**Cải thiện độ trong và bảo vệ màu sắc cho sản phẩm rượu vang sim**

Improves clarity and color protection for sim wine products

**Tóm tắt**

Độ đục và sự kết tủa ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng cảm quan của rượu vang sim. Bên cạnh đó, màu sắc của sản phẩm sẽ bị suy giảm theo thời gian khi biện pháp bảo vệ không có hiệu quả. Enzyme pectinase đã được nghiên cứu trong khoảng 0,05÷0,08% (v/w), thời gian xử lý 1,5 ÷ 3,0 giờ, nhiệt độ 45oC, pH = 4,0 nhằm giảm tác hại của độ đục. Phương pháp hóa học (chitosan) cũng được sử dụng trong nghiên cứu này. Ba loại chitosan bao gồm: Chitosan tôm thẻ, chitosan tôm sú, chitosan ghẹ xanh. Nồng độ dung dịch chitosan 2,0% (pha trong acid citric 1,5%) được thiết kế trong khoảng 0,5 ÷ 2,0% (v/v). Sodium meta bisunfit 30 mg/l được thêm vào ở công đoạn thanh trùng trước khi lên men và sau quá trình lên men phụ để bảo vệ anthocyanin trong rượu vang sim. Acid ascorbic được bổ sung ở các nồng độ 0,20, 0,25, 0,30% (w/v) nhằm hỗ trợ quá trình chống oxy hóa của anthocyanin. Kết quả đã xác định nồng độ enzyme pectinase tốt nhất là 0,07% (v/w), thời gian xử lý 2,5 giờ. Dịch lên men được lọc thu dịch và lên men phụ ở điều kiện nhiệt độ 10oC trong 15 ngày. Dung dịch chitosan tôm sú sử dụng là 1,5% (v/v), thời gian 3,0 giờ. Độ truyền quang (T) của rượu vang sau quá trình lắng đạt 81,7%. Hỗn hợp được lọc thô bằng túi lọc trước khi đi qua thiết bị lọc rượu vang với kích thước màng 1 ÷ 2μm. Sản phẩm thu được có độ truyền quang ở 660 nm là 89,7%. Citric được sử dụng với nồng độ là 0,0225% (w/v), acid ascorbic nồng độ 0,20%. Rượu vang sim được đánh giá cảm quan bằng phương pháp QDA cho kết quả cao, đáp ứng tốt yêu cầu về các chỉ tiêu của sản phẩm.

***Từ khóa:*** *Saccharomyces cerevisiae RV002; quả sim; anthocyanin; pectinase.*

***Astract***

Turbidity and precipitation seriously affect the organoleptic quality of sim wines. In addition, the color of the product will degrade over time when the protective measure is not effective. Pectinase enzyme was studied in the range of 0.05 ÷0.08% (v/w), treatment time 1.5 ÷ 3.0 hours, temperature 45oC, pH = 4.0 to reduce harmful effects of turbidity. Chemical method (chitosan) was also used in this study. Three types of chitosan including: Chitosan of white shrimp, chitosan of black tiger shrimp, and chitosan of blue crab. The concentration of chitosan solution 2.0% (mixed in citric acid 1.5%) was designed in the range of 0.5 ÷ 2.0% (v/v). Sodium meta bisulfite 30 mg/l was added at pasteurization stage before fermentation and after secondary fermentation to protect anthocyanins in myrtle wine. Ascorbic acid was added at concentrations of 0.20, 0.25, and 0.30% (w/v) to support the antioxidant process of anthocyanins. The results determined that the best concentration of pectinase enzyme was 0.07% (v/w), the treatment time was 2.5 hours. The fermenter was filtered and fermented at 10oC for 15 days. The chitosan solution used for black tiger shrimp was 1.5% (v/v), time for 3.0 hours. The optical transmittance after settling was 81.7%. The mixture is coarsely filtered with filter bags before passing through a wine filter with a membrane size of 1 ÷ 2μm. The obtained product has an optical transmittance at 660 nm of 89.7%. Citric was used at a concentration of 0.0225% (w/v), ascorbic acid at a concentration of 0.20%. Sim wine was evaluated sensory by QDA method for high results, meeting the requirements of product criteria.

***Keywords:*** *Saccharomyces cerevisiae RV002; Rhodomyrtus tomentosa; anthocyanin; pectinase*

**1. GIỚI THIỆU**

Ở nước ta, cây sim thường mọc hoang dã trên triền núi, sườn đồi ở khắp các tỉnh vùng trung du, núi thấp. Đây là loại cây có sức sống mãnh liệt, có khả năng chịu nắng hạn, chua phèn và cả vùng ngập úng. Sim là loại quả rất phổ biến ở khu vực trung du và miền núi phía bắc, đây là loại nguyên liệu quý, có hàm lượng dinh dưỡng cao. Từ các bộ phận của sim có thể chữa các bệnh: Thiếu máu ở thai phụ, suy nhược sau ốm, băng huyết, thổ huyết, tiêu chảy, kiết lỵ, thoát giang, bỏng, viêm dạ dày, viêm ruột cấp, viêm gan virus, đau đầu, phong thấp, bị thương lâu ngày nên khớp xương đau nhức, tiểu đường, trĩ lở loét. Các sắc tố chủ yếu trong sim là chất màu anthocyanin [1] bao gồm tannins, flavones, triterpenes và steroids [2]. Các chất có màu tím (có trong nhóm phytochemical) còn làm giảm cholesterol, triglyceride và thromboxane (là những thành phần tham gia vào sự phát triển tim mạch) trong máu, ngăn ngừa các bệnh tim mạch, đột quỵ và còn có khả năng chống sự lão hóa, già nua của tế bào. Trái sim chứa các flavon–glucosid, malvidin – 3 glucosid, các hợp chất phenol, các acid amin, đường và acid hữu cơ. Trái sim có vị ngọt, tính bình, dưỡng huyết, cố tinh (Đỗ Huy Bích et al., 2004) [3].

Rượu vang sau lên men thường có trạng thái mờ đục và theo thời gian màu sắc tự nhiên tiếp tục bị biến đổi từ màu tím đỏ sang màu nâu nhạt. Để có được sản phẩm rượu vang chất lượng cao nhất thiết phải duy trì được màu sắc tự nhiên và tạo được độ trong cho sản phẩm. Nguyễn Phương và cộng sự (2011) cho rằng để khắc phục tình trạng dịch ép bị đục cần sử dụng enzyme pectinase để làm trong dịch quả vì enzyme pectinase có khả năng phân cắt pectin thành những hợp chất đơn giản dễ tan từ đó sẽ làm giảm độ nhớt, tăng hiệu suất thu hồi và làm tăng độ trong của dịch nước ép trái cây [4] Đỗ Thị Hiền (2020) [5] sử dụng enzyme pectinase (733,7 UI/mL) sau khi lọc qua màng kích thước 30 kDa có khả năng làm tăng hiệu suất thu hồi dịch quả, giảm độ nhớt và tăng độ trong. Các sản phẩm từ dịch ép trái cây cần đạt các yêu cầu về phương pháp chiết rút, độ trong và độ bền của của sản [6]. Hiện nay, pectinase, cellulase, và hemicellulase thường được dùng để cải thiện quá trình ép, tách chiết và làm trong dịch ép trái cây [7]. Enzyme pectinase được sử dụng để tăng sản lượng, cải thiện khả năng hóa lỏng, làm trong nước ép trái cây, chiết xuất các mô thực vật, giải phóng hương vị, enzyme, protein, polysaccharide, tinh bột [8]. Grassin và Fauquembergue, 1996 [9] cho rằng pectin là nguyên nhân chủ yếu gây ra độ đục của dịch ép. Việc sử dụng pectinase sẽ làm giảm pectin do đó sẽ giảm được độ đục của sản phẩm.

Để tạo được độ trong cho sản phẩm về mặt lý thuyết có thể sử dụng enzyme petinase để thủy phân thành phần protopectin không tan thành dạng hòa tan, đồng thời bổ sung thêm một số chất trợ lắng để tạo ra vật liệu liên kết hấp phụ với các hạt lơ lửng, làm cho chúng tạo thành phân tử lớn hơn, có thể kết tủa trong rượu dễ dàng và nhanh hơn. Các chất này có thể là hợp chất polymer, phenol và protein,... Mục tiêu trong nghiên cứu này là sử dụng enzyme pectinase, sodium metabisunfit, chitosan, acid ascorbic, acid citric kết hợp quá trình lọc màng để làm trong và ổn định màu sắc và độ trong của rượu vang sim được lên men từ nguyên liệu *Rhodomyrtus tomentosa (Ait.) Hassk*.

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

**2.1. Vật liệu nghiên cứu**

**a. Qủa sim:** Quả sim nguyên liệu được thu hái tại khu vực núi Chí Linh, Hải Dương tháng 7÷9. Yêu cầu độ chín đồng đều, màu đỏ đến tím thẫm, không có quả thối, sâu.

**b. Nấm men:** *Saccharomyces cerevisiae* thương mại Angel Active Wine Dry Yeasr (RV002) của Trung Quốc do công ty Kovin cung cấp. Nấm men được hoạt hóa trước khi bổ sung vào dịch lên men. Qúa trình hoạt hóa được thực hiện như sau: 1,0 g nấm men + 2 g đường saccharose + 10,0 mL nước khuấy đều và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.

**c. 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.

**d. Môi trường đệm:** CH3COOH/CH3COONa. Dung dịch được pha theo TCVN 4320-86, được Bộ Y tế cấp phép đủ điều kiện dùng trong thực phẩm và được cung cấp bởi C**ông ty TNHH SX & thương mại Việt Mỹ** (VMC).

**e. Enzyme pectinase:**Sử dụng enzyme pectinase do Công ty TNHH Một thành viên KOVIN cung cấp. Sản xuất tại ANGEL YEAST CO., LTD. Xác nhận công bố phù hợp số 21885/2016/ATTP-XNCB. Hoạt tính của chế phẩm 4.000 đơn vị polygalacturonase/mL. Phạm vi hoạt động từ pH đến 3,0 đến 5,0. Nhiệt độ hiệu dụng từ 25 đến 65oC, phạm vi nhiệt độ tối ưu là từ 40 đến 55oC.

**f. Chitosan:** Chitosan được sản xuất tại phòng thí nghiệm khoa Thực phẩm và Hóa học, Trường Đại học Sao Đỏ. Chỉ tiêu chất lượng chitosan sản xuất từ tôm thẻ: Màu trắng, sáng, dạng vảy, độ tan trong CH3COOH 1%: 98,8±0,6%, độ nhớt: 465,3±2,1cps, độ deacetyl (DA): 85,7±1,4%. Chỉ tiêu chất lượng chitosan sản xuất từ tôm sú: Màu trắng, sáng, dạng vảy, độ tan trong CH3COOH 1%: 98,8±0,6%, độ nhớt: 514,3±1,7cps, độ deacetyl (DA): 86,3±1,6%. Chỉ tiêu chất lượng chitosan sản xuất ghẹ xanh: Màu trắng, sáng, dạng vảy, độ tan trong CH3COOH 1%: 98,8±0,6%, độ nhớt: 535,3±1,5cps, độ deacetyl (DA): 86,4±2,2%. Chitosan được sản xuất tháng 5/2021 và chuẩn bị dung dịch trước khi tiến hành thí nghiệm để đảm bảo các chỉ tiêu chất lượng.

**g. Acid ascorbic, citric, Sodium metabisunfit (Na2S2O5):** Được cung cấp bởi C**ông ty TNHH SX & thương mại Việt Mỹ** (VMC). Đảm bảo các tiêu chuẩn dùng trong thực phẩm.

**h. 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.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**2.2.1. Quy trình bố trí tổng quát ổn định chất lượng rượu vang sim**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Qủa sim |  |  |
|  |  | ↓ |  |  |
|  |  | Tách quả thối, hỏng, loại bỏ cuống, cành, lá | → | Phế phụ phẩm |
|  |  | ↓ |  |  |
| Nước thải | ← | Rửa sạch, để ráo | ← | Nước sạch |
|  |  | ↓ |  |  |
| Na2S2O5 30ppm  (tính theo SO2) | → | Nghiền dập | ← | Bổ sung nước theo tỷ lệ nguyên liệu/nước là 1,0/1,5 w/v |
|  |  | ↓ |  |  |
| t=45oC; pH = 4,0; **[Pectinase], thời gian=?** | → | Xử lý enzyme pectinase | ← | Bổ sung Pectinase |
|  |  | ↓ |  |  |
| Saccharose | → | Điều chỉnh đến 23oBx, pH=4,0 | ← | Dung dịch đệm  CH3COOH/CH3COONa |
|  |  | ↓ |  |  |
| Nấm men đã hoạt hóa 0,45 g/L | → | Lên men  (τ=11 ngày, t=28±1oC) |  |  |
|  |  | ↓ |  |  |
|  |  | Lọc tách bã | → | Bã sim |
|  |  | ↓ |  |  |
|  |  | Lên men phụ  (τ=15 ngày, t=10oC) |  |  |
|  |  | ↓ |  |  |
|  |  | Bổ sung chất trợ lọc |  | Chitosan: **Xác định** **loại chitosan, nồng độ=?** |
|  |  | ↓ |  |  |
|  |  | Lọc màng | → | Cặn |
|  |  | ↓ |  |  |
|  |  | Dịch lọc lên men | ← | Bổ sung acid ascorbic: **Xác định nồng độ** |
|  |  | ↓ |  |  |
| Na2S2O5 30ppm  (tính theo SO2) | → | Sunfit hóa |  |  |
|  |  | ↓ |  |  |
| Đánh giá cảm quan, màu sắc, độ trong | → | Sản phẩm |  |  |

**Hình 1. Sơ đồ quy trình bố trí tổng quát ổn định chất lượng rượu vang sim**

**2.2.2. Mô tả quá trình lên men và các thí nghiệm nghiên cứu**

Qủa sim đã lựa chọn được loại tạp chất, rửa sạch và để ráo. Tiến hành xử lý cơ học để làm nhỏ nguyên liệu, bổ sung nước theo tỷ lệ nguyên liệu/nước là 1/1,5 (w/v) và thiết kế các thí nghiệm với nồng độ pectinase là 0,05%, 0,06%, 0,070%, 0,08% (v/w), xử lý trong các khoảng thời gian 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 giờ ở nhiệt độ 45oC, pH = 4,0. Bổ sung đường, nấm men, sau đó thanh trùng dịch lên men bằng natri metabisunfit (Na2S2O5) trong thời gian 2,0 giờ nhằm tiêu diệt các vi sinh vật không có lợi cho quá trình lên men rượu (nồng độ 30 mg/l tính theo SO2), đồng thời chống oxy hóa các chất anthocyanin và thực hiện lên men chính, lên men phụ. Lên men được thực hiện theo phương pháp lên men gián đoạn, thời gian lên men chính là 11 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau khi lên men chính, lọc loại bỏ bã, thu dịch, tiếp tục lên men phụ ở nhiệt độ 10ºC trong 15 ngày [10]. Để thuận lợi cho quá trình lọc trên thiết bị lọc màng, chitosan được thêm vào ở các nồng độ khác nhau. Các thông số cần xác định của công đoạn này là 03 loại chitosan (chitosan từ tôm sú, tôm thể chân trắng, ghẹ xanh) và tỷ lệ dung dịch chitosan 2% pha trong dung dịch acid citric 1,5% bổ sung vào dịch lên men thông qua 4 thí nghiệm ở 0,5, 1,0, 1,5, 2,0% (v/v). Chitosan sau khi bổ sung được khuấy trộn đều và để yên 3 giờ để thực hiện quá trình lắng. Dịch lên men tiếp tục được bơm đẩy qua cột lọc có kích thước màng là 1÷2μm. Acid ascorbic được thiết kế nghiên cứu ở các nồng độ 0,20%, 0,25%, 0,30% nhằm tìm nồng độ bổ sung phù hợp. Dịch lên men sau lọc được sunfit hóa bằng cách bổ sung Na2S2O5 30ppm (tính theo SO2) để tiêu diệt toàn bộ vi sinh vật trước khi đem tàng trữ.

**2.2.3. Phương pháp đánh giá chất lượng**

- Đánh giá màu sắc sản phẩm bằng phương pháp đo độ hấp thu A trên máy Spectrophotometer 722N ở λ = 521 nm [20].

- Đánh giá độ trong sản phẩm bằng phương pháp đo độ truyền quang T trên máy Spectrophotometer 722N ở λ = 660nm [11].

- Đánh giá cảm quan bằng phương pháp QDA (Quantitative Descriptive Analysis). Hội đồng cảm quan gồm 7 thành viên được chọn lựa và huấn luyện theo ISO 8586: 2012. Các thuật ngữ mô tả cho sản phẩm và điểm đánh giá sử dụng được trình bày ở bảng sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Tên chỉ tiêu** | **Điểm đánh giá** | **Thuật ngữ sử dụng** |
| Màu | 5 | Màu tím đỏ đặc trưng |
| 4 | Màu tím đỏ khá đặc trưng |
| 3 | Màu tím đỏ ít đặc trưng |
| 2 | Màu tím đỏ kém đặc trưng |
| 1 | Màu nâu |
| Mùi | 5 | Mùi đặc trưng |
| 4 | Mùi khá đặc trưng |
| 3 | Mùi ít đặc trưng |
| 2 | Mùi không đặc trưng |
| 1 | Có mùi lạ |
| Vị | 5 | Vị hài hòa |
| 4 | Vị khá hài hòa |
| 3 | Vị tương đối hài hòa |
| 2 | Vị kém hài hòa |
| 1 | Vị đắng xen lẫn chua |
| Độ trong | 5 | Trong suốt, không vẩn đục và vật thể lạ nhỏ |
| 4 | Trong suốt, không vẩn đục, có ít vật thể lạ nhỏ |
| 3 | Trong, có tương đối nhiều vật thể lạ nhỏ |
| 2 | Hơi đục, có khá nhiều vật thể lạ nhỏ thô trầm trọng |
| 1 | Đục nhiều lắng cặn, có nhiều vật thể lạ nhỏ trầm trọng, thô |

**2.2.4. Thiết bị nghiên cứu**

Nghiên cứu sử dụng Thiết bị lên men đa năng và thiết bị lọc được Khoa Thực phẩm và Hóa học chế tạo. Thiết bị lên men bao gồm phần thân thiết bị bằng inox 304, bộ phận tạo khí vô trùng, bộ phận bẫy khí CO2, đồng hồ đo áp suất. Thiết bị lọc rượu vang sử dụng cột lọc có kích thước màng lọc 1÷2μm.



**Hình 2. 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 chưa đựng và không khí chứa vi sinh vật. Qúa 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 khả 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.



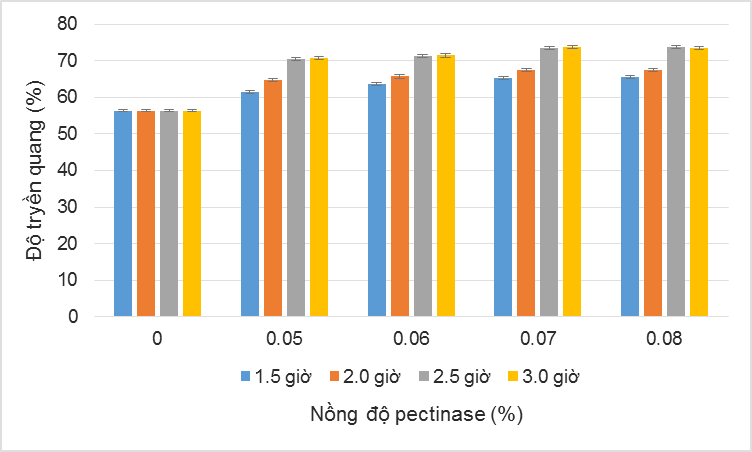
**Hình 3. Thiết bị lọc rượu vang có kích thước màng 1 ÷ 2μm**

**2.3. Xử lý thống kê:** Số liệu được xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai ANOVA, độ tin cậy β=95% bằng phần mềm SPSS 22.0.

**3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận**

**3.1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý pectinase đến độ trong của rượu vang**

Enzyme pectinase là enzyme xúc tác sự thủy  phân  liên  kết  ester  hoặc  liên  kết glucoside có trong mạch polyme của pectin. Sự có mặt của pectin sẽ làm khối quả nghiền sẽ có trạng thái keo, do đó khi ép dịch quả và các chất màu không thoát ra được. Enzyme pectinase có khả năng thủy phân pectin và làm cho phức pectin-protein bị kết bông [12] và từ đó dễ dàng được loại bỏ bằng các phương pháp lọc hoặc ly tâm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh được hiệu quả làm trong dịch ép của pectinase trong sản xuất thực phẩm [13]. Khi bổ sung enzyme pectinase vào chúng sẽ thủy phân hỗn hợp khối quả nghiền, lần lượt phân cắt các thành phần cấu tạo nên thành tế bào. Kết quả của việc này làm phá vỡ cấu trúc thành tế bào, giải phóng các thành phần bên trong bao gồm nước và các hợp chất màu [14]. Bên cạnh đó, pectinase thủy phân các phân tử pectin, cắt đứt các mạch liên kết trong phân tử và làm giảm phân tử lượng của chúng, các hạt cặn lơ lửng trong dịch dễ kết lắng dịch quả sẽ trong suốt không bị đục và lọc sẽ dễ hơn.



**Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý pectinase đến độ trong của rượu vang**

Tính chất keo liên kết của pectin trong nước có tác dụng ngăn cản sự kết lắng. Dưới sự hiện diện của enzyme pectinase, phân tử pectin bị thủy phân, các sản phẩm được tạo thành mất đi tính keo và tạo điều kiện dễ dàng hơn cho quá trình lắng. Quá trình lắng diễn ra càng tốt thì độ trong của dịch quả càng cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả nồng độ và thời gian đều ảnh hưởng có ý nghĩa đến độ trong (α=0,05). Trong cùng thời gian thủy phân khi tăng nồng độ enzyme từ 0,05% đến 0,07% thì độ truyền quang của sản phẩm tăng lên (tương ứng với độ trong tăng lên) và có sự khác biệt có ý nghĩa với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ pectinase lên 0,08% thì độ truyền quang không tăng lên đáng kể và không có sự khác biệt có ý nghĩa. Kết quả cũng chỉ ra rằng, khi tăng thời gian thủy phân thì độ truyền quang cũng tăng đáng kể ở các mẫu thí nghiệm trong 1,5 ÷ 2,5 giờ. Ở 3,0 thủy phân, độ truyền quang tăng không đáng kể và không khác nhau có nghĩa với mẫu sau 2,5 giờ thủy phân. Điều này có thể giải thích là phản ứng thủy phân xúc tác bởi pectinase cần có một khoảng thời gian tối thiểu để xúc tác. Vì thế, việc kéo dài thời gian cho hoạt động thủy phân là cần thiết để tăng hiệu quả hoạt động. Nồng độ pectinase càng cao, thời gian thủy phân càng dài thì quá trình phân cắt càng diễn ra triệt để hơn. Tuy nhiên, đến một giới hạn nào đó thì lượng cơ chất bị phân cắt toàn bộ, lượng chất được giải phóng tối đa [15]. Bên cạnh đó vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ enzyme tăng nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất thì vận tốc phản ứng không thay đổi hoặc không tăng thêm khi tăng nồng độ enzyme. Hơn nữa, về mặt động học, vận tốc phản ứng tăng khi nồng độ enzyme tăng, nhưng khi nồng độ enzyme bão hòa với nồng độ cơ chất thì tốc độ phản ứng không thay đổi hoặc không tăng thêm [16]. Vì vậy, lựa chọn nồng độ pectinase là 0,07% (v/w), thời gian thủy phân là 2,5 giờ.

**3.2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ chitosan đến độ trong của rượu vang**

Trong sản xuất rượu vang, công đoạn làm trong là bước quan trọng. Trong thức tế, để làm trong nước quả các nhà khoa học thường dùng các chất trợ lắng như: Gelatin, alubumin lòng tắng trứng, bentonite, tannins, polyvinylpyrrolidone,…[15]. Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm làm trong với chitosan được thử nghiệm.

Chitosan là chất xơ có nguồn gốc động vật, tiền chất của nó là chitin, chủ yếu có ở vỏ ngoài của động vật giáp xác, nhuyễn thể, côn trùng và ở một số loài nấm. Chitosan là một amino polysaccharit, được hình thành từ quá trình deacetyl hoá chitin, một sản phẩm giá trị gia tăng từ phế liệu tôm. Chitosan có rất nhiều ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm, y học và xử lý môi trường [16] Chitosan thể hiện là một chất keo tụ rất tốt, có thể tạo phức tốt với nhiều chất hữu cơ, vô cơ khác nhau vì vậy được ứng dụng nhiều vào thu hồi các chất hữu cơ, xử lý nước thải, đặc biệt trong thu hồi protein. Một trong những ứng dụng của chitosan là khả năng liên kết trực tiếp với các chất tích điện âm để tạo thành các tập hợp lớn hơn và lắng xuống đáy của thiết bị [17].

Chitosan có điện tích dương cho nên chúng có khả năng chiếm giữ các liên kết có thuộc tính acid và ảnh hưởng đến việc tách các hạt chất rắn ở dạng thể keo của nước thải trong quá trình chế biến thực phẩm. Sandipan Chatterjee và cộng sự (2004) [19], đã sử dụng dung dịch chitosan 2% hòa tan trong acid acetic 7% để làm trong nước ép táo, nước ép chanh và nước ép cam cho kết quả tốt.

**3.2.1. Ảnh hưởng của loại chitosan**

Chitosan có được do deacetyl hoá chitin, các sản phẩm thương mại có mức độ deacetyl và trọng lượng phân tử/ độ nhớt khác nhau và do vậy có các đặc tính chức năng khác nhau. Chitosan có độ deacetyl hóa cao thì trong dung dịch có chứa nhiều gốc amin (NH3+) tích điện dương sẽ trung hòa điện tích của các phân tử protein tích điện âm trong dung dịch nước rửa, giảm khả năng hydrat hóa, tập hợp lại và kết tụ. Thí nghiệm này được thiết kế với 3 loại chitosan được sản xuất từ các nguồn nguyên liệu khác nhau, nồng độ chitosan sử dụng được cố định là 1,5% (v/v), thời gian để lắng tự nhiên là 2,0 giờ, sau đó dùng phần nước trong phía trên để xác định độ truyền quang.





**Hình 5. Ảnh hưởng của loại chitosan đến độ trong của rượu vang**

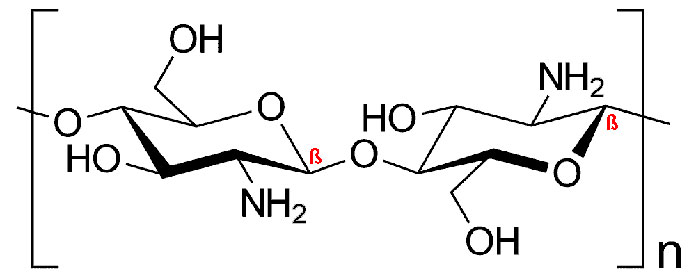
Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, các thí nghiệm với các loại chitosan khác nhau có sự khác biệt có ý nghĩa so với mẫu đối chứng. Độ truyền quang của các mẫu có xử lý bằng chitosan thay đổi không lớn. Với mẫu dùng chitosan tôm thẻ độ truyền quang (T) là nhỏ nhất, đồng nghĩa với hiệu quả làm trong nhỏ nhất và có sự khác biệt có nghĩa với hai mẫu dùng chitosan tôm sú và ghẹ xanh. Hiệu quả của chitosan khi tham gia vào quá trình trợ lắng phụ thuộc nhiều vào tổng điện tích dương của chúng. Các mạch phân tử chứa nhiều nhóm NH3+ sẽ liên kết được với nhiều chất lơ lửng như protein, pectin, xác nấm men,… Với chitosan tôm thẻ, tôm sú, ghẹ xanh độ nhớt có quan hệ tỷ lệ thuận với chiều dài và khối lượng phân tử của chúng và có trong nghiên cứu này sử dụng các loại chitosan có độ nhớt tương ứng là 465,3±2,1cps, 514,3±1,7cps, 535,3±1,5cps. Quan sát tốc độ lắng cho thấy, ngay sau khi bổ sung chitosan vào quá trình lắng lập tức xảy ra. Sau thời gian 3,0 giờ để yên xác định độ truyền quang. Kết quả cho thấy độ truyền quang của mẫu khi sử dụng chitosan tôm sú và ghẹ xanh không khác nhau có nghĩa. Vì thế, nghiên cứu lựa chọn chitosan tôm sú cho những nghiên cứu tiếp theo.

**3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan**

Nồng độ chitosan là yếu tố đóng vai trò quan trọng và quyết định đến hiệu quả cũng như tốc độ làm trong. Các thí nghiệm được thiết kế trong khoảng nồng độ chitosan 0,5÷2,0% trong thời gian 2,0 giờ. Kết quả được thể hiện trên hình 6.

**Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan đến độ trong rượu vang**

Chitosan khi được thêm vào dịch lên men sẽ phân tán đồng đều và tạo thành mạng lưới trong hỗn hợp và trong khoảng thời gian nhất định, các polycation mang điện tích dương của chitosan sẽ tương tác với các phần tử gây đục mang điện tích âm trong rượu vang tạo thành các hạt có kích thước lớn hơn và lắng xuống. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi nồng độ chitosan tăng dần thì lượng chất kết lắng tăng lên, lớp cặn dưới đáy dễ dàng quan sát được. Nồng độ chitosan càng cao, tốc độ kết lắng diễn ra càng nhanh.



**Hình 7. Chitosan mang nhóm amin tích**

**điện dương**

Độ truyền quang ở các nồng độ chitosan sử dụng khác nhau có sự sai khác có ý nghĩa và khác biệt rõ rệt so với mẫu đối chứng. Điều này chứng tỏ độ trong của rượu vang đã được cải thiện đáng kể khi mật độ chitosan đủ lớn. Ở nồng độ chitosan 1,5% độ truyền quang đạt được là 81,7% tăng đáng kể so với mẫu đối chứng (56,6%) đồng thời cho độ chua hài hòa với vị ngọt, chát. Khi tăng nồng độ chitosan lên 2% mặc dù độ truyền quang tiếp tục tăng nhẹ (82,4%) nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa so với nồng độ 1,5%. Vì vậy, nghiên cứu lựa chọn nồng độ dung dịch chitoan là 1,5% để thực hiện việc trợ lắng.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Sau 30 phút thêm chitosan | Sau 120 phút thêm chitosan |

0% 0,5% 1,0% 1,5% 2,0%

0% 0,5% 1,0% 1,5% 2,0%

**Hình 8. Chitosan liên kết với các chất tạo cặn kết lắng**

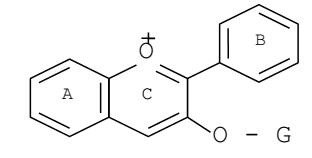
**3.3. Ảnh hưởng của acid citric đến màu sắc của sản phẩm**

Trong nghiên cứu này, acid citric được sử dụng để hòa tan chitosan đồng thời hướng tới mục đích bảo vệ màu cho sản phẩm rượu vang. Kết thúc quá trình lọc, chitosan cùng với các chất cặn được loại bỏ thông qua màng lọc kích thước 1÷2μm, acid citric được giữ lại trong sản phẩm. Nồng độ acid citric được bổ sung trong sản phẩm rượu vang là 0,0225% và có tác dụng chống oxy hóa cho sản phẩm.



**Hình 9. Biến đổi màu sắc của rượu vang khi bổ sung acid citric**

Kết quả cho thấy khi sử dụng acid citric trong quá trình bảo quản, độ hấp thụ cao hơn rõ rệt so với mẫu đối chứng. Màu tím tự nhiên của sản phẩm cũng ít bị biến đổi theo thời gian bảo quản hơn mẫu đối chứng. Điều này có thể giải thích là do pH tối thích của phenolase nằm trong khoảng 6÷7, khi hạ pH thì enzyme sẽ không thuận lợi để hoạt động*.* Việc sử dụng các loại acid tự nhiên như acid citric, acid malic, acid ascorbic để giảm pH của sản phẩm, sẽ giảm được tốc độ phản ứng hóa nâu và vừa có giá trị dinh dưỡng [19]. Độ hấp thụ ở mẫu sử dụng acid citric giảm dần theo thời gian bảo quản ở điều kiện thông thường và có sự khác nhau có ý nghĩa. Sau 1 tháng độ hấp thụ giảm từ giá trị ban đầu là 0,252 còn 0,192. Điều đó chứng tỏ, các chất màu trong rượu vang đã có sự suy giảm về nồng độ. Theo Lê Ngọc Tú và cộng sự(2003) [20], anthocyanin trong rượu vang có vai trò quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm và mang những đặc tính tốt về giá trị cảm quan và dinh dưỡng. Bản chất của chúng là những hợp chất phenol nên rất dễ bị oxy hóa trong các điều kiện khác nhau. Các hợp chất phenol có thể bị oxy hóa ngay ở nhiệt độ bình thường trong không khí ẩm, phản ứng này sẽ xảy ra nhanh hơn khi ở nhiệt độ cao và nhất là trong môi trường kiềm tính.Acid citric có tính khử sẽ nhường điện tử cho các gốc tự do làm hạn chế quá trình oxy hóa các hợp chất màu, đặc biệt là anthocyanin. Vai trò của acid citric như chất hỗ trợ chống oxy hóa.



**Hình 10.** **Cyanidin 3-glucoside**

**3.4. Ảnh hưởng của acid ascorbic đến màu sắc của sản phẩm**

Màu sắc của anthocyanin luôn thay đổi phụ thuộc vào pH, các chất màu có mặt và nhiều yếu tố khác. Tuy nhiên, màu sắc của anthocyanin thay đổi mạnh nhất phụ thuộc vào pH môi trường. Thông thường khi pH < 7,0 các anthocyanin có màu đỏ, khi pH > 7,0 thì có màu xanh. Ở pH = 1,0 các anthocyanin thường ở dạng muối oxonium màu cam đến đỏ, ở pH = 4,0 ÷ 5,0 chúng có thể chuyển về dạng bazơ cacbinol hay bazơ chalcon không màu, ở pH = 7,0 ÷ 8,0 lại về dạng bazơ quinoidal anhydro màu xanh. Trong môi trường trung tính, dung dịch cho màu tím [21]. Việc bổ sung thêm viamin C sẽ làm thay đổi pH của rượu vang đồng thời có khả năng chống oxy hóa rất tốt. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của vitamin C đến khả năng duy trì màu sắc của rượu vang được thể hiện ở hình 11.



**Hình 11. Ảnh hưởng của acid ascorbic đến màu sắc của sản phẩm**

Acid ascorbic được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm, không chỉ do giá trị dinh dưỡng của nó mà còn vì những đóng góp chức năng của nó đến chất lượng sản phẩm. Acid ascorbic là một trong những acid có khả năng chống các phản ứng oxy hóa rất tốt và các phản ứng hóa nâu do enzyme mà không gây tổn thương đến các mô thực vật nếu được sử dụng với một lượng vừa đủ [22]. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung ascorbic ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng bảo vệ màu sắc của rượu vang. Ở mẫu đối chứng (mẫu đã bổ sung 0,0225% acid citric) sau 4 tuần bảo quản màu sắc của sản phẩm bị nâu hóa nhẹ, độ hấp thụ giảm 0,220 so với ban đầu. Với các mẫu bổ sung 0,20%, 0,25%, 0,30% (w/v) acid ascorbic sau 4 tuần bảo quản vẫn giữ được màu sắc tương đồng so với ban đầu và độ hấp thụ không có sự khác nhau có ý nghĩa. Qúa trình oxy hóa phenol, sản phẩm oxy hóa đầu tiên là các chất o-quinone tương ứng. Các o-quinone này là các chất hoạt động, chúng có thể gây ra hàng loạt các phản ứng quan trọng, hoặc là tự ngưng tụ với nhau để tạo các sản phẩm có màu và không màu, tan và không tan trong nước. Tuy nhiên, các hợp chất phenol bị oxy hóa, nếu trong hệ thống phản ứng có mặt những chất có tính khử mạnh như glucose, acid ascorbic (vitamin C)... thì các o-quinone sẽ oxy hóa chúng, còn bản thân sẽ trở lại trạng thái ban đầu, không còn khả năng ngưng tụ thành các chất màu [20].Phản ứng xảy ra được thể hiện ở các phương trình sau:

O- diphenol + ½ O2 🡪 O-quinone + H2O

O-quinone + Acid ascorbic 🡪 O- diphenol + Acid dehydroascorbic

Ở mẫu đối chứng do tham gia vào một loạt các phản ứng trên nên hàm lượng các hợp chất phenol giảm xuống kéo theo là giảm một lượng đáng kể anthocyanin làm giảm độ hấp thụ màu trong rượu vang. Để hạn chế việc bổ sung nhiều acid ascorbic có thể ảnh hưởng đến độ chua của sản phẩm, vì vậy lựa chọn nồng độ acid ascorbic 0,20% để bảo vệ màu anthocyanin cho sản phẩm.

**3.5. Đánh giá cảm quan rượu vang sim**

Ngoài các quy chuẩn về chỉ tiêu hóa học, rượu vang cũng cần được sự chấp nhận cao của người tiêu dùng thông qua đánh giá cảm quan. Kết quả đánh giá cảm quan rượu theo phương pháp QDA được cho ở hình 12.

**Hình 12. Giá trị cảm quan của rượu vang sim theo phương pháp QDA**

Rượu vang sim có màu sắc tím đỏ đặc trưng, mùi sim tự nhiên, không có mùi lạ. Vị của rượu là sự kết hợp hài hòa của vị chát, vị chua và vị ngọt.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| **Hình 13. Sản phẩm rượu vang sim** | | |

**Kết luận**

Độ trong của rượu vang sim được cải thiện đáng kể nhờ các biện pháp sinh học và hóa học. Nguyên liệu quả sim sau khi nghiền được bổ sung 0,07% (v/w) enzyme pectinase và xử lý trong 2,5 giờ ở nhiệt độ 45oC, pH = 4,0. Dịch lên men được lọc thu dịch và lên men phụ ở điều kiện nhiệt độ 10oC trong 15 ngày. Để quá trình lọc được thực hiện dễ dàng, hiệu quả nghiên cứu đã sử dụng dung dịch chitosan tôm sú 2,0% pha trong acid citric 1,5% với tỷ lệ 1,5% (v/v) để làm chất trợ lắng. Qúa trình lắng được thực hiện dễ dàng ở điều kiện thông thường trong thời gian 3,0 giờ. Độ truyền quang sau quá trình lắng đạt 81,7%. Hỗn hợp được lọc thô bằng túi lọc trước khi đi qua máy lọc rượu vang với kích thước màng 1÷2μm. Sản phẩm thu được có độ truyền quang ở 660nm là 89,7%. Acid citric và ascorbic có tác dụng tốt trong việc duy trì màu sắc cho rượu vang. Citric được sử dụng với cả hai mục đích là hòa tan chitosan và chống oxy hóa, nồng độ citric sử dụng là 0,0225% (w/v). Acid ascorbic được sử dụng với nồng độ 0,20%. Bên cạnh việc sử dụng 2 acid làm chất chống oxy hóa, trong quy trình còn có sự tham gia của sodium metabisunfit 30mg/l đóng vai trò là tác nhân thanh trùng nguyên liệu trước khi lên men, sản phẩm sau lên men phụ và chất hỗ trợ quá trình chống oxy hóa. Rượu vang sim được đánh giá cảm quan bằng phương pháp QDA cho kết quả cao, đáp ứng tốt yêu cầu về các chỉ tiêu của sản phẩm.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

[1] Tung, N.H; Ding, Y.; Choi, E.M.; Kiem, P.V.; Minh, C. V. and Kim, Y.H. (2009). *New anthracene glycosides from Rhodomyrtus tomentosa stimulate osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells*. Arch Pharm Res, 32(4): 515-520.

[2] Hui, W.H. and Li, M.M. (1976). *Two new triterpenoids from Rhodomyrtus tomentosa*. Phytochemistry, 15: 1741-1743.

[3] Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiển, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn, (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

[4] Nguyễn Nhật Minh Phương, Lý Nguyễn Bình, Châu Trần Diễm Ái và Chế Văn Hoàng, 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*. Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ, 20(a): 127-136.

[5] Đỗ Thị Hiền (2020). *Bán tinh sạch và ứng dụng enzyme pectinase từ nấm mốc Aspergillus niger vào xử lý nước ép táo và nho*. Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, 15(1 ), 58-71

[6] Bhat, M. K. (2000). *Cellulases and related enzymes in biotechnology*. Biotechnol. Adv. 18:355–383.

[7] Galante, Y. M., De Conti, A. and Monteverdi, R. (1998). *Application of Trichoderma enzymes in food and feed industries*. Trichoderma & Gliocladium—Enzymes, Biological Control and Commercial Applications.2:327–342.

[8] Dorreich, K. (1996). *Investigations on production of apple juice without the utilisation of presses*. In: XII International Congress of Fruit Juice Report of Congress (pp. 183–197). IFU, Interlaken, 20–24 May.

[9] Grassin, C. and Fauquembergue, P. (1996a). *Fruit juices*. Industrial Enzymol 2:226.

[10] Bùi Văn Tú, Nguyễn Ngọc Tú (2021). Sử dụng *Saccharomyces cerevisiae RV002* để lên men rượu vang từ quả sim (*Rhodomyrtus tomentosa*). Tạp chí Nghiên cứu khoa học, số 1 (72), Trường Đại học Sao Đỏ.

[11] Sin H. N., S. Yusof, N. Sheikh Abdul Hamid and R. A.Rahman (2006). *Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology*. Journal of Food Engineering, 73: 313-319.

[12] Liew Abdullah A. G., Sulaiman N. M. and Aroua M. K. *Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme.* Food Eng, vol. 81, pp. 65-71, 2007.

[13] H. M. Azeredo, A. N. Santos, A. C. Souza, K. C. Mendes, M. I. R., and Andrade. *Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract*. American Journal of Food Technology, vol. 2, pp. 307-312, 2007.

[14] Nguyễn Thị Thu Hồng, Trần Minh Tuấn, Nguyễn Tấn Hùng (2019). *Ảnh hưởng của xử lý enzyme và chế độ thanh trùng đến chất lượng sản phẩm nước ép dưa lưới.*Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Tập 55, Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học (2019)(2): 241-249.

[15] Nguyễn Thị Minh Nguyệt và Trương Thị Cẩm Trang, 2010. *Nghiên cứu xử lý dịch ép một số loại trái cây Việt Nam*. Tạp chí hoạt động khoa học, 38-39.

[16] Hirano, S., 1996. *Chitin biotechnology application*. *Biotechnology Annual Review*, 2, 237-258.

[17] Trang Sĩ Trung và cộng sự (2008). *Nghiên cứu ứng dụng chitosan trong việc thu hồi protein từ nước rửa surimi*. Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản - số 02, Trường Đại học Nha Trang.

[18] S. Chattejee, S. Chatterjee, B.P. Chatterjee, A.K Guh (2004). *Clarification of fruit juice with chitosan.* Process Biochemistry 39, 2229-2232.

[19] Nguyễn Minh Thủy (2010). *Ổn định và nâng cao chất lượng rượu vang sim bằng biện pháp hóa học và sinh học.* Tạp chí Khoa học số14, trang 195-204, Trường Đại học Cần Thơ.

[20] Lê Ngọc Tú, Bùi Đức Lợi, Lưu Duẩn, Ngô Hữu Hợp, Đặng Thị Thu, Nguyễn Trọng Cẩn (2003). *Hoá học thực phẩm*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

[21] Nguyễn Thị Phương Anh và Nguyễn Thị Lan (2007). *Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến màu anthocyanin từ bắp cải tím ứng dụng làm chất chỉ thị an toàn trong phân tích thực phẩm và hoá học*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Đà Nẵng (20), trang 6.

[22] Pongsakul N, Leelasart B, Rakariyatham N (2006). *Effect of L-cysteine , Potassium Metabisulfite , Ascorbic Acid and Citric Acid on Inhibition of Enzymatic Browning in Longan*. Chiang Mai Journal of Science. 33:37-141.