**SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM GIẤM ĂN TỪ PHỤ PHẨM NGÀNH CÔNG NGHIỆP RƯỢU BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN NHANH**

**TRIAL PRODUCTION OF VINEGAR FROM BY-PRODUCT OF WINE PRODUCTION INDUSTRY USING QUICK FERMENTATION METHOD**

**Bùi Văn Tú, Trần Thị Dịu**

*Trường Đại học Sao Đỏ*

Ngày nhận bài: / /

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: / /

Ngày chấp nhận đăng: / /

***Tóm tắt***

Axit acetic là một acid hữu cơ quan trọng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp, đặc biệt là công nghiệp chê biến thực phẩm. Mục đích của nghiên cứu là xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men giấm từ dịch hèm rượu như nồng độ đường, nồng độ các chất khoáng bổ sung. Mối quan hệ giữa các giá trị pH lên men, thời gian lên men, tỷ lệ men cái/dịch hèm rượu và nồng độ ethanol với hàm lượng acid acetic được khảo sát và xác định thông qua phương pháp đáp ứng bề mặt. Kết quả khảo sát điều kiện lên men acid acetic của chủng *Acetobacter tropicalis* ở nhiệt độ phòng (26÷28oC), nồng độ đường là 7,0%, nồng độ các chất khoáng *MgSO4.5H2O: 0,4g/l, KH2PO4: 1,0g/l, (NH4)H2PO4: 0,8g/l*, nồng độ ethanol của dịch lên men là 5,9%, pH lên men là 6,1, thời gian lên men là 8,1 ngày, tỷ lệ giống/dịch hèm rượu là 3,5% (men cái có mật độ vi khuẩn là 107CFU/ml). Lượng acid được tạo thành là 4,3%.

***Từ khóa:*** *Acetobacter; axit acetic; lên men acetic; vi khuẩn acetic; giấm gạo.*

**Astract**

Acetic acid is an important organic acid that is widely used in many industries, especially the food processing industry. The purpose of the study is to identify the factors that influence the fermentation of vinegar from the wort of alcohol such as the concentration of sugar, the concentration of mineral supplements. The relationship between the fermentation pH values, fermentation time, the ratio of yeast/wort and the concentration of ethanol with acetic acid content was investigated and determined through the surface response method. Survey results of acetic acid fermentation conditions of strains Acetobacter tropicalis at room temperature (26 ÷ 28oC), sugar concentration of 7.0%, concentration of minerals MgSO4.5H2O: 0.4 g/l, KH2PO4: 1,0 g/l, (NH4)H2PO4: 0,8g/l, ethanol concentration of fermented liquid is 5.9%, fermentation pH is 6.1, fermentation time is 8.1 days, seed rate / liquor wort is 3.5% (yeast with bacterial density of 107 CFU/ml). The amount of acid formed is 4.3%.

***Keywords:*** *Acetobacter; acetic acid; acid acetic fermentation; acetic bacteria; rice vinegar.*

**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Vi khuẩn acetic thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm hiếu khí bắt buộc, với khả năng oxy hóa ethanol thành axit acetic cho phép chúng có thể sinh trưởng ở các môi trường có chứa ethanol [1]. Giấm là một loại gia vị truyền thống dùng trong chế biến các món ăn ở nhiều nước trên thế giới. Ngày nay, dấm được sản xuất từ nhiều loại nguyên liệu khác nhau và được sử dụng rất phổ biến trong công nghiệp thực phẩm với mức tiêu thụ ước tính trên toàn thế giới lên tới 3,2 tỉ lít dấm chứa 5% acid acetic mỗi năm. Quá trình lên men giấm cơ bản là quá trình hai giai đoạn với giai đoạn đầu tiên là chuyển đổi kỵ khí các loại đường lên men thành ethanol bằng nấm men, sử dụng loài Saccharomyces, và thứ hai là quá trình oxy hóa hiếu khí ethanol do vi khuẩn, thường loài Acetobacter (Horiuchi et al., 2000) [2]. Giấm được sản xuất rộng rãi từ gạo, mạch nha, táo, các dạng rượu vang khác nhau và các vật liệu nông nghiệp (Horiuchi et al., 1999) [3]. Nguồn nguyên liệu để sản xuất giấm có thể từ quả, hạt ngũ cốc, phụ phẩm trong sản xuất rượu vang chua, hành đỏ thứ phẩm, mật ong thứ phẩm,….Kết quả phân tích GC-MS cho thấy, thành phần hợp chất bay hơi của dịch bã rượu bao gồm: axit acetic, ethyl acetate, benzenethanol, ethyl lactate, 2-3-butanediol, 2-methyl-Propanoic acid, propanoic acid; chúng có vai trò quan trọng trong tạo hương thơm của dịch bã rượu [4]. Lên men dấm sử dụng phụ phẩm từ qui trình sản xuất rượu gạo sẽ tận dụng được các thành phần dinh dưỡng có giá trị và phát triển nguồn chất thơm tự nhiên từ quá trình lên men rượu gạo.

Dịch hèm thường được tận dụng làm thức ăn chăn nuôi, men bánh mỳ, men gia súc,…

Nghiên cứu tận thu nguồn phụ phẩm trong ngành công nghệ sản xuất rượu có ý nghĩa thực tiễn, đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường về dấm, giảm giá thành sản phẩm và góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

**2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

## 2.1. Vật liệu nghiên cứu

***2.1.1. Hèm rượu***

Dịch hèm thu nhận từ quy trình sản xuất rượu gạo lên men quy mô hộ gia đình sản xuất rượu ở khu vực Chí Linh. Yêu cầu của dịch hèm rượu sử dụng dịch hèm vừa thu được sau khi nấu rượu, hèm rượu màu sáng trắng, không có màu và mùi lạ.

### *2.1.2. Rượu*

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

### *2.1.3. 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.

### *2.1.4. Môi trường đệm:* CH3COOH/CH3COONa

Dung dịch được pha theo TCVN 4320-86, đủ điều kiện dùng trong thực phẩm.

***2.1.5.*** ***Dòng vi khuẩn lên men acetic mạnh***

Sử dụng vi khuẩn *Acetobacter tropicalis* được phân lập và công bố trong nghiên cứu[5]

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

***2.2.1. Bố trí thí nghiệm xác định nồng độ đường bổ sung***

Dịch hèm rượu thu được, cho vào thiết bị lên men nhanh, bổ sung khoáng chất (MgSO4.5H2O, KH2PO4, (NH4)H2PO4); etanol ở nồng độ cố định; mật độ tế bào của dịch men cái là 107TB/ml. Thay đổi tỷ lệ đường là 3g/l, 5g/l, 7g/l, 9g/l, 11g/l. Tiến hành lên men ở nhiệt độ phòng (26÷28oC). pH trong quá trình lên men được ổn định bằng hệ đệm acetat. Sản phẩm sau khi lên men, lọc thu dịch lọc, thanh trùng ở nhiệt độ 100oC trong thời gian 15 phút. Xác định nồng độ axit acetic cuối để lựa chọn nồng độ đường bổ sung.

***2.2.2. Bố trí thí nghiệm xác định nồng độ các chất khoáng đến quá trình lên men***

Chất khoáng ảnh hưởng đến quá trình lên men, đối với lên men axit acetic từ dịch hèm rượu, lựa chọn chất khoáng là (MgSO4.5H2O, KH2PO4, (NH4)H2PO4). Thí nghiệm này xác định nồng độ các chất khoáng bổ sung cho quá trình lên men. Nồng độ các chất khoáng thay đổi như bảng 1.

Bảng 1. *Nồng độ chất khoáng bổ sung*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Khoáng chất | Nồng độ (g/l) | | | | |
| MgSO4.5H2O | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 |
| KH2PO4 | 0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
| (NH4)H2PO4 | 0 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 |

Cố định các thành phần đường, etanol, mật độ tế bào của dịch men cái là 107TB/ml. Tiến hành lên men ở nhiệt độ phòng (26÷28oC). pH trong quá trình lên men được ổn định bằng hệ đệm acetat. Sản phẩm sau khi lên men, lọc thu dịch lọc, thanh trùng ở nhiệt độ 100oC trong thời gian 15 phút. Xác định nồng độ acid acetic cuối để lựa chọn nồng độ các khoáng chất bổ sung.

***2.2.3. Bố trí nghiệm tối ưu hóa pH, thời gian lên men, tỉ lệ men cái/dịch hèm rượu, nồng độ ethanol***

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: pH lên men (X1), thời gian lên men (X2), tỉ lệ men cái/ dịch hèm rượu (X3) và nồng độ ethanol (X4). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trực 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 (Bảng 2). Trong số 27 thí nghiệm được tiến hành (Bảng 3), 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:

Trong đó:  
Yk : Biến phụ thuộc (k = 1 ÷ 4)  
Xi,j: Nhân tố mã hóa của biến độc lập ảnh hưởng đến Yk

B0: Hệ số hồi qui bậc 0  
Bj: Hệ số hồi qui bậc 1 mô tả ảnh hưởng của biến Xj đến Yk  
Bij: Hệ số ảnh hưởng đồng thời của biến Xi và Xj đến Yk

Bjj: Hệ số hồi qui bậc hai mô tả ảnh hưởng của biến X2j đến Yk

Bảng 2.*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 |
| X1: pH lên men | U1 | 2,75 | 4,00 | 5,25 | 6,50 | 7,75 |
| X2: Thời gian lên men (ngày) | U2 | 4,00 | 6,00 | 8,00 | 10,00 | 12,00 |
| X3: Tỉ lệ men cái/dịch hèm rượu | U3 | 0,00 | 2,00 | 4,00 | 6,00 | 8,00 |
| X4: Nồng độ ethanol (%) | U4 | 3,00 | 4,00 | 5,00 | 6,00 | 7,00 |

*Ghi chú:* α *= 2, Umax, Umin là giá trị cận trên (+1) và cận dưới (-1) của biến độc lập, U0 = (Umin + Umax)/2 là giá trị trung bình của cận trên và cận dưới.*

Bổ sung vào dịch hèm đường, các khoáng chất (MgSO4.5H2O, KH2PO4, (NH4)H2PO4). Quá trình lên men được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ phòng (26÷28oC). Mật độ tế bào của dịch men cái là 107CFU/ml. pH trong quá trình lên mên được ổn định bằng hệ đệm acetat.

**2.3. Phương pháp phân tích**

***2.3.1. Phương pháp cảm quan***

Kiểm tra chất lượng cảm quan theo tiêu chuẩn 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 và độ trong (hệ số quan trọng 0,8), mùi (hệ số quan trọng 1,2), vị (hệ số quan trọng 2,0).

***2.3.2. Phương pháp phân tích:*** Xác định độ ẩm bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi. Xác định hàm lượng ethanol bằng cách sử dụng cồn kế với rượu trắng theo TCVN 8008:2009. Hàm lượng acid của dịch lên men

được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với NaOH 0,1N. pH được xác định bằng pH kế (Sartorius, PB-20, Đức). Xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl. Xác định đường tổng số bằng phương pháp Bertrand.

## 2.3. Thiết bị lên men

Thiết bị lên men gồm: Thân thiết bị được chia 2 phần: phần dưới chứa dịch lên men, phần trên chứa chất mang và vi khuẩn acetic là nơi lên men giấm. Máy bơm (AC 240V; 50/60Hz; 24Vdc; 1,2A; 110psi). Thiết bị sục khí (AC 220-240V; 50Hz; 3W; 0,02MPa; 0,017A). Qúa trình hoạt động dịch lên men được bơm và xả dạng sương lên bề mặt chất mang chứa vi khuẩn acetic. Không khí được lọc bụi, vi khuẩn thông qua bộ lọc gồm than hoạt tính, dung dịch NaCl bão hòa và được bơm khí sục phía dưới của dịch lên men nhằm cung cấp oxy cho vi khuẩn.

**2.4. Phương pháp xử lý số liệu**

Kết quả nhận được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel. Các thí nghiệm được thiết kế và xử lý bằng phần mềm Design Expert 11.0. Phân tích ANOVA được tiến hành bằng phần mềm SPSS17.0. SPSS (Statistical Product and Services Solutions).

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Thành phần của dịch hèm**

Bảng 3. *Kết quả phân tích thành phần của bã rượu truyền thống*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| TT | Thành phần | Tỷ lệ |
| 1 | Độ ẩm (%) | 86,75 |
| 2 | Protein (% Chất khô) | 28,12 |
| 3 | Acid (%) | 2,36 |
| 4 | Tinh bột (% Chất khô) | 3,15 |
| 5 | Lipid (% Chất khô) | 4,21 |
| 6 | pH | 3,45 |

Từ kết quả bảng 3, cho thấy dịch hèm có độ ẩm cao, hàm lượng tinh bột cao, phù hợp cho quá trình lên men acetic.

**3.2. Kết quả xác định nồng độ đường**

Ảnh hưởng của nồng độ đường bổ sung đến nồng độ acid acetic cuối cùng được thể hiện ở hình 1.

Hình 1. *Đồ thị* *ảnh hưởng của nồng độ đường đến nồng độ acid acetic*

Đường saccharose là nguồn cung cấp dinh dưỡng cho sự sinh trưởng, phát triển và ảnh hưởng đến quá trình lên men giấm. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng đường saccharose bổ sung trong khoảng từ 3 g/l đến 11 g/l, nồng độ tiếp giống ban đầu 9%, hàm lượng ethanol đầu 6%, hàm lượng axit acetic ban đầu 0,6%, kết quả phân tích thể hiện ở hình 1. Trong đó, có thể thấy nồng độ đường bổ sung vào môi trường 7g/l thì quá trình lên men giấm đạt hiệu quả tốt nhất là 8,2%. Ở nồng độ đường bổ sung lớn (9g/l) hàm lượng acid acetic thấp. Điều này chứng tỏ saccharose là nguồn cung cấp năng lượng cần thiết để duy trì các hoạt động của vi khuẩn *Acetobacter tropicalis* trong quá trình lên men giấm. Tuy nhiên, nồng độ đường cao có thể gây ra sự ức chế đối với tế bào và tăng chi phí sản xuất. Vì vậy, để vừa tiết kiệm chi phí vừa đạt hiệu quả lên men acid acetic cao chúng tôi đã chọn hàm lượng đường bổ sung vào dịch lên men là 7 g/l cho các nghiên cứu tiếp theo.

**3.5. Ảnh hưởng của các thành phần chất khoáng đến quá trình lên men**

Vi khuẩn acetic đòi hỏi nguồn chất khoáng cho quá trình trao đổi chất. Trong đó, phải kể đến một số khoáng chất như: magie, kali, photpho,… [6]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng một số nguồn khoáng chất từ MgSO4.5H2O, KH2PO4, (NH4)H2PO4 nhằm cung cấp Mg, K, P cho vi khuẩn acetic trong quá trình lên men giấm. Như vậy bên cạnh tác động tích cực của các nguồn chất khoáng đến quá trình lên men dấm còn có cả ảnh hưởng bất lợi khi nồng độ khoáng trong môi trường quá cao. Dựa trên hình 2, chúng tôi lựa chọn nồng độ chất khoáng bổ sung vào môi trường lên men như sau: MgSO4.5H2O 0,4g/l, KH2PO4 1,0g/l, (NH4)H2PO4 0,8g/l.

*(1) MgSO4.5H2O: 0g/l, KH2PO4: 0g/l, (NH4)H2PO4: 0g/l*

*(2) MgSO4.5H2O: 0,2g/l, KH2PO4: 0,5g/l, (NH4)H2PO4: 0,4g/l*

*(3) MgSO4.5H2O: 0,4g/l, KH2PO4: 1,0g/l, (NH4)H2PO4: 0,8g/l*

*(4) MgSO4.5H2O: 0,6g/l, KH2PO4: 1,5g/l, (NH4)H2PO4: 1,2g/l*

*(5) MgSO4.5H2O: 0,8g/l, KH2PO4: 2,0g/l, (NH4)H2PO4: 1,6g/l*

Hình 2. *Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ MgSO4.5H2O, KH2PO4, (NH4)H2PO4 đến nồng độ acid acetic cuối cùng*

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

Ảnh hưởng của các nhân tố X1 (pH), X2 (thời gian lên men, ngày), X3 (tỷ lệ men cái/dịch hèm rượu), X4 (nồng độ ethanol) được trình bày ở bảng 4 và hình 3.

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

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| TT | Biến mã hóa | | | | Biến thực | | | | Nồng độ acetic (%) | Điểm cảm quan |
| U1 | U2 | U3 | U4 | X1 | X2 | X3 | X4 |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4,20 | 13,71 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | 6,5 | 6 | 2 | 4 | 4,44 | 14,33 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 4 | 10 | 2 | 4 | 4,28 | 16,83 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 6,5 | 10 | 2 | 4 | 4,46 | 17,72 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 | 4 | 6 | 6 | 4 | 4,31 | 14,64 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 6,5 | 6 | 6 | 4 | 4,46 | 17,54 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 4 | 10 | 6 | 4 | 4,32 | 17,21 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | -1 | 6,5 | 10 | 6 | 4 | 4,54 | 17,95 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | 1 | 4 | 6 | 2 | 6 | 4,23 | 16,95 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 6,5 | 6 | 2 | 6 | 4,34 | 18,03 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 4 | 10 | 2 | 6 | 4,25 | 18,85 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 | 6,5 | 10 | 2 | 6 | 4,44 | 18,91 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 4 | 6 | 6 | 6 | 4,26 | 18,33 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | 1 | 6,5 | 6 | 6 | 6 | 4,48 | 18,73 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | 1 | 4 | 10 | 6 | 6 | 4,28 | 18,54 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6,5 | 10 | 6 | 6 | 4,48 | 18,94 |
| 17\* | -2 | 0 | 0 | 0 | 2,75 | 8 | 4 | 5 | 4,21 | 11,23 |
| 18\* | 2 | 0 | 0 | 0 | 7,75 | 8 | 4 | 5 | 4,54 | 17,21 |
| 19\* | 0 | -2 | 0 | 0 | 5,25 | 4 | 4 | 5 | 4,29 | 12,72 |
| 20\* | 0 | 2 | 0 | 0 | 5,25 | 12 | 4 | 5 | 4,37 | 18,23 |
| 21\* | 0 | 0 | -2 | 0 | 5,25 | 8 | 0 | 5 | 4,35 | 12,42 |
| 22\* | 0 | 0 | 2 | 0 | 5,25 | 8 | 8 | 5 | 4,44 | 19,14 |
| 23\* | 0 | 0 | 0 | -2 | 5,25 | 8 | 4 | 3 | 4,29 | 17,32 |
| 24\* | 0 | 0 | 0 | 2 | 5,25 | 8 | 4 | 7 | 4,19 | 18,92 |
| 25t | 0 | 0 | 0 | 0 | 5,25 | 8 | 4 | 5 | 4,32 | 18,23 |
| 26 t | 0 | 0 | 0 | 0 | 5,25 | 8 | 4 | 5 | 4,26 | 18,63 |
| 27 t | 0 | 0 | 0 | 0 | 5,25 | 8 | 4 | 5 | 4,28 | 18,34 |

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

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

Hình 3. *Ảnh hưởng tương tác của các yếu tố (X1, X2, X3, X4) đến hàm mục tiêu*

Kết quả cho thấy cả bốn yếu tố đều ảnh hưởng đến hàm mục tiêu là nồng độ acid. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với lý thuyết về lên men bởi vi khuẩn. Theo đó, các nhân tố là pH lên men, thời gian lên men, tỷ lệ men cái/dịch hèm rượu, nồng độ ethanol đều có ảnh hưởng đến việc tạo thành acid acetic. Kết quả cũng chỉ ra, cả bốn yếu tố đều có tương tác với nhau và tương tác đến hàm mục tiêu. Cụ thể, yếu tố X1 (pH), X2 (Thời gian lên men), X3 (tỷ lệ men cái/dịch hèm rượu) có ảnh hưởng đồng biến đến hàm mục tiêu, yếu tố X4 (Nồng độ ethanol) có ảnh hưởng nghịch biến với hàm mục tiêu. Điều này có nghĩa là, trong phạm vi nghiên cứu khi tăng giá trị pH, tăng thời gian lên men, tăng tỷ lệ men cái bổ sung vào thì hàm lượng acid được tạo thành càng lớn. Ngược lại, khi tăng lượng ethanol vào môi trường lên men thì quá trình lên men sẽ bị ức chế, lượng acid tạo thành giảm.

**3.7. Tối ưu hóa một số điều kiện lên men**

Bảng 3 trình bày kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ảnh hưởng của các nhân tố đến hàm mục tiêu là hàm lượng acid acetic. Kết quả cho thấy các biến X1, X2, X3, X4, X23, X24 đều có ảnh hưởng đến hàm mục tiêu (p<0,05). Các biến khác (p>0,05) mặc dù không ảnh hưởng đáng kể đến hàm mục tiêu (xem bảng 6), tuy nhiên vì các biến đơn có ảnh hưởng đáng kể nên được giữ lại trong mô hình để phục vụ cho việc tối ưu hóa.

Bảng 5. *Kết quả tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **TT** | **pH** | **Thời gian (ngày)** | **Tỷ lệ men cái/dịch hèm (%)** | **Nồng độ rượu (%)** | **Nồng độ acetic (%)** | **Điểm cảm quan** |  | **Desirability** |
| **1** | **6.112** | **8.133** | **3.518** | **5.900** | **4.331** | **19.258** | **1.000** | **Selected** |
| 2 | 5.878 | 8.432 | 3.934 | 5.820 | 4.322 | 19.406 | 1.000 |  |
| 3 | 5.381 | 8.357 | 4.686 | 5.882 | 4.292 | 19.599 | 1.000 |  |
| 4 | 5.136 | 9.438 | 3.944 | 5.755 | 4.282 | 19.319 | 1.000 |  |
| 5 | 5.264 | 9.316 | 2.906 | 5.901 | 4.281 | 19.160 | 1.000 |  |
| 6 | 6.349 | 9.124 | 4.944 | 5.531 | 4.411 | 19.278 | 1.000 |  |
| 7 | 5.455 | 9.204 | 5.178 | 5.059 | 4.345 | 19.162 | 1.000 |  |
| 8 | 5.845 | 8.818 | 5.365 | 5.014 | 4.381 | 19.195 | 1.000 |  |
| 9 | 5.341 | 9.261 | 5.671 | 5.149 | 4.352 | 19.159 | 1.000 |  |
| 10 | 6.327 | 6.277 | 5.863 | 5.984 | 4.412 | 19.202 | 1.000 |  |

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

**Với hàm mục tiêu Y1 là nồng độ acid acetic:**

*Y1 = 4.29+0,0898X1+0,0202 X2+0,0282 X3-0,0182 X4+0,0042 X1X2+0,0052 X1X3-0,0038 X1X4-0,0073 X2X3-0,0033 X2X4-0,0013 X3X4+0,0260 X1²+0,0150 X2²+0,0310 X3²-0,0075 X4² (1)*

Ở mô hình (1) giá trị F=16,64 có nghĩa là mô hình có ý nghĩa. Chỉ có 0,01% cơ hội giá trị F lớn như vậy có thể xảy ra do nhiễu. Giá trị P-values < 0.0500 chỉ ra rằng các biến trong mô hình có ý nghĩa. Giá trị p kiểm định không tương thích (lack of fit) của mô hình là 0,5267 > p=0,05. Do đó, mô hình hồi quy là tương thích với thực nghiệm.

**Với hàm mục tiêu Y1 là điểm cảm quan:**

*Y2 = 18,40 + 0,7938\*X1 + 0,9879\*X2 + 0,8327\*X3 + 0,8560\*X4 - 0,1824\*X1X2 + 0,1116\* X1X3 - 0,2005\*X1X4 - 0,3681\*X2X3 - 0,3923\*X2X4 - 0,1843\*X3X4 - 0,8069\*X1² - 0,4927\*X2² - 0,4164\*X3² + 0,1686\*X4² (2).*

Ở mô hình (2) giá trị F=2,8 có nghĩa là mô hình có ý nghĩa. Chỉ có 4,09% cơ hội giá trị F lớn như vậy có thể xảy ra do nhiễu. Giá trị P-values < 0.0500 chỉ ra rằng các biến trong mô hình có ý nghĩa. Do đó, mô hình hồi quy là tương thích với thực nghiệm.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

1. *(b)*

Hình 4. *Ảnh hưởng của các yếu tố đến hàm mục tiêu là nồng độ acetic (a) và điểm cảm quan (b)*

Bằng việc tối ưu hóa bằng phần mềm Design Expert 11.0 thu được giá trị tối ưu ứng với cực đại của hàm mục tiêu như sau: X1 = 6,1; X2 = 8,1 ngày; X3 = 3,5%; X4 = 5,9%. Lượng acid tổng số được tạo thành là 4,3%.

Điều kiện lên men và hàm lượng acid acetic cũng được nghiên cứu và công bố bởi một số tác giả. [Trịnh Nguyệt Trân](https://qldiem.ctu.edu.vn/ql/docgia/tacgia-44748.html) và cộng sự [7] đã xác định các điều kiện lên men giấm từ dịch quả sơ ri với tỷ lệ giống là 1% (v/v) *A. senegalensis* và 1% (v/v/) *Saccharomyces cerevisiae,* mật số giống chủng ban đầu tương ứng 105 CFU/mL và 107 CFU/mL, dịch quả sơ ri với nồng độ chất khô hòa tan là 10ºBrix và pH 5,0 thu được sản phẩm giấm sơ ri có hàm lượng axit đạt 6,99% (w/v) sau 8 ngày lên men ở 28-32°C. Huỳnh Xuân Phong và cộng sự [8] đã lên men axit acetic với chủng *A. sicerae* A18 ở 39°C, nồng độ ethanol ban đầu 4,32%, pH 4,0 và số lượng tế bào giống vikhuẩn là 105 tb/ml, hàm lượng acid acetic đạt 2,61% (w/v). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Gullo, et al. [9] và Beheshti, et al. [10] về khả năng phát triển tốt của các chủng vi khuẩn acetic ở môi trường có bổ sung 5% (v/v) ethanol với hiệu suất chuyển hóa ethanol thành acid acetic là cao nhất. Với chủng *A. tropicalis* DK4 được Phong, et al. [11] công bố hàm lượng acid đạt 2,52% (w/v) vào ngày thứ 7 trong môi trường YPGD bổ sung 4% (v/v) ethanol ở 39°C. Kết luận của Phạm Hồng Quang và Cộng sự [6] xác định loài *Acetobater aceti* cho khả năng lên men cao dịch lên men đạt nồng độ acid cao sau 7 − 9 ngày lên men ở mật số giống chủng 105 tế bào/mL, nồng độ đường 15ºBx, pH 5,5 và nhiệt độ ủ 30°C. Như vậy, so với nhiều nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước, hàm lượng acid tổng số (axit acetic chiếm đa số) trong nghiên cứu thu được ở mức cao hơn khá nhiều. Nghiên cứu cũng so sánh về hàm lượng giấm với giấm Toan Hà Nội (1,30%), giấm gạo nếp Hà Nội (2,5%), giấm trắng Trung Thành (2,52%).

Sản phẩm sau khi lên men được lọc cặn lơ lửng và bổ sung Kali Sorbate ở nồng độ là 500mg/l. Quá trình thanh trùng được tiến hành ở 85oC, thời gian 10 phút, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng và đem bảo quản ở nơi khô ráo, thoáng mát, tránh ánh nắng trực tiếp của mặt trời.

**4. KẾT LUẬN**

Nghiên cứu đã xác định được nồng đường và các chất khoáng ảnh hưởng đến quá trình lên men; xây dựng được mô hình toán thể hiện mới quan hệ giữa giá trị pH lên men, thời gian lên men, tỷ lệ men cái/nguyên liệu và nồng độ ethanol với hàm lượng acid acetic. Các giá trị tối ưu để thực hiện quá trình lên men như sau: nồng độ đường 7,0%; MgSO4.5H2O 0,4g/l, KH2PO4 1,0g/l, (NH4)H2PO4 0,8g/l; pH = 6,1; thời gian lên men, 8,1 ngày; Tỷ lệ giống bổ sung, 3,5%; Nồng độ rượu, 5,9%. Lượng acid tổng số được tạo thành là 4,3%. Sản phẩm giấm ăn được hội đồng đánh giá cảm quan theo thang điểm 20, hệ số quan trọng 4 đánh giá được 19,2 điểm, đạt loại tốt. Sản phẩm được bổ sung sorbat kali với nồng độ 500mg/lít.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Bùi Ái (2003), *Công nghệ lên men ứng dụng trong công nghệ thực phẩm*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia. Tp. Hồ Chí Minh, trang 53-57.
2. Horiuchi, J. I., Kanno, T., & Kobayashi, M, 2000. *Effective* onion vinegar production by a two-step fermentation system. Journal of bioscience and bioengineering, 90(3), 289-293
3. Horiuchi, J. I., Kanno, T., & Kobayashi, M, 1999. New *vinegar* production from onions. Journal of bioscience and bioengineering, 88(1), 107-109.
4. Đỗ Thị Kim Loan (2016), *Nghiên cứu công nghệ sản xuất dấm bằng phương pháp lên men chìm sử dụng phụ phẩm trong sản xuất rượu gạo*, luận án tiến sĩ kỹ thuật, chuyên ngành công nghệ sinh học thực phẩm, mã số: 62.54.02.05. Viện Công nghệ Thực phẩm, Hà Nội.
5. Bùi Văn Tú, Nguyễn Đức Thắng (2018), *Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn acetic để sản xuất thử nghiệm giấm ăn từ nguyên liệu chuối tiêu bằng phương pháp lên men nhanh*, Tạp chí nghiên cứu khoa học, Tạp chí Nghiên cứu khoa học - Đại học Sao Đỏ, ISSN 1859-4190. Số 3(62), tr 98-106
6. Dhouha Mamlouk, Maria Gullo (2011), “Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation”, Indian J Microbiol, 53(4), pp. 377- 384.
7. [Trịnh Nguyệt Trân](https://qldiem.ctu.edu.vn/ql/docgia/tacgia-44748.html), [Ngô Thị Phương Dung](https://qldiem.ctu.edu.vn/ql/docgia/tacgia-5474.html), [Nguyễn Ngọc Thạnh](https://qldiem.ctu.edu.vn/ql/docgia/tacgia-13237.html), [Huỳnh Xuân Phong](https://qldiem.ctu.edu.vn/ql/docgia/tacgia-1111.html), [Huỳnh Diễm Mi](https://qldiem.ctu.edu.vn/ql/docgia/tacgia-44749.html) (2016), [*Tuyển chọn vi khuẩn acetic và ứng dụng trong lên men giấm từ dịch quả sơ ri*](https://qldiem.ctu.edu.vn/ql/docgia/tapchitrongnuoc-2016/baibao-44446.html?page_current=3)**,** Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Số 11, Trang: 96-104.
8. Huỳnh Xuân Phong và cộng sự (2017), *Tuyển chọn vi khuẩn acetic chịu nhiệt ứg dụng trong lên men acid acetic*, Tạp chí KHCN Việt Nam, tập 20, số 9, trang 44-49.
9. M.K. Beheshti, and R. Shafiee (2009), “*Isolation and identification of an Acetobacter strain from Iranian white-red cherry with high acetic acid productivity as a potential strain for cherry vinegar production in food and agriculture biotechnology”*, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering,* 3(6), pp.281-283.
10. M. Gullo, C. Caggia, L.D. Vero and P. G.iudici (*2006*), *“Characterization of acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar*”, *International Journal of Food Microbiology,* 106(2), pp.209-212.
11. Phong Huynh Xuan, Chanhom Loinheuang, Gunjana Theeragool, Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi (2012), “*Geographical* distribution *of thermo-tolerant acetic acid bacteria*”, *Summary Book of Asian Core Program,* pp.77-80, International Exchange Core Program in Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan T11