



TƯƠNG QUAN GIỮA HÀM LƯỢNG ACID ACETIC SINH RA VÀ ETHANOL, ĐƯỜNG, MẬT SỐ VI KHUẨN *A. ACETI* TRONG SẢN XUẤT GIẤM VANG CHUỐI

Nguyễn Thị Mai Hiền¹ và Nguyễn Minh Thủy²

¹ Học viên Cao học CNSTH K19, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

The relationship between acetic acid content and ethanol, sugar, bacteria in the production of banana vinegar

Từ khóa:

Acetobacter aceti, ethanol, đường, giấm chuối, mô hình bề mặt đáp ứng

Keywords:

Acetobacter aceti, ethanol, sugar, vinegar banana, response surface methodology

ABSTRACT

Traditionally, vinegar production is performed using parts of too ripe fruits or by-product of fruit processing. Vinegar could be produced using sugar and starch, which are substrates for ethanol fermentation then acetic acid fermentation. Bacterium used for fermentation of vinegar (acetic acid bacterium) is *Acetobacter* which transforms ethanol (C_2H_5OH) into acetic acid (CH_3COOH) by oxidation. In this study, vinegar was produced using bananas by controlling main factors affecting the acetic acid production, including alcohol concentration (5 to 9% v/v), sugar concentration (0 to 75 g/L) and bacteria cell population (10^4 to 10^6 cells *A. aceti*/mL). The Response Surface Methodology was adopted to optimize the process parameters including alcohol content, sugar content, and *A. aceti* population for the vinegar fermentation. The correlation between the experimental data and the predicted model was quite good ($R^2=0.97$). For banana vinegar, the maximum acidity was obtained (4%) at 5% of alcohol level, sugar content of 20.62 g/L and *A. aceti* cell concentration of 10^5 cell per mL for 6 weeks at 37-38°C.

TÓM TẮT

Theo truyền thống, sản xuất giấm nhằm tận dụng một lượng lớn tỷ lệ trái cây ở giai đoạn trái quá chín hoặc các phần trái cây loại ra từ các cơ sở chế biến. Giấm có thể được sản xuất từ nguyên liệu có đường và tinh bột, là chất nền cho quá trình lên men tạo rượu và tiếp theo là quá trình lên men tạo acid acetic. Vi khuẩn lên men giấm (vi khuẩn acid acetic) là giống *Acetobacter* với đặc tính chuyển đổi rượu ethylic (C_2H_5OH) thành acid acetic (CH_3CO_2H) bởi quá trình oxy hóa. Trong nghiên cứu này, giấm được sản xuất từ chuối với việc kiểm soát các thông số ảnh hưởng chủ yếu đến khả năng tạo acid acetic, bao gồm nồng độ rượu (5-9% v/v), nồng độ đường (0-75 g/L) và mật số vi khuẩn *A. Aceti* trong khoảng 10^4 đến 10^6 tế bào/mL. Phương pháp mô hình bề mặt đáp ứng được chọn nhằm tối ưu hóa các thông số của tiến trình như hàm lượng rượu, đường và mật số tế bào vi khuẩn cho quá trình lên men giấm vang chuối. Tương quan giữa hàm lượng acid acetic thực nghiệm và tính toán theo phương trình được tìm thấy ($R^2=0,97$). Giấm chuối đạt hàm lượng acid acetic cao (4%) khi lên men trong thời gian 6 tuần ở nhiệt độ phòng (37-38°C) với dịch lên men chứa 5% ethanol, hàm lượng đường 20,62 g/L và mật số vi khuẩn 10^5 tế bào/mL.

1 GIỚI THIỆU

Giấm được biết đến trên toàn thế giới như là một gia vị hay tác nhân bảo quản thực phẩm. Giấm được sản xuất từ nguyên liệu có nguồn gốc nông nghiệp phù hợp, có chứa tinh bột, đường hoặc cả tinh bột và đường do quá trình lên men đôi, tạo cồn và acid acetic. Giấm là loại gia vị truyền thống có tính acid, được sản xuất rộng rãi từ gạo, mạch nha, táo, các dạng rượu vang khác nhau và các vật liệu nông nghiệp (Horiuchi *et al.*, 1999). Quá trình lên men giấm cơ bản là quá trình hai giai đoạn với giai đoạn đầu tiên là chuyển đổi kỵ khí các loại đường lên men thành ethanol bằng nấm men, sử dụng loài *Saccharomyces*, và thứ hai là quá trình oxy hóa hiếu khí ethanol do vi khuẩn, thường loài *Acetobacter* (Horiuchi *et al.*, 2000). Vi khuẩn giấm, còn gọi là vi khuẩn acid acetic, là thành viên của chi *Acetobacter* với đặc điểm chuyển đổi ethyl alcohol, C_2H_5OH thành acid acetic. Theo FDA (Food and Drug Administration, Hoa Kỳ), giấm chứa không ít hơn 4 gram acid acetic trong 100 ml ở 20°C, có thể áp dụng biện pháp lọc, chưng cất và thanh trùng ở 74°C trước khi đóng chai.

Nguyên liệu sử dụng lên men giấm thường là rượu gạo, rượu vang, và các sản phẩm có cồn khác. Hiện chỉ có khoảng 10% sản lượng acid acetic trên thế giới được sản xuất theo phương pháp sinh học (Awad *et al.*, 2012) nhưng phương pháp này vẫn được xem là quan trọng vì qui định ở nhiều quốc gia và của tổ chức FAO rằng giấm sử dụng trong thực phẩm phải có nguồn gốc sinh học (lên men) (Zahoor *et al.*, 2006).

Việt Nam là nước có sản lượng chuối cao với giá rất thấp ở thị trường khi chuối quá chín. Chuối có thời gian sử dụng ngắn và nhanh chóng suy giảm với tỷ lệ lớn sau thu hoạch. Chuối (*Musa sp.*) rất giàu vitamin B6, giúp chống nhiễm trùng và cần thiết cho sự tổng hợp hemoglobin (có chứa sắt). Chuối cũng rất giàu kali và là nguồn chất xơ tốt. Vì vậy, lên men tạo giấm từ chuối chín sẽ hạn chế tổn thất sau thu hoạch chuối, nâng cao hiệu quả kinh tế cho nhà vườn. Trong thí nghiệm này, nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được sử dụng để chuyển đổi glucose thành rượu ethylic. Lên men acetic là bước tiếp theo của quá trình lên men, trong đó các phân tử rượu được oxy hóa thành acid acetic do tác động của vi khuẩn *Acetobacter aceti* tạo hương vị đậm đặc trưng. Phương pháp bề mặt đáp ứng được xem là thành công và sử dụng phổ biến để mô hình hóa và tối ưu các quá trình hóa sinh hóa và công nghệ sinh học liên quan đến hệ thống thực phẩm. Đặc biệt trong nghiên cứu sản xuất giấm từ vang

chuối, phương pháp này cũng được sử dụng để tối ưu hóa quá trình lên men tạo acid acetic từ vang chuối.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên vật liệu

Nguyên liệu: chuối già chín (*Musa acuminata* Colla cv.) được thu nhận từ vườn chuối của các nông hộ tại xã Thiện Mỹ, Trà Ôn, Vĩnh Long.

Giống nấm men: dòng *Saccharomyces cerevisiae* phân lập từ nước thốt nốt (Nguyễn Minh Thủy và *ctv.*, 2011).

Giống vi khuẩn: *Acetobacter aceti* ATCC 15973 (ATCC, Mỹ).

Môi trường tăng sinh vi khuẩn: môi trường GYC (Glucose–Yeast extract–Calcium carbonate) (Benito, 2005).

Enzyme Pectinex Ultra SPL (Đan Mạch): chế phẩm enzyme có nguồn gốc từ nấm mốc *Aspergillus aculeatus* bao gồm hệ enzyme pectolytic, protease, cellulase và hemicellulase

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Quy trình sản xuất giấm vang chuối được thực hiện theo sơ đồ:

Chuối chín → Bóc vỏ → Chần → Xay → Lọc → Dịch quả → Phối chế → Thanh trùng → Lên men rượu → Phối chế → Lên men giấm → Lọc và thanh trùng → Sản phẩm.

Chọn nguyên liệu chuối có độ chín đồng đều, tách vỏ, xắt miếng với kích thước 3-5 cm và xử lý trong dung dịch acid citric 0,3% (với tỷ lệ chuối: nước là 2:1). Nguyên liệu được chần ở nhiệt độ 70°C trong 5 phút, sau đó được xay nhuyễn (tạo thành dạng paste) và điều chỉnh pH 4,5. Paste chuối được bổ sung 0,05% chế phẩm enzyme Pectinex Ultra SPL và tiến trình này được thực hiện ở nhiệt độ 40°C trong 40 phút. Enzyme với tỷ lệ 0,1% được bổ sung và duy trì ở nhiệt độ 55°C trong 15 phút. Lọc lấy dịch quả, điều chỉnh dịch lên men 18°Brix và bổ sung nấm men để lên men rượu bằng phương pháp lên men tĩnh ở nhiệt độ phòng trong 8 ngày. Rượu sau khi kết thúc quá trình lên men được pha loãng ở các nồng độ từ 5 đến 9% (cách nhau 2%) và kiểm soát hàm lượng đường bổ sung theo các tỉ lệ từ 25 đến 75 g/L (cách nhau 25 g) cùng với mẫu không bổ sung đường. Mật số vi khuẩn *Acetobacter aceti* ATCC 15973 được chủng vào rượu chuối với hàm lượng thay đổi từ 10^4 đến 10^6 tế bào/mL. Quá trình lên men giấm được thực hiện ở nhiệt độ phòng.

Các chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm được phân tích bao gồm: hàm lượng ethanol (% v/v), độ Brix, và hàm lượng acid acetic (%) (Lê Thanh Mai và *ctv.*, 2009).

Hiệu suất được tính theo công thức: $H(\%) = \frac{\text{Lượng sản phẩm thực tế}}{\text{Lượng sản phẩm lý thuyết}} \times 100$.

2.3 Phân tích thống kê

Phân tích thống kê (STATGRAPHIC) được sử dụng để chọn mô hình phù hợp cho các dữ liệu thu thập. Mô hình (1) được đề xuất (giá trị Y) trong trường hợp này:

$$Y = b_0 + b_n X_n + b_{nn} X_n^2 + b_{nm} X_n X_m + \dots (1)$$

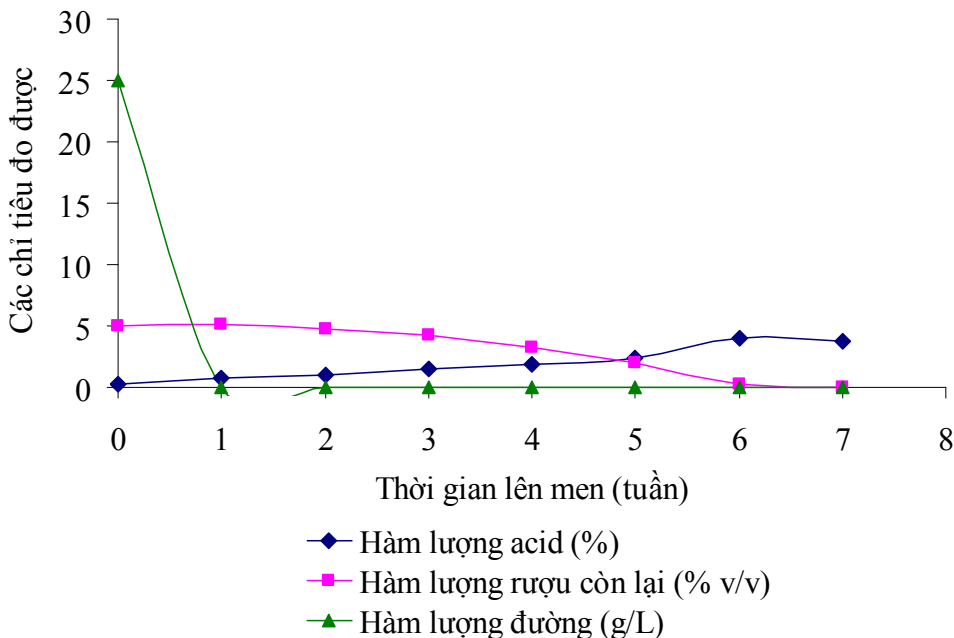
Trong đó: b_0 là hệ số; b_n , b_{nn} và b_{nm} là các hệ số bậc 1, bậc 2 của phương trình hồi quy; X_n , X_m ... là các giá trị của biến độc lập. Kiểm định sự tương thích của dữ liệu theo mô hình và dữ liệu thực nghiệm được thực hiện.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tiến trình lên men tạo giấm từ chuối

Rượu sau lên men đạt nồng độ 11 (% v/v) được pha loãng 5%, bổ sung lượng đường 25 g/L để thực hiện quá trình oxi hóa ethanol thành acid acetic.

Quá trình lên men khoảng 6 tuần. Hình 1 biểu diễn sự tích tụ acid acetic và thay đổi hàm lượng ethanol, saccharose theo thời gian lên men. Trong tuần đầu, khi đường được bổ sung vào môi trường lên men, vi khuẩn sử dụng hết đường để sinh trưởng và phát triển. Theo Sossou *et al.* (2009), sự khởi đầu của quá trình hình thành acid acetic có liên quan đến sự tăng trưởng tối đa của tế bào và đủ sinh khối để bắt đầu quá trình chuyển hóa ethanol thành acid acetic. Do đó, việc thay đổi môi trường ban đầu có ảnh hưởng đến các vi sinh vật lên men. Nghiên cứu của Brock và Madigan (1991) cho thấy các vi sinh vật cần giai đoạn để thích ứng (pha lag), tại thời điểm đó vi sinh vật hoạt động chưa mạnh nên hàm lượng acid sinh ra ít. Ở pha lag, vi khuẩn có đủ năng lượng và được sử dụng để tổng hợp acid acetic. Sự tiêu thụ hết hàm lượng ethanol 5% tương ứng với sự tăng dần hàm lượng acid acetic và đạt tối đa từ 0,3 đến 3,98% trong thời gian 6 tuần. Vi khuẩn sử dụng chất nền ethanol để chuyển hóa thành sản phẩm trung gian acetaldehyde và cuối cùng thành acid acetic. Quá trình lên men kết thúc ở tuần thứ 6 vì khi ethanol đã được sử dụng hết thì vi khuẩn tiếp tục thực hiện quá trình oxy hóa, sử dụng acid để chuyển hóa thành CO₂ và H₂O làm giảm chất lượng của giấm.



Hình 1: Chuyển hóa các thành phần (rượu và đường) thành acid acetic theo thời gian lên men (mật số tế bào vi khuẩn là 10⁵ tế bào/mL)

3.2 Ảnh hưởng của hàm lượng ethanol

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng ethanol đến hàm lượng acid sinh ra và các chỉ tiêu của sản phẩm trong quá trình lên men giấm ở 3 mức độ 5, 7 và 9% được thể hiện ở Bảng 1. Theo Nguyễn Đức Lượng và ctv. (2004), trong sản xuất giấm có thể dùng rượu không cần thanh trùng, chỉ cần bổ sung một ít acid để acid hóa môi trường. Tuy nhiên, để giữ được hương vị tự nhiên của sản phẩm giấm vang, rượu được sử dụng cho quá trình lên men giấm ở nghiên cứu này không qua thanh trùng, không bổ sung acid acetic để acid hóa môi trường. Vì vậy, mặc dù trong quá trình lên men số lượng vi khuẩn acetic tăng nhưng ở giai đoạn đầu của quá trình lên men số lượng các vi sinh vật tạp

nh nhiễm cũng tăng, đặc biệt là tế bào nấm men có sẵn trong rượu nên khi đường được bổ sung vào môi trường thì nấm men tiếp tục hoạt động. Dữ liệu phân tích cho thấy với nồng độ rượu 7 và 9% thì ở giai đoạn đầu (pha lag) vi khuẩn *A.aceti* cần thời gian để thích nghi với môi trường, lượng acid sinh ra thấp, pH môi trường chưa giảm mạnh nên không đủ để ức chế hoạt động của nấm men, vì thế nấm men tiếp tục hoạt động làm cho nồng độ rượu tăng lên ức chế hoạt động của vi khuẩn *A.aceti*. Ở hàm lượng ethanol ban đầu là 9% thì sau lên men lượng ethanol còn lại trên 10%. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với kết quả đã công bố của Zahoor et al. (2006), ở nồng độ ethanol 10% vi khuẩn *A.aceti* không phát triển và acid sinh ra rất thấp.

Bảng 1: Ảnh hưởng của hàm lượng ethanol đến các chỉ tiêu của sản phẩm

Hàm lượng ethanol (%v/v)	Chỉ tiêu			
	Hàm lượng acid (%)	Ethanol còn lại (% v/v)	Độ Brix (%)	Hiệu suất (%)
5	2,750 ^a	1,344 ^a	3,008 ^a	59,043 ^a
7	0,809 ^b	7,500 ^b	3,650 ^b	12,246 ^b
9	0,379 ^c	10,559 ^c	4,658 ^c	4,437 ^c

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau đi kèm theo trung bình nghiệm thức trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Ngoài ra, cũng theo Nguyễn Đức Lượng và ctv. (2004), hàm lượng ethanol thích hợp cho quá trình lên men giấm là 6-15%. Tuy nhiên, khả năng oxy hóa ethanol để tạo thành acid acetic của vi khuẩn acetic có sự thay đổi rất lớn giữa các giống, loài (Gullo and Giudici, 2008) và các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men như nhiệt độ, sự thoáng khí, phương pháp lên men. Vì vậy, với hàm lượng ethanol sử dụng khoảng 7% thì hàm lượng acid acetic sinh ra cũng không cao, trung bình 0,8%. Bên cạnh đó, lượng đường bổ sung ban đầu vào dịch lên men với hàm lượng ethanol 7 và 9% đã được sử dụng hết chính là do nấm men sử dụng đường để lên men rượu.

Ngược lại với hàm lượng ethanol để lên men giấm là 5% thì lượng acid sinh ra rất cao do ở nồng độ rượu này vi khuẩn thích ứng nhanh với môi trường. Nồng độ rượu thấp kích thích sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2004), acid sinh ra nhiều, pH giảm mạnh ức chế hoạt động của nấm men, do đó ở hàm lượng ethanol 5% thích hợp cho quá trình lên men giấm vang, hàm lượng acid sinh ra trung bình khoảng 2,75%. Bấy giờ hàm lượng đường của dịch lên men cũng giảm nhanh do vi khuẩn sử dụng đường để sinh trưởng, tăng mật số chuyển hóa ethanol thành acid acetic. Cũng ở hàm lượng ethanol này, hiệu suất quá trình lên men rất cao

(trung bình 59,04%) và thể hiện sự khác biệt ý nghĩa so với hiệu suất lên men của các mẫu có nồng độ rượu 7 và 9%, tương ứng là 12,24 và 4,43%.

3.3 Ảnh hưởng của mật số vi khuẩn

Trong tiến trình lên men giấm, vi khuẩn *Acetobacter* tham gia vào quá trình oxy hóa sinh học chuyển hóa ethanol thành acid acetic là do sự kết hợp của 2 enzyme là alcohol dehydrogenase (ADH) và aldehyde dehydrogenase (ALDH) (Valli et al., 2006). Khi lên men giấm, tế bào nấm men bị ức chế và chết đi do sự hình thành acetaldehyde là sản phẩm đầu tiên của quá trình chuyển hóa rượu thành acid acetic và acetaldehyde cũng ảnh hưởng đến hoạt động của enzyme của nấm men (Aranda and Delomo, 2003). Kết quả thể hiện ở bảng 2 cho thấy với mật số vi khuẩn là 10⁵ và 10⁶ tế bào/mL thì hàm lượng acid acetic sinh ra nhiều và không thể hiện sự khác biệt ý nghĩa. Tương tự, hàm lượng ethanol trong sản phẩm cũng không thể hiện sự khác biệt ý nghĩa giữa hai mức độ vi khuẩn sử dụng. Trong khi đó với mật số vi khuẩn sử dụng cho tiến trình lên men là 10⁴ tế bào/mL thì cho lượng acid sinh ra ít, pH môi trường chỉ giảm nhẹ không đủ để ức chế hoạt động của nấm men, làm cho nấm men tiếp tục lên men rượu trở lại. Và khi đó nồng độ rượu cao sẽ ức chế ngược lại hoạt động của vi khuẩn dẫn đến lượng rượu còn lại nhiều.

Bảng 2: Ảnh hưởng của mật số vi khuẩn đến các chỉ tiêu của sản phẩm

Mật số vi khuẩn (tế bào/mL)	Chỉ tiêu			
	Hàm lượng acid (%)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Độ Brix (%)	Hiệu suất (%)
10 ⁴	0,867 ^a	7,072 ^a	3,858 ^a	16,537 ^a
10 ⁵	1,499 ^b	6,314 ^b	3,783 ^a	28,825 ^b
10 ⁶	1,572 ^b	6,017 ^b	3,675 ^b	30,364 ^b

Ghi chú: những chữ cái khác nhau đi kèm theo trung bình nghiệm thức trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

3.4 Ảnh hưởng của nồng độ đường

Dữ liệu phân tích thể hiện ở **bảng 3** cho thấy đối với mẫu giấm có bổ sung đường 25 g/L cho lượng acid sinh ra cao hơn và có sự khác biệt so với các mẫu không bổ sung đường và các mẫu bổ sung đường hàm lượng 50 và 75 g/L.

Theo Gullo and Giudici (2008), các chi *Acetobacter* và *Gluconacetobacter* oxy hóa ethanol dễ dàng hơn đường trong khi *Gluconobacter* spp. oxy hóa đường dễ dàng hơn ethanol, do đó *Acetobacter* có thể oxy hóa ethanol thành acid acetic mà không cần bổ sung đường. Tuy nhiên, đường hiện diện trong quá trình lên men giấm cũng có ảnh hưởng đến giá trị cảm quan của sản phẩm.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ đường đến các chỉ tiêu của sản phẩm

Hàm lượng đường (g/L)	Chỉ tiêu			
	Nồng độ acid (%)	Lượng ethanol (%v/v)	Độ Brix (%)	Hiệu suất (%)
0	1,304 ^a	5,439 ^a	2,422 ^a	25,081 ^b
25	1,607 ^b	5,474 ^a	3,356 ^b	30,952 ^c
50	1,299 ^a	6,889 ^b	4,322 ^c	24,849 ^b
75	1,041 ^c	8,064 ^c	4,989 ^d	20,083 ^a

Ghi chú: những chữ cái khác nhau đi kèm theo trung bình nghiệm thức trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%

Hiệu suất quá trình lên men cũng chịu ảnh hưởng của hàm lượng đường bổ sung. Với hàm lượng đường sử dụng cho quá trình lên men là 25 g/L thì hiệu suất lên men cao nhất (trung bình 30,95%), trong khi các hàm lượng đường bổ sung khác (50 và 75g/L) hoặc không bổ sung đường thì hiệu suất quá trình lên men thấp hơn, các giá trị trung bình đạt được tương ứng là 28,5, 24,8 và 20,08%.

3.5 Tương tác giữa hàm lượng acid acetic sinh ra và các biến độc lập (hàm lượng rượu, hàm lượng đường và mật số vi khuẩn)

Theo Kadere *et al.* (2008) các chủng của chi *Acetobacter* giữ vai trò chủ yếu trong quá trình sản xuất giấm. Vai trò quan trọng của vi khuẩn *Acetobacter* là khá rõ trong chuyển hóa ethanol thành acid acetic. Ngoài ra, quá trình sản xuất giấm cũng cần lượng đường cho sự phát triển của vi khuẩn, tham gia vào quá trình sản xuất acid acetic (Gullo *et al.*, 2005). Do đó, nghiên cứu xác định mối tương quan của 3 nhân tố bao gồm hàm lượng ethanol (5÷9% v/v), hàm lượng đường bổ sung (25÷75g/L và mẫu đối chứng) và mật số vi khuẩn

(10⁴ đến 10⁶ tế bào/mL) đến hàm lượng acid acetic sinh ra trong quá trình lên men giấm được thực hiện.

Kết quả phân tích cho thấy sự tương thích của mô hình hồi quy đa chiều (phương trình 2) mô tả mối quan hệ giữa acid acetic sinh ra và 9 số hạng (3 biến độc lập là X₁, X₂, X₃).

$$\begin{aligned} \text{Hàm lượng acid acetic (\%)} = & -0,2411 - 2,3923 X_1 - 0,00108 X_2 + 4,4328 X_3 - 0,1838 X_1 X_3 + \\ & 0,189 X_1^2 - 0,2794 X_3^2 - 0,000224 X_2^2 + 0,00193 X_1 X_2 \end{aligned} \quad (2)$$

Trong đó: X₁ là hàm lượng ethanol (5÷9% v/v), X₂ là hàm lượng đường bổ sung (25÷75 g/L) và X₃ là mật số vi khuẩn (10⁴ đến 10⁶ tế bào/mL).

Phân tích thể hiện ở bảng ANOVA cho thấy các giá trị P hầu hết nhỏ hơn 0,05, cho thấy tương quan có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các biến với mức độ tin cậy 95% (dữ liệu thống kê ANOVA không được trình bày ở đây). Hệ số xác định tương quan R² theo thống kê chỉ ra rằng mô hình tương thích 96,425% biến thiên trong giá trị acid acetic thu nhận. Sai số chuẩn của các ước tính (SEE) cho

thấy độ lệch chuẩn của các số dư là 0,2503. Với giá trị P lớn hơn 0,05, cho thấy không có sự tương quan tiếp trong các số dư ở mức độ tin cậy 95,0%.

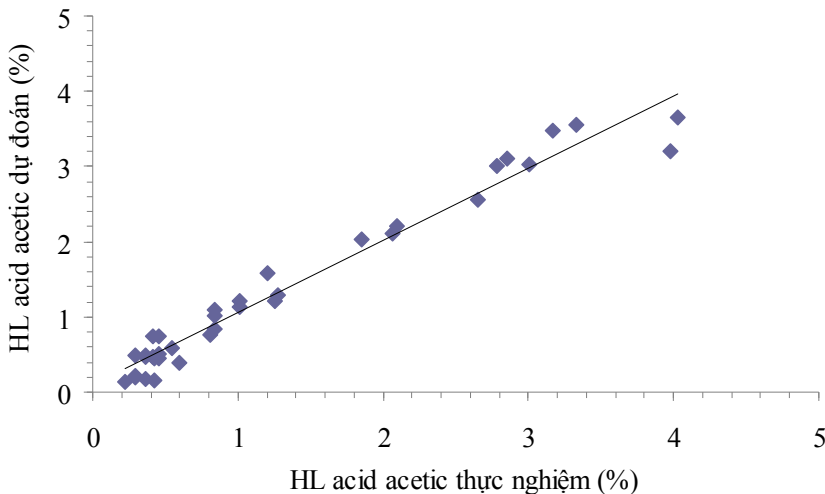
Trong việc xác định mô hình có thể được đơn giản hóa, giá trị P thể hiện cao nhất trong các biến độc lập là 0,8965, thuộc về giá trị X_2 (hàm lượng đường). Khi giá trị P của biến độc lập $\geq 0,05$, thành phần này không có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95% hoặc cao hơn. Do đó, có thể xem xét và loại bỏ biến X_2 từ mô hình. Phương trình 2 cũng cho thấy yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến quá trình tạo acid acetic chính là hàm lượng ethanol (X_1) sử dụng, kế đến là mật số vi khuẩn (X_3) và sau cùng là lượng đường (X_2). Các tương tác liên quan đến các biến độc lập (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , X_1X_3 , X_1X_2) cũng thể hiện mức độ ảnh hưởng quan trọng. Phương trình 2 có thể được viết lại thành phương trình 3.

$$\text{Hàm lượng acid acetic (\%)} = - 0,2702 - 2,3889 X_1 + 4,4328 X_3 - 0,1838 X_1X_3 + 0,189 X_1^2 - 0,2794 X_3^2 - 0,000229 X_2^2 + 0,00183 X_1X_2 \quad (3)$$

$$R^2 = 96,43\%, \text{ SEE} = 0,2458$$

Phân tích ANOVA cho thấy các biến độc lập đều có giá trị P nhỏ hơn 0,05, giá trị P cao nhất là 0,0033 thể hiện ở biến X_1^2 (mật số vi khuẩn) (bảng phân tích ANOVA không được trình bày ở đây). Như vậy dù giá trị này cao nhất so với các giá trị P của các biến độc lập khác nhưng vẫn nhỏ hơn 0,05, cho thấy mức độ ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

Giá trị P của mô hình cũng nhỏ hơn 0,05 và hệ số xác định tương quan cao ($R^2=96,43\%$), càng khẳng định mức độ ý nghĩa và độ tin cậy của mô hình hồi quy đa chiều được thiết lập. Mức độ tương thích giữa hàm lượng acid acetic thực nghiệm và tính toán theo phương trình hồi quy 3 được tìm thấy (Hình 2) ($R^2 = 0,96$).



Hình 2: Tương quan giữa nồng độ acid acetic (%) thực nghiệm và dự đoán theo phương trình (2) (HL: hàm lượng)

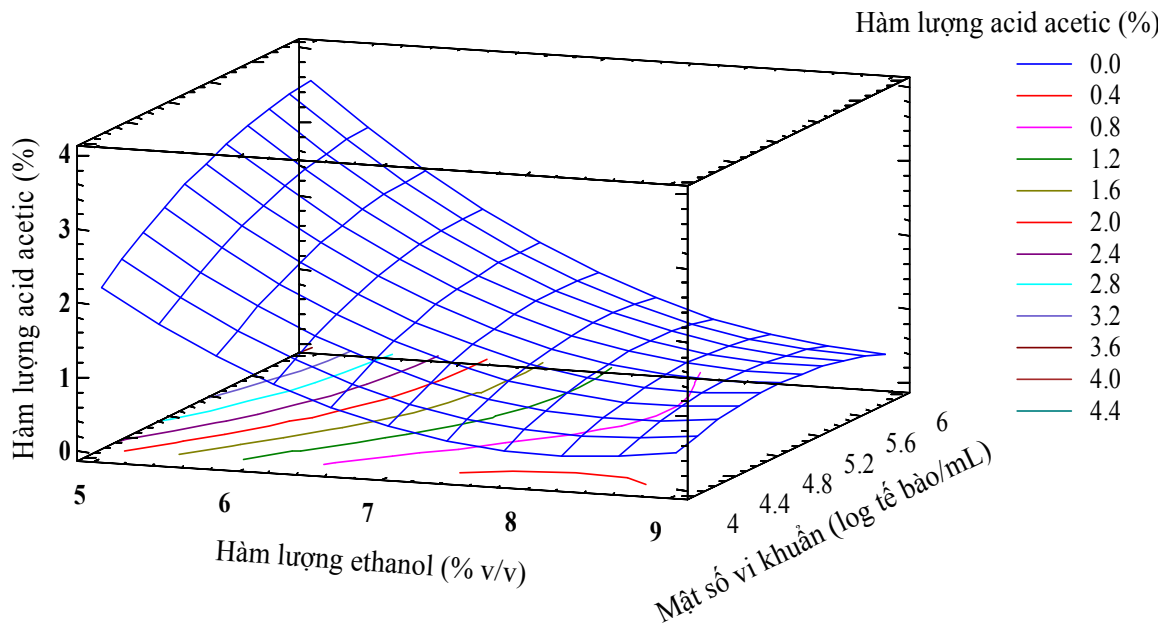
Khi cố định hàm lượng đường bổ sung là 25 g/L, tương quan giữa hàm lượng acid acetic sinh ra và hàm lượng ethanol với mật số vi khuẩn được trình bày ở phương trình 4 và Hình 3.

$$\text{Hàm lượng acid acetic (\%)} = - 0,4136 - 2,343 X_1 + 4,4328 X_3 - 0,1838 X_1X_3 + 0,189 X_1^2 - 0,2794 X_3^2 \quad (4)$$

Trong quá trình lên men giấm, khi tăng hàm lượng ethanol từ 5 lên 9% thì lượng acid tạo thành càng giảm do chất nền ethanol cao đã ức chế hoạt động của vi khuẩn *A.aceti*. Đồng thời, thời gian để vi khuẩn thích nghi môi trường mới lâu hơn ở hàm lượng ethanol thấp, do đó tạo điều kiện cho nấm

men hoạt động trở lại và ức chế hoạt động của vi khuẩn.

Ngược lại với hàm lượng ethanol, khi thực hiện tiến trình lên men acetic, việc bổ sung mật số vi khuẩn tăng dần từ 10^4 đến 10^6 (tế bào/mL) thì hàm lượng acid acetic tạo thành cũng tăng dần và đạt cao nhất ở mật số vi khuẩn từ 10^5 đến 10^6 (tế bào/mL) (không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa). Điều này là do khi mật số vi khuẩn càng nhiều thì khả năng chuyển hóa ethanol thành acid acetic càng nhanh, pH môi trường giảm nhanh có thể ức chế và ngăn cản sự hoạt động trở lại của nấm men (Valli *et al.*, 2005).



Hình 3: Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa acid acetic, hàm lượng ethanol và mật số vi khuẩn trong quá trình lên men giấm vang chuối

Mô hình bề mặt đáp ứng thể hiện tương quan giữa hàm lượng acid sinh ra theo hàm lượng ethanol sử dụng và mật số vi khuẩn của chúng được thiết lập (Hình 3) (từ phương trình 4). Đồng thời sử dụng chương trình STAGRAPHIC có thể dò tìm được các giá trị tối ưu cho quá trình lên men giấm vang chuối với hàm lượng acid acetic đạt được cao nhất (hàm lượng 4%) là: hàm lượng ethanol 5%, hàm lượng đường 20,62 g/L và mật số vi khuẩn 10⁵ (tế bào/mL).

4 KẾT LUẬN

Quá trình sản xuất giấm vang từ chuối già trong thời gian 43 ngày đạt 4% lượng acid acetic sinh ra. Thông số tối ưu cho quá trình lên men giấm là 5% ethanol trong dịch lên men, hàm lượng đường 20,62 g/L và mật số vi khuẩn là 10⁵ tế bào/mL. Từ kết quả này cho thấy cơ chất rượu ban đầu (ethanol) không qua thanh trùng, không acid hóa môi trường lên men giấm tạo được hương vị hài hòa, đặc trưng cho sản phẩm giấm vang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aranda, A. and M. Delolmo, 2003. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, 20: 747-759.

2. Awad, H.M., R. Diaz, R.A. Malek, N.Z. Othman, R.A. Aziz and H.A. El Enshasy, 2012. Efficient production process for food grade acetic acid by *Acetobacter aceti* in shake flask and in bioreactor Cultures. *E-Journal of Chemistry*, Volume 9 (2012), Issue 4, Pages 2275-2286.
3. Benito Á.G, 2005. Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria. http://www.uco.es/vinegarnetwork/tesis/tesis_Gonzalez.pdf, accessed on 01/01/2014.
4. Brock, T.D and M.T. Madigan (1991). *Biology of microorganisms* (6th Edition). Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
5. Gullo, M. and P. Giudici, 2008. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (2008) 46–53.
6. Gullo, M., C. Caggia, L. Devero and P. Giudici, 2005. Characterization of acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Int. J. Food Microbiol.*, 106: 209-212.
7. Horiuchi, J. I., Kanno, T., & Kobayashi, M, 1999. New vinegar production from onions. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(1), 107-109.

8. Horiuchi, J. I., Kanno, T., & Kobayashi, M, 2000. Effective onion vinegar production by a two-step fermentation system. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(3), 289-293.
9. Kadere, T.T., T. Miamoto, R.K. Oniang'o, P.M. Kutima and S.M. Njoroge, 2008. Isolation and identification of genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 2963-2971.
10. Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng và Lê Thị Lan Chi, 2009. Các phương pháp phân tích ngành Công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội. 331 trang.
11. Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, Lê Thị Thủy Tiên, Tạ Thu Hằng, Huỳnh Ngọc Anh, Nguyễn Thúy Hương và Phan Thị Huyền, 2004. Công nghệ Enzyme. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. 534 trang.
12. Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành và Bùi Thị Thúy Ngân, 2011. Tuyển chọn các dòng nấm men được phân lập từ nước thốt nốt. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Vol. 18b, trang 117–126. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. ISSN 1859-2333.
13. Sossou S.K., Ameyapoh Y, Karou SD, de Souza C, 2009. Study of pineapple peelings processing into vinegar by biotechnology. *Pak J. Biol. Sci.*; 12(11): 859-65.
14. Valli, M., M. Sauer, P. Branduardi, N. Borth, D. Porro and D. Mattanovich, 2006. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Applied Environ. Microbiol.*, 72: 5492-5499.
15. Valli, M., M. Sauer, P. Branduardi, N. Borth, D. Porrot and D. Mattanovich, 2005. Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Applied Environ. Microbiol.*, 71: 1515-1521.
16. Zahoor, T., F. Siddique and U. Farooq, 2006. Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter aceti*) from indigenous sources. *British Food Journal*, Vol. 108 Iss: 6, pp.429 – 439