

OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS IN CIDER PRODUCTION FROM KING ORANGE (*Citrus nobilis* L. Osbeck)

Nguyen Thi Mong Tuyen¹, Luu Minh Chau¹, Nguyen Ngoc Thanh¹, Bui Hoang Dang Long¹, Doan Thi Kieu Tien², Tran Thanh Truc¹, Nguyen Van Muoi¹, Huynh Xuan Phong^{1*}

¹Can Tho University, ²Can Tho University of Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/7/2022 Revised: 22/8/2022 Published: 23/8/2022 KEYWORDS Alcoholic beverage Cider <i>Citrus nobilis</i> King orange <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cider is an alcoholic beverage fermented from fruit juices with a naturally delicious taste, containing many nutrients available in fruit. This study was conducted to determine the method of processing raw material and to investigate the fermentation conditions for cider fermentation from King orange (<i>Citrus nobilis</i> L. Osbeck). The factors were observed including Brix (10 - 20 °Brix), pH (4.0 - 5.5), yeast concentration (0.02 - 0.05 % w/v), and fermentation time (36 - 48 hours). The results show that the best raw material treatment method was treated with 0.2% w/v of pectinase enzyme. Optimal conditions for cider fermentation from orange were 18.91 °Brix, pH 4.73, yeast concentration 0.04% w/v. The fermentation process was carried out for 40 hours and the ethanol content was 4.95% v/v. The product had a good sensory and quality conformed to QCVN 6-3:2010/BYT. This shows that the research creates a new direction for the beverage industry and contributes to diversifying products from orange.

TỐI ƯU HÓA MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN LÊN MEN CIDER TỪ CAM SÀNH (*Citrus nobilis* L. Osbeck)

Nguyễn Thị Mộng Tuyền¹, Lưu Minh Châu¹, Nguyễn Ngọc Thanh¹, Bùi Hoàng Đăng Long¹, Đoàn Thị Kiều Tiên², Trần Thanh Trúc¹, Nguyễn Văn Mười¹, Huỳnh Xuân Phong^{1*}

¹Trường Đại học Cần Thơ, ²Trường Đại học Kỹ thuật – Công nghệ Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 14/7/2022 Ngày hoàn thiện: 22/8/2022 Ngày đăng: 23/8/2022 TỪ KHÓA Cam sành Cider <i>Citrus nobilis</i> Đồ uống có cồn <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cider là đồ uống có cồn được lên men từ các dịch ép trái cây có hương vị thơm ngon tự nhiên, chứa nhiều chất dinh dưỡng có sẵn trong trái cây. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định phương pháp xử lý nguyên liệu và xác định các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình lên men cider từ cam sành (<i>Citrus nobilis</i> L. Osbeck) với các nhân tố bao gồm Brix (10 - 20 Brix), pH (4,0 - 5,5), nồng độ nấm men (0,02 - 0,05% w/v) và thời gian lên men (36 - 48 giờ). Kết quả cho thấy phương pháp xử lý nguyên liệu cho hiệu quả tốt với enzyme pectinase 0,2% w/v. Điều kiện tối ưu lên men cider từ cam sành là 18,91 °Brix, pH 4,73 và nồng độ nấm men 0,04% w/v. Quá trình lên men được thực hiện trong 40 giờ và hàm lượng ethanol của sản phẩm đạt 4,95% v/v. Sản phẩm sau khi hoàn thiện quy trình có cảm quan tốt và chất lượng phù hợp với QCVN 6-3:2010/BYT. Điều này cho thấy, nghiên cứu đã thúc đẩy một hướng đi mới của ngành công nghiệp sản xuất nước giải khát và góp phần đa dạng hóa sản phẩm từ cam sành.

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6257>

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

1. Giới thiệu

Ngày nay, xã hội ngày càng phát triển, các loại đồ uống có cồn ngày càng trở nên phổ biến trên toàn cầu và việc sử dụng rượu bia quá mức có thể gây ra các tác động tiêu cực đến văn hóa xã hội bao gồm tai nạn và bạo lực [1]. Tuy nhiên, không thể phủ nhận những lợi ích to lớn của các loại đồ uống này mang lại. Các nghiên cứu cho thấy việc uống rượu bia ở mức độ thấp và vừa phải giúp cải thiện hệ tiêu hóa, giảm nguy cơ tim mạch, tăng cường sức khỏe và tinh thần [2], [3]. Vì những lý do đó, việc sản xuất các loại đồ uống lên men có cồn thấp được cho là một giải pháp thay thế cho các loại đồ uống có cồn cao mà vẫn mang lại nhiều lợi ích về mặt sức khỏe và giảm thiểu một số tác động tiêu cực của việc uống rượu bia. Hơn nữa, loại thức uống này còn được khuyến khích cho nhóm người như phụ nữ, những người mắc bệnh tim mạch và gan, các vận động viên thể thao và những người dùng thuốc [3]-[5]. Trong đó, phải kể đến cider, là một loại đồ uống có độ cồn thấp được làm từ nước ép táo. Tuy nhiên, tùy thuộc vào nguồn nguyên liệu và vị trí địa lý mà cider có thể sản xuất từ các nguồn trái cây khác nhau với độ cồn thường trong khoảng 3-9% (v/v).

Việt Nam là một quốc gia có khí hậu nhiệt đới thích hợp cho việc trồng các loại cây ăn quả. Do đó, tại Việt Nam đã có các nghiên cứu lên men dạng cider từ nhiều nguồn trái cây khác nhau như cider từ táo mèo [6], dâu tằm [7], sơ ri [8], thanh long ruột trắng [9],... Trong số các loại cây nhiệt đới, cam sành là giống cây ăn quả thuộc chi *Citrus*, có phẩm chất trái thơm ngon, rất giàu chất dinh dưỡng, tốt cho sức khỏe con người và được tận dụng để nghiên cứu nhằm tạo ra nhiều dòng sản phẩm như mứt cam [10], cam sấy dẻo [11], rượu vang cam [12],... Tuy nhiên, nước cam lên men dạng cider là sản phẩm vẫn chưa được nghiên cứu rộng rãi do nước ép cam sành thường có vị đắng và bị đục trong quá trình sản xuất. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu để xác định được phương pháp xử lý dịch quả, đồng thời tối ưu hóa một số điều kiện lên men sản xuất cider cam sành và khảo sát thời gian lên men thích hợp; từ đó có thể tận dụng được nguồn nguyên liệu, đa dạng hóa sản phẩm và kết hợp các lợi ích của cả cam sành và cider trong cùng một sản phẩm.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Quả cam sành được thu mua tại tỉnh Vĩnh Long, đóng gói trong thùng giấy hoặc bao PE (polyetylen); sau đó được vận chuyển đến phòng thí nghiệm để giảm thiểu tối đa sự thay đổi tính chất, trạng thái ban đầu.

Dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* BV818 (Angel Yeast Co., Ltd.) được sử dụng trong nghiên cứu. Nấm men được kích hoạt trước khi lên men theo tỷ lệ nấm men, đường và nước (w/w/v) là 1:2:10.

Hóa chất điều chỉnh pH (Na_2CO_3 và acid citric, HiMedia, Ấn Độ), đường saccharose (Biên Hòa), enzyme pectinase (ICFOOD Vietnam), hóa chất thanh trùng (NaHSO_3), kalichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), H_2SO_4 5M, tri-butyl phosphate (Sigma-Aldrich, Đức), acid 3,5-dinitrosalicylic, kali natri tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), NaOH, phenolphthalein, I_2 0,01 N, hồ tinh bột 1%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của việc xử lý nguyên liệu đến chất lượng cider từ cam sành

Cam sau khi được rửa sạch, bỏ đôi, ép thu được dịch quả. Sau đó, dịch quả xử lý như sau:

- Lên men từ dịch quả thu được bằng phương pháp ép không xử lý (A1): Dịch quả được pha với nước (sử dụng tỷ lệ cố định 1:1, w/v), tiếp theo điều chỉnh về 18°Brix bằng cách bổ sung đường sucrose, pH 4,5 được điều chỉnh bằng Na_2CO_3 .

- Lên men từ dịch quả bằng phương pháp ép kết hợp xử lý enzyme pectinase 0,2% (A2): Dịch quả được pha với nước (sử dụng tỷ lệ cố định 1:1, w/v), sau đó bổ sung chế phẩm enzyme

pectinase 0,2% khuấy đều rồi ủ ở 40°C trong 2 giờ, tiếp theo điều chỉnh về 18°Brix bằng cách bổ sung đường sucrose, pH 4,5 được điều chỉnh bằng Na₂CO₃.

- Lên men từ dịch quả bằng phương pháp ép kết hợp xử lý Na₂CO₃ (A3): Dịch quả được chỉnh pH đến 8 bằng Na₂CO₃, sau đó chỉnh về pH 4,5 bằng acid citric. Tiếp theo, dịch quả được pha loãng với nước (sử dụng tỷ lệ cố định 1:1, w/v), điều chỉnh về 18°Brix bằng cách bổ sung đường sucrose.

- Lên men từ dịch quả bằng phương pháp ép kết hợp xử lý Na₂CO₃ kết hợp với enzyme pectinase (A4): Dịch quả được chỉnh đến pH 8 bằng Na₂CO₃, sau đó chỉnh về pH 4,5 bằng acid citric. Tiếp theo, dịch quả được pha loãng với nước (sử dụng tỷ lệ cố định 1:1, w/v), bổ sung chế phẩm enzyme pectinase 0,2%, khuấy đều và đun cách thủy ở 40°C trong 2 giờ, điều chỉnh về 18°Brix bằng cách bổ sung đường sucrose.

Dịch quả được xử lý từ các nghiệm thức sẽ được thanh trùng bằng NaHSO₃ với 120 mg/L và được giữ kín trong 2 giờ để tiêu diệt vi sinh vật tạp nhiễm [13]. Bổ sung nấm men *S. cerevisiae* BV818 với hàm lượng cố định 0,04% (w/v). Tiến hành lên men ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 28 - 32°C trong 48 giờ (2 ngày). Xác định đường sót bằng phương pháp DNS [14], pH, °Brix và hàm lượng ethanol với thuốc thử tri-n-butyl phosphate và xác định độ hấp thụ ở 595 nm [15], đánh giá cảm quan sản phẩm theo TCVN 3217-79 [16].

2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện lên men cider từ cam sành

Sau khi xác định phương pháp xử lý dịch cam và tỉ lệ phối chế ở thí nghiệm 2.2.1, tiến hành tối ưu hóa điều kiện lên men cider theo mô hình CCD (Central Composite Design). Sử dụng phần mềm Design Expert 7.0 với các nhân tố bao gồm đường ban đầu (10 - 20°Brix), pH (4,0 - 5,5) và nồng độ nấm men (0,02 - 0,05% w/v). Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ phòng 28 - 32°C trong 48 giờ. Xác định đường sót, pH, °Brix, hàm lượng ethanol sau lên men và đánh giá cảm quan sản phẩm.

2.2.3. Thử nghiệm xác nhận điều kiện tối ưu

Dựa trên kết quả mô hình tối ưu hóa CCD, chương trình thống kê Design-Expert sẽ đề xuất các nghiệm thức tối ưu. Lựa chọn 5 nghiệm thức tối ưu hóa để thực hiện lên men xác nhận mô hình thống kê CCD. Mỗi thử nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần để lấy kết quả trung bình.

2.2.4. Khảo sát thời gian lên men từ cam sành

Sử dụng các giá trị tối ưu từ mô hình thống kê để khảo sát thời gian lên men thích hợp cho quá trình lên men cider từ cam sành nhằm tạo ra sản phẩm cider đạt hàm lượng ethanol nằm trong khoảng 4,5 - 5,0% (v/v).

2.2.5. Phân tích chất lượng cider cam sành

Mẫu cider cam sành sau khi hoàn thiện quy trình sản xuất được gửi phân tích tại Công ty Cổ phần Dịch vụ Khoa học công nghệ Thế kỉ mới. Sản phẩm được phân tích dựa trên QCVN 6-3:2010/BYT bao gồm các chỉ tiêu hóa học, kim loại nặng và chỉ tiêu vi sinh đối với các sản phẩm đồ uống có cồn.

2.2.6. Phân tích và xử lý số liệu

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phương pháp xử lý nguyên liệu

Trong quá trình sản xuất các loại nước trái cây nói chung hay nước trái cây lên men nói riêng thì phương pháp xử lý nguyên liệu đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng đến chất lượng cũng như cảm quan của sản phẩm. Đặc biệt, dịch ép cam thường bị vẩn đục và chứa nhiều pectin. Do đó, khảo sát ảnh hưởng của việc xử lý nguyên liệu đến chất lượng cider từ cam sành là cần thiết. Kết quả thử nghiệm các phương pháp xử lý nguyên liệu cam sành được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy lên men từ dịch quả thu được bằng phương pháp ép xử lý enzyme pectinase 0,2% có hàm lượng ethanol cao nhất, đạt 6,17% (v/v) và có sự khác biệt về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% so với phương pháp ép không xử lý (hàm lượng ethanol là 5,80% (v/v)) nhưng lại khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% so với phương pháp ép xử lý Na_2CO_3 (6,06% v/v) và phương pháp ép xử lý kết hợp enzyme pectinase 0,2% và Na_2CO_3 (6,03% v/v).

Bảng 1. Chỉ tiêu theo dõi của 4 phương pháp xử lý nguyên liệu

Nghiệm thức	Brix sau lên men	pH sau lên men	Vitamin C (mg/l)	Acid tổng (g/l)	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
A1	14,00	3,83	165,00	4,64	6,97	5,80 ^b
A2	13,00	3,76	205,33	5,28	6,88	6,17 ^a
A3	13,33	4,15	212,67	6,51	6,75	6,06 ^a
A4	13,83	4,10	216,33	5,97	6,76	6,03 ^a

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, các ký tự theo sau các giá trị trong cùng một cột khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$). A1 không xử lý, A2 xử lý enzyme pectinase 0,02% (w/v), A3 xử lý Na_2CO_3 , A4 xử lý kết hợp Na_2CO_3 và enzyme pectinase.

Bảng 2. Kết quả tối ưu hóa các nhân tố tác động dựa trên mô hình tối ưu CCD

Nghiệm thức	Nhân tố			Các chỉ tiêu sau lên men			
	Brix	pH	Nấm men (% w/v)	Brix	pH	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
14	17,97	4,3	0,04	13,17	3,58	11,75	6,11 ^e
5	12,03	5,2	0,04	9,00	4,74	7,09	3,89 ^j
16	15,00	4,00	0,04	10,83	3,62	8,51	4,91 ^h
20	15,00	4,75	0,04	11,00	4,34	9,79	5,89 ^f
17	15,00	4,75	0,04	11,00	4,36	9,73	5,89 ^f
2	15,00	4,75	0,02	13,33	4,47	10,79	4,53 ⁱ
15	15,00	4,75	0,04	11,00	4,56	9,65	5,89 ^f
10	17,97	5,2	0,04	14,00	4,37	10,82	6,91 ^b
1	12,03	5,2	0,03	9,00	4,45	6,59	2,89 ^m
3	15,00	4,75	0,04	11,70	4,45	10,34	5,66 ^{fg}
19	12,03	4,3	0,03	8,00	3,98	6,48	3,18 ^l
8	15,00	4,75	0,04	11,00	4,36	9,79	5,86 ^f
11	10,00	4,75	0,04	6,00	4,19	6,19	2,55 ⁿ
12	15,00	4,75	0,04	11,00	4,36	9,71	5,89 ^f
6	17,97	5,2	0,03	13,33	4,57	12,06	6,28 ^d
4	12,03	4,3	0,04	9,17	4,14	6,82	3,37 ^k
13	15,00	4,75	0,05	9,83	4,24	8,87	6,46 ^c
18	20,00	4,75	0,04	14,17	4,02	11,13	7,13 ^a
7	15,00	5,5	0,04	10,83	4,56	10,24	5,73 ^{fg}
9	17,97	4,3	0,03	12,00	3,78	10,17	6,28 ^d

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, các ký tự theo sau các giá trị trong cùng một cột khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$)

Kết quả đánh giá cảm quan sản phẩm cho thấy dịch ép cam được xử lý với enzyme pectinase 0,2% (A2) tạo ra sản phẩm có độ trong cao, ít đắng và đạt giá trị cảm quan tốt hơn so các nghiệm thức còn lại. Nguyên nhân là do enzyme pectinase đã tác động hiệu quả đến sự phân cắt các liên kết ester hoặc liên kết glucoside có trong mạch polymer của pectin [17]. Trong khi đó, phương

pháp ép rồi tăng pH của dịch quả bằng cách sử dụng Na_2CO_3 (A4), tuy đã giúp giảm đáng kể vị đắng nhưng sản phẩm vẫn bị đục [18]. Hơn nữa, việc kết hợp enzyme pectinase và Na_2CO_3 cho hàm lượng ethanol và kết quả cảm quan khác biệt không có ý nghĩa. Vì vậy, phương pháp thích hợp để xử lý dịch quả tốt nhất là bổ sung enzyme pectinase 0,2%.

3.2. Tối ưu hóa một số điều kiện lên men cider cam sành

Thí nghiệm được bố trí với 3 nhân tố pH (4,0 - 5,5), °Brix (10 - 20) và nồng độ nấm men (0,02 - 0,05% w/v) bằng phần mềm Design Expert 7.0. Kết quả hàm lượng ethanol sinh ra dựa trên thiết kế mô hình CCD được trình bày trong Bảng 2.

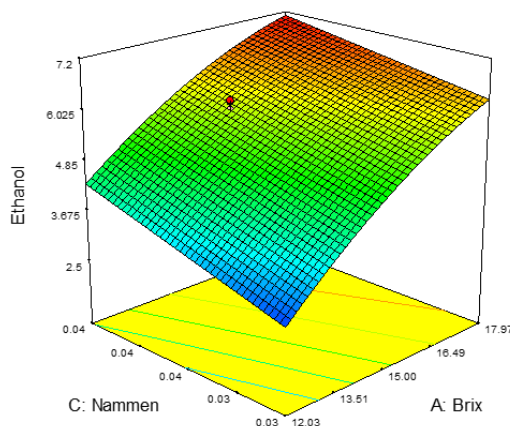
Sau 48 giờ lên men, độ Brix và pH của dịch lên men đều giảm so với độ Brix và pH ban đầu, với pH nằm trong khoảng 3,58 - 4,74 và độ Brix ở mức 6,0 - 14,17°Brix, tương ứng với lượng đường còn lại sau quá trình lên men (6,19 - 12,06 g/100 ml). Kết quả thống kê cũng cho thấy rằng hàm lượng ethanol hình thành tỷ lệ thuận với hàm lượng đường ban đầu, cụ thể là hàm lượng cồn được tạo thành ở nghiệm thức 18 với các giá trị 20°Brix, pH 4,75 với nồng độ nấm men là 0,04% (w/v) cho hàm lượng ethanol cao nhất đạt 7,13% (v/v), nghiệm thức 11 với 10°Brix, pH 4,75 và nồng độ nấm men 0,04% (w/v) cho hàm lượng ethanol thấp nhất (2,55% v/v) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Điều này là do nấm men đã sử dụng đường làm nguồn nguyên liệu cho các quá trình chuyển hóa để tạo thành ethanol, CO_2 và một số acid hữu cơ [19].

Bảng 3. Kết quả phân tích ANOVA đến sự hình thành ethanol của mô hình CCD

Sum of Source	Squares	Mean df	F-value Square	p-value	
Model	37,27	7	5,32	265,39	< 0,0001 significant
A-Brix	26,80	1	26,80	1335,82	< 0,0001
B-pH	0,060	1	0,060	2,99	0,1094
C-Nammen	3,09	1	3,09	154,07	< 0,0001
AC	0,079	1	0,079	3,94	0,0704
BC	0,24	1	0,24	11,89	0,0048
A ²	1,88	1	1,88	93,71	< 0,0001
B ²	0,53	1	0,53	26,43	0,0002
Residual	0,24	12	0,020		
Lack of Fit	0,20	7	0,029	3,47	0,0950 not significant
Pure Error	0,041	5	8,227		
Cor Total	37,52	19			
Std. Dev.	0,14			R-Squared	0,9936
Mean	5,29			Adj R-Squared	0,9898
C.V. %	2,68			Pred R-Squared	0,9720
PRESS	1,05			Adeq Precision	54,696

Dựa vào kết quả phân tích ANOVA ở Bảng 3, có thể thấy rằng mô hình thử nghiệm có ý nghĩa với p-value < 0,0001. Trong đó, các nhân tố khảo sát có tác động ý nghĩa đến quá trình hình thành ethanol của cider cam sành là Brix và nấm men với giá trị p-value đều < 0,0001 và hệ số biến động CV là 2,68%. Bên cạnh đó, giá trị $R^2 = 0,9936$ và $R^2_{adj} = 0,9898$ cũng thể hiện mô hình thống kê có độ tin cậy cao. Hình 1 cho thấy sự tác động giữa Brix và nồng độ nấm men đến sự hình thành ethanol. Mỗi điểm trên bề mặt đáp ứng đại diện cho lượng ethanol tạo thành tương ứng với các yếu tố ảnh hưởng được khảo sát đến chiều hướng tạo ra độ cồn ở mức cao nhất hay thấp nhất. Trong đó, độ Brix ban đầu phải đủ cao để cung cấp nguồn cơ chất cho hoạt động của

nấm men bao gồm cả việc tăng sinh và hình thành ethanol [20]. Đồng thời, nấm men bổ sung vào dịch trái cây phải đạt mật số thích hợp để quá trình chuyển hóa đường thành rượu được thực hiện nhanh chóng [21].



Hình 1. Sự tác động giữa Brix và nấm men đến sự hình thành ethanol

3.3. Thử nghiệm xác nhận một số điều kiện tối ưu

Sau khi phân tích số liệu từ mô hình CCD, có khoảng 30 nghiệm thức với các thông số tối ưu được đề xuất bởi phần mềm Design-Expert. Năm nghiệm thức có hàm lượng ethanol lý thuyết cao nhất trong 30 nghiệm thức dự đoán từ mô hình được chọn để xác nhận kết quả tối ưu. Kết quả cho thấy hàm lượng ethanol thực tế sinh ra tương đồng với hàm lượng ethanol phần mềm dự đoán, sự chênh lệch giữa hàm lượng ethanol giữa thực tế và lý thuyết không đáng kể và chỉ nằm trong khoảng 0,01 - 0,13% (Bảng 4). Từ đó có thể chứng minh các nghiệm thức được đề xuất bởi phần mềm có độ tin cậy cao và được ứng dụng để lên men cider cam sành. Cuối cùng, nghiệm thức tốt nhất được lựa chọn là nghiệm thức 11 với 18,91°Brix, pH 4,73 và nồng độ nấm men 0,04% (w/v) do có khả năng lên men tốt và cảm quan phù hợp với sản phẩm cider.

Bảng 4. Kết quả các chỉ tiêu theo dõi thu được từ mô hình và thực tế

Nghiệm thức	Brix	pH	Nồng độ nấm men	Brix sau lên men	pH sau lên men	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol lý thuyết (% v/v)	Hàm lượng ethanol thực tế (% v/v)
1	18,19	5,19	0,04	8,33	4,41	6,63	6,99	6,90 ^c
2	18,91	4,73	0,04	9,00	4,39	5,27	6,86	6,99 ^b
3	18,39	4,63	0,04	8,73	4,43	7,04	6,73	6,74 ^d
4	18,65	5,12	0,04	9,00	4,44	5,07	7,11	7,10 ^a
5	17,26	5,15	0,04	9,17	4,46	7,07	6,76	6,78 ^d

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, các ký tự theo sau các giá trị trong cùng một cột khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$)

Cider cam sành được lên men trong điều kiện tối ưu có độ cồn đạt 6,99% (v/v). Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Duyên và cộng sự (2013), khi lên men tự nhiên nước dâu tằm có độ Brix ban đầu là 24 và pH 3,5 ở nhiệt độ 18 - 20°C trong 96 giờ, hàm lượng ethanol của sản phẩm là 5% (v/v) [22]. Trong khi đó, theo Huỳnh Thị Ngọc Mi và Đoàn Thị Kiều Tiên (2021), khi nghiên cứu quy trình sản xuất nước ép thanh long ruột trắng cho thấy điều kiện lên men tốt là ở 72 giờ với mật số chủng nấm men 2%, 22°Brix và pH 4,6 thì sản phẩm sau lên men có hàm lượng ethanol đạt 3,19% (v/v), vị ngọt và chua phù hợp với sản phẩm nước ép lên men [9]. Bên cạnh đó, năm 2019, tác giả Bùi Văn Tú cũng đã sử dụng phần mềm Design-Expert để tối ưu hóa quá trình lên men nước giải khát cider dâu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng với 4 yếu tố. Kết

quả đã xác định được giá trị tối ưu của các nhân tố để thực hiện quá trình lên men như độ Brix của dịch lên men là 23,4; tỷ lệ nấm men là 353,6 mg/l, pH 4,1 và thời gian là 4,4 ngày. Cuối cùng, độ cồn thu được là 6,0% (v/v) [7]. Nhìn chung, độ cồn ở các nghiên cứu có sự khác nhau tùy theo sở thích và mức độ cảm quan phù hợp với từng loại trái cây lên men nên các điều kiện lên men cũng có sự khác nhau để đáp ứng nhu cầu thị hiếu.

3.4. Xác định thời gian lên men từ cam sành

Thời gian lên men là một yếu tố ảnh hưởng lớn đến quá trình lên men, quyết định đến hàm lượng ethanol cũng như chất lượng của sản phẩm nước ép lên men. Chính vì thế, việc xác định thời gian lên men là rất cần thiết để đạt được độ cồn và cảm quan mong muốn. Bảng 5 trình bày kết quả khảo sát thời gian lên men cider cam sành (36, 40, 44 và 48 giờ) với các điều kiện tối ưu hóa đã xác định. Kết quả cho thấy độ Brix và pH có xu hướng giảm dần theo các mốc thời gian, tương ứng với sự tăng dần của hàm lượng ethanol. Cụ thể là trong khoảng thời gian từ 36 đến 48 giờ, lượng ethanol sinh ra tăng lên từ 4,05% đến 6,96% (v/v). Trong đó, ở 48 giờ lên men thu được hàm lượng ethanol cao nhất, đạt mức 6,96% (v/v) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các mức thời gian còn lại. Tuy nhiên, với mong muốn sản phẩm có độ cồn nằm trong khoảng 4,5 - 5,5% nên thời gian được chọn để kết thúc quá trình lên men cho độ cồn thích hợp (4,95% v/v) là 40 giờ. Nghiên cứu Cerrillo và cộng sự (2019) báo cáo rằng nước cam lên men có độ cồn thấp hỗ trợ khả năng cải thiện nguy cơ tim mạch ở người có cholesterol cao trong máu và trong tương lai nó có thể được xem là “đồ uống chức năng” [23].

Kết quả này thấp hơn so với một số nghiên cứu về thời gian lên men nước trái cây đã được báo cáo là 72 - 120 giờ [6]-[9]. Trong đó, để sản phẩm nước giải khát lên men từ quả sơ ri, tác giả Trần Thị Ngọc Mai (2020) cần 3 ngày lên men ở nhiệt độ phòng để cho ra sản phẩm có hàm lượng cồn là 1,4% (v/v) và vitamin C là 581,2 mg [8]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Đức Hanh và cộng sự (2016) khi lên men dịch quả táo mèo trong 14 ngày ở điều kiện 18°Brix, pH 3,4 và nấm men bổ sung với tỉ lệ 0,01% tạo ra sản phẩm cider táo mèo đạt chất lượng tốt nhất với hàm lượng ethanol đạt 5,2% [6].

Bảng 5. Chỉ tiêu theo dõi thời gian lên men

Thời gian (giờ)	Brix sau	pH sau	Hàm lượng đường sót (g/100 ml)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
36	10,83	4,47	7,29	4,05 ^d
40	10,27	4,42	5,98	4,95 ^c
44	9,17	4,40	5,67	5,84 ^b
48	8,83	4,39	5,26	6,96 ^a

Ghi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, các ký tự theo sau các giá trị trong cùng một cột khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$)

3.5. Đánh giá chất lượng sản phẩm cider cam sành

Chất lượng của cider cam sành được đánh giá dựa trên các chỉ tiêu được quy định trong QCVN 6-3:2010/BYT của Bộ Y tế. Kết quả so sánh các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm và trong quy định được trình bày trong Bảng 6. Kết quả phân tích cho thấy sản phẩm cider phù hợp với quy định của Bộ Y Tế về giới hạn cho phép trong sản phẩm đồ uống có cồn. Cụ thể là các chỉ tiêu hóa học (methanol, acid hydrocyanic, SO₂) đều nhỏ hơn mức tối đa quy định. Đối với các chỉ tiêu vi sinh như tổng vi sinh vật hiếu khí đạt 43 CFU/ml (<10³ CFU/ml), tổng số nấm men, nấm mốc đạt <1 CFU/ml (<10² CFU/ml), các vi sinh vật như *E. coli*, *Coliforms*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis* và kim loại nặng như chì (Pb) đều không phát hiện trong sản phẩm. Ngoài ra, các kim loại khác như Cd, As, Hg, Zn, Cu và nhóm vi sinh vật gây bệnh như *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* cũng không được phát hiện. Nhìn chung, cider cam sành có cảm quan tốt và chất lượng đạt vượt QCVN 6-3:2010/BYT.

Bảng 6. Chỉ tiêu phân tích cider cam sành

STT	Chỉ tiêu chất lượng	Cider cam sành	QCVN 6-3:2010/BYT
1	Hàm lượng methanol, mg/l còn 100°	700	Không lớn hơn 10.000
2	Hàm lượng acid hydrocyanic đối với rượu chế biến từ trái cây có hạt, mg/l còn 100°	Không phát hiện	Không lớn hơn 70
3	Hàm lượng lưu huỳnh dioxit (SO ₂), mg/l sản phẩm	28,8	Không lớn hơn 150
4	Độ acid dễ bay hơi, mEq/L	Không phát hiện	-
5	Hàm lượng kim loại chì, mg/l	Không phát hiện	Không lớn hơn 0,2
6	Hàm lượng kim loại cadimi, mg/l	Không phát hiện	-
7	Hàm lượng kim loại asen, mg/l	Không phát hiện	-
8	Hàm lượng kim loại thủy ngân, mg/l	Không phát hiện	-
9	Hàm lượng kim loại kẽm, mg/l	Không phát hiện	-
10	Hàm lượng kim loại đồng, mg/l	Không phát hiện	-
11	Tổng số vi sinh vật hiếu khí, CFU/ml	43	Không lớn hơn 10 ³
12	Tổng số nấm men và nấm mốc, CFU/ml	<1	Không lớn hơn 10 ²
13	<i>E.coli</i> , CFU/ml	<1	Không được có
14	<i>Coliforms</i> , CFU/ml	<1	Không được có
15	<i>Clostridium perfringens</i> , CFU/ml	<1	Không được có
16	<i>Streptococcus faecalis</i> , CFU/ml	<1	Không được có
17	<i>Staphylococcus aureus</i> , CFU/ml	<1	-
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , CFU/ml	<1	-

Ghi chú: “-” chỉ tiêu không yêu cầu trong QCVN 6-3:2010/BYT.

4. Kết luận

Sự ảnh hưởng của phương pháp xử lý nguyên liệu và các nhân tố bao gồm Brix, pH và nồng độ nấm men đến quá trình lên men dịch cam sành đã được khảo sát. Dịch quả cam sành được xử lý bằng enzyme pectinase với nồng độ 0,2% (w/v) trong 2 giờ cho sản phẩm cider cam sành có cảm quan tốt nhất. Nghiệm thức tối ưu cho quy trình lên men sản xuất cider cam sành với dịch quả được điều chỉnh 18,91°Brix, pH 4,73 và nồng độ nấm men 0,04% (w/v) với thời gian lên men 40 giờ. Sản phẩm lên men ở điều kiện tối ưu có độ cồn đạt 4,95% (v/v) với các chỉ tiêu chất lượng đạt yêu cầu theo QCVN 6-3:2010/BYT, cho thấy đây là một loại thức uống tiềm năng từ cam sành.

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] R. Room, T. Babor, and J. Rehm, “Alcohol and public health,” *Lancet*, vol. 365, pp. 519-530, 2005.
- [2] J. B. German and L. W. Rosemary, “The health benefits of wine,” *Annual review of nutrition*, vol. 20, no. 1, pp. 561-593, 2000.
- [3] T. Brányik, D. P. Silva, M. Baszczyński, R. Lehnert, and J. B. Almeida e Silva, “A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production,” *Journal of Food Engineering*, vol. 108, no. 4, pp. 493-506, 2012.
- [4] G. J. Pickering, “Low- and reduced-alcohol wine: A review,” *Journal of Wine Research*, vol. 11, pp. 129-144, 2000.
- [5] G. D. Francesco, G. Freeman, E. Lee, O. Marconi, and G. Perretti, “Effects of operating conditions during low-alcohol beer production by osmotic distillation,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, pp. 3279-3286, 2014.
- [6] D. H. Nguyen, T. L. H. Hoang, T. T. M. Hoang, and V. L. Nguyen, “Study on the use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in cider making from *Docynia indica* fruit,” *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, vol. 8, no. 69, pp. 89-93, 2016.

-
- [7] V. T. Bui, "Optimizing fermentation beverage cider strawberry by four-factors response surface," *Sao Do University Scientific Journal*, vol. 2, no. 65, pp. 77-85, 2019.
- [8] T. N. M. Tran, "Processing of fermented fruit juice from acerola (*Malpighia glabra* L.)," *The Journal of Agriculture and Development*, vol. 19, no. 2, pp. 99-105, 2020.
- [9] 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.
- [10] D. T. Nguyen, T. H. Nguyen, T. T. Nguyen, T. T. Le, S. L. Le, and A. K. Mai, "Research on the production of candied orange slices," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no. 1, pp. 106-111, 2021.
- [11] T. T. Q. Phan, K. T. Duong, D. N. Le, L. T. V. Nguyen, C. T. Kha, V. A. Nguyen, and T. P. L. Duong, "Effect of pretreatments on the quality of soft dried Sanh orange (*Citrus sinensis*)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 57, pp. 151-160, 2021.
- [12] P. T. Nguyen and V. T. Nguyen, "Isolation, selection and identification of natural yeasts for orange wine fermentation," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 58, no. 1B, pp. 121-131, 2021.
- [13] U. N. Phan, T. K. T. Vo, Q. D. Tran, and T. M. Linh Mai, "Study on the wine fermentation process from green grape and mulberry," *Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 15, no. 5-6, pp. 65-73, 2019.
- [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. Sriariyanun, 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] 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.
- [17] S. Croak and M. Corredig, "The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles," *Food Hydrocolloids*, vol. 20, no. 7, pp. 961-965, 2006.
- [18] V. T. Kore and I. Chakraborty, "Efficacy of various techniques on biochemical characteristics and bitterness of pummelo juice," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 9, pp. 6073-6077, 2015.
- [19] D. P. Luong, *Industrial Yeasts*. Science and Technology Publishing House, (in Vietnamese), Hanoi, 2006.
- [20] B. L. Attri, "Effect of initial sugar concentration on the physico-chemical characteristics and sensory qualities of cashew apple wine," *Natural Product Radiance*, vol. 8, no. 4, pp. 374-379, 2009.
- [21] A. Tahir, M. Aftab, and T. Farasat, "Effect of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *Sacharomyces cerevisiae* bio-07," *Journal of Applied Pharmaceutical*, vol. 3, no. 2, pp. 72-78, 2010.
- [22] 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.
- [23] I. Cerrillo, B. Escudero-López, A. Ortega, F. Martín, and M. S. Fernández-Pachón, "Effect of daily intake of a low-alcohol orange beverage on cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic humans," *Food Research International*, vol. 116, pp. 168-174, 2019.