

	VIETTEL AI RACE	TD596
	NGHIÊN CỨU NGUYÊN VẬT LIỆU SỬ DỤNG DÚA ĐỂ LÊN MEN RUỢU	Lần ban hành: 1

1. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1 Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị

1.1.1 Nguyên liệu

Quả dứa (được thu hoạch vào tháng 5/2014 từ Nông trường Dứa Đồng Giao, Huyện Tam Đíệp, tỉnh Ninh Bình) dùng để chiết dịch quả lên men.

Nước ép dứa (có bổ sung saccharose để đường tổng đạt 300 g/l và bổ sung acid citric 2g/l nhằm tạo môi trường có tính chọn lọc cao) cho lên men tự nhiên.

Thanh gỗ sồi (kích thước trung bình $0,3 \times 2 \times 10$ cm) và bột gỗ sồi (Arobois VD110171) được nhập từ Pháp.

1.1.2 Hoá chất và môi trường

Các hoá chất được sử dụng có nguồn gốc từ Trung Quốc, Đức, Pháp, Mỹ và Việt Nam.

+ Hóa chất để tạo môi trường: Saccharose (Công ty TNHH Quốc Hưng, Việt Nam), glucose, KH₂PO₄ (7778-70-0), MgSO₄ (10034-99-8), (NH₄)₂SO₄ (7783-20-2), pepton (20154-78-2-30) của Công ty hóa chất Xilong - Trung Quốc), C₂H₅OH (UNI 1170, Samchun – Hàn Quốc), KNO₃ (0540000500, Aladdin – Trung Quốc), agar (M870, Ấn Độ), nước cất (Bộ môn Công nghệ sinh học - vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội), citric acid (77-92-9, Hexeal – Anh)

+ Hóa chất phân tích: glucose (1.08337.0250, Merck – Đức), DNS (GRM1582- 100G, Himedia, Ấn Độ); fucfurol, NaOH, KMnO₄, phenol phtalein và các hóa chất dành cho xử lí mẫu và phân tích bằng GC-MS (Ethanol E7023, n-hexan 73117, ethyl acetate 650528, ester E7877, aldehyde 55977 nhập từ hãng Sigma - Aldrich, đều có độ tinh khiết ở mức phân tích.

+ Các hóa chất sinh học phân tử: chloroform (UN1888, Sigma - Aldrich), 2- propanol (BPA 4164, Thermo Scientific), isoamin alcohol

	VIETTEL AI RACE	TD596
	NGHIÊN CỨU NGUYÊN VẬT LIỆU SỬ DỤNG DÚA ĐỂ LÊN MEN RUỘU	Lần ban hành: 1

(100859, Merck), agarose (1,05437, Merck), N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) (9562060, Merck).

- Môi trường phân lập, giữ giống nấm men là môi trường Hansen rắn, thành phần gồm: glucose 50g, pepton 10g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄ 2g, agar 20g, nước cát 1000ml, pH 5,5 Môi trường nuôi cây là môi trường Hansen lỏng (không có agar)
- Môi trường nhân giống nấm men: hàm lượng đường saccharose 70g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, Mg SO₄ 2 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2 g/l và nước chiết của 100 g giá đỗ /l, pH 4,0
- Môi trường lên men: Dịch ép dứa có pH = 4, hàm lượng đường tổng 200 g/l, lượng oxy hòa tan là 7 mg/l

1.2 Chủng giống vi sinh vật

Giống nấm men được phân lập từ dịch ép dứa Queen lên men tự nhiên trong điều kiện chọn lọc. Chủng được tuyển chọn có đặc tính lên men mạnh và hương thơm đặc trưng.

1.3 Thiết bị nghiên cứu

Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu thuộc các phòng thí nghiệm: (1) Bộ môn Công nghệ Sinh học – Vi sinh, Đại học Sư phạm Hà Nội; (2) Khoa Tự nhiên – Kỹ Thuật và công nghệ, Trường Đại học Tân Trào Tuyên Quang; (3) Phòng nghiên cứu các hợp chất thiên nhiên, Viện Hóa, Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam; Viện công nghiệp thực phẩm

Các thiết bị phòng thí nghiệm thông thường: Cân (Precisa XT 320M - Thụy Sĩ), máy đo pH (MP200R, Thụy Sĩ), nồi hấp (Tommy, Nhật), tủ sấy (Heraeus, Đức), buồng thao tác vi sinh HeraSafe (ThermoScientific, Mỹ), máy xác định nồng độ đường (Terumo - Nhật Bản), máy lắc Orbital Shaker (Gallenkamp, Anh), máy li tâm (Sorvall, Mỹ), tủ nuôi cây lắc ổn nhiệt Innova (NewBrunswick, Mỹ), máy chưng

	VIETTEL AI RACE	TD596
	NGHIÊN CỨU NGUYÊN VẬT LIỆU SỬ DỤNG DỰA ĐỂ LÊN MEN RUỢU	Lần ban hành: 1

cát nước hai lần (Hamilton, Anh), kính hiển vi điện tử S4800 – NIHE (New Brunswick, Mỹ), Máy soi Ultra Violet, buồng đếm hồng cầu (Thomas, Đức), bình Smith (Việt Nam)...

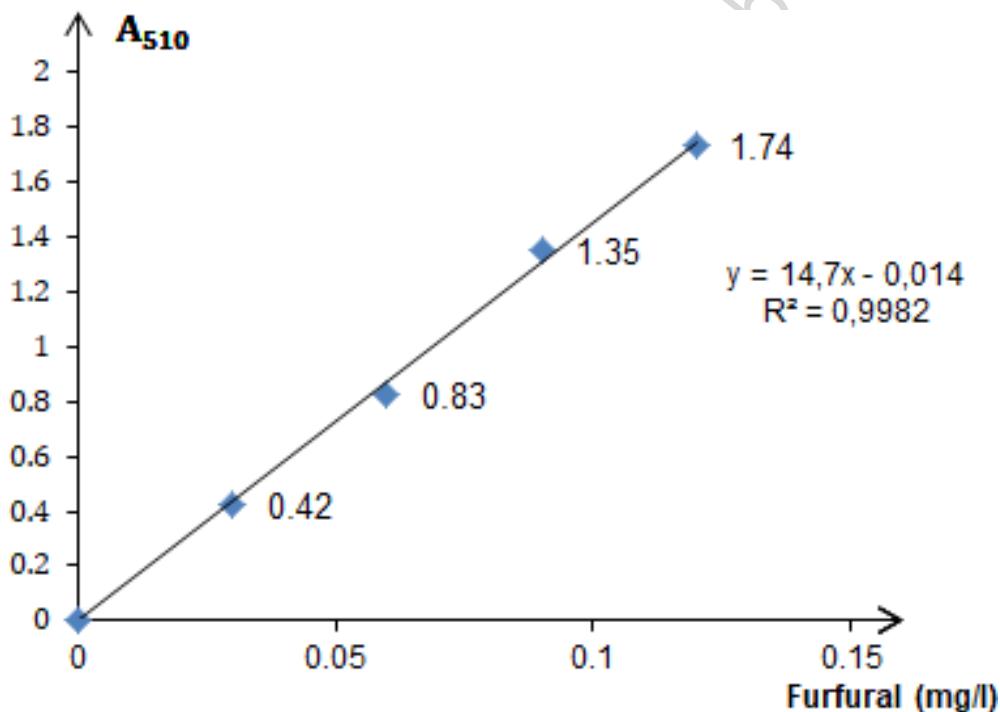
Thiết bị phân tích: Máy quang phổ khả kiến (UV-VIS 1800, Shimadzu - Nhật), cân phân tích (Precisa 320, Thụy Sỹ), máy đo pH (MP 220, Mettler Toledo, Thụy Sĩ), thiết bị khuếch đại gen (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Mỹ), hệ thống máy chụp gel (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System, Mỹ), máy điện di (Agilent 2100, Bioanalyzer, Mỹ), hệ thống phân tích sắc ký khí khói phổ GC - MS (QP2010, Shimazu - Nhật Bản).

Bảng 2.3. Bảng mẫu thử và dung dịch furfurol chuẩn

	Bình 1	Bình 2	Bình 3	Bình 4	Bình 5	Bình 6	Bình 7
Mẫu thử (ml)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Dung dịch furfurol chuẩn (ml)	0,0	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	0,0
Anilin (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Acid acetic (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Rượu 50° (ml)	Vừa đủ 10 ml						
Hàm lượng furfurol	0,0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	

Chú ý: Thể tích mẫu ở ống 7 có thể thay đổi từ 1 ml đến 5 ml tùy theo lượng rượu furfurol có trong rượu thử. Nếu màu ở ống 7 vẫn nhạt hơn các ống chuẩn cần cô đặc mẫu; nếu màu đậm hơn thì phải pha loãng (ghi nhận hệ số pha loãng).

	VIETTEL AI RACE NGHIÊN CỨU NGUYÊN VẬT LIỆU SỬ DỤNG DỰA ĐỂ LÊN MEN RUỢU	TD596
		Lần ban hành: 1



Hình 2.2. Đồ thị chuẩn xác định hàm lượng furfurol

Xác định hàm lượng của furfurol (mg/lít) trong rượu thử dựa trên đồ thị chuẩn (Hình 2.2).

Hàm lượng furfurol C (mg) trong 1 lít rượu thử được tính theo công thức sau:

$$C_A (\text{mg/lít}) = C_x * n * R$$

Trong đó: R: hệ số thu hồi sau cát mẫu (chỉ áp dụng đối với rượu chưa qua chưng cất), C_x: số mg furfurol trong 1 ml rượu thử, n: độ pha loãng. Hàm lượng furfurol trong mẫu rượu thử quy về độ rượu 100% V/V được tính theo công thức:

$$C (\text{mg/lít}) = (C_A * 100) / k \quad (k: là độ rượu của mẫu đo được) [15].$$

Xác định hiệu suất lên men

$$\text{Hiệu suất lên men (\%)} = \frac{\text{Lượng rượu thực tế}}{\text{Lượng rượu lý thuyết}} \times 100$$

Trong đó, lượng rượu thực tế được xác định theo phương pháp tì trọng; lượng rượu lý thuyết được xác định theo phương trình phản ứng tạo rượu cǎn cứ vào lượng đường tổng có trong dịch lên men.

	VIETTEL AI RACE	TD596
	NGHIÊN CỨU NGUYÊN VẬT LIỆU SỬ DỤNG DÙA ĐỂ LÊN MEN RUỘU	Lần ban hành: 1

2. Phân tích cảm quan rượu

Phương pháp cảm quan theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3217:1979 về rượu

- Phân tích cảm quan - Phương pháp cho điểm [1]. Hội đồng cảm quan gồm 4 người, bao gồm: 02 thầy cô giáo hướng dẫn, 02 nghiên cứu sinh đều là những người nghiên cứu về rượu, có kiến thức và kỹ năng thử nếm rượu. Chấm điểm độc lập theo TCVN 3217:1979.

Bảng 2.4. Yêu cầu cảm quan đối với rượu chưng cất - TCVN 3217 – 79 [1]

Tên chỉ tiêu	Điểm chưa có trọng lượng	Yêu cầu sản phẩm
Độ trong và màu sắc	5	Chất lỏng trong suốt không vẫn đục và vật thể nhỏ, màu hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm
	4	Chất lỏng trong suốt không vẫn đục, có ít vật thể lạ nhỏ, màu đặc trưng cho sản phẩm
	3	Chất lỏng trong có tương đối nhiều vật thể lạ nhỏ, màu hơi khác một ít so với màu sắc đặc trưng của sản phẩm
	2	Chất lỏng hơi đục, có khá nhiều vật thể lạ nhỏ trầm trọng, màu khác nhiều so với màu đặc trưng của sản phẩm.
	1	Chất lỏng đục nhiều lăng cặn, có nhiều vật thể lạ nhỏ trầm trọng, thô, màu không đặc trưng của sản phẩm.
	0	Vẫn đục, màu vẫn, sản phẩm bị hỏng.
Mùi	5	Hòa hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm
	4	Chưa hoàn toàn hòa hợp, thơm đặc trưng cho sản phẩm nhưng hơi khó nhận thấy.
	3	Hơi nồng, thoảng mùi lạ, rất ít đặc trưng cho sản phẩm
	2	Nồng, thông mùi lạ, rất ít đặc trưng cho sản phẩm
	1	Nồng, hăng, mùi lạ rõ, không đặc trưng cho sản phẩm
	0	Có mùi lạ khó chịu của sản phẩm hỏng
Vị	5	Hòa hợp, êm dịu, hậu vị tốt, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm

	VIETTEL AI RACE	TD596
	NGHIÊN CỨU NGUYÊN VẬT LIỆU SỬ DỤNG DÙA ĐỂ LÊN MEN RUỘU	Lần ban hành: 1

4	Chưa hoàn toàn hòa hợp, hậu vị vừa phải, đặc trưng cho sản phẩm bình thường
3	Chưa hòa hợp, hơi gắt và sôc, hậu vị yếu, ít đặc trưng cho sản phẩm
2	Đắng, xốc, thoảng vị lạ, rất ít đặc trưng cho sản phẩm
1	Có vị lạ rõ, không đặc trưng cho sản phẩm
0	Có mùi vị khó chịu của sản phẩm hỏng