hàm mục tiêu là điểm chất lượng cảm quan:

$$Y_1 = -63,92 + 4,36Z_1 + 0,083Z_2 + 5,32Z_3 + 2,80Z_4 - 0,00056Z_1^2 - 0,036Z_1Z_2 - 0,065Z_1Z_3 - 0,00368Z_2^2 - 0,00394Z_2Z_3 - 0,18125Z_3^2 - 0,091Z_1^2 - 5,02 \cdot 10^{-5}Z_2^2 - 0,427Z_3^2 + 0,166Z_4^2 \quad (1)$$

Với hàm mục tiêu là nồng độ ethanol:

$$Y_2 = -52,77 + 3,29Z_1 + 0,062Z_2 + 2,842Z_3 + 2,842Z_4 - 0,000958Z_1^2 - 0,0417Z_1Z_3 - 0,075Z_1Z_4 - 0,0015Z_2^2 - 0,00275Z_2Z_4 - 0,0875Z_3^2 - 0,0657Z_1^2 - 3,417 \cdot 10^{-5}Z_2^2 - 0,3042Z_3^2 + 0,034Z_4^2 \quad (2)$$

Mô hình (1) có giá trị p-value = 0,0086 < $\alpha=0,05$ cho thấy mô hình hồi quy là phù hợp với thực nghiệm, tương tự như vậy ở mô hình (2) có giá trị p-value = 0,0077 < $\alpha=0,05$ khẳng định mô hình tương thích. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy ảnh hưởng của các nhân tố chiết đến hàm mục tiêu. Kết quả cho thấy các biến: Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 , và Z_1^2, Z_2^2, Z_3^2 có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p < 0,05$). Các biến khác mặc dù không có ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu ($p > 0,05$), nhưng vì các biến đơn có ảnh hưởng đáng kể nên các biến tương tác của chúng cũng được giữ lại trong mô hình để tiến hành tối ưu hóa. Kết quả cho thấy cả bốn yếu tố đều ảnh hưởng đến hàm mục tiêu là nồng độ ethanol được tạo ra. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với lý thuyết về lên men bởi nấm men. Theo đó, các nhân tố

là nồng độ chất hòa tan ($^{\circ}\text{Bx}$), tỷ lệ nấm men (mg/l), pH lên men, thời gian lên men đều có ảnh hưởng đến việc tạo thành ethanol và trực tiếp ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm. Kết quả cũng chỉ ra, cả bốn yếu tố đều có tương tác với nhau và tương tác đến hàm mục tiêu Y_1, Y_2 . Cụ thể, yếu tố Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 có ảnh hưởng đồng biến với hàm mục tiêu. Điều này có nghĩa là, trong phạm vi miền tối ưu được nghiên cứu khi tăng giá trị pH, tăng thời gian lên men, tăng tỷ lệ dịch ép quả/nước, tăng nồng độ chất hòa tan thì hàm lượng ethanol được tạo thành càng lớn, điểm chất lượng cảm quan càng cao và ngược lại.

4.4. Tối ưu hóa một số điều kiện lên men

Bằng các thuật toán phân tích tối ưu (optimization) sử dụng phần mềm Design Expert 11.0 thu được các giá trị tối ưu ứng với giá trị cực đại của hàm mục tiêu như sau: Độ Bx của dịch lên men, 23,4; Tỷ lệ nấm men (mg/l), 353,6; pH, 4,1; Thời gian, 4,4 (ngày). Độ cồn thu được ở thí nghiệm tối ưu là 6,0, điểm chất lượng cảm quan là 18,9. Nồng độ chất khô trong dịch lên men tăng thì độ cồn tạo ra trong sản phẩm sau lên men cũng tăng theo. Tuy nhiên, khi nồng độ chất khô quá cao tạo ra áp suất thẩm thấu lớn, làm mất cân bằng trạng thái sinh lý của tế bào, gây ức chế hoạt động của nấm men. Kết quả nghiên cứu chứng minh khi bổ sung lượng đường thấp thì sẽ không tạo điều kiện thích hợp cho quá trình lên men, làm cho sản phẩm có mùi vị không ngon, nếu bổ sung lượng đường quá cao thì khả năng lên

men giảm, sản phẩm sẽ có vị đắng và sốc. Giá trị pH có ý nghĩa quan trọng trong quá trình lên men. Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng lên men ethanol ở pH từ 3,0÷5,0. Ở pH ≤ 4,0 tạp khuẩn hầu như không phát triển, nấm men phát triển chậm hơn so với



Hình 8. Sản phẩm nước cider dâu

Đánh giá chất lượng sản phẩm:

Sau khi đánh giá cảm quan thì sản phẩm đạt được 18,9 điểm và theo bảng phân loại chất lượng TCVN 3215 – 79 thì sản phẩm được loại tốt, sản phẩm có màu đỏ tím đặc trưng của dâu, mùi thơm của dâu, vị ngọt dịu hài hòa. Tổng số vi sinh vật hiếu khí, số khuẩn lạc trong 1ml sản phẩm: 7 (Giới hạn tối đa: 10); *Coliforms*, số vi khuẩn trong 1ml sản phẩm: Không phát hiện. Kết quả kiểm tra vi sinh của sản phẩm ta thấy

pH=4,5÷5,0. Do đó ở các thí nghiệm tại pH =2,0 hay 3,0, nồng độ cồn thu được thấp vì ở pH này nấm men phát triển chậm, quá trình chuyển hóa xảy ra kém nên lượng ethanol tạo thành ít, các axit hữu cơ tạo ra trong quá trình lên men không đủ làm thay đổi pH môi trường.

lượng vi sinh vật sản phẩm đạt yêu cầu theo quyết định 46/2007/QĐ-BYT [H9].

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình toán thể hiện mối quan hệ giữa giá trị pH lên men, thời gian lên men, tỷ lệ nấm men với hàm lượng ethanol tạo thành và điểm chất lượng cảm quan. Các giá trị tối ưu để thực hiện quá trình lên men như sau: Độ Bx của dịch lên men, 23,4; Tỷ lệ nấm men, 353,6mg/l; pH, 4,1; Thời gian, 4,4 (ngày). Độ cồn thu được ở thí nghiệm tối ưu là 6,0. Sản phẩm cider dâu được hội đồng đánh giá cảm quan theo thang điểm 20, hệ số quan trọng 4 đánh giá được 18,9 điểm, đạt loại tốt. Quy trình sản xuất được thực hiện như sau: Quả dâu → Phân loại → Rửa → Xử lý nguyên liệu → Ép, lọc → Dịch quả → Phối chế (Thêm nước theo tỷ lệ 1v dịch ép quả/2v nước; thêm saccharose để dịch lên men đạt 23,4°Bx) → Thanh trùng (30mg SO₂/L) → Bổ sung nấm men (353,6mg/l) → Lên men (pH=4,1; τ=4,4 ngày, t=25±1°C) → Xử lý sau lên men → Thanh trùng (t=65°C, τ=15 phút) → Làm nguội → Rót chai → Tàng trữ (1÷2 tháng) → Sản phẩm

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định 46/2007/QĐ-BYT, mục 6.7: Quy định giới hạn cho phép vi sinh vật trong nước khoáng và nước giải khát đóng chai.
- Bae SH, Suh HJ (2007). *Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea*. LWT - Food Sci. Technol. 40:955-962.
- Eric Wei-Chiang Chan, Phui-Yan Lye, Siu-Kuin Wong (2016), "Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*", Chinese Journal of Natural Medicines, pp. 17-30. 12.
- Fujie Yan, Xiaodong Zheng (2017), "Anthocyanin-rich mulberry fruit improves insulin resistance and protects hepatocytes against oxidative stress during hyperglycemia by regulating AMPK/ACC/mTOR pathway", Journal of Functional Foods, Vol. 30, pp.270-281
- Halliwell B (1992). *The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system*. Haemostasis 23(Suppl 1):118-126.
- Srivastava S, Kapoor R, Thathola A, Srivastava RP (2006). *Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*)*. Int. J.Food Sci. Nutr. 57:305-313.
- Tomoyuki O, Kobayashi M, Nakamura T, Okuyama A, Masuda M, Shiratsuchi H, Suda I (2006). *Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation*. J. Food Sci.71:18-22.
- Wang CY, Fan T, Gui ZZ, Jia JQ (2011). *The research and development of mulberry*. J. China Food Indust. (in Chinese), 174:95-98.
- Zadernowski R, Naczka M, Nesterowicz J (2005). *Phenolic acid profiles in some small berries*. J. Agric. Food Chem. 53:2118-2124.