

STUDY ON THE CONDITIONS FOR CIDER FERMENTATION FROM NAM ROI POMELO (*Citrus grandis* L.)

Bui Ngoc Bao Tran, Tran Thi Giang, Luu Minh Chau, Nguyen Ngoc Thanh, Tran Bach Long, Tran Thanh Truc, Nguyen Van Muoi, Huynh Xuan Phong*

Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 11/7/2022 Revised: 15/9/2022 Published: 15/9/2022	Cider is a low alcohol drink containing high nutrients, vitamins, minerals and probiotics which good for digestion and suitable for most ages. The objective of this study was to determine the raw material treatment method and to establish a fermentation process for Nam Roi pomelo (<i>Citrus grandis</i> L. Osbeck) cider using a commercial yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BV818. The factors investigated include the dilution ratio (pure and diluted 1:1), °Brix of 10 to 20; pH of 4.0 to 5.5 with yeast concentration of 0.02 to 0.05% and fermentation time at 36 to 48 hours. The results show that fermentation from fruit juice combined with the pectinase enzyme of 0.2% (w/v) is an effective raw material treatment method. The best fermentation was done at 1:1 dilution ratio, 18 °Brix, pH 5.0 and yeast concentration 0.04% (w/v) with 44 h fermentation time. The product after fermentation has an ethanol content of 5.25% (v/v), light yellow and clear color, sweet and sour taste, a specific pomelo aroma.
KEYWORDS Alcoholic beverage Cider <i>Citrus grandis</i> Nam Roi pomelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN LÊN MEN CIDER TỪ BƯỞI NĂM ROI (*Citrus grandis* L.)

Bùi Ngọc Bảo Trân, Trần Thị Giang, Lưu Minh Châu, Nguyễn Ngọc Thanh, Trần Bạch Long, Trần Thanh Trúc, Nguyễn Văn Mười, Huỳnh Xuân Phong*

Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 11/7/2022 Ngày hoàn thiện: 15/9/2022 Ngày đăng: 15/9/2022	Nước ép lên men có độ cồn thấp (cider) là thức uống được ưa chuộng hiện nay có chứa nhiều chất dinh dưỡng, vitamin, khoáng chất tốt cho tiêu hóa và phù hợp với nhiều lứa tuổi. Mục tiêu của nghiên cứu là nhằm xác định phương pháp xử lý nguyên liệu và thiết lập quy trình lên men cider bưởi Năm Roi (<i>Citrus grandis</i> L. Osbeck) bằng chủng nấm men thương mại <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BV818. Các nhân tố được khảo sát bao gồm tỉ lệ pha loãng (nguyên chất và pha loãng 1:1), °Brix trong khoảng 10-20, pH 4,0-5,5 cùng với nồng độ nấm men 0,02-0,05% và thời gian lên men trong 36-48 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy lên men từ dịch bưởi Năm Roi ép kết hợp với enzyme pectinase 0,2% (w/v) là phương pháp xử lý nguyên liệu hiệu quả. Quá trình lên men tốt nhất được thực hiện ở tỉ lệ phối trộn 1:1, 18 °Brix, pH 5,0, nồng độ nấm men 0,04% (w/v) với thời gian lên men 44 giờ. Sản phẩm sau lên men có hàm lượng ethanol đạt 5,25% (v/v) với màu vàng nhạt và trong suốt, vị chua ngọt, thơm hương bưởi nhẹ.
TỪ KHÓA Bưởi Năm Roi Cider <i>Citrus grandis</i> Đồ uống có cồn <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6245>

* Corresponding author. Email: hxphong@ctu.edu.vn.com

1. Giới thiệu

Bưởi Năm Roi là một trong những loại trái cây phổ biến của nước ta, đặc biệt là vùng Đồng bằng Sông Cửu Long và có giá trị xuất khẩu cao. Theo quy hoạch của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn trong phát triển cây có múi đến năm 2020, diện tích trồng bưởi chiếm vị trí thứ nhất lên đến 27.900 ha, kế đến là cam với diện tích trồng 26.250 ha và đến chanh, quýt. Quả bưởi ở Việt Nam đa dạng về chủng loại và phân bố rộng rãi theo các vùng sinh thái nông nghiệp [1]. Bưởi Năm Roi có đặc trưng quả to, hình dáng quả lê, đẹp và cân đối, dễ tách vỏ, tách múi, hương vị thơm ngon, múi bưởi đều, giòn và ngọt thanh, đặc biệt có rất ít hạt [2]. Thịt bưởi chứa nhiều thành phần dinh dưỡng như đường, chất xơ, vitamin C, B và các loại khoáng cần thiết cho sức khỏe của con người [3]. Do đó, việc sử dụng bưởi giúp tăng sức đề kháng, phòng ngừa ung thư, giúp giảm cân, giảm cholesterol và thích hợp cho người bệnh tiểu đường. Không chỉ vậy, các bộ phận khác của cây như dầu ở lá còn được sử dụng chữa các chứng rối loạn về da, nhức đầu và đau bụng, có tính kháng khuẩn, chống oxy hóa và đặc tính chống ung thư [4], [5]. Trong y học cổ truyền, vỏ và hoa được dùng như một phương pháp điều trị ho, tiêu sưng, chống lo âu và rối loạn giấc ngủ, một số trường hợp tâm thần bất thường, hen suyễn, bệnh phong và động kinh. Ngoài ra, tinh dầu bưởi cũng phổ biến rộng rãi trong thực phẩm, mỹ phẩm, dược phẩm và nước hoa [6]-[8].

Với hương vị đặc trưng riêng, có độ cồn thấp, nước trái cây lên men (cider) đang dần trở thành một trong những thức uống được ưa chuộng, từng bước chiếm lĩnh thị trường và thay thế cho các loại thức uống có cồn cao độ. Do hàm lượng cồn chỉ nằm trong khoảng 4-6% nên cider không những không gây say như một số sản phẩm đồ uống có cồn khác mà còn giúp kích thích hệ tiêu hóa, giảm nguy cơ tim mạch và cải thiện tinh thần cho người sử dụng. Hiện nay, các nghiên cứu về sản xuất nước ép lên men từ nhiều loại trái cây đang trở nên phổ biến như nho, ôi, sáo [9], dâu tằm [10], táo mèo [11], thanh long [12],... Trong đó, sản phẩm nước ép lên men từ bưởi Năm Roi chưa được nghiên cứu và sản xuất nhiều mà chủ yếu được sử dụng dưới dạng trái tươi. Gần đây, tác giả Huỳnh Xuân Phong và cộng sự (2021) đã nghiên cứu các điều kiện lên men tối ưu để sản xuất rượu vang từ bưởi Năm Roi với hàm lượng ethanol đạt 13,24% v/v. Nghiên cứu đã sử dụng dịch ép bưởi Năm Roi được phối chế ở 30°Brix, pH 5,0 và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (0,04% w/v) để lên men ở 28-32°C trong 9 ngày [13]. Với mục tiêu đa dạng hóa sản phẩm từ bưởi Năm Roi, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng quy trình lên men cider có độ cồn thấp nhằm tạo ra sản phẩm mới phù hợp với xu hướng của người tiêu dùng và nâng cao giá trị sử dụng cây bưởi Năm Roi.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Bưởi Năm Roi được thu mua tại các vườn ở tỉnh Vĩnh Long, bưởi được chọn có hình quả lê, cân đối, vỏ màu xanh vàng. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* BV818 (Angel Yeast Co., Ltd.) được sử dụng trong nghiên cứu. Trước khi sử dụng, nấm men được hoạt hóa trong nước ấm 35-37°C theo tỷ lệ nấm men, đường và nước (w/w/v) là 1:2:10 trong 12-15 phút.

Hóa chất điều chỉnh pH gồm Na_2CO_3 và acid citric (HiMedia, Ấn Độ), enzyme pectinase (ICFOOD Vietnam), hóa chất thanh trùng (NaHSO_3), tri-n-butyl phosphate (Sigma-Aldrich, Đức), acid dinitrosalicylic (Sigma-Aldrich, Đức), NaOH, H_2SO_4 , I_2 , hồ tinh bột, phenolphthalein, kalichromate, kali natri tartrate, sucrose, cồn 70°, cồn 96°.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của việc xử lý nguyên liệu đến chất lượng nước ép bưởi Năm Roi

Mục đích nghiên cứu này nhằm xác định phương pháp xử lý nguyên liệu hiệu quả để tăng hiệu suất thu hồi dịch ép bưởi và ít đắng. Bưởi Năm Roi được thu mua tại vườn ở Vĩnh Long và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong các thùng xốp, sau đó tách lấy múi bưởi và ép bằng máy

ép trái cây (Panasonic MJ-68M, Việt Nam) để thu dịch bưởi. Dịch quả được thu bằng phương pháp ép, pha loãng với nước theo tỉ lệ 1:1 và sau đó xử lý theo 4 điều kiện thử nghiệm như sau: (1) lên men từ dịch quả thu được bằng phương pháp ép không xử lý; (2) lên men từ dịch quả thu được bằng phương pháp ép xử lý với enzyme pectinase 0,2% (w/v); (3) lên men từ dịch quả thu được bằng phương pháp ép xử lý với Na_2CO_3 ; (4) lên men từ dịch quả thu được bằng phương pháp ép xử lý kết hợp Na_2CO_3 và enzyme pectinase.

Sử dụng 100 mL dịch quả thu được từ 4 nghiệm thức xử lý, điều chỉnh đến 20 °Brix (sử dụng đường sucrose) và pH 4,5 để lên men trong bình tam giác 250 ml. Dịch quả được thanh trùng bằng NaHSO_3 để tiêu diệt vi sinh vật tạp nhiễm. Nấm men *S. cerevisiae* BV818 được bổ sung vào dịch quả với hàm lượng 0,04% (w/v) và lên men ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng đến hiệu quả lên men bằng *S. cerevisiae*

Khảo sát tỉ lệ pha loãng giữa dịch ép bưởi và nước ở 2 mức 1:0 và 1:1, đồng thời bổ sung đường để đạt 6 mức từ 10 đến 20 °Brix để xác định phương pháp phối chế thích hợp cho quá trình lên men cider bưởi Năm Roi. Điều chỉnh pH 4,5 và thanh trùng bằng NaHSO_3 và bổ sung nấm men *S. cerevisiae* BV818 (0,04% w/v) và lên men ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ.

2.2.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện lên men nước ép bưởi Năm Roi

Khảo sát nồng độ pH ở 4 mức từ 4,0 đến 5,5 và 4 mức nồng độ nấm men từ 0,02% đến 0,05% (w/v) để xác định các yếu tố thích hợp cho quá trình lên men cider bưởi Năm Roi. Dịch bưởi được phối trộn với đường và tỉ lệ nước phù hợp tạo môi trường thuận lợi cho quá trình lên men. Cố định các thông số được chọn từ những nội dung khảo sát trên và tiến hành lên men ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ.

2.2.4. Khảo sát thời gian lên men nước ép bưởi Năm Roi

Sử dụng các giá trị tối ưu được chọn từ các thí nghiệm trên để khảo sát thời gian lên men cider bưởi Năm Roi nhằm thu được độ cồn thích hợp cho sản phẩm. Các mốc thời gian theo dõi là 36, 40, 44 và 48 giờ.

2.2.5. Phương pháp phân tích chỉ tiêu và xử lí số liệu

- Xác định pH bằng máy đo pH Horiba (pH1100, Nhật Bản) và °Brix được xác định bằng khúc xạ kế Atago (Master-2 α , Nhật Bản).

- Hàm lượng đường sót được phân tích bằng phương pháp DNS với thuốc thử là acid dinitrosalicylic [14]. Dịch bưởi sau lên men được pha loãng thích hợp sao cho nằm trong đường chuẩn. Hai ml thuốc thử DNS thêm vào 1 ml dịch lên men và lắc đều bằng máy vortex. Đun cách thủy dịch phản ứng trong 5 phút, sau đó để nguội và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Hàm lượng đường sót trong dịch bưởi được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của glucose được xây dựng ở các nồng độ 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 và 1 mg/ml.

- Hàm lượng ethanol được xác định dựa trên phản ứng với tri-n-butyl phosphate (TBP) và kali chromate [15]. Hút 1 ml TBP vào ống eppendorf chứa 1 ml dịch bưởi và lắc bằng máy vortex trong 1 phút. Để yên đến khi dung dịch tách thành 2 lớp, hút 500 μL dung dịch lớp trên cho vào ống eppendorf mới, bổ sung 500 μL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10% được pha trong H_2SO_4 5 M và lắc đều trong 10 phút và sau đó để yên cho dung dịch tách lớp. Tiếp theo, hút 100 μL lớp dưới cho vào eppendorf mới, pha loãng 10 lần với 900 μL nước cất. Đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 595 nm. Hàm lượng ethanol của cider được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của ethanol tuyệt đối được xây dựng ở các nồng độ 0, 1, 2, 3, 4, 5 và 6 % v/v.

- Hàm lượng vitamin C được xác định bằng phương pháp chuẩn độ [16]. Lấy 10 ml dịch bưởi cho vào bình tam giác 250 ml, cho 5 ml dung dịch HCl 5% và thêm vài giọt tinh bột 1%, lắc nhẹ rồi chuẩn độ bằng I_2 0,01N tới khi bắt đầu xuất hiện màu xanh dương bền trong 20 giây. Hàm lượng vitamin C được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng acid ascorbic} = \frac{n \times 0,88 \times 1000}{V} \text{ g/L}$$

Trong đó, n là số ml dung dịch I₂ 0,01 N dùng để chuẩn độ; hệ số 0,88 là số mg acid ascorbic tương ứng với 1 mL I₂ 0,01N và V là số ml dịch lên men đã lấy để phân tích.

- Cảm quan sản phẩm được đánh giá theo TCVN 3217-79 [17].
- Số liệu thí nghiệm được phân tích ANOVA bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVIII và xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của việc xử lý nguyên liệu đến chất lượng nước ép bưởi Năm Roi

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của việc xử lý nguyên liệu đến chất lượng cider bưởi Năm Roi được thể hiện ở Bảng 1 với các chỉ tiêu về độ Brix, pH, hàm lượng đường khử, hàm lượng ethanol và hàm lượng vitamin C của dịch quả sau lên men.

Bảng 1. Kết quả khảo sát phương pháp xử lý nguyên liệu

Phương pháp xử lý nguyên liệu	°Brix sau lên men	pH sau lên men	Vitamin C (mg/l)	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
Ép + Không xử lý	10,33 ^c	3,27 ^d	278,67 ^c	8,52 ^d	3,85 ^d
Ép + Enzyme pectinase	10,00 ^c	3,42 ^c	352,00 ^a	9,38 ^c	4,98 ^a
Ép + Na ₂ CO ₃	11,50 ^a	3,73 ^b	303,11 ^b	10,18 ^b	4,62 ^b
Ép + Enzyme pectinase + Na ₂ CO ₃	10,83 ^b	3,76 ^a	261,56 ^d	10,32 ^a	4,33 ^c

Ghi chú: Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy độ Brix sau khi lên men ở cả 4 phương pháp xử lý nguyên liệu đều giảm so với ban đầu (20 °Brix) và nằm trong khoảng 10,33-11,50 °Brix, tương ứng với hàm lượng đường khử còn sót lại (8,52-10,32 g/100 ml) trong sản phẩm. Bên cạnh đó, các giá trị pH sau 48 giờ lên men cũng có xu hướng giảm về mức acid. Điều này đã cho thấy sự hoạt động của nấm men trong môi trường nước ép bưởi, nấm men đã sử dụng đường để làm nguồn dinh dưỡng cho quá trình tăng sinh khối và chuyển hóa thành ethanol, CO₂ và một số acid hữu cơ [18].

Khi xét về hàm lượng ethanol sinh ra sau 48 giờ lên men, có thể thấy rằng ở phương pháp ép (không xử lý) cho hàm lượng ethanol thấp nhất (3,98% v/v), tiếp đến là phương pháp ép xử lý kết hợp cả enzyme pectinase và Na₂CO₃ (4,33% v/v) và phương pháp ép xử lý Na₂CO₃ (4,62% v/v). Trong khi đó, phương pháp ép kết hợp với xử lý enzyme pectinase cho hàm lượng ethanol cao nhất đạt 4,98% (v/v) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Nguyên nhân là do enzyme pectinase đã thủy phân pectin có trong dịch quả thành các phân tử nhỏ hơn, giúp tăng hiệu suất thu hồi và cải thiện chất lượng dịch quả [19], [20], từ đó đã tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình lên men tốt hơn. Không chỉ vậy, hàm lượng vitamin C sau lên men khi xử lý dịch quả bằng enzyme pectinase cũng cho kết quả cao nhất với 352 mg/l. Vậy nên, phương pháp ép kết hợp xử lý enzyme pectinase được chọn để thực hiện ở các nội dung tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của quá trình pha loãng đến hiệu quả lên men cider

Hàm lượng chất khô hòa tan là một trong những nhân tố quan trọng, không chỉ ảnh hưởng đến quá trình lên men mà còn ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm sau lên men. Hơn nữa, việc xác định tỉ lệ phối chế dịch quả với nước cũng rất quan trọng vì nó ảnh hưởng đến hương vị của thành phẩm sau khi kết thúc quá trình lên men. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của 2 tỉ lệ phối trộn giữa dịch quả và nước (dịch quả nguyên chất và 1:1) với 6 mức °Brix (10, 12, 14, 16, 18 và 20 °Brix) đến quá trình lên men cider bưởi Năm Roi. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tỉ lệ pha loãng và nồng độ đường ban đầu

Thí nghiệm	Nhân tố		°Brix sau lên men	pH sau lên men	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
	Tỉ lệ pha loãng (dịch bưởi : nước)	°Brix				
1	1 : 0	10	4,83 ^g	4,12 ^c	5,68 ^h	3,79 ^h
2	1 : 0	12	5,50 ^{ef}	4,08 ^d	6,16 ^g	4,10 ^g
3	1 : 0	14	6,33 ^d	3,92 ^e	7,18 ^f	4,58 ^e
4	1 : 0	16	8,83 ^c	3,78 ^g	7,96 ^e	4,90 ^d
5	1 : 0	18	10,17 ^b	3,59 ^h	8,63 ^d	5,63 ^a
6	1 : 0	20	12,00 ^a	3,44 ^j	10,25 ^b	5,48 ^b
7	1 : 1	10	4,83 ^g	4,25 ^a	5,60 ^h	3,52 ⁱ
8	1 : 1	12	5,33 ^{fg}	4,16 ^b	6,28 ^g	4,00 ^g
9	1 : 1	14	6,00 ^{de}	3,89 ^f	7,30 ^f	4,24 ^f
10	1 : 1	16	8,83 ^c	3,53 ⁱ	8,79 ^d	4,93 ^d
11	1 : 1	18	10,17 ^b	3,21 ^l	9,45 ^c	5,51 ^{ab}
12	1 : 1	20	12,17 ^a	3,24 ^k	10,58 ^a	5,16 ^c

Ghi chú: Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy tỉ lệ pha loãng và nồng độ đường ban đầu khác nhau dẫn đến độ Brix, pH, hàm lượng đường khử và hàm lượng ethanol sau lên men cũng có sự khác nhau. Trong đó, hàm lượng ethanol thu được khi lên men dịch quả nguyên chất hay pha loãng đều có xu hướng tỉ lệ thuận với độ Brix ban đầu. Cụ thể, từ thí nghiệm thứ 1-6 (lên men nguyên chất), hàm lượng ethanol tăng dần và nằm trong khoảng 3,79-5,63% (v/v), tương tự, thí nghiệm thứ 7-12 (pha loãng 1:1), nồng độ ethanol dao động trong khoảng 3,52-5,51% (v/v). Đặc biệt, ở thí nghiệm thứ 5 cho hàm lượng ethanol cao nhất đạt 5,63% (v/v) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các thí nghiệm thứ còn lại, trừ thí nghiệm thứ 11 (5,51% v/v). Khi so sánh nồng độ ethanol ở thí nghiệm thứ 6 và thí nghiệm thứ 11 thì khác biệt này cũng không có nghĩa thống kê ở mức 5%. Trong khi đó, thí nghiệm thứ 7 và thí nghiệm thứ 1 cho hàm lượng ethanol thấp nhất, lần lượt là 3,52% v/v và 3,79% v/v. Nguyên nhân là do ở 2 thí nghiệm này, hàm lượng chất khô hòa tan thấp (10 °Brix) nên không có đủ nguồn dinh dưỡng để nấm men hoạt động và chuyển hóa thành ethanol. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ chất rắn hòa tan lên 20 °Brix, hàm lượng ethanol có xu hướng giảm. Điều này cho thấy, nấm men đã bị ức chế bởi hàm lượng đường cao có trong dịch quả, dẫn đến mất cân bằng trạng thái sinh lý của nấm men và làm giảm hiệu suất lên men [21]. Kết quả này tương tự với kết quả của Nguyễn Đức Hạnh và cộng sự (2016), trong quá trình nghiên cứu lên men nước táo mèo có độ cồn thấp, khi hàm lượng chất rắn hòa tan đạt 20 °Brix cũng cho hàm lượng ethanol thấp nhất, nhưng khi bổ sung đường ở mức 18 °Brix đã tạo ra sản phẩm có hàm lượng ethanol và chất lượng cảm quan cao nhất [11].

Bên cạnh đó, kết quả từ Bảng 2 cũng cho thấy hàm lượng đường sót trong sản phẩm ở cả 2 tỉ lệ pha loãng có xu hướng giảm tương tự nhau. Điều này chứng tỏ khi pha loãng dịch ép bưởi, nấm men vẫn có đủ dinh dưỡng cần thiết để chuyển hóa đường thành ethanol. Ngoài ra, hàm lượng đường còn sót lại cũng đóng vai trò quan trọng trong việc tạo nên hương vị cho sản phẩm. Giúp tạo ra sản phẩm cider bưởi có vị hài hòa và dễ uống hơn. Nhìn chung, để tiết kiệm chi phí nguyên liệu ban đầu mà vẫn đảm bảo được sản phẩm có nồng độ ethanol phù hợp, hương vị thơm ngon đặc trưng thì tỉ lệ phối trộn 1:1 và 18 °Brix được lựa chọn.

3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện lên men nước ép bưởi Năm Roi

Nấm men đóng vai trò chính trong quá trình thực hiện các phản ứng sinh hóa để sản xuất cồn và tạo nên hương vị đặc trưng cho sản phẩm. Do đó, nồng độ nấm men ban đầu là một trong những yếu tố quyết định và ảnh hưởng trong suốt quá trình lên men. Nếu nồng độ nấm men quá

cao sẽ xảy ra sự cạnh tranh nguồn dinh dưỡng, tiêu hao nguồn giống và nguyên liệu nuôi cấy. Ngược lại, nếu nồng độ nấm men quá thấp thì quá trình lên men xảy ra chậm và không triệt để. Bên cạnh đó, pH cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng lên men, chất lượng sản phẩm và khả năng tập nhiễm của các vi sinh vật trong quá trình lên men [22]. Kết quả khảo sát quá trình lên men với các giá trị pH 4,0-5,5 và nồng độ nấm men bổ sung 0,02-0,05% (w/v) được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát nồng độ pH và nấm men bổ sung

Thí nghiệm thứ	Nhân tố		°Brix sau lên men	pH sau lên men	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
	pH	Nấm men (% w/v)				
1	4,0	0,02	13,83 ^a	3,45 ^l	11,15 ^a	3,02 ^k
2	4,0	0,03	13,50 ^{ab}	3,42 ^m	10,71 ^b	3,51 ^j
3	4,0	0,04	13,17 ^b	3,40 ^{mn}	10,19 ^c	4,16 ^{hi}
4	4,0	0,05	12,50 ^c	3,39 ⁿ	9,88 ^{de}	4,45 ^{fg}
5	4,5	0,02	13,50 ^{ab}	3,73 ⁱ	10,06 ^{cd}	4,10 ⁱ
6	4,5	0,03	13,17 ^b	3,61 ^j	9,39 ^f	4,57 ^f
7	4,5	0,04	11,83 ^d	3,56 ^k	8,97 ^{hi}	5,38 ^c
8	4,5	0,05	10,67 ^e	3,47 ^l	8,43 ^j	5,79 ^b
9	5,0	0,02	12,50 ^c	4,30 ^b	9,94 ^{de}	4,29 ^{gh}
10	5,0	0,03	11,83 ^d	4,12 ^d	9,08 ^{gh}	4,92 ^e
11	5,0	0,04	10,33 ^{ef}	3,98 ^g	8,74 ⁱ	5,93 ^{ab}
12	5,0	0,05	9,83 ^g	3,95 ^h	8,05 ^k	6,12 ^a
13	5,5	0,02	12,50 ^c	4,39 ^a	9,80 ^e	4,08 ⁱ
14	5,5	0,03	11,5 ^d	4,27 ^c	9,31 ^{fg}	4,22 ^{hi}
15	5,5	0,04	10,17 ^{fg}	4,08 ^e	8,83 ⁱ	4,96 ^e
16	5,5	0,05	9,33 ^h	4,01 ^f	8,41 ^j	5,17 ^d

Ghi chú: Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Từ kết quả ở Bảng 3 có thể thấy rằng, ở cùng điều kiện pH, nồng độ nấm men càng tăng thì nồng độ cồn thu được cũng tăng tương ứng. Nhìn chung, trong khoảng pH khảo sát, nấm men đều có thể phát triển và sản xuất ethanol. Tuy nhiên, theo Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng (2007) [23], pH thích hợp nhất cho quá trình lên men rượu là 4,5-5,0 nên khi lên men dịch quả ở pH 5,5 có thể không thích hợp cho nấm men phát triển, từ đó làm giảm hiệu suất lên men và hàm lượng ethanol sinh ra cũng thấp hơn so với môi trường pH 5,0. Còn đối với lên men dịch quả ở pH thấp (pH 4,0) cho nồng độ cồn khá thấp trong khoảng 3,02-4,45% (v/v). Mặc dù pH thấp hạn chế sự nhiễm của các vi sinh vật khác nhưng lại là điều kiện không thuận lợi cho nấm men hoạt động mạnh, do đó nấm men đã bị giảm hoạt lực một phần ngay từ giai đoạn đầu của quá trình lên men. Cụ thể là ở thí nghiệm thứ 1, khi pH bằng 4,0 và nồng độ nấm men là 0,02% (w/v) thì lượng ethanol sinh ra thấp nhất (3,02% v/v) tương ứng với độ Brix sau lên men và lượng đường còn sót lại ở mức cao nhất. Ngược lại, ở thí nghiệm thứ 12 (pH 5,0 và nấm men 0,05% w/v) cho hàm lượng ethanol cao nhất đạt 6,12% (v/v) và hàm lượng đường còn sót lại thấp nhất (8,05 g/100 ml), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các thí nghiệm thứ còn lại nhưng không khác biệt có ý nghĩa với thí nghiệm thứ 11 (pH 5,0 và nấm men 0,04% w/v). Khi so sánh hàm lượng ethanol thu được từ thí nghiệm thứ 8 (5,79% v/v) và thí nghiệm thứ 11 (5,93% v/v) cũng cho thấy không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Do đó, dựa trên các chỉ tiêu sau lên men bao gồm °Brix, pH, hàm lượng đường sót và hàm lượng ethanol thì giá trị thích hợp được chọn để lên men nước ép bưởi là pH 5,0 và bổ sung nấm men ở tỉ lệ 0,04% (w/v) (thí nghiệm thứ 11).

Tuy nhiên, kết quả trong thí nghiệm này có sự khác biệt so với một số nghiên cứu đi trước. Khi lên men nước trái cây có độ cồn thấp, các nghiên cứu đều có xu hướng lên men ở pH hơi

acid. Trong đó, nghiên cứu của Nguyễn Đức Hanh và cộng sự (2016), khi lên men nước táo mèo ở pH 3,4 đã tạo ra sản phẩm có hàm lượng ethanol cao nhất với hương thơm đặc trưng và có vị hài hòa [11]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Thị Duyên và cộng sự (2013), cho thấy lên men tự nhiên nước dâu tằm ở pH 3,5 cho hàm lượng ethanol cao nhất so với các nồng độ pH còn lại [10]. Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này có thể là do ở các nghiên cứu khác nhau thì sử dụng các loại trái cây cũng như các chủng nấm men khác nhau, từ đó các điều kiện môi trường cũng phải thay đổi để tạo ra một loại thức uống phù hợp với sở thích của người tiêu dùng.

3.4. Thời gian lên men nước ép bưởi Năm Roi

Thời gian lên men là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình lên men. Hàm lượng ethanol sinh ra có xu hướng tăng theo thời gian, tế bào nấm men phát triển nhanh và sử dụng các chất dinh dưỡng để sinh ra ethanol. Vì vậy, việc xác định thời gian lên men là rất cần thiết để đạt được độ cồn phù hợp mà nghiên cứu đang hướng đến. Bảng 4 thể hiện các chỉ tiêu sau lên men khi khảo sát nước ép bưởi ở 4 mức thời gian với các điều kiện tối ưu đã được xác định trước đó. Kết quả cho thấy quá trình lên men xảy ra đúng theo như dự đoán. Trong đó, độ Brix, hàm lượng đường sót giảm dần tương ứng khi kéo dài thời gian lên men và hàm lượng ethanol tăng dần từ 4,2% v/v ở 36 giờ lên 5,98% v/v sau 48 giờ. Nhìn chung, có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê giữa hàm lượng ethanol sinh ra ở các mốc thời gian khảo sát nhưng đều nằm trong khoảng giá trị thích hợp cho sản phẩm cider. Tuy nhiên, dịch quả sau khi lên men ở 44 giờ nhận được sự yêu thích và đánh giá cảm quan tốt hơn so với dịch quả ở các mức thời gian còn lại. Sản phẩm lên men 48 giờ với hàm lượng ethanol đạt 5,98% v/v nên lượng đường sót còn lại thấp (10,50 °Brix) và pH ở mức 3,85 nên sản phẩm khá chua, không được đánh giá cao về cảm quan. Sản phẩm có màu vàng nhạt trong suốt, mang hương thơm đặc trưng của bưởi, vị chua ngọt hài hòa và hơi nồng nhẹ của cồn.

Bảng 4. Kết quả khảo sát ở 4 mức thời gian lên men

Thời gian (giờ)	°Brix sau lên men	pH sau lên men	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
36	13,17 ^a	4,24 ^a	11,51 ^a	4,20 ^d
40	11,83 ^b	4,10 ^b	10,96 ^b	4,89 ^c
44	11,33 ^c	4,01 ^c	9,89 ^c	5,25 ^b
48	10,50 ^d	3,85 ^d	9,45 ^d	5,98 ^a

Ghi chú: Số liệu trung bình của 3 lần lặp lại; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

So sánh với các nghiên cứu lên men nước quả khác, kết quả trong nghiên cứu này cần thời gian lên men thấp hơn. Trong báo cáo của Nguyễn Thị Duyên và cộng sự (2013), quá trình lên men nước dâu tằm cần được thực hiện trong 96 giờ để sản phẩm đạt 5% (v/v) độ cồn [10]. Còn theo báo cáo của Huỳnh Thị Ngọc Mi và cộng sự (2021), khi nghiên cứu trên dịch trái thanh long ruột trắng cho thấy có sự thay đổi hàm lượng ethanol theo thời gian lên men. Cụ thể, sau 48 giờ lên men thì không có ethanol sinh ra hoặc sinh ra rất thấp (0,17% v/v). Khi tăng thời gian lên men lên 96 giờ thì hàm lượng ethanol là 8,70% (v/v). Tác giả đã chọn thời gian 72 giờ lên men để đạt độ cồn 3,19% (v/v) là thích hợp nhất cho dòng sản phẩm nước ép thanh long lên men [12]. Hay trong quy trình sản xuất nước giải khát lên men từ quả sơ ri, tác giả Trần Thị Ngọc Mai và cộng sự (2020) đề xuất 72 giờ lên men ở nhiệt độ phòng để cho ra sản phẩm có hàm lượng cồn là 1,4% (v/v) [24]. Qua đó cho thấy, thời gian kết thúc quá trình lên men đối với sản phẩm cider bưởi Năm Roi ngắn hơn các nghiên cứu khác là một lợi thế giúp tiết kiệm thời gian sản xuất ở quy mô lớn hơn. Như vậy, tùy thuộc vào định hướng lên men của các nhóm nghiên cứu mà có thời gian lên men thích hợp cho từng loại nước trái cây lên men khác nhau.

4. Kết luận

Phương pháp ép kết hợp xử lý với enzyme pectinase là phù hợp nhất cho quy trình lên men cider bưởi Năm Roi. Các điều kiện thích hợp cho quá trình lên men được xác định với tỷ lệ pha loãng dịch quả với nước là 1:1 (v/v), dịch lên men được điều chỉnh 18 °Brix, pH 5,0 và 0,04% (w/v) nấm men *Saccharomyces cerevisiae* BV818 với thời gian lên men là 44 giờ. Theo các thông số trên, kết quả thu được nước ép bưởi Năm Roi lên men với hàm lượng ethanol 5,25% (v/v) và sản phẩm có mùi vị và màu sắc đặc trưng phù hợp với sản phẩm nước ép lên men.

Lời cảm ơn

Kính phí thực hiện được tài trợ thông qua đề tài nghiên cứu khoa học Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Vĩnh Long (Hợp đồng thực hiện nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ số 03/HĐ-2021 giữa Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Vĩnh Long và Trường Đại học Cần Thơ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. L. P. Nguyen, "Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of peels' essential oils of different pomelo varieties in the south of Vietnam," *International Food Research Journal*, vol. 22, no. 6, pp. 2426-2431, 2015.
- [2] H. D. Nguyen, *Citrus fruit trees (orange, lemon, tangerine, grapefruit)*. Nghe An Publishing House 2003.
- [3] Y. Liu, E. Heying, and S. A. Tanumihardjo, "History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits," *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, vol. 11, no. 6, pp. 530-545, 2012.
- [4] M. L. Tsai, C. D. Lin, and K. A. Khoo, "Composition and bioactivity of essential oil from *Citrus grandis* L. Osbeck "Mato Peiyu" leaf," *Molecules*, vol. 22, no. 12, 2017, Art. no. 2154.
- [5] L. Duan, L. Guo, and L. L. Dou, "Comparison of chemical profiling and antioxidant activities of fruits, leaves, branches, and flowers of *Citrus grandis* Tomentosa," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 46, pp. 11122-11129, 2014.
- [6] H. L. Tsai, S. K. Chang, and S. J. Chang, "Antioxidant content and free radical scavenging ability of fresh red pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) juice and freeze-dried products," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 8, pp. 2867-2872, 2017.
- [7] N. Thavanapong, P. Wetwitayaklung, and J. Charoenteeraboon, "Comparison of essential oils compositions of *Citrus maxima* Merr. Peel obtained by cold press and vacuum steam distillation methods and of its peel and flower extract obtained by supercritical carbon dioxide extraction method and their antimicrobial activity," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 22, no. 1, pp. 71-77, 2010.
- [8] W. He, X. Li, Y. Peng, X. He, and S. Pan, "Anti-oxidant and anti-melanogenic properties of essential oil from peel of pomelo cv. Guan Xi," *Molecules*, vol. 24, no. 2, 2019, Art. no. 242.
- [9] N. B. Shet, S. D. Sagar, and M. N. Bollamma, "Production of fermented fruit juice and value addition by blending medicinal plants," *Journal of Bacteriology & Mycology*, vol. 5, no. 6, pp. 395-397, 2017.
- [10] T. D. Nguyen, T. H. Le, P. M. Nguyen, and T. A. D. Dong, "Application of natural fermentation to ferment mulberry juice into alcoholic beverage," *International Journal of Scientific and Technology Research*, vol. 2, no. 11, pp. 339-346, 2013.
- [11] D. H. Nguyen, T. L. H. Hoang, T. T. M. Hoang, and V. L. Nguyen, "Study on the use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in processing fermented apple juice (*Docynia indica*) with low alcohol content," *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, vol. 8, no. 69, pp. 89-93, 2016.
- [12] T. N. M. Huynh and T. K. T. Doan, "Fermentation of pitaya (*Selenicereus undatus*) using *Saccharomyces cerevisiae* RV100," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no. 14, pp. 137-145, 2021.
- [13] X. P. Huynh, T. K. V. Nguyen, T. V. Mai, M. C. Luu, H. D. L. Bui, and N. T. Nguyen, "Selection of yeast and optimization of wine production from Nam Roi pomelo (*Citrus grandis* L.)," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no. 10, pp. 237-244, 2021.
- [14] G. L. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426-428, 1959.

-
- [15] M. Sririyanun, P. Mutrakulcharoen, S. Tapaamorndech, K. Cheenkachorn, and K. Rattanaporn, "A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of ethanol in fermentation products," *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 35, no. 2, pp. 744-750, 2019.
- [16] V. S. Pham and T. N. T. Bui, *Food Testing*. Hanoi University of Science and Technology, (in Vietnamese), Hanoi, 1991.
- [17] Ministry of Science and Technology of Vietnam, *Vietnam National Standard 3217-79: Sensory analysis – Methodology test by means of marking*. Hanoi: Directorate for Standards, Metrology and Quality, 1979.
- [18] D. P. Luong, *Industrial Yeasts*. Science and Technology Publishing House, (in Vietnamese), Hanoi, 2006.
- [19] X. Jiang, Y. Lu, and S. Q. Liu, "Effects of pectinase treatment on the physicochemical and oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Torulaspora delbrueckii*," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 132, no. 1, 2020, Art. no. 109929.
- [20] N. Demir, J. Acar, K. Sarioglu, and M. Mutlu, "The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment," *Journal of Food Engineering*, vol. 47, no. 4, pp. 275-280, 2001.
- [21] T. K. O. Le, "Research on using dragon fruit (*Hylocereus undatus*) to make fermented drink," Master's Thesis in Biology, Ho Chi Minh City Pedagogical University, Ho Chi Minh City, Vietnam, 2005.
- [22] D. P. Luong, *Fermentation Technology Curriculum*. Vietnam Education Publishing House, 2006.
- [23] D. T. Nguyen and T. H. Nguyen, *Alcohol Production and Testing Technology Ethanol*. Science and Technics Publishing House, 2007.
- [24] T. N. M. Tran, "Processing of fermented fruit juice from acerola (*Malpighia glabra* L.)," *The Journal of Agriculture and Development*, vol. 2, pp. 5-6, 2020.