

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

PGS. TS. LÊ THANH MẠI (CHỦ BIÊN)

GS. TS. NGUYỄN THỊ HIỀN

PGS. TS. PHẠM THU THỦY

TS. NGUYỄN THANH HẰNG

ThS. LÊ THỊ LAN CHI



CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH NGÀNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT



PGS. TS. LÊ THANH MAI (CHỦ BIÊN),
GS. TS. NGUYỄN THỊ HIỀN, PGS. TS. PHẠM THU THỦY,
TS. NGUYỄN THANH HẰNG, ThS. LÊ THỊ LAN CHI

CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH NGÀNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN

(In lần thứ ba, có sửa chữa và bổ sung)



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI – 2009

LỜI MỞ ĐẦU

Cuốn sách “**CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH NGÀNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN**” được tập thể các cán bộ thuộc Bộ môn Công nghệ các sản phẩm lên men, Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, biên soạn.

Cuốn sách được đưa ra nhằm mục đích làm giáo trình giảng dạy cho sinh viên ngành Công nghệ lên men và ngành Công nghệ Thực phẩm nói chung, và làm tài liệu tham khảo cho sinh viên, các cán bộ nghiên cứu, cán bộ kỹ thuật trong các viện nghiên cứu, các nhà máy cũng như các cơ quan quản lý có liên quan đến chuyên ngành chế biến thực phẩm, đặc biệt trong lĩnh vực sản phẩm đồ uống lên men.

Cuốn sách được chia ra 3 phần chính, gồm 15 chương:

Phần I: Giới thiệu các phương pháp phân tích các nguyên liệu chính dùng trong sản xuất các sản phẩm bia, rượu, nước giải khát, mì chính như hạt đại mạch, malt, các nguyên liệu chứa tinh bột, ri đường, hoa houblon, quả và nước.

Phần II: Nêu các phương pháp phân tích kiểm tra hóa lý các sản phẩm lên men: bia, rượu, vang, rượu etylic, mì chính và chế phẩm enzym.

Phần III: Các phương pháp phân tích vi sinh vật, từ phương pháp kiểm tra độ tiết trùng, phương pháp định tính, định lượng vi sinh vật cho tới các phương pháp phân tích một số chỉ tiêu vi sinh vật trong các sản phẩm thực phẩm.

Danh sách tác giả biên soạn:

Chương 1, 2, 5, 8 và 11: GS.TS. Nguyễn Thị Hiền, ThS. Lê Thị Lan Chi.

Chương 3, 4 và 9: TS. Nguyễn Thanh Hằng.

Chương 6, 7, 10, 13, 14 và 15: PGS. TS. Lê Thanh Mai.

Chương 12: PGS. TS. Phạm Thu Thủy.

Đây là tài liệu được biên soạn trên cơ sở tài liệu thí nghiệm chuyên ngành đã được giảng dạy trong thời gian qua của Bộ môn cùng các tài liệu tham khảo khác trong và ngoài nước.

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc xuất bản cuốn sách này.

Cuốn sách được xuất bản lần đầu nên không tránh khỏi thiếu sót. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn và trân trọng tiếp nhận những ý kiến đóng góp của các bạn đọc giả gần xa để lần tái bản sau được hoàn chỉnh hơn.

Các ý kiến đóng góp xin gửi về Bộ môn Công nghệ các sản phẩm lên men, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, điện thoại 04 86801119.

Các tác giả

PHẦN 1

PHÂN TÍCH NGUYÊN LIỆU

Chương 1

PHÂN TÍCH HẠT ĐẠI MẠCH

1.1. ĐỘ ẨM

1. Mục đích

Xác định hàm lượng ẩm của đại mạch bằng khối lượng mất đi trong quá trình sấy ở điều kiện tiêu chuẩn.

Phương pháp này áp dụng cho các loại hạt đại mạch, nhưng không dùng cho malt. Đối với đại mạch có độ ẩm lớn hơn 17% cần phải sấy sơ bộ trước khi xác định.

2. Nguyên tắc

Đại mạch được sấy sơ bộ (nếu cần), rồi nghiền mịn, sau đó sấy trong tủ sấy đã đặt nhiệt độ tiêu chuẩn. Độ ẩm được tính toán dựa vào khối lượng mất đi trong quá trình sấy.

3. Dụng cụ

- Máy nghiền trục phòng thí nghiệm (đặt khoảng cách giữa 2 trục là 0,2 mm).
- Tủ sấy có thể điều chỉnh nhiệt độ trong khoảng $\pm 2^{\circ}\text{C}$, đặt nhiệt độ 130 – 133 $^{\circ}\text{C}$.
- Cốc cân làm bằng kim loại (thường bằng nhôm), đường kính khoảng 50 mm và không sâu quá 20 mm, có nắp đậy kín.
- Bình hút ẩm.
- Cân phân tích, độ chính xác tới 0,001 g.

4. Tiến hành

- Cân khoảng 20 g mẫu hạt đại mạch và nghiền mịn. Trộn kỹ, lấy ngay khoảng 5 g bột nghiền vào hộp cân sạch khô đã biết trước trọng lượng, đậy

nắp và cân với độ chính xác 0,001 g. Mở nắp, đặt hộp và nắp vào tủ sấy đã đạt nhiệt độ 130 – 133°C, bắt đầu tính thời gian khi tủ sấy đạt nhiệt độ này. Sau 2 giờ sấy, lấy hộp ra, đậy nắp, làm nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng (thường khoảng 30 – 40 phút). Cân lại hộp.

Chú ý: Nếu mẫu đại mạch có độ ẩm trên 17% (khối lượng), lấy khoảng 6 g mẫu hạt chưa nghiền cho ngay vào hộp sạch khô, đã biết trước trọng lượng, đậy nắp và cân với độ chính xác 0,001 g. Sấy trong tủ sấy 60°C khoảng 10 phút và làm nguội về nhiệt độ phòng trong khoảng 2 giờ (không dùng bình hút ẩm, không đậy nắp). Sau đó mới xác định độ ẩm của mẫu đã sấy sơ bộ như trên.

5. Kết quả

$$\text{Độ ẩm} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100, \%$$

trong đó:

m_1 - khối lượng mẫu trước khi sấy, g;

m_2 - khối lượng mẫu sau khi sấy, g.

Đối với đại mạch có độ ẩm trên 17% sử dụng công thức:

$$\text{Độ ẩm} = \left(1 - \frac{m_2 \cdot m_4}{m_1 \cdot m_3}\right) \times 100, \%$$

trong đó:

m_3 - khối lượng mẫu trước khi sấy sơ bộ (g);

m_4 - khối lượng mẫu sau khi sấy sơ bộ (g).

1.2. KHỐI LƯỢNG 1000 HẠT

1. Mục đích

Xác định khối lượng trung bình của hạt, chỉ tiêu này được dùng để đánh giá chất lượng các loại hạt đại mạch, ngũ cốc và malt.

2. Nguyên tắc

Đếm số hạt đại mạch trong mẫu cân phân tích. Sau đó tính toán để biết khối lượng của 1000 hạt đại mạch khô (tính theo g).

3. Dụng cụ

- Máy đếm hạt tự động (nếu có).
- Cân phân tích, độ chính xác tới 0,01 g.

4. Tiến hành

- Cân 40 g hạt đại mạch cần phân tích, loại bỏ những hạt vỡ, hạt lạ và trừ khối lượng. Tiếp đó, đếm bằng tay hoặc bằng máy số hạt trong mẫu.

5. Kết quả

Tính khối lượng 1000 hạt đại mạch theo chất khô theo công thức:

$$G = \frac{M \times 1000 \times (100 - W)}{n \times 100} , g$$

trong đó:

G - khối lượng 1000 hạt đại mạch khô (g);

M - khối lượng mẫu phân tích (g);

W - độ ẩm (% m/m);

n - số lượng hạt trong lô mẫu phân tích.

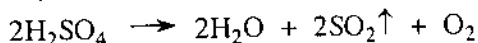
1.3. NITƠ TỔNG SỐ

1. Mục đích

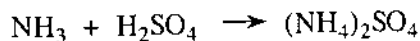
Xác định hàm lượng nitơ tổng số trong hạt bằng phương pháp Kjeldahl. Phương pháp được áp dụng cho mọi loại hạt đại mạch có hàm lượng nitơ $\leq 2,4\%$, nếu hàm lượng nitơ lớn hơn 2,4% thì phải giảm lượng mẫu.

2. Nguyên tắc

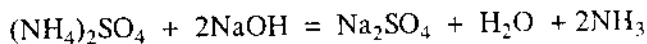
Trước tiên mẫu được vô cơ hóa bằng H_2SO_4 đậm đặc ở nhiệt độ cao với chất xúc tác. Các phản ứng của quá trình vô cơ hóa xảy ra như sau:



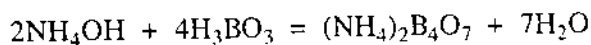
Oxy tạo thành lại oxy hóa các nguyên tố khác: carbon tạo thành CO_2 , hydro tạo thành H_2O , còn nitơ giải phóng ra dưới dạng NH_3 kết hợp với H_2SO_4 dư tạo thành $(NH_4)_2SO_4$ tan trong dung dịch.



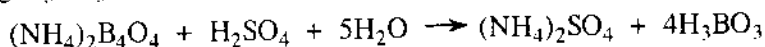
Đuổi NH_3 ra khỏi dung dịch bằng NaOH



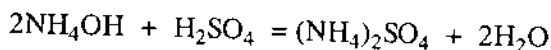
NH_3 bay ra cùng với nước sang bình hứng, trong bình hứng chứa H_3BO_3 :



Định lượng H_3BO_3 dư bằng H_2SO_4 0,1N



hoặc H_2SO_4 :



Định lượng H_2SO_4 dư bằng NaOH có cùng nồng độ đương lượng gam.

3. Hóa chất

- H_2SO_4 đậm đặc, $d = 1,84$
- Dung dịch H_2SO_4 0,1N chuẩn
- Dung dịch NaOH 0,1N chuẩn
- Dung dịch NaOH 40%
- Hỗn hợp xúc tác: dung dịch HClO_3 hoặc H_2O_2 30% hoặc K_2SO_4 , CuSO_4 (100:10:1), có thể dùng selen kim loại (0,05 g) hoặc hỗn hợp K_2SO_4 và CuSO_4 tỷ lệ 3:1.
- Dung dịch H_3BO_3 3%
- Thuốc thử hỗn hợp: metyl đỏ 0,1% pha trong cồn và metyl xanh 0,1% pha trong cồn, tỷ lệ 2:1.
- Chỉ thị tariso: Hòa 0,05 g metyl xanh vào 5 ml nước cất, cho 100 ml cồn vào và hòa thêm 0,1 g metyl đỏ. Hòa tan và bảo quản trong lọ tối màu. Hỗn hợp thuốc thử này có giới hạn biến đổi màu ở pH 5,2 – 5,6. Môi trường axit có màu tím, môi trường kiềm có màu xanh lục.
- Thuốc thử Nessler để phát hiện sự có mặt nitơ trong dung dịch. Cách pha chế như sau:

Cách 1: 15 g HgI_2 , 10 g KI hòa vào 15 ml nước cất, thêm 80 ml dung dịch NaOH 50%, định mức đến 500 ml bằng nước cất.

Cách 2: 35 g KI hòa tan trong 100 ml nước cất nóng, 17 g HgCl_2 hòa tan trong 300 ml nước cất, NaOH hoặc KOH 20%. Cho dung dịch HgCl_2 vào dung dịch KI đến khi tạo thành kết tủa HgI_2 không tan nữa thì dừng lại. Sau đó dùng dung dịch kiềm 20% định mức đến 1 lít. Tiếp đó thêm 5 ml dung dịch HgCl_2 đến khi xuất hiện kết tủa đỏ HgCl_2 . Để lắng kết tủa đến khi dung dịch trong hoàn toàn. Bảo quản trong lọ tối màu.

4. Dụng cụ

- Tủ hút
- Bộ cất đạm Kjeldahl (hình 1.1)
- Pipet 1, 2, 5, 10 ml
- Buret 25 hoặc 50 ml
- Bình định mức 50 hoặc 100 ml

- Máy nghiền trục phòng thí nghiệm
- Cân kỹ thuật, độ chính xác 0,001 g

5. Tiến hành

5.1. Vô cơ hóa nguyên liệu

- Cân khoảng 20 g mẫu đại mạch đã nghiền mịn để xác định độ ẩm và nitơ. Trộn đều mẫu, cân chính xác 1,0 – 1,5 g rồi đổ toàn bộ vào bình Kjeldahl khô (chú ý không để mẫu dính lên thành bình). Cho thêm 10 – 20 ml H_2SO_4 đậm đặc. Trước khi cho axit có thể cho vài giọt nước cất không có nitơ để thấm ướt bột. Đậy bình, lắc nhẹ rồi đặt lên bếp đun nhẹ khoảng 30 – 40 phút, sau đó nhấc bình ra, để nguội.

- Cho vài giọt chất xúc tác HClO_3 hoặc H_2O_2 30%, chỉ cho giai đoạn cuối khi dung dịch đã có màu vàng sẫm, hoặc cho hỗn hợp K_2SO_4 và CuSO_4 , cho một lần ngay từ đầu, lượng chất xúc tác bằng lượng mẫu dùng để vô cơ hóa. Tiếp tục đốt trên bếp khoảng 30 phút nữa. Dung dịch sẽ chuyển từ màu đen sang màu cánh dán. Nhấc bình ra khỏi bếp, để nguội.

- Cho thêm chất xúc tác lần hai (vài giọt HClO_3 hoặc H_2O_2). Tiếp tục đốt trên bếp đến khi mất màu dịch trong bình. Để nguội.

- Chuyển dịch sang bình định mức 50 hoặc 100 ml, tráng bình Kjeldahl vài lần bằng nước cất không có nitơ và định mức tới gần bình.

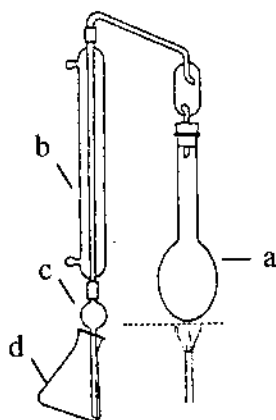
5.2. Chung cất

Sử dụng H_3BO_3 để thu nhận NH_3 :

- Rửa bình chung cất Kjeldahl bằng nước cất không có nitơ. Lấy 10 – 20 ml dung dịch đã vô cơ hóa cho vào bình phản ứng (a). Cho thêm vài giọt thuốc thử hỗn hợp nếu dùng chất xúc tác bằng HClO_3 hoặc H_2O_2 .

- Cho vào bình hứng (d) 20 ml H_3BO_3 3%, thêm vài giọt chỉ thị Tariso.

- Rót từ từ 70 ml NaOH 40% vào bình (a), giữ yên để phân thành 2 lớp rõ rệt. Không làm xáo trộn các lớp, lắp vào bộ cất đậm (hình 1.1). Để đầu ra của ống (c) ngập dưới dung dịch axit boric. Nén bật bếp trước



Hình 1.1: Bộ cất đậm Kjeldahl.

khi lắp bình để giảm thiểu nguy cơ chất lỏng chảy ngược vào ống ngưng. Lắc mạnh bình để đảm bảo trộn nhanh và cấp nhiệt đều. Ngay sau khi trộn, tạm thời tháo bình chứa axit boric, để nước chảy ra hết khỏi ống (c) và tạo cân bằng áp suất trong bình cất.

- Đun bình phản ứng, NH_3 bay ra cùng lên cùng với nước qua ống ngưng (b) sang bình hứng (d) và tác dụng với axit boric tạo thành muối amoni tetraborat $[(\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7]$. Tiến hành chưng cất trong 30 – 40 phút. Kiểm tra NH_3 đã hết chưa bằng cách hứng dịch cất và thử bằng giấy đo pH. Khi NH_3 đã được cất hoàn toàn, hạ thấp bình hứng, dùng bình tia nước cất tráng sạch axit dính ở đầu ống.

- Định lượng amoni tetraborat tạo thành bằng dung dịch H_2SO_4 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt.

Sử dụng H_2SO_4 để thu nhận NH_3 :

- Quá trình định lượng tiến hành như trên, nhưng ở bình hứng (a) cho một lượng H_2SO_4 0,1N (ngập đầu ống (c)) và vài giọt thuốc thử hỗn hợp metyl. Theo dõi bình hứng, nếu thấy dung dịch biến đổi từ màu vàng sang màu lá mạ thì cho thêm 5 ml H_2SO_4 0,1N nữa, cần làm nhanh để tránh mất nitơ.

- Đun sôi khoảng 30 phút, quan sát cột nước đầu ống sinh hàn (b) không chuyển từ màu hồng sang xanh là được. Muốn chắc chắn, lấy dịch cất đầu ống (c) thử với thuốc thử Nessler, rồi chuẩn độ axit dư bằng dung dịch NaOH 0,1N.

Chú ý:

- Quá trình vô cơ hóa giải phóng ra SO_2 nên phải tiến hành trong tủ hút.

- Thời gian đốt mẫu thường là 3 – 4 giờ phụ thuộc lượng mẫu, nguồn nhiệt và chất xúc tác. Nếu dùng CuSO_4 với lượng lớn (1 – 2 g) thì thời gian vô cơ hóa khoảng 2 – 3,5 giờ. Khi dùng H_2O_2 (4 – 5 ml) mất 40 – 50 phút. Nếu dùng selen (0,1 g/1 g mẫu), thời gian 30 – 40 phút. Dùng hỗn hợp xúc tác K_2SO_4 và CuSO_4 và selen (100:10:1) với tỷ lệ 4 g/1 g mẫu, khoảng 50 – 60 phút.

6. Tính kết quả

6.1. Nếu sử dụng H_3BO_3 để thu nhận NH_3 thì tính hàm lượng nitơ tổng số (Nt) có trong mẫu theo công thức:

$$N_t = \frac{n \cdot 1,42 \cdot 100}{m(100 - w)}, \text{ mg\%}$$

trong đó:

n - số ml H_2SO_4 0,1N dùng để chuẩn độ;

1,42 - số mg nitơ ứng với 1 ml H_2SO_4 0,1N;

100 - hệ số chuyển thành %;

m - khối lượng mẫu phân tích, mg;

w - độ ẩm mẫu phân tích, %

6.2. Nếu sử dụng H_2SO_4 để thu nhận NH_3 thì tính hàm lượng nitơ tổng số có trong mẫu theo công thức:

$$N_1 = \frac{(n_1 - n_2) \cdot 1,42 \cdot f \cdot 100}{m(100 - w)}, \text{ mg\%}$$

trong đó:

n_1 - số ml H_2SO_4 0,1N cho vào bình hứng;

n_2 - số ml NaOH 0,1N dùng chuẩn độ axit dư;

f - hệ số điều chỉnh nồng độ H_2SO_4 ở bình hứng; $f = 1$ nếu nồng độ H_2SO_4 chính xác 0,1N;

m - khối lượng mẫu dùng để vô cơ hóa ứng với thể tích dịch mẫu lấy để định lượng nitơ (g);

w - độ ẩm của mẫu, % (m/m);

1,42 - số mg nitơ ứng với 1 ml H_2SO_4 0,1N.

1.4. KHẢ NĂNG NẢY MẦM CỦA HẠT **(GC = GERMINATIVE CAPACITY)**

1.4.1. Phương pháp nhuộm màu nhanh

1. Mục đích

Xác định phần trăm số hạt có khả năng nảy mầm bằng kỹ thuật nhuộm màu nhanh. Phương pháp được áp dụng cho mọi loại đại mạch.

2. Nguyên tắc

Hạt được cắt đôi theo chiều dọc và ngâm vào dung dịch 2,3,5-triphenyl-clorua tetranat. Sau đó phân loại hạt theo độ nhuộm màu của phôi.

3. Hoá chất

- 2,3,5-Triphenyl clorua tetranat 10 g/l. Pha hoá chất trong nước nguội và bảo quản trong bình tối màu.

4. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy mẫu.

- Dao hoặc dụng cụ để cắt hạt theo chiều dọc.
- Ống nghiệm.
- Bơm lọc.
- Máy khuếch đại

5. Tiến hành

- Lấy 100 hạt bằng dụng cụ lấy mẫu, loại bỏ những hạt lạ và những hạt vỡ. Cắt hạt theo chiều dọc thành 2 phần đều có phôi, loại bỏ một phần. Phần còn lại cho vào ống nghiệm và rót dung dịch 2,3,5-triphenyl clorua tetranat vào. Đặt ống vào bình hút chân không với áp lực < 200 mmHg trong khoảng 3 - 4 phút, rồi bơm khí tạo áp lực cho dung dịch sục đều vào khối hạt. Giữ mẫu ở 40°C trong 30 phút để nhuộm màu phôi. Gạn lấy hạt và phân loại.

- Phân loại: Rãi hạt trên giấy lọc hút ẩm và sử dụng máy khuếch đại để phân loại mầm nhuộm thành ba phần:

+ Phần 1: Những mầm nhuộm màu hoàn toàn là những mầm sống, khỏe (X)

+ Phần 2: Những mầm nhuộm màu một phần, mặc dù hỏng nhưng vẫn có thể nảy mầm để sản xuất malt, những mầm này có chồi, vảy và một chút lớp vỏ lụa ở giữa chồi và rễ bất màu nhuộm (Y).

+ Phần 3: Các mầm hoàn toàn không nhuộm màu hoặc nhuộm ít hơn các mầm của phần 2.

6. Kết quả

Khả năng nảy mầm được tính theo công thức:

$$GC = X + Y, \% \text{ (phương pháp nhuộm màu)}$$

trong đó:

X - số hạt nhuộm màu hoàn toàn;

Y - số hạt nhuộm màu một phần.

Chú ý: Khi ghi kết quả nên ghi rõ phương pháp sử dụng. Ví dụ, GC = X% (phương pháp nhuộm màu)

1.4.2. Phương pháp dùng hydroperoxyt và tách vỏ

1. Mục đích

Xác định phần trăm số hạt tốt trong mẫu đại mạch cần phân tích, sử dụng H_2O_2 để kích thích tăng trưởng. Phương pháp áp dụng cho các loại hạt đại mạch.

2. Nguyên tắc

Ngâm hạt trong H_2O_2 trong 3 ngày, sau đó đếm và loại bỏ những hạt không

phát triển cả rễ và mầm. Tách phôi khỏi vỏ trấu và lớp vỏ lụa che phủ để lộ mầm trước khi nảy mầm trong điều kiện có không khí ẩm. Đếm số hạt mọc rễ và mầm.

3. Hoá chất

- Dung dịch H_2O_2 7,5 g/l. Pha 5 ml dung dịch H_2O_2 300 g/l thành 200 ml với nước. Kiểm tra nồng độ 7,5 g/l bằng phương pháp iot, và bảo quản dung dịch trong tủ lạnh. Chuẩn bị dung dịch mỗi ngày.

4. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy mẫu.
- Cốc có mỏ 500 ml.
- Giấy lọc màu trắng.
- Bộ lọc.
- Đĩa Petri đường kính 90 mm.

5. Tiến hành

- Lấy 200 hạt, loại bỏ những hạt lạ và vỡ, đếm lại. Ngâm mẫu vào 200 ml dung dịch H_2O_2 ở $19,5 \pm 1,5^\circ C$ trong 2 ngày. Gạn bỏ dung dịch ngâm và thay 200 ml dung dịch H_2O_2 $19,5 \pm 1,5^\circ C$ mới, ngâm tiếp 1 ngày. Sau đó gạn bỏ dịch ngâm, phân loại và đếm những hạt không mọc cả rễ và mầm.

- Nếu số hạt nảy mầm ít hơn 95%, thì lấy những hạt chưa mọc rễ và mầm để tách vỏ trấu bao bọc ra khỏi phôi. Đưa đầu mũi dao dưới lớp vỏ trấu phía mầm và xoay xung quanh để cắt phần vỏ trấu phủ trên mầm. Loại bỏ lớp da nâu phủ trên mầm bằng cách lấy ngón tay chà để phần vỏ lụa lộ ra, rất cần bóc lộ mầm. Ủ những hạt đã bóc vỏ trên 2 tấm giấy lọc đã làm ẩm với 4 ml nước, đặt trong đĩa Petri đậy kín trong 1 ngày ở $19,5 \pm 1,5^\circ C$. Đếm những hạt đã mọc rễ và mầm.

6. Kết quả

Đếm số hạt hoàn toàn không mọc rễ và mầm (n), đồng thời đếm số hạt hỏng đã bị loại bỏ trong quá trình thí nghiệm kể cả những hạt chỉ mọc hoặc rễ hoặc mầm (d).

Khả năng nảy mầm GC (%) được xác định theo công thức:

$$GC = \frac{200 - (n + d)}{200} \times 100, \%$$

1.5. NĂNG LỰC NẤY MẦM (GE = GERMINATIVE ENERGY)

1. Mục đích

Xác định phần trăm hạt đại mạch có thể nảy mầm để dùng sản xuất malt. Phương pháp được dùng cho mọi loại hạt đại mạch.

1.5.1. Phương pháp Aubry

2. Nguyên tắc

Đại mạch được nảy mầm trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sau 72 giờ, loại bỏ các hạt đã nảy mầm, đếm số lượng hạt không nảy mầm và tiếp tục cho nảy mầm trong 48 giờ nữa, tiếp đó đếm số hạt không nảy mầm.

3. Hoá chất

- Nước máy hoặc nước cất.

4. Dụng cụ

- Tủ ổn nhiệt có quạt gió, đặt nhiệt độ $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối là $95 \pm 5\%$.
- Các khay nảy mầm làm bằng thép không gỉ, có gờ cao 1 cm, đục lỗ 8 – 10 mm. Khoảng cách giữa các khay ít nhất là 4 cm.
- Vải bông rộng 30 cm, dày 1 cm.
- Giấy lọc 30×40 cm.
- Bình phun nước.

5. Tiến hành

- Chuẩn bị: Cắt vải với kích thước vừa với giấy lọc, trải lên khay nảy mầm, một tấm vải bông, chuẩn bị một lượng nước bằng 4 lần trọng lượng của 2 tờ giấy lọc, lượng nước này đủ làm ẩm cho 2 bước.

- Tưới 3/4 lượng nước lên vải, rải 500 hạt lên mặt giấy lọc. Phủ một tấm giấy khác lên trên. Tưới nốt phần nước còn lại và đặt vào tủ ổn nhiệt.

- Sau 72 giờ, nhặt bỏ các hạt đã nảy mầm, giữ lại những hạt chưa nảy mầm và đếm số lượng. Đặt khay vào tủ. Sau 48 giờ nữa đếm số hạt không nảy mầm. Hạt được coi là đã nảy mầm nếu có rễ hoặc mầm có thể nhìn thấy được bằng mắt thường.

6. Kết quả

Năng lực nảy mầm (%) (phương pháp Aubry 3 ngày hoặc 5 ngày)

$$GE = \frac{500 - n}{500} \times 100, \%,$$

trong đó:

500 - số hạt thí nghiệm;

n - số hạt không nảy mầm sau 3 hoặc 5 ngày.

1.5.2. Phương pháp BRF

1. Nguyên tắc

Đại mạch được kích thích nảy mầm trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tiến hành 2 thí nghiệm sử dụng lượng nước ngâm khác nhau.

2. Dụng cụ

- Dụng cụ chia mẫu.
- Đĩa Petri đường kính 90 mm.
- Giấy lọc màu trắng.
- Buồng tối có thể điều chỉnh nhiệt độ, đặt $t^{\circ} = 19,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$.
- Pipet 5 và 10 ml.

3. Tiến hành

- Đặt giấy lọc vào đĩa Petri, thêm chính xác hoặc 4 ml hoặc 8 ml nước. Lấy 100 hạt cân phân tích và dàn đều sao cho các hạt tiếp xúc đều trên mặt giấy lọc. Nếu dùng 8 ml nước thì phải đảm bảo sao cho chỉ phần bụng hạt chạm vào giấy để nước không ngập phôi. Đậy chặt nắp đĩa để không bị mất ẩm, cho đĩa Petri vào túi nilong và dán kín miệng túi.

- Ủ mẫu ở trong phòng và loại bỏ những hạt mọc mầm sau 24, 48 và 72 giờ, như vậy tránh được sự hấp thụ ẩm dư của các hạt đã nảy mầm sớm.

4. Kết quả

Tính phần trăm số hạt nảy mầm sau mỗi ngày. Ghi kết quả để tính toán các giá trị sau:

- Năng lực nảy mầm cho mẫu dùng 4ml nước (được tính theo tỷ lệ phần trăm số hạt nảy mầm sau 72 giờ).
- Năng lực nảy mầm cho mẫu dùng 8 ml nước (được tính theo tỷ lệ phần trăm số hạt nảy mầm sau 72 giờ).

Từ số hiệu số hạt nảy mầm giữa 2 thí nghiệm dùng 4 ml và 8 ml có thể đưa ra mức độ nhạy nước của đại mạch (bảng dưới)

Hiệu số hạt nảy mầm	0	1-10	11-20	21-35	>50
Độ nhạy nước	Không	Yếu	Trung bình	Mạnh	Rất mạnh

1.5.3. Phương pháp Schönfeld

1. Nguyên tắc

Đại mạch được nảy mầm trong điều kiện phòng thí nghiệm. Đếm số hạt không nảy mầm sau 72 giờ kể từ khi bắt đầu thí nghiệm và cho nảy mầm tiếp đến 120 giờ, đếm số hạt không nảy mầm.

2. Hoá chất

- Nước máy có hàm lượng clo tự do < 0,2 mg/l hoặc nước cất.

3. Dụng cụ

- Phễu đường kính 100 mm có lắp sàng bằng thép không gỉ để có thể thoát nước mà không mất hạt.
- Nắp thủy tinh.
- Dụng cụ ngâm hạt.

4. Tiến hành

- Lấy 500 hạt đổ vào phễu đặt dưới vòi nước có nhiệt độ 18 – 20°C, điều chỉnh mức nước đủ ngập hạt. Sau 3 giờ ngâm, gạt bỏ nước và phủ giấy lọc ướt lên trên hạt. Đậy nắp.

- Sau 18 – 20 giờ nảy mầm kể từ khi bắt đầu thí nghiệm, ngâm hạt lại trong 2 giờ. Và sau 72 giờ kể từ khi bắt đầu thí nghiệm, đổ hạt ra ngoài, đếm số hạt không nảy mầm. Những hạt không nảy mầm lại cho vào phễu và ngâm nước trong 30 phút, rồi cho nảy mầm tiếp đến 120 giờ kể từ khi bắt đầu thí nghiệm, đếm số hạt không nảy mầm (n).

5. Kết quả

Ghi kết quả trung bình số hạt không nảy mầm sau 72 giờ và 120 giờ:

Năng lực nảy mầm (%) (phương pháp Schönfeld 3 ngày và 5 ngày):

$$GE = \frac{500 - n}{500} \times 100, \%$$

trong đó:

500 - số hạt trong một lô mẫu thí nghiệm;

n - số hạt không nảy mầm.

1.6. TỶ LỆ NẢY MẦM VÀ CHỈ SỐ NẢY MẦM

1. Mục đích

Tính phần trăm số hạt nảy mầm và tốc độ nảy mầm của hạt đại mạch dùng sản xuất malt tại thời điểm thí nghiệm. Phương pháp áp dụng cho mọi loại đại mạch.

2. Nguyên tắc

Tương tự phương pháp BRF (xem phần 1.5.2).

3. Hoá chất

- Nước cất, nước máy hoặc nước có hàm lượng clo ít hơn 0,2 mg/l.

4. Dụng cụ

- Đĩa Petri tiêu chuẩn có đường kính trong 85 mm, đường kính ngoài 90 mm.

- Giấy lọc.

- Buồng ủ có thể điều chỉnh nhiệt độ nóng, lạnh và thông gió để đạt nhiệt độ $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

- Pipet 5 ml.

5. Tiến hành

- Đặt hai tờ giấy lọc vào 1 hộp Petri, cho 100 hạt cần phân tích vào, dàn đều, rồi đậy kín nắp hộp để tránh mất ẩm. Cho chính xác 4 ml nước cất vào. Đậy chặt nắp để tránh bay hơi nước và cho vào túi nilon dán kín. Để mẫu trong buồng tối ở nhiệt độ $19,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ kể từ khi bắt đầu thí nghiệm lấy ra đếm những hạt đã nảy mầm và loại bỏ ngay. Sau mỗi lần lấy mẫu phải dán kín túi lại.

- Các hạt đã nảy mầm được phát hiện như sau: Mở nắp đĩa và loại bỏ những hạt đã nảy mầm. Lắc đĩa đến khi các hạt long ra khỏi giấy lọc, loại bỏ hết những hạt có dấu hiệu đã nảy mầm. Lắc đĩa lần nữa và loại bỏ nốt những hạt đã nảy mầm. Hạt được xem như đã nảy mầm khi có thể nhìn thấy mầm hoặc rễ.

Nếu không phát hiện ra mầm khi hạt nằm dọc trên giấy lọc hoặc chỉ thấy có mầm mới nhú thì coi như hạt chưa nảy mầm.

6. Kết quả

- Tính tỷ lệ phần trăm hạt đã nảy mầm sau 72 giờ theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ hạt nảy mầm} = \frac{n_{24} + n_{48} + n_{72}}{400} \times 100, \%$$

trong đó:

- n_{24}, n_{48}, n_{72} - lần lượt là tổng số hạt nảy mầm ở 4 hộp Petri đã được loại ra sau 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ.
- Thời gian nảy mầm trung bình (cho những hạt đã nảy mầm):

$$\text{MGT (Mean germinative time)} = \frac{n_{24} + 2n_{48} + 3n_{72}}{n_{24} + n_{48} + n_{72}}$$

- Chỉ số hay tốc độ nảy mầm = $\frac{10}{\text{MGT}}$.

Chương 2

PHÂN TÍCH MALT ĐẠI MẠCH

2.1. ĐỘ ẨM

1. Nguyên tắc

Theo phương pháp sấy đến trọng lượng không đổi. Mẫu được nghiền mịn, và sấy khô trong tủ sấy đã đạt nhiệt độ tiêu chuẩn. Độ ẩm được tính từ khối lượng mất đi trong quá trình sấy.

2. Dụng cụ

- Máy nghiền trục phòng thí nghiệm (đặt khoảng cách giữa 2 trục là 0,2 mm).
- Tủ sấy có thể điều chỉnh nhiệt độ, đặt nhiệt độ 105 – 106°C.
- Cốc cân làm bằng kim loại (thường bằng nhôm), đường kính khoảng 50 mm và không sâu quá 20 mm, có nắp đậy kín.
- Bình hút ẩm.
- Cân phân tích, độ chính xác tới 0,001 g.

3. Tiến hành

- Cân khoảng 20 g malt và nghiền mịn. Trộn kỹ, lấy ngay khoảng 5 g bột nghiền vào cốc cân sạch khô đã biết trước trọng lượng. Đậy nắp và cân với độ chính xác 0,001 g. Mở nắp, đặt cốc và nắp vào tủ sấy đã đạt nhiệt độ 105 – 106°C, bắt đầu tính thời gian khi tủ sấy đạt nhiệt độ trên. Sấy trong 3 giờ ± 5 phút, đậy nắp, lấy cốc cân ra làm nguội trong bình hút ẩm về nhiệt độ phòng trong 20 phút rồi cân. Sấy lại hơn 1 giờ nữa và cân lại với độ chính xác 0,001 g.

4. Kết quả

Độ ẩm (W %) của malt được tính theo công thức sau:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100, \%$$

trong đó:

m_1 - khối lượng mẫu trước khi sấy, g;

m_2 - khối lượng mẫu sau khi sấy, g.

2.2. KHỐI LƯỢNG 1000 HẠT

Xem phần 1.2.

2.3. NITƠ TỔNG SỐ

Xem phần 1.3.

2.4. ĐỘ HOÀ TAN

Khái niệm

- Độ hòa tan: Là lượng chất khô trong malt có thể hoà tan vào dung dịch ở điều kiện phòng thí nghiệm và biểu thị theo tỷ lệ phần trăm so với trọng lượng của malt.

- Hiệu suất hòa tan: Là lượng chất khô của malt hoà tan vào dung dịch trong quá trình sản xuất và cũng biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm so với trọng lượng malt. Hiệu suất hòa tan thường bé hơn độ hòa tan khoảng 1 - 3%.

Phân tích này cũng được dùng để xác định tốc độ đường hoá, mùi, tốc độ lọc, pH, màu, độ nhớt của dịch đường, hàm lượng nitơ hoà tan và nitơ tự do.

1. Nguyên tắc

Hàm lượng chất hoà tan của malt được xác định từ hàm lượng chất hòa tan của dịch đường sau khi đường hoá và lọc bã malt. Hàm lượng chất hòa tan của dịch đường được tính từ tỷ trọng của dịch đường đo ở 20°C dựa trên các bảng phụ lục 1.

Tỷ trọng là tỷ lệ giữa khối lượng của một thể tích chất lỏng ở 20°C với khối lượng của cùng một thể tích nước ở nhiệt độ đó.

Phương pháp này có thể áp dụng cho tất cả các loại malt có đơn vị màu dưới 15° EBC.

2. Hoá chất

- Dung dịch I₂ 0,02 N: Hòa 1,27 g I₂ tinh khiết và 2,5 g KIO₃ hoặc KI trong nước và pha tới 500 ml. Bảo quản trong bình nâu và để nơi tối, không quá 1 tháng.

3. Dụng cụ

- Máy nghiền trục phòng thí nghiệm (đặt khoảng cách giữa 2 trục là 0,2 mm).
- Cân phân tích với độ chính xác 0,1 g.

- Cốc có mỏ 500 ml.
- Bình cách thủy điều nhiệt.
- Đũa thủy tinh.
- Bình tam giác 500 ml.
- Phễu đường kính 200 mm.
- Giấy lọc.
- Bình cân tỷ trọng.
- Đĩa sứ.

4. Tiến hành

- Cân khoảng 55 g malt và nghiền, trộn đều, lấy ra một phần nhỏ để xác định độ ẩm (khoảng 3 - 5 g).

- Đặt nhiệt độ bình điều nhiệt 45°C.

- Cân chính xác 50 g malt đã nghiền cho vào cốc đã biết trọng lượng, rồi rót vào cốc 200 ml nước cất 46°C, dùng đũa thủy tinh khuấy cho khỏi vón cục, tránh tạo bọt. Giữ cốc ở 45°C trong 30 phút, khuấy liên tục. Tăng nhiệt độ lên 70°C với tốc độ 1°C/ 1 phút. Khi nhiệt độ của cốc đạt 70°C rót thêm vào đó 100 ml nước cất 70°C. Cứ 5 phút lấy mẫu 1 lần để thử dịch đường hóa bằng cách hoà một giọt dung dịch I₂ 0,02N với mẫu đến khi hỗn hợp có màu vàng rơm (không làm mất màu dung dịch I₂) coi như đường hóa kết thúc. Thời gian từ khi hỗn hợp trong cốc đạt 70°C đến khi không làm mất màu dung dịch iot gọi là thời gian đường hóa. Nếu quá trình đường hoá không kết thúc sau 1 giờ thí nghiệm thì ngừng lại, hoặc làm lại hoặc thay đổi lượng malt thí nghiệm.

- Tiếp tục giữ nhiệt độ 70°C trong 1 giờ (tính từ khi đạt 70°C), sau đó lấy cốc ra và làm nguội đến nhiệt độ phòng trong khoảng 10 - 15 phút. Rửa đũa khuấy bằng một chút nước cất. Lau khô bên ngoài cốc và đem cân lại sao cho trọng lượng trong cốc đạt 450 g bằng cách bổ sung thêm nước cất (chú ý: không kể trọng lượng cốc).

- Khuấy đều rồi đổ toàn bộ lượng dịch lọc vào phễu lọc. Lọc lại 100 ml dịch lọc ban đầu rồi mới bắt đầu tính thời gian lọc. Lấy một phần dịch lọc để xác định độ màu theo phương pháp ở phần 2.5. Quá trình lọc coi như kết thúc khi bề mặt bã trên phễu khô hoặc quá trình lọc chậm (kéo dài quá 2 giờ).

- Ghi nhận xét “vận tốc lọc bình thường” nếu lọc trong vòng 1 giờ. Nếu hơn 1 giờ, ghi là vận tốc lọc “chậm”. Nhận xét mùi: “bình thường” hoặc “không thơm”, hoặc “có mùi lạ”.

- Xác định tỷ trọng dịch đường:

Phương pháp cân bình tỷ trọng:

+ Chuẩn bị:

* Bình tỷ trọng sạch, khô, ghi trọng lượng bình (kể cả nút) m_0 (kết quả đọc tới 5 số sau dấu thập phân).

* Nước cất, dịch cần xác định tỷ trọng được làm lạnh đến 20°C.

+ Mẫu trắng: Tráng bình tỷ trọng bằng nước cất đã làm lạnh 20°C. Đổ nước cất đến vạch định mức của bình, đậy nút, rồi đặt bình vào bình ổn nhiệt 20°C trong 30 phút. Chú ý: luôn để mực nước trong bình ổn nhiệt vượt quá vạch định mức của bình tỷ trọng. Sau 30 phút lấy bình ra, lau khô bên ngoài, để yên trong 5 phút, lau khô bên ngoài bình và cân, ghi kết quả m_1 (kết quả đọc tới 5 số sau dấu thập phân).

+ Mẫu thực: Đổ hết nước ra khỏi bình tỷ trọng, tráng bình vài lần bằng dịch phân tích đã làm lạnh tới 20°C. Đổ dịch phân tích đến vạch định mức của bình, đậy nút, rồi đặt bình vào bình ổn nhiệt 20°C trong 30 phút. Chú ý: luôn để mực nước trong bình ổn nhiệt vượt quá vạch định mức của bình tỷ trọng. Sau 30 phút lấy ra, lau khô bên ngoài, để yên trong 5 phút, lau khô bên ngoài bình và cân, ghi kết quả m_2 (kết quả đọc tới 5 số sau dấu thập phân).

Tỷ trọng của dịch lọc được tính theo công thức sau:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (\text{g/g})$$

Làm 2 - 3 mẫu lặp, nếu 2 lần cho giá trị tỷ trọng khác nhau lớn hơn 2 đơn vị của thập phân thứ tư thì phải làm lại thí nghiệm.

5. Kết quả

- Hàm lượng chất hoà tan của dịch đường được xác định từ tỷ trọng bằng phụ lục 1 *Bảng tra hàm lượng chất khô hoà tan theo tỷ trọng của dịch*- Goldiner và Klemann.

- Hàm lượng chất hoà tan của malt tính bằng công thức sau:

$$E_1 = \frac{e(W + 800)}{100 - e}, \quad \%$$

$$E_2 = \frac{E_1 \cdot 100}{100 - W}, \quad \%$$

trong đó:

E_1 - hàm lượng chất hoà tan của malt, %, (theo khối lượng);

E_2 - hàm lượng chất hoà tan của malt khô tuyệt đối, % (theo khối lượng);

e - hàm lượng chất hoà tan của dịch đường, % (theo khối lượng);

W - độ ẩm của malt, %, (theo khối lượng);

800 - lượng nước cất dùng để đường hóa 100 g malt, ml.

Kết quả biểu diễn theo % (theo khối lượng) lấy đến một số thập phân.

2.5. ĐỘ MÀU

2.5.1. Phương pháp quang phổ

1. Mục đích

Xác định màu của dịch đường chế biến từ malt cần phân tích trong phòng thí nghiệm bằng phương pháp quang phổ. Phương pháp này được sử dụng đối chứng với phương pháp so màu bằng mắt thường.

Áp dụng cho các mẫu dịch đường đã lọc trong. Phương pháp đã được thử nghiệm với khoảng màu từ 3,6 tới 25,3 đơn vị EBC. Các mẫu dịch đường phải làm sáng màu trước khi phân tích.

2. Nguyên tắc

Mẫu malt được nghiền và đường hoá trong phòng thí nghiệm theo một trong những phương pháp xác định độ hoà tan của malt (xem phần 2.4). Lọc và thu dịch. Dịch lọc được làm trong bằng cách lọc màng 0,45 µm cho tới khi màu dịch sáng. Đo độ hấp thụ của dịch đường ở 430 nm và nhân với hệ số thích hợp.

3. Hoá chất

- Nước cất.

4. Dụng cụ

- Máy nghiền malt.
- Các dụng cụ đường hoá.
- Phễu lọc, giấy lọc.
- Thiết bị lọc màng.
- Máy quang phổ với độ chính xác ít nhất là $\pm 0,5$ nm và các cuvet.

5. Tiến hành

- Chuẩn bị dịch đường như các phương pháp xác định độ hoà tan của malt (xem phần 2.4). Khuấy đều dịch nấu và đổ ngay vào phễu lọc, lọc lại 100 ml dịch lọc đầu, lấy khoảng 50 ml dịch lọc và cho lọc ngay bằng bộ lọc màng kích thước 0,45 µm, bỏ đi 20 ml dịch lọc đầu, thu lấy 30 ml.

- Kiểm tra độ trong của dịch bằng cách xác định độ hấp thụ của dịch ở 700 nm. Dịch đường được gọi là trong nếu độ hấp thụ của nó ở 700 nm so với nước nhỏ hơn 0,02. Nếu không thì phải lọc lại mẫu bằng bộ lọc màng 0,45 μm . Nếu thay màng mới thì phải bỏ đi 20 ml dịch lọc đầu. Nếu dịch đường không đạt yêu cầu trên thì không thể xác định màu bằng phương pháp này.

- Chuẩn bị đo quang phổ: Bật máy quang phổ, đặt bước sóng 430 nm. Chính độ hấp thụ của máy bằng nước cất về 0.000 sau đó mới đo mẫu.

- Xác định độ hấp thụ chỉ trong vòng 30 phút sau khi chuẩn bị mẫu. Nếu cần thì phải pha loãng sao cho độ hấp thụ tại 430 nm nằm trong giới hạn của máy quang phổ.

6. Kết quả

Tính độ màu theo công thức:

$$C = 25 \cdot A_{430} \cdot F$$

trong đó:

C - độ màu tính theo đơn vị EBC;

A_{430} - độ hấp thụ ở 430 nm;

25 - hệ số nhân;

F - hệ số pha loãng.

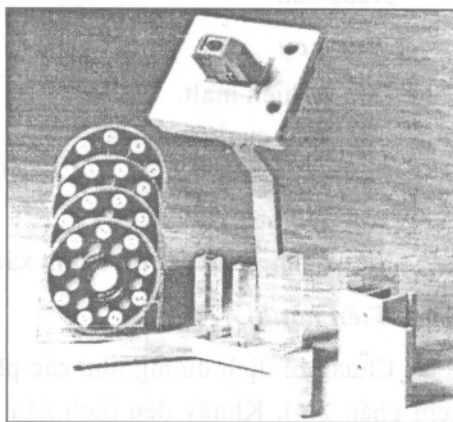
Chú ý: biểu thị kết quả tới 2 số có nghĩa.

2.5.2. Phương pháp so màu bằng mắt thường

EBC đã thiết lập một dãy màu chuẩn để so màu sử dụng các kính màu có cường độ nằm trong khoảng 2 – 27 đơn vị màu EBC. Tương ứng điểm cuối của thang đo là dịch đường có màu nhạt hơi vàng; ở điểm đầu của thang đo là dịch đường màu sẫm hơi đỏ và caramen. Nếu khó so sánh màu thì dùng khoảng so màu thích hợp để so màu chính xác.

1. Mục đích

Xác định độ màu dịch malt bằng



Hình 2.1: Thiết bị so màu.

cách so sánh màu. Phương pháp được áp dụng cho mọi loại malt.

2. Nguyên tắc

Chuẩn bị dịch đường từ malt cần phân tích theo một trong số những phương pháp đã miêu tả ở trên. Ánh sáng màu tiêu chuẩn, độ truyền quang qua dịch đường thí nghiệm tương ứng với một trong số kính màu chuẩn.

3. Hoá chất

- Bột trợ lọc Kieselguhr.
- Dichromat kali $K_2Cr_2O_7$.
- Nitroprussitnatri $Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$.

4. Dụng cụ

- Máy so màu thích hợp, các đĩa màu chuẩn, các buồng kính quang học.
- Phễu lọc, giấy lọc.
- Máy ly tâm siêu tốc.
- Bộ lọc màng 0,2 μm .

5. Tiến hành

- Chuẩn bị dịch đường: Chuẩn bị dịch đường theo các phương pháp xác định độ hoà tan của malt (xem phần 2.4), chú ý quá trình lọc dịch tránh bị bay hơi và ánh sáng mạnh.

- Nếu dịch đường không trong thì phải lọc bằng bột trợ lọc với hàm lượng 50 g/l. Kiểm tra độ trong của dịch đường ở 700 nm có độ hấp thụ ít hơn 0,02 so với nước cất. Lắc đều và lọc dịch đường, có thể để yên 5 phút. Đổ toàn bộ lượng dịch vào bộ lọc, bỏ phần lọc đầu. Nếu có kết tủa mịn thì lọc lại qua bộ lọc màng 0,2 μm , bỏ phần nước lọc đầu. Tiếp đó, dịch đường được ly tâm với vận tốc 5000 vòng/phút trong ống ly tâm đáy nắp kín, không gia nhiệt nếu không sẽ ảnh hưởng tới màu dịch, làm sẫm màu.

- Cách đo màu: Các mẫu có độ màu nhỏ hơn 10 đơn vị EBC thì có thể dùng các cuvet 25mm hoặc 40 mm, với mẫu có độ màu trong khoảng 10 - 27 đơn vị EBC thì dùng cuvet 40 mm. Đối với dịch màu sẫm hơn có thể chọn cuvet thích hợp hoặc pha loãng với nước để có thể đọc kết quả trong khoảng 20 tới 27 đơn vị.

- Kiểm tra màu bằng dung dịch Harton. Pha 0,1 g $K_2Cr_2O_7$ và 3,5 g $Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$ với nước cất và pha thành 1 lít. Phải đảm bảo các dụng

cụ thủy tinh sạch không dính chất hữu cơ (trắng bằng axit chromic). Bảo quản dung dịch trong 24 h trong phòng tối trước khi sử dụng, có thể sử dụng trong vòng 1 tháng. Đo độ màu ở cuvet 40 mm, giá trị của dịch chuẩn là 15 đơn vị EBC (giá trị trung bình lấy từ 128 người đọc là 14,9). Nên làm thí nghiệm hàng tuần.

6. Kết quả

- Kết quả tính toán từ 450 g dịch malt.
- Giá trị độ màu phải quy chuẩn về dịch đường không pha loãng đo trong cuvet 25 mm tính theo công thức:

$$\text{Màu (25 mm)} = \frac{\text{màu (450 g)} \times 25 \times \text{hệ số pha loãng}}{\text{chiều dài ống dẫn (mm)}}$$

2.6. NITƠ HÒA TAN

1. Mục đích

Xác định hàm lượng nitơ tổng số trong dịch đường chế biến từ malt cần phân tích, bằng phương pháp Kjeldahl. Phương pháp có thể áp dụng cho các loại dịch đường và mọi loại malt.

2. Nguyên tắc

Xác định các hợp chất nitơ trong dịch đường hoá được thực hiện như xác định lượng nitơ tổng số (xem phần 1.3) ngoại trừ cách chuẩn bị mẫu và tính kết quả.

3. Tiến hành

- Đường hoá malt theo phương pháp xác định độ hoà tan (xem phần 2.4).
- Lấy 20 ml dịch đường hoá từ malt cần phân tích cho vào bình Kjeldahl dung tích 500 ml. Thêm 2 – 3 ml axit sulfuric đậm đặc. Nếu cần, thêm chất chống tạo bọt để tránh trào bọt. Làm bốc hơi từ từ cho đến gần như khô bằng cách đốt thành than. Tiếp theo thực hiện như phần 1.3.

4. Kết quả

Có thể tính các kết quả sau: hàm lượng nitơ hoà tan trong 1 lít dịch đường (N_V) hoặc tính theo phần trăm malt khô (N_S), hoặc theo hàm lượng nitơ tổng số (Chỉ số Kolbach) (N_K)

- Hàm lượng nitơ hoà tan có trong 1 lít dịch đường:

$$N_V = \frac{n \times 14}{V} \times 100, \text{ mg/l}$$

trong đó:

N_V - hàm lượng nitơ hoà tan, mg/l;

n - số ml axit chuẩn dùng để trung hoà dung dịch amoni sau khi đã trừ mẫu trắng;

V - thể tích mẫu phân tích, ml.

- Hàm lượng nitơ hoà tan tính theo phần trăm malt khô:

$$N_S = \frac{N_V \times E_1}{10000 \times e}, \%$$

trong đó:

N_S - hàm lượng nitơ hoà tan tính theo malt khô, % (theo khối lượng);

N_V - hàm lượng nitơ hoà tan tính theo mg/l;

E_1 - hàm lượng chất hoà tan tính theo malt khô, % (theo khối lượng);

e - hàm lượng chất hoà tan có trong dịch đường tính theo g/100 ml dịch đường;

10 000 - hệ số chuyển đổi để tính kết quả theo phần trăm.

- Hàm lượng nitơ hoà tan tính theo phần trăm nitơ tổng số (chỉ số Kolbach):

$$N_K = \frac{N_S \times 100}{N}, \%$$

trong đó:

N_K - hàm lượng nitơ hoà tan tính theo % nitơ tổng số, % (theo khối lượng);

N - hàm lượng nitơ tổng số tính theo malt khô, % (theo khối lượng).

2.7. NĂNG LỰC ĐƯỜNG HÓA

1. Mục đích

Xác định hoạt độ kết hợp α và β -amilaza của malt trong các điều kiện tiêu chuẩn. Áp dụng cho tất cả các loại malt.

2. Nguyên tắc

Các enzym trong malt được chiết với nước 40°C và dùng để thủy phân dung dịch tinh bột chuẩn. Lượng đường khử tạo thành nhờ hoạt động của enzym amilaza được tính theo phương pháp iot. Kết quả được tính bằng số gam maltoza tạo thành từ 100 g malt ở điều kiện chuẩn.

3. Hóa chất

- Nước cất

- Dung dịch đệm axetat, $\text{pH} = 4,3 \pm 0,1$. Cân 30 g axit axetic, hoà tan với nước và định mức tới 1 lít. Cân 34 g natri axetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), hoà tan với nước và định mức tới 500 ml. Trộn 2 dung dịch này đến khi đạt được $\text{pH} = 4,3$ ở 25°C .

- Dung dịch tinh bột 20 g/l. Cân một lượng tinh bột tan tương đương với 10 g chất khô và khuấy với một chút nước lạnh đến dạng huyền phù. Thêm vào đó 400 ml nước sôi, khuấy và giữ hỗn hợp luôn luôn sôi. Rửa dũa khuấy bằng một chút nước lạnh và cho vào dung dịch tinh bột, đun sôi trong 5 phút. Đặt cốc và nước lạnh và khuấy hỗn hợp để làm nguội, tránh để tạo màng. Định mức đến 500 ml. Pha và dùng trong ngày.

- Dung dịch iot 0,1 N. Cân 12,7 g iot và 20 g KI, hoà tan trong 200 ml nước và định mức tới 1 lít.

- Dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N. Cân 24,82 g natri thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) và 7,6 g disodium tetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), hoà tan trong 300 – 400 ml nước và định mức tới 1 lít, hoặc dùng ống chuẩn.

- Natri hydroxit (NaOH) 1N.

- Dung dịch H_2SO_4 0,5N.

- Dung dịch thymolphthalein 5g/l. Cân 0,5 g thymolftalein và hoà tan trong 100 ml ethanol 96% (v/v).

4. Dụng cụ

- Máy nghiền malt.

- Cân với độ chính xác $\pm 0,05$ g.

- Cốc thủy tinh có mỏ dùng để nấu, dũa khuấy.

- Bếp cách thủy điều nhiệt.

- Phễu lọc, đường kính 200 mm, giấy lọc.

- Giấy lọc gấp nếp, đường kính 320 mm.

- Bình tam giác 250 ml, 500 ml có vạch định mức.

- Bình định mức 250 ml.

- Pipet 5 ml và 50 ml, buret 25 ml.

5. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Cân mẫu: nếu malt vàng nhạt 21 g; malt màu sẫm 41 g hoặc malt enzym 11 g, đem nghiền mịn. Cân chính xác 20,0 g malt vàng nhạt; 40,0 g malt màu sẫm; hoặc 10,0 g malt enzym cho vào cốc nấu.

- Thu dịch chiết: Đun bếp cách thủy tới nhiệt độ 40°C. Rót 480 ml nước lạnh vào mẫu malt. Khuấy đều tránh vón cục. Đặt cốc vào bếp cách thủy 40°C khuấy liên tục trong vòng 1 giờ ± 2 phút. Làm nguội dịch chiết tới nhiệt độ phòng. Rửa đĩa khuấy bằng một ít nước. Lau khô phía ngoài cốc, điều chỉnh khối lượng cốc tới 520; 540 hoặc 510 g ± 0,2g tương ứng với lượng malt nêu trên.

- Lọc: Khuấy thật đều dịch chiết, đổ ngay toàn bộ hỗn hợp vào phễu lọc, loại bỏ 200 ml dịch lọc đầu, lấy 50 ml dịch lọc sau để phân tích.

- Thủy phân dung dịch tinh bột:

+ Mẫu thí nghiệm: Dùng pipet lấy 100 ml dung dịch tinh bột vào bình định mức 250 ml, thêm vào 6,5 ml dung dịch đệm axetat, đặt vào bình cách thủy 20°C, để yên 20 phút. Cho tiếp 6,5 ml dịch chiết malt đã lọc vào hỗn hợp trên, lắc đều rồi để tiếp ở 20°C đúng 30 phút tính từ lúc bắt đầu thêm dịch chiết malt. Sau đó cho 5 ml NaOH để ngừng hoạt động của enzym. Thêm nước tới gần định mức và lắc đều. Kiểm tra độ kiềm bằng cách nhỏ một giọt thymolphthalein, màu của dung dịch phải là màu xanh.

+ Mẫu kiểm chứng: Lấy 100 ml dung dịch tinh bột vào bình 250 ml, thêm 3 ml dung dịch NaOH, lắc kỹ. Thêm 6,5 ml dịch chiết malt rồi thêm nước tới gần bình và lắc đều.

- Xác định đường khử theo phương pháp iot: hút 50 ml dung dịch trên vào bình tam giác 250 ml, thêm 25 ml dung dịch iot và 3 ml dung dịch NaOH và lắc đều. Đậy nút bình để tránh tổn thất iot và để yên trong 15 phút. Thêm 4,5 ml H₂SO₄ và chuẩn phần iot dư không phản ứng bằng dung dịch Na₂S₂O₃ tới khi mất màu xanh.

Lượng iot đã phản ứng nên trong khoảng 6 - 12 ml, nếu ngoài khoảng giới hạn này thì phải làm lại thí nghiệm với lượng malt nhiều hoặc ít hơn.

6. Kết quả

- Tính lượng maltoza tạo thành theo công thức:

$$DP_1 = F(V_B - V_T) ;$$

$$DP_2 = \frac{DP_1 \cdot 100}{100 - W} ;$$

trong đó:

DP_1 - hoạt lực diastaza của mẫu, tính theo đơn vị WK (Windish-Kolbach);

DP_2 - hoạt lực diastaza của malt khô, WK;

V_B - thể tích $Na_2S_2O_3$ dùng chuẩn độ lượng iot dư trong mẫu trắng, ml;

V_T - thể tích $Na_2S_2O_3$ dùng chuẩn độ lượng iot dư trong mẫu thực, ml;

F - hệ số chuyển đổi để tính kết quả theo 100 g malt dùng chiết enzym.

Lượng mẫu lấy để phân tích là 10g, 20g và 40g. Vì cứ 1 ml $Na_2S_2O_3$ 0,1N tương ứng với 0,0171 g maltoza nên ta có $F_{10g} = 68,4$; $F_{20g} = 34,2$; $F_{40g} = 17,1$;

W - độ ẩm của malt (% , m/m).

2.8. HOẠT LỰC ENZYM α -AMILAZA

1. Mục đích

Xác định hoạt lực α -amilaza của malt khi dextrin hóa dung dịch tinh bột chuẩn cùng với β -amilaza. Phương pháp áp dụng cho mọi loại malt.

2. Nguyên tắc

α -amilaza của malt được chiết bằng dung dịch NaCl 5 g/l ở 20°C và được dùng để thủy phân dextrin. Lượng α -amilaza thường được xác định theo tiêu chuẩn màu sắc tương ứng với nồng độ tinh bột còn lại trong dung dịch tại thời điểm kết thúc quá trình dextrin hóa. Kết quả tính ra lượng α -amilaza sẽ dextrin hoá tinh bột hoà tan, với sự có mặt của β -amilaza, với tốc độ 1g/1h tại 20°C.

3. Hóa chất

- β -amilaza. Bột β -amilaza tinh khiết không có α -amilaza, có hoạt lực diastaza chuẩn 2000°L (các enzym Sturge). Bảo quản bột β -amilaza trong tủ lạnh, đựng trong lọ kín. Trước khi dùng nên để lọ ấm đến nhiệt độ phòng để tránh tụ ẩm cho enzym.

- Tinh bột tan đặc hiệu dùng cho xác định diastaza và α -amilaza.

- Dung dịch đệm axetat pH = 4,7: Hòa tan 120 ml axit axetic đóng băng với nước, định mức tới 500 ml. Hòa tan 164 g axetat natri khan trong nước, định mức tới 500 ml. Trộn 2 dung dịch này tới khi đạt pH = 4,7 ở 25°C

- Dung dịch dextrin 20g/l: cân tinh bột tương ứng $10 \pm 0,005$ g chất khô, khuấy với 100 ml nước lạnh thành dạng sền sệt. Đổ từ từ hỗn hợp này vào 300 ml nước sôi, đun sôi và khuấy liên tục trong 1 - 2 phút. Sau đó làm nguội dịch tới 20°C, khuấy liên tục. Hòa tan 250 mg β -amilaza với một chút nước. Bổ sung dịch enzyme và 25 ml dung dịch đệm axetat vào dung dịch tinh bột. Định mức tới 500 ml bằng nước cất đã bão hòa toluen. Bảo quản dung dịch ở 20°C trong vòng 18 giờ tới 72 giờ trước khi sử dụng.

- Dung dịch NaCl 5 g/l.

- Dung dịch iot gốc: cân 5,5 g iot và 11 g KIO_3 , hòa vào nước và định mức tới 250 ml. Bảo quản dung dịch trong lọ màu nâu, dùng trong tháng.

- Dung dịch iot pha loãng: cân 20 g KIO_3 , hòa vào nước, thêm 2,0 ml dung dịch iot gốc và định mức tới 500 ml.

4. Dụng cụ

- Máy nghiền trục phòng thí nghiệm.

- Cân, độ chính xác tới 0,01 g.

- Bình ổn nhiệt, đặt $20 \pm 0,05^\circ\text{C}$.

- Phễu, đường kính 200 mm, giấy lọc gấp nếp.

- Đĩa màu đặc dụng. Các đĩa đều phải đạt tiêu chuẩn màu tương ứng với nồng độ tinh bột còn lại trong dung dịch ở thời điểm kết thúc quá trình dextrin hóa.

- Máy so màu, dùng ghi và so sánh đĩa màu tiêu chuẩn với thành phần khoang màu.

- Các tế bào quang học, ống vuông (ống dẫn dài 13,0 mm, hoặc ống dẫn dài 13,5 mm). Chú ý: các đĩa màu α -amilaza chỉ cho giá trị đúng khi sử dụng đúng tế bào quang học.

- Nắp kính quan sát hoặc đồng hồ tính giây.

- Các dụng cụ thủy tinh: bình tam giác 50 và 1000 ml; ống nghiệm 25 × 150 mm; pipet 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml.

5. Tiến hành

- Cân khoảng 26 g malt và nghiền mịn. Lấy nhanh 25 g malt đã nghiền vào bình tam giác 1000 ml, rót 500 ml NaCl vào và lắc mạnh, rồi đặt vào bình cách thủy 20°C, giữ trong 2,5 giờ, cứ 20 phút lắc 1 lần. Lắc mạnh bình để trộn đều hỗn hợp, rồi lọc ngay. Lọc lại 50 ml dịch lọc đầu.

- Pha loãng 20 ml dịch lọc với dung dịch NaCl thành 100 ml. Điều chỉnh nhiệt độ dung dịch dextrin, dịch chiết malt đã pha loãng, và các ống nghiệm có chứa 10 ml dung dịch iot loãng tới $20 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ trong bình ổn nhiệt.

- Lấy 10 ml dịch chiết malt đã pha loãng vào bình tam giác 50 ml hoặc ống nghiệm, đặt vào bình ổn nhiệt $20 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút. Thêm 20 ml dung dịch dextrin, ghi thời điểm bắt đầu. Trộn đều hỗn hợp bằng cách thổi pipet, để phòng nhiễm nước bọt.

- Sau 10 phút phản ứng, lấy 2 ml hỗn hợp thủy phân vào ống nghiệm đã có sẵn 10 ml dung dịch iot loãng đã chỉnh nhiệt độ, trộn đều và cho ngay vào buồng kính quang học. So sánh với đĩa màu α -amilaza trong máy so màu.

- Lấy 2 ml hỗn hợp phản ứng trên vào ống nghiệm đã có sẵn dung dịch iot loãng, trộn đều và so màu tới khi nhìn thấy rõ chuẩn màu α -amilaza. Sử dụng cùng một buồng kính quang học để so màu và chỉ rửa buồng kính khi đọc mẫu khác.

- Để kết quả chính xác, thời gian dextrin hoá nên trong khoảng 15 - 25 phút. Nếu thời gian ngắn hơn thì lấy 5 ml dịch chiết malt loãng và 5 ml dung dịch clorua natri thay cho 10 ml dịch để dextrin hoá. Nếu thời gian lâu hơn thì pha loãng dịch chiết enzym ban đầu với tỷ lệ khác.

6. Kết quả

Tính hoạt độ α -amilaza theo đơn vị dextrin hoá dùng công thức:

$$\text{DU}_1 = \frac{24}{m \times T} ;$$
$$\text{DU}_2 = \frac{\text{DU}_1 \cdot 100}{100 - W}$$

trong đó:

DU_1 - hoạt độ α -amilaza của mẫu tính theo đơn vị dextrin - *DU (dextrinizing units)*;

DU_2 - hoạt độ α -amilaza của malt khô, tính theo đơn vị dextrin *DU*;

24 - khối lượng tinh bột (0,4 g) nhân với thời gian (60 phút);

m - khối lượng malt trong dịch chiết đã pha loãng, g;

T - thời gian dextrin hoá, phút;

W - hàm lượng ẩm của malt, % (m/m).

Chương 3

PHÂN TÍCH NGUYÊN LIỆU CHỨA TINH BỘT

3.1. ĐỘ ẨM

1. Nguyên tắc

Thông thường độ ẩm trong nguyên liệu được xác định theo phương pháp sấy nhưng chỉ cho kết quả gần đúng. Vì khi sấy ở nhiệt độ cao, một số chất hữu cơ của nguyên liệu sẽ bị phân huỷ và bay hơi cùng với nước, khi đó lại có một lượng nhỏ nước liên kết không bay hơi hết. Để hạn chế sai số người ta chỉ sấy ở 100 - 105°C và kéo dài 3 - 4 giờ. Đôi khi muốn rút ngắn thời gian sấy người ta thực hiện ở 130°C trong 40 phút.

2. Dụng cụ

- Tủ sấy điều chỉnh nhiệt độ 105 - 150°C.
- Cân phân tích có độ chính xác 0,001 g.
- Hộp cân.
- Bình hút ẩm.

3. Tiến hành

- Cân khoảng 5 gam bột đã nghiền nhỏ trong hộp nhôm đã biết trọng lượng. Mở nắp và đặt hộp nhôm vào tủ sấy có nhiệt độ 105°C, sau 3 giờ sấy, lấy hộp ra, đậy nắp và làm nguội trong bình hút ẩm, sau đó cân lại, ghi số cân. Sấy tiếp 30 - 60 phút. Sau đó đem làm nguội và cân lại lần 2. Nếu sai số giữa hai lần không quá 0,001 gam thì xem như quá trình tách nước kết thúc.

4. Kết quả

Độ ẩm của nguyên liệu (%) được tính theo công thức:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100, \% (m/m)$$

trong đó:

m_1 - khối lượng mẫu trước khi sấy, g;

m_2 - khối lượng mẫu sau khi sấy, g.

3.2. DUNG TRỌNG

1. Mục đích

Dung trọng được sử dụng để tính toán thể tích kho chứa và thể tích các thiết bị vận chuyển.

Dung trọng là trọng lượng của 1 lít nguyên liệu (hạt hoặc bột). Dung trọng liên quan tới cách sắp xếp của nguyên liệu khi đổ, vì vậy dung trọng phụ thuộc vào hình dáng, kích thước và trạng thái bên ngoài của khối hạt.

- Hạt có hình dáng và kích thước càng gọn (ngắn, tròn) thì dung trọng càng lớn.

- Bề mặt hạt càng xù xì, có râu thì dung trọng càng nhỏ.

Khối hạt chứa nhiều hạt lép, hạt xanh thì dung trọng càng thấp, hạt mất vỏ có dung trọng càng lớn. Do vậy dung trọng cũng có thể được sử dụng để đánh giá chất lượng khối hạt.

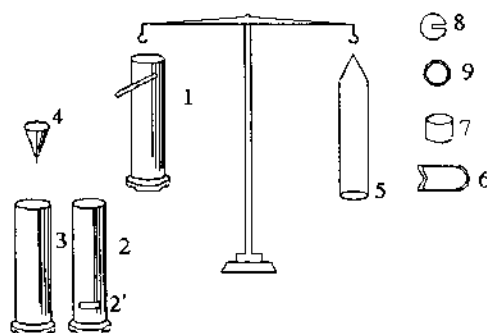
Dung trọng còn phụ thuộc vào cách đổ hạt khi xác định, chẳng hạn nếu xóc mạnh, khoảng cách giữa các khối hạt nhỏ, dung trọng xác định được sẽ lớn hơn. Vì vậy cần phải thống nhất phương pháp cũng như dụng cụ xác định dung trọng. Bình litpurka là dụng cụ được sử dụng để xác định dung trọng.

2. Dụng cụ

Dụng cụ để xác định dung trọng là lít purka (hình 3.1).

Hình 3.1: Lít purka:

1. bình ao;
2. bình đổ hạt trước khi đưa vào bình ao;
3. bình phụ chứa hạt;
4. phễu;
5. đĩa đặt quả cân;
6. dao cắt;
7. miếng đệm;
8. quả cân;
9. nắp bình sao.



3. Tiến hành

- Sau khi lấy mẫu phân tích, đổ khối hạt vào bình phụ (3) thật đầy (cao hơn miệng 1 cm), không được xóc bình và nén khối hạt.

- Sau đó cho khối hạt chảy từ bình (3) sang bình (2) qua phễu (4). Trong lúc cửa của bình (2) được mở để không khí thoát ra, nhưng hạt không chảy ra.

- Sau đó dùng dao (6) gạt cẩn thận và thật ngang sát mép bình (2) cho các hạt thừa rơi ra phía ngoài bình. Sau đó khối hạt lại được chuyển toàn bộ từ bình (2) sang bình ao (1).

- Đậy nắp bình ao, rồi treo vào móc và cân chính xác đến 0,5 g. Làm 2 mẫu song song để lấy kết quả. Kết quả giữa 2 lần xác định không được khác nhau quá 5 g. Nếu quá phải làm lại thí nghiệm.

4. Kết quả

Dung trọng của khối hạt ($G, g/l$) được xác định theo công thức sau:

$$G = P_2 - P_1$$

trong đó:

P_1 - trọng lượng của bình ao và nắp trước khi cho hạt vào, g;

P_2 - trọng lượng của bình ao, nắp và hạt, g.

Ghi chú: để xác định dung trọng của hạt cần ít nhất 2 kg mẫu.

3.3. TRỌNG LƯỢNG RIÊNG

1. Mục đích

Trọng lượng riêng của nguyên liệu là trọng lượng của một đơn vị thể tích. Với nguyên liệu là hạt thì trọng lượng riêng đặc trưng cho độ chắc, độ mẩy và độ chín của hạt.

Trọng lượng riêng phụ thuộc thành phần hoá học của hạt. Hàm lượng tinh bột trong hạt càng cao thì trọng lượng riêng của thóc càng lớn. Hàm lượng chất béo và nước của hạt càng cao thì trọng lượng riêng của hạt càng thấp.

Trọng lượng riêng từng phần giải phẫu của hạt cũng khác nhau. Phần nội nhũ có trọng lượng riêng lớn hơn cả, trọng lượng riêng của phôi thấp và vỏ có trọng lượng riêng thấp nhất. Do đó, hạt lép, xanh, nhỏ... có tỷ lệ phôi và vỏ lớn thì có trọng lượng riêng thấp hơn so với hạt chắc, mẩy và chín hoàn toàn.

3. Hoá chất

- Toluen (hoặc nước cất).

4. Dụng cụ

- Cân kỹ thuật.
- Ống đong dung tích 100 ml.

5. Tiến hành

- Lấy một ống đong sạch và khô. Đổ vào ống đong đúng 100 ml toluen (hoặc nước). Cân m g hạt cần phân tích cho vào ống đong. Đọc thể tích toluen (nước) dâng lên trong ống đong.

6. Kết quả

Trọng lượng riêng của hạt tính theo công thức:

$$d = \frac{m}{V}, \text{ g/ml}$$

trong đó:

- d - trọng lượng riêng của hạt, g/ml;
- m - trọng lượng mẫu hạt, g;
- V - thể tích toluen (nước) dâng lên trong ống đong, ml

3.4. TINH BỘT

Mục đích

Tinh bột là thành phần chủ yếu của nhiều loại củ và hạt. Việc xác định đúng sẽ giúp ta dự kiến chính xác lượng sản phẩm thu được cũng như tổn thất trong quá trình sản xuất.

Phương pháp xác định hàm lượng tinh bột có nhiều nhưng có thể chia ba nhóm:

- Phương pháp quang học - dựa vào khả năng làm quay mặt phẳng ánh sáng phân cực của tinh bột.
- Phương pháp hoá học - dựa trên cơ sở thủy phân tinh bột đến glucoza bằng axit, sau đó xác định khả năng khử của dung dịch.
- Phương pháp sinh học - dựa trên cơ sở thủy phân tinh bột bằng amylaza, sau đó đem lên men dịch đường để biến thành rượu rồi xác định lượng rượu tạo thành.

3.4.1. Phương pháp hoá học

Đây là phương pháp được áp dụng nhiều nhất trong các nhà máy rượu ở nước ta. Phương pháp này chỉ chính xác khi xác định hàm lượng tinh bột trong dung dịch tinh khiết, còn đối với bột thô thì kết quả nhận được thường cao hơn so với thực tế. Vì trong điều kiện thủy phân sẽ có một phần pentoza và hemixenluloza biến thành đường pentoza, nhưng đường này lại không biến thành rượu khi lên men. Do đó trên thực tế đáng lẽ phải trừ bớt lượng pentoza có trong dịch thủy phân, nhưng các nhà máy của ta chưa làm điều này. Một phần do xác định đường pentoza mất khá nhiều thời gian (4 – 5 giờ). Mặt khác do nhiều người chưa hiểu đúng, chưa quan tâm đúng mức đến công tác phân tích tinh bột.

1. Nguyên tắc

Thủy phân tinh bột thành đường trong dung dịch HCl 2% ở điều kiện đun sôi trong bình cách thủy trong thời gian 2 giờ. Dịch đã thủy phân được làm nguội và trung hoà bằng NaOH với chỉ thị methyl da cam. Hàm lượng đường trong dung dịch được xác định theo các phương pháp xác định như Betran, Lain-Aynol, Graxianop,...

2. Dụng cụ

- Bình định mức dung tích 100, 250 ml.
- Bình tam giác dung tích 250ml.
- Cốc thủy tinh 100, 250 ml.
- Phễu thủy tinh.
- Ống đong dung tích 100 ml.
- Ống sinh hàn khí.
- Nồi cách thủy.
- Bếp điện.
- Cân phân tích có độ chính xác 0,001 g.
- Nhiệt kế đo được đến 100°C.

3. Hoá chất

- Axit chlohydric đặc.
- Dung dịch hydroxyt natri 10%.
- Metyl da cam 1%.

4. Tiến hành

Cân khoảng 2 g bột rồi chuyển toàn bộ vào bình tam giác hoặc bình cầu có dung tích 250 ml. Tiếp theo cho thêm 100 ml HCl 2% (100 ml nước cất cộng 6 ml HCl 35%), đậy nút cao su và nối với ống sinh hàn khí. Lắc nhẹ rồi đặt nổi vào đun cách thủy, đun tới sôi và cho sôi khoảng 2 giờ. Mức nước ở nổi cách thủy phải luôn cao hơn mức nước trong bình thủy phân, phải chuẩn bị nước sôi để bổ sung vào. Sau 2 giờ thủy phân, toàn bộ lượng tinh bột đã chuyển hoá thành glucoza, làm nguội đến nhiệt độ phòng rồi thêm 4 - 5 giọt metyl da cam, dùng NaOH 10% để trung hoà axit tới đổi màu. Chú ý chỉ trung hoà khi đã làm nguội đến 30°C, vì ở nhiệt độ cao và kiểm cục bộ thì glucoza sẽ bị phân huỷ làm kết quả kém chính xác. Trung hoà xong ta chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 250 ml, tráng bình rồi thêm nước cất tới gần bình và đem lọc.

Dịch đường thu được có thể xác định theo các phương pháp xác định đường.

5. Kết quả

Hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu TB (%) được tính theo công thức sau:

$$TB = \frac{a \times 250 \times 100}{b \times m} \times 0,9, \%$$

trong đó:

a - số gam glucoza tương ứng với 20 ml ferixyanua kali;

b - số mililít dịch đường loãng tiêu hao khi định phân;

m - số gam bột ở mẫu thí nghiệm;

0,9 - hệ số chuyển glucoza thành tinh bột.

Ví dụ, khi xác định chỉ số của dung dịch ferixyanua kali ta tính được lượng glucoza tương đương 20 ml là 0,025 g, số bột trong dịch thủy phân là 2 g, số dịch đường loãng tiêu hao khi định phân là 4,5 ml. Do đó hàm lượng tinh bột (kể cả pentozan) trong nguyên liệu sẽ là:

$$TB = \frac{0,025 \times 250 \times 100}{4,5 \times 2,00} \times 0,9 = 62,5 \%$$

Chú ý: Xác định đường theo phương pháp Lain-aynon và Graxianop sẽ chính xác hơn khi dịch dùng để chuẩn chứa 0,3 - 0,5% đường.

3.4.2. Phương pháp quang học Evec

1. Nguyên tắc

Phương pháp Evec dựa trên cơ sở chuyển tinh bột thành dạng hoà tan nhờ

đun nóng trong dung dịch HCl 1,124% trong 15 phút. Sau đó đem kết tủa protein và lọc trong. Tiếp theo đo khả năng làm quay mặt phẳng phân cực của dung dịch rồi từ đó suy ra nồng độ tinh bột.

Nếu cho ánh sáng phân cực đi qua chất hoạt động quang học thì nó sẽ làm quay mặt phẳng phân cực, mặt phẳng này quay lệch đi nhiều hay ít tùy thuộc vào nồng độ chất hoạt quang. Một số chất làm cho mặt phẳng quay theo chiều kim đồng hồ như đường sacaroza, tinh bột, rafinoza,... được gọi là chất quay phải. Ngược lại đường fructoza và đường hoàn nguyên làm mặt phẳng quay ngược chiều kim đồng hồ, gọi là chất quay trái.

Để so sánh độ hoạt quang của các chất khác nhau và ứng dụng vào thực tế phân tích, người ta đưa ra khái niệm “góc quay riêng”. Đó là góc quay mặt phẳng phân cực (biểu diễn theo độ tròn) do tác dụng của dung dịch chứa 100 g chất hoạt quang trong 100 ml khi ánh sáng đi qua lớp dung dịch có chiều dày 1 dm.

Theo quy ước, “góc quay riêng” $[\alpha]_D^{20}$ được đo ở 20°C với ánh sáng phát ra từ đèn natri. Đại lượng $[\alpha]_D^{20}$ của các chất hoạt quang rất khác nhau nhưng đều có thể xác định theo công thức:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \times \alpha}{l \times C}$$

trong đó:

α - góc lệch quan sát được độ tròn;

l - chiều dày lớp dung dịch ánh sáng phân cực đi qua, dm;

C - nồng độ dung dịch - tức hàm lượng chất hoạt quang, g/100ml.

Từ phương trình suy ra:
$$C = \frac{100 \times \alpha}{[\alpha]_D^{20} \times l}$$

Biết $[\alpha]_D^{20}$ của các chất, căn cứ vào vào độ lệch α quan sát được ta suy ra nồng độ của dung dịch và hàm lượng tinh bột.

2. Hoá chất

- Dung dịch HCl 1,124%: Lấy 26,6 ml HCl đậm đặc ($d=1,19$) pha với nước cất thành 1 lít

- Dung dịch molipdat amoni $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 2,5%

3. Dụng cụ

- Bình định mức 100 ml cổ rộng miệng loe.

- Phân cực kế hoặc đường kế.

4. Tiến hành

Cân đúng 5 g bột nghiền mịn rồi cho vào bình định mức 100 ml miệng loe, sau đó cho thêm 50 ml dung dịch HCl 1,124%. Đặt bình vào nồi nước đang sôi, 3 phút đầu lắc nhẹ để bột không dính vào thành bình hoặc vón cục. Lượng nước trong nồi phải luôn cao hơn mực dung dịch trong bình. Sau 15 phút đem làm nguội nhanh bằng cách thêm vào bình 30 - 35 ml nước cất và làm lạnh tới 50⁰ C. Tiếp theo cho thêm 5 ml dung dịch molipdat amoni để kết tủa protein, thêm nước cất tới gần bình và đem lọc. Dung dịch trong nhận được cho vào ống phân cực kế có độ quay tròn.

5. Kết quả

Hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu được tính theo công thức sau:

$$C = \frac{100 \times \alpha}{[\alpha]_D^{20} \times l} \times \frac{100}{5}, \%$$

trong đó:

α - chỉ số đọc được trên thang chia độ tròn. Nếu đo trên phân cực kế kiểu đường kế thì α cần nhân với 0,3468;

l - chiều dày của ống phân cực khi đo, dm;

$[\alpha]_D^{20}$ - góc quay riêng của tinh bột.

Theo số liệu của Evect, góc quay riêng của các loại tinh bột sẽ như sau:

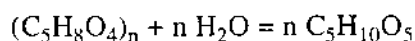
Khoai tây	194,5
Gạo	185,9
Ngô	184,6
Lúa mì	182,7
Đại mạch	181,5
Sắn	187,0*

Khi đo nếu nhiệt độ dung dịch khác 20⁰C thì cần hiệu chỉnh về 20⁰C, theo công thức thực nghiệm sau:

$$\alpha^{20} = \frac{\alpha_t}{1 + 0,000143(t - 20)}$$

3.5. PENTOZAN VÀ ĐƯỜNG 5 CARBON

Pentozan là thành phần chất bán xơ (hemixelluloza) của tế bào thực vật. Trong điều kiện thủy phân bằng axit, pentozan sẽ tạo thành đường pentozơ



pentozan

pentozơ

Đường pentozơ chứa 4 nhóm aldehyt tự do, dễ bị oxy hoá bởi hỗn hợp Fehling, iot và các chất oxy hoá khác. Do đó làm tăng hàm lượng tinh bột trong nguyên liệu khi xác định bằng phương pháp hoá học.

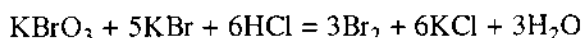
1. Nguyên tắc

Khi đun nguyên liệu chứa pentozan trong dung dịch HCl 12% thì pentozan sẽ bị thủy phân thành pentozơ. Đường 5 carbon này dễ bị mất nước và tạo thành furfural.

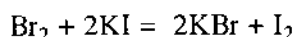
Glucosa trong dung dịch HCl 12% cũng bị phân huỷ và thành oxymethylfurfural. Chất này cũng cho phản ứng tương tự furfural. Vì thế ảnh hưởng xấu đến kết quả phân tích. Nhưng do tính chất kém bền của oxymethylfurfural trong dung dịch axit nếu người ta dùng phương pháp đun cất 2 lần để loại trừ oxymethylfurfural.

Lượng furfural được xác định bởi phản ứng với brom trong môi trường axit theo phương trình:

Brom phân tử sẽ nhận được do phản ứng:



Lượng brom dư sẽ xác định theo phản ứng:



Lượng iot thải ra sẽ chuẩn bằng dung dịch thiosulfit natri.

2. Hoá chất

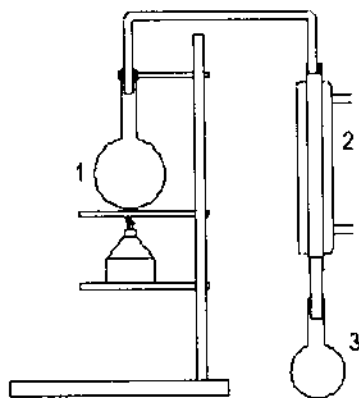
- Dung dịch HCl 12%: Lấy 286 ml HCl đậm đặc ($d = 1,185$) cho vào bình định mức 1 lít rồi thêm nước cất tới gần bình.

- Dung dịch kali bromat 0,1N: Cân 2,782 g $KBrO_3$ và 11,892 g KBr rồi hoà tan và định mức 1 lít.

- Dung dịch KI 10%.

- Dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N.

- Dung dịch tinh bột 1%.



Hình 3.2: Hệ thống chưng cất furfural:

1. bình chưng cất; 2. sinh hàn nước; 3. bình thu mẫu

3. Tiến hành

- Cân khoảng 2 - 5 g nguyên liệu, cho vào bình cất 300 - 400 ml. Sau đó cho 100 ml dung dịch HCl 12% vào và đậy bằng 1 nút có đục 2 lỗ, một dùng để cắm phễu chiết và cho thêm dung dịch HCl vào bình trong quá trình cất, lỗ khác nối với ống làm lạnh để thu dung dịch furfural cất được (xem hình 3.2).

- Chuẩn bị xong ta bắt đầu đun bình cất và thu dịch ngưng tụ. Khi thu được 30 ml dịch ngưng thì cho thêm vào 30 ml dung dịch HCl 12%. Chú ý phải cho từ từ để dung dịch không sôi mạnh phọt ra ngoài. Tiếp tục cất, thu và cho thêm axit cho đến khi thu đủ 300 ml chất lỏng ngưng tụ thì ngừng cất. Sau đấy ta đem dung dịch thu được cất lại và cũng làm tương tự như trên cho đến khi thu được 270 ml thì ngừng. Tiếp theo ta thêm dung dịch HCl 12% cho tới 300 ml.

- Bây giờ lấy 2 bình tam giác 250 ml. Bình (1) cho vào 100 ml dịch ngưng thu được, bình (2) cho 100 ml dung dịch HCl 12% (bình kiểm chứng). Sau đó cho vào mỗi bình 30 ml dung dịch brom 0,1N. Nút kín bình và để vào chỗ tối. Sau 1 giờ ta cho mỗi bình 10 ml dung dịch KI. Lượng I_2 thải ra sẽ định phân ngay bằng dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N với chỉ thị là dung dịch tinh bột.

Dựa vào hiệu số tiêu hao thiosulfit natri trong mẫu kiểm nghiệm ta suy ra số ml dung dịch brom 0,1N đã phản ứng với furfural.

4. Kết quả

Hàm lượng pentozan (P %) trong mẫu nguyên liệu tính theo công thức:

$$P = \frac{(a_0 - a) \cdot 0,0041 \times 300 \times 100}{100 \times m}, \%$$

trong đó:

a_0 - số ml dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N tiêu hao trong thí nghiệm kiểm tra;

a - số ml dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N tiêu hao trong thí nghiệm thực;

0,0041 - số gam pentozan tương ứng với 1ml dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N;

m - số gam nguyên liệu phân tích.

5. Ví dụ

Khi phân tích ta lấy 2 g nguyên liệu, lượng $a_0 = 24,4$ ml, $a = 20,4$ ml.

Do đó:

$$P = \frac{(24,4 - 20,4) \times 0,0041 \times 300 \times 100}{100 \times 2} = 2,46 \%$$

Hàm lượng tinh bột thực có trong nguyên liệu:

$$(62,5 - 2,46) \% = 60,04\%$$

3.6. ĐỘ HOÀ TAN

1. Mục đích

Xác định hàm lượng chất hoà tan trong các nguyên liệu như: gạo, ngô, lúa miến, lúa mì và các sản phẩm tinh bột.

2. Nguyên tắc

Biến đổi các chất trong nguyên liệu thành dạng hòa tan bằng cách sử dụng malt đại mạch làm nguồn enzym với nhiệt độ và thời gian thích hợp. Sau đó xác định tỷ trọng của dịch đường.

3.6.1. Phương pháp ASBC

Quy trình thí nghiệm được áp dụng cho tất cả các loại mẫu ngũ cốc kể cả ngô mảnh và gạo.

1. Hoá chất

- Enzym: Malt đại mạch có hoạt lực diastaza lớn hơn 300 đơn vị WK. Độ ẩm và hàm lượng chất hòa tan của malt phải được xác định cùng thời gian khi được dùng xác định chất hòa tan của nguyên liệu thay thế.

- Dung dịch I₂ 0,02 N.

2. Dụng cụ

- Máy nghiền phù hợp cho mỗi loại nguyên liệu.

- Cân phân tích, độ chính xác 0,05 g.

- Nồi đường hoá có bộ phận đo nhiệt độ, thời gian và tốc độ cánh khuấy là 100 – 200 vòng/phút.

- Dụng cụ đo tỷ trọng.

- Tủ sấy.

- Cốc sấy.

3. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Nghiền khoảng 21 g mẫu. Nếu xác định cả độ ẩm, dầu, protein và tro thì cần ít nhất là 45 g. Ngô mảnh hoặc gạo tấm không cần nghiền.

- Cân 20 g $\pm$ 0,05 g nguyên liệu đã nghiền và 5 g $\pm$ 0,05 g malt nghiền cho vào cốc nấu đã biết trước trọng lượng. Cho 200 ml nước cất 46°C vào, khuấy đều bằng đũa thủy tinh. Đặt cốc lên bếp đun sao cho trong khoảng 10 - 15 phút dịch bắt đầu sôi, khuấy liên tục, giữ dịch sôi trong 30 phút, và khuấy kỹ trong 10 phút tiếp theo, chú ý không để bị cháy, không để dịch sôi bắn ra ngoài hay nổi bọt nhiều. Khuấy đều trong suốt quá trình nấu và giữ thể tích dịch nấu không đổi bằng cách bổ sung nước 15 phút 1 lần. Làm nguội dịch nấu tới 46°C và thêm 25 g $\pm$ 0,05 g malt nghiền, trộn đều, tránh vón cục. Tráng thành cốc bằng một ít nước cất. Giữ nhiệt độ dịch nấu 45°C đúng 30 phút (tính từ thời gian đặt cốc vào bình ổn nhiệt 46°C), khuấy liên tục.

- Tiếp đó nâng nhiệt độ tới 70°C với tốc độ 1°C/1 phút, thêm 100 ml nước cất 70 - 71°C, giữ 70°C trong 60 phút. Sau 15 phút tính từ khi dịch đạt 70°C bắt đầu thử với dung dịch I₂ cho đến khi đường hóa hoàn toàn. Chú ý trong quá trình nấu không để nhiệt độ vượt quá nhiệt độ yêu cầu 0,5°C. Thời gian đường hóa được nhận xét: dưới 15 phút, 15 - 30 phút, 30 - 45 phút, 46 - 60 phút, không hoàn toàn nếu dài hơn 60 phút.

- Tiếp đó làm nguội và lọc dịch chiết như đối với dịch chiết malt.

- Xác định tỷ trọng của dịch đường, để xác định hàm lượng chất hoà tan dựa vào phụ lục 1 (*Bảng tra hàm lượng chất khô hoà tan theo tỷ trọng của dịch-Goldiner và Klemann*).

Nếu dùng loại ngô và gạo đã giập nát thì không được nghiền và không được đun sôi. Cân 20 g nguyên liệu không nghiền và 30 g malt nghiền với 200 ml nước cất 46°C, trộn kỹ để tránh vón cục. Rửa thành cốc bằng một chút nước và tiến hành nấu như đã trình bày.

4. Kết quả

Tính hàm lượng chất hòa tan theo các công thức sau:

$$E_t = \frac{(800 + 0,6W_m + 0,4W_c)e}{100 - e} ; \%$$

$$E_c = \frac{(E_t - 0,6E_m).100}{40} ; \%$$

$$E'_c = \frac{100.E_c}{100 - W_c} ; \%$$

trong đó:

E_t - hàm lượng tổng chất hòa tan trong hỗn hợp malt và nguyên liệu bột, % (tính theo khối lượng);

E_c - hàm lượng chất hòa tan của nguyên liệu bột theo khối lượng, % ;

E'_c - hàm lượng chất hòa tan của nguyên liệu bột tính theo chất khô, % (theo khối lượng);

E_m - hàm lượng chất hòa tan của malt, % (theo khối lượng);

e - hàm lượng chất hòa tan trong dịch đường, %, (theo khối lượng);

W_m - độ ẩm của malt, %;

W_c - độ ẩm của nguyên liệu bột, %.

Kết quả lấy đến một số thập phân.

5. Ví dụ

Độ ẩm của malt 7 %

Hàm lượng chất hòa tan của malt 70,5 %

Độ ẩm của gạo 12 %

Tỷ trọng của dịch đường 1,03400

Hàm lượng chất hòa tan dịch đường 8,54 %

$$E_t = \frac{8,54 \cdot (800 + 0,6 \cdot 7,0 + 0,4 \cdot 12,0)}{100 - 8,54} = 74,72 \%$$

$$E_c = \frac{[74,72 - (0,6 \cdot 70,5)] \cdot 100}{40} = 81,05 \%$$

$$E'_c = \frac{81,05 \cdot 100}{100 - 12} = 92,1 \%$$

3.6.2. Phương pháp De Clerk

Phương pháp này áp dụng cho mọi loại ngũ cốc: gạo ngô, lúa miến, đại mạch, và các sản phẩm tinh bột khác dùng làm nguyên liệu thay thế trong sản xuất bia.

Dùng malt đại mạch có hoạt lực diastaza ít nhất 250 WK và có thời gian đường hóa dưới 10 phút làm enzym.

1. Tiến hành

- Cân 25 g bột nguyên liệu và cân riêng 25 g malt nghiền. Cho toàn bộ lượng bột nguyên liệu cùng 200 ml nước vào cốc nấu, nâng nhiệt độ lên 90°C, khuấy liên tục cho đến khi tinh bột bị hồ hóa hoàn toàn. Hạ nhiệt độ xuống

70 - 75°C, khuấy liên tục, cho thêm 1 g malt nghiền. Để hỗn hợp dịch hóa trong vài phút rồi đun sôi và giữ sôi trong 5 - 10 phút. Hạ nhiệt độ hỗn hợp xuống 45°C và cho nốt lượng malt còn lại và thêm 100 ml nước cất 45°C, khuấy đều.

- Các bước tiếp theo tiến hành như phương pháp xác định độ hoà tan của malt (xem phần 2.4), nhưng ở đây chỉ thêm 50 ml nước cất để rửa thành cốc.

Nếu nguyên liệu là mảnh ngô: vì bột trong mảnh ngô đã hồ hoá nên không cần đun sôi, mà hoà trực tiếp bột malt với bột ngô và tiến hành như phương pháp xác định độ hoà tan của malt (xem phần 2.4).

2. Kết quả

Hàm lượng chất hoà tan của nguyên liệu bột tính theo công thức sau:

$$E_c = \frac{e \cdot (1600 + W_m + W_c)}{100 - e} - E_m, \%$$

$$E'_c = \frac{100 \cdot E_c}{100 - W_c}, \%$$

trong đó:

E_c - hàm lượng chất hoà tan của nguyên liệu bột, % (theo khối lượng);

E'_c - hàm lượng chất hòa tan của nguyên liệu bột, % (theo chất khô);

E_m - hàm lượng chất hoà tan của malt, %;

W_m - độ ẩm của malt, %;

W_c - độ ẩm của nguyên liệu thay thế, %;

e - hàm lượng chất hòa tan trong dịch đường, % (theo khối lượng);

Kết quả lấy đến một số thập phân.

3. Ví dụ

Độ ẩm của malt	7,0 %
Hàm lượng chất hoà tan của malt	70,5 %
Độ ẩm của gạo	12 %
Tỷ trọng của dịch đường	1,03400
Hàm lượng chất hòa tan dịch đường	8,54 %

$$E_c = \frac{8,54(1600 + 7,0 + 12)}{100 - 8,54} - 70,5 = 79,04 \%$$

$$E'_c = \frac{79,04 \cdot 100}{100 - 12} = 89,82 \%$$

3.6.3. Phương pháp sử dụng enzym Termamyl để dịch hoá

1. Nguyên tắc

Sử dụng enzym Termamyl để dịch hoá hoàn toàn gạo thành các dextrin.

2. Dụng cụ

- Cân phân tích.
- Cốc thuỷ tinh 500 ml.

3. Hoá chất

- Enzym Termamyl 120 L.
- Dung dịch iot 1%.

4. Tiến hành

- Cân 50 g bột gạo vào cốc 500 - 600 ml đã biết trước trọng lượng.
- Sau đó rót vào cốc 300 ml nước và 0,02 ml chế phẩm enzym Termamyl (để đảm bảo chính xác nên lấy 2 ml Termamyl đã pha loãng 100 lần).
- Khuấy đều rồi đặt cốc vào nồi cách thuỷ tới nhiệt độ 90 - 93°C và giữ thời gian 30 phút.
- Sau đó ta tăng dần nhiệt độ cho tới sôi, trong thời gian đun sôi cần bổ sung thêm lượng nước nóng do một phần nước đã bay hơi. Thời gian đun sôi 30 phút.
- Tiếp theo làm nguội tới 90 - 93°C rồi cho tiếp 0,005 ml Termamyl (tương ứng với 0,5 ml Termamyl đã pha loãng 100 lần) và giữ 30 phút, sau 5 phút bắt đầu dùng I₂ 1% để thử cho tới đường hoá hoàn toàn, bằng cách thử dịch đường hoá với dung dịch I₂ 1%, cho đến khi dịch đường hoá không làm đổi màu của iot. Sau đó làm nguội xuống nhiệt độ phòng.
- Lau khô phía ngoài cốc, rửa sạch đĩa thuỷ tinh rồi đem cân lại và thêm nước cất tới trọng lượng 450 g (không kể khối lượng cốc). Tiếp theo đem lọc qua giấy lọc hoặc bông. Nước lọc lúc đầu còn đục nên cần lọc lại.
- Sau đó đem xác định tỷ trọng của dịch lọc, căn cứ vào tỷ trọng đem tra bảng phụ lục 1 ta được nồng độ dịch đường đường theo % trọng lượng.

5. Kết quả

- Độ hoà tan của gạo E₁ (% tính theo khối lượng) được tính theo công thức sau:

$$E_1 = \frac{e_g(800 + W_g)}{100 - e_g}, \%$$

trong đó:

e_g - nồng độ dịch lọc xác định được, % (theo khối lượng);

W_g - độ ẩm của gạo, % (theo khối lượng).

- Độ hoà tan của gạo tính theo chất khô E_2 (% theo khối lượng) được tính theo công thức sau:

$$E_2 = \frac{E_1 \times 100}{100 - W_g}, \%$$

Chương 4

PHÂN TÍCH RỈ ĐƯỜNG

4.1. NỒNG ĐỘ CHẤT KHÔ

Xác định nồng độ chất khô trong rỉ đường có thể bằng các dụng cụ đo như Bx kế, Bome kế hoặc chiết quang kế.

4.1.1. Bx kế và Bome kế

Bx kế:

Nếu dung dịch đường tinh khiết Bx kế chỉ trực tiếp % trọng lượng đường trong dung dịch. Nếu dung dịch đường không tinh khiết nó chỉ hàm lượng chất khô biểu kiến theo trọng lượng.

$$1^0\text{Bx} = 1\% \text{ trọng lượng}$$

Bome kế:

Bome kế là dụng cụ đo nồng độ chất khô. Độ Bome được quy đổi sang độ Bx như sau:

$$1 \text{ Be} = 1,84^0\text{Bx}$$

1. Tiến hành

Rỉ đường là sản phẩm đặc có độ nhớt lớn không đo trực tiếp được mà phải pha loãng. Có thể dùng phương pháp pha loãng gấp đôi. Ví dụ: cân 150 g rỉ đường trong cốc khô biết trước trọng lượng, tiếp đó cho nước nóng để hoà tan, rồi làm nguội, sau đó rót thêm nước đủ đến trọng lượng 300 g rồi đem đo nồng độ chất khô.

Dùng ống đong thuỷ tinh (cao 35cm, rộng 3 cm) tráng 2 - 3 lần bằng dung dịch cần đo. Đổ đầy dung dịch vào ống, thổi bọt rồi thả nhẹ Bx kế hoặc Bome kế, sau khi Bx kế và Bome kế giữ ở trạng thái cân bằng, đọc trên vạch chia độ của Bx hoặc Be, nhớ ghi nhiệt độ.

Chú ý: Để đọc chính xác cần đổ thật đầy, làm nhẹ tay và đặt thật thẳng góc.

2. Kết quả

Đọc Bx quan sát được. Nếu ở nhiệt độ khác 20°C thì cần hiệu chỉnh theo phụ lục 2 (*Bảng hiệu chỉnh Bx về nhiệt độ 20°C*).

Độ Bx của dịch ở nhiệt độ 20°C được tính như sau:

- Khi nhiệt độ đo $< 20^{\circ}\text{C}$ thì lấy giá trị đo được trừ đi hệ số hiệu chỉnh.
- Khi nhiệt độ đo $> 20^{\circ}\text{C}$ thì lấy giá trị đo được cộng với hệ số hiệu chỉnh.

4.1.2. Chiết quang kế

1. Nguyên tắc

Dựa vào chiết suất để suy ra nồng độ dung dịch, khi nồng độ dung dịch tăng chiết suất tăng.

2. Tiến hành

- Hiệu chỉnh chiết quang kế: Về nguyên tắc, nước cất không chứa chất hòa tan, do vậy người ta sử dụng nước cất để hiệu chỉnh chiết quang kế về 0. Nhỏ một giọt nước cất (nhiệt độ 20°C) lên mặt kính đo. Chú ý không tạo bọt và đóng mặt kính lại. Điều chỉnh bằng vít vặn sao cho giải phân cách giữa 2 vùng sáng tối rõ nét và ở đúng điểm 0.

- Trước khi đo nồng độ chất khô của mật rỉ, lấy khoảng 100g đun cách thủy $70 - 80^{\circ}\text{C}$, khuấy đều để hoà tan hoàn toàn các tinh thể (nhớ đậy kín tránh hiện tượng bay hơi làm tăng nồng độ), sau đó để nguội, pha loãng và đo.

- Lấy 1 giọt mật rỉ (đã được xử lý nhiệt) nhỏ lên mặt kính đo. Chú ý không tạo bọt và đóng mặt kính lại. Đọc chỉ số tương ứng trên giải phân cách.

- Đo nhiệt độ của dịch đường. Nếu nhiệt độ khác 20°C thì cần hiệu chỉnh theo phụ lục 3 (*Bảng hiệu chỉnh nồng độ chất khô đo được về nhiệt độ 20°C*).

Chú ý: Trước và sau khi đo chiết suất phải dùng bông tắm rượu hoặc ete lau lăng kính đựng dung dịch thật sạch. Thường xuyên kiểm tra điểm "0" của chiết quang kế bằng cách lấy 2 - 3 giọt nước cất cho vào máy đo và thước đo sẽ chỉ nồng độ = 0. Nếu thấy sai số phải dùng khoá điều chỉnh. Chiết quang kế chỉ cho nồng độ chất khô hoà tan mà thôi.

4.2. HÀM LƯỢNG ĐƯỜNG

4.2.1. Xử lý và pha loãng rỉ đường

1. Nguyên tắc

Dùng dung dịch axetat chì để loại bỏ protein và canxi có trong rỉ đường. Phản ứng xảy ra như sau:

$\text{Protein} + \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \longrightarrow$ kết tủa do protein bị biến tính.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{ dư} \longrightarrow \text{PbHPO}_4 + 2\text{CH}_3\text{COONa}$

$\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{Ca}^{2+} \longrightarrow \text{CaC}_2\text{O}_4\downarrow + 2\text{K}^+$

Rỉ đường đã xử lý được thủy phân bằng axit HCl ở 70°C trong 5 phút. Xác định hàm lượng đường trong dịch pha loãng rồi quy ra hàm lượng đường trong rỉ đường.

2. Dụng cụ

- Bình định mức 250 ml.
- Bình tam giác 250 ml.
- Cốc 50; 100 ml.
- Ống đong 100 ml.
- Phễu lọc.

3. Hoá chất

- Dung dịch axetat chì axit bão hoà.
- Na_2HPO_4 10%.
- Oxalat kali 5%.
- HCl đậm đặc.
- Chỉ thị methyl da cam 0,05%.
- NaOH 5 - 10N.

4. Tiến hành

- Cân 5 g mật rỉ trong cốc 100 ml sau đó dùng 50 ml nước cất nóng 40°C để pha loãng và chuyển toàn bộ vào bình định mức 250 ml. Tiếp theo cho 5 - 6 ml axetat chì axit tính, lắc đều rồi cho thêm nước cất tới gần bình và đem lọc. Lấy 100ml dịch trong cho vào bình định mức 250 ml, thêm 5 ml Na_2HPO_4 10%, 5 ml oxalat kali 5%. Lắc đều rồi thêm nước cất tới gần bình và đem lọc.

- Sau khi kết tủa protein và loại canxi, ta lấy 100 ml dịch lọc lần 2 cho vào bình định mức 250 ml rồi dùng xi lanh lấy 10 ml HCl đậm đặc ($d = 1,19$) cho vào bình, lắc đều rồi đặt vào nồi cách thủy 70°C để thủy phân saccaroza trong 5 phút. Sau đó đem làm nguội tới nhiệt độ phòng rồi cho vào 2 - 3 giọt chỉ thị phenolphthalein và trung hoà bằng NaOH 10 N tới đổi màu. Tiếp theo thêm nước cất tới gần bình, lắc đều rồi đem xác định hàm lượng đường trong dung dịch pha loãng bằng một trong các phương pháp xác định đường sau.

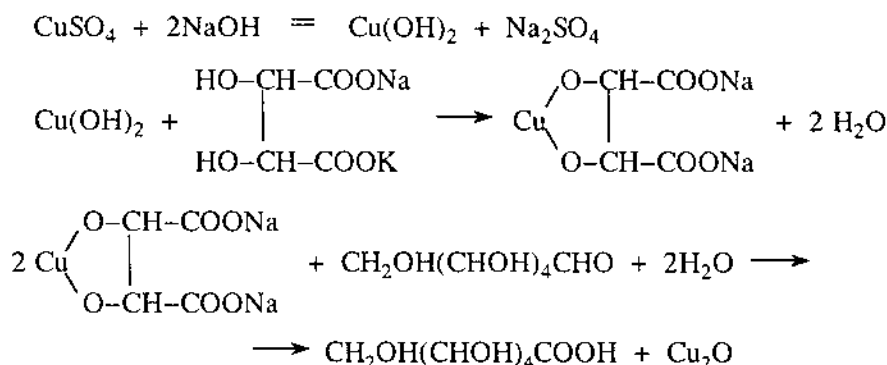
4.2.2. Phương pháp Bectran

Đây là phương pháp được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và cho tới nay vẫn được xem là chính xác hơn so với phương pháp khác.

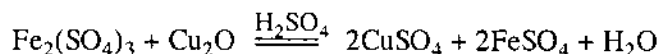
1. Nguyên tắc

Trong môi trường kiềm các đường khử có khả năng khử ion Cu^{2+} thành Cu^+ kết tủa dưới dạng oxit đồng I màu đỏ

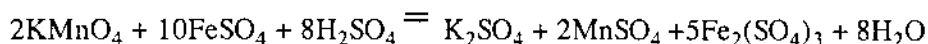
Dùng dung dịch Fehling A và B (bao gồm CuSO_4 và tartrat kép trong môi trường kiềm) khử đường khử có trong dịch phân tích để tạo thành đồng oxit kết tủa màu đỏ.



Kết tủa đồng màu đỏ sẽ bị sulfat sắt III hoà tan theo phản ứng sau:



Tiếp theo ta định phân lượng FeSO_4 mới tạo thành bằng dung dịch KMnO_4 :



Căn cứ vào lượng KMnO_4 tiêu hao ta nhân với 6,36 sẽ nhận được số mg Cu. Sau đó tra phụ lục 12, 13 (Quan hệ giữa lượng Cu và lượng glucoza hoặc maltoza khi xác định đường khử theo phương pháp Bectran) ta sẽ biết được lượng đường chứa trong mẫu thí nghiệm.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác.
- Ống dòng.
- Bếp điện, bếp ga.

3. Hoá chất

- Dung dịch Fehling A: Cân 40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, hoà tan và định mức tới 1 lít sau đó đem lọc rồi cho vào lọ nút nhám khô rồi đậy kín.

- Dung dịch Fehling B: cân 200 g muối tartrat kép và 150 g NaOH vào 2 cốc khác nhau, sau đó đem hoà tan lẫn và để nguội rồi định mức tới 1 lít. Đem lọc rồi bảo quản trong bình nâu nút kín.

- Dung dịch $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$: Cân 50 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ hoà tan trong 500 - 600 ml nước. Tiếp đó cho thêm 110 ml H_2SO_4 đậm đặc ($d = 1,84$) rồi đổ đầy tới 1 lít. Sau khi lọc ta thêm vài giọt KMnO_4 0,1N đến xuất hiện màu hồng nhạt rồi bảo quản trong bình kín.

- Dung dịch KMnO_4 0,1N.

4. Tiến hành

- Dùng ống đong lấy 20 ml Fehling A và 20 ml Fehling B cho vào bình tam giác rồi dùng pipet hút 20 ml dung dịch đường đã xử lý và pha loãng vào. Lắc đều rồi đặt bình tam giác lên bếp điện hoặc bếp ga, đun sao cho sau 3 - 4 phút thì sôi và cho sôi tiếp đúng 3 phút nữa. Lấy bình ra khỏi bếp và để lắng, sau đó đem lọc qua phễu xốp rồi rửa nhiều lần bằng nước cất nóng 70 - 80°C.

Chú ý: Khi lọc rửa phải luôn giữ nước trong phễu để tránh hiện tượng oxit đồng bị oxy hoá do tiếp xúc với không khí. Rửa xong ta dùng 25 ml dung dịch $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ để hoà tan oxit đồng, rồi cũng rửa 2 - 3 lần bằng nước nóng. Dung dịch nhận được sau khi hoà tan và rửa đem chuẩn bằng dung dịch KMnO_4 0,1N đến xuất hiện màu hồng và không mất đi sau 2 - 3 giây.

Số ml KMnO_4 0,1N tiêu hao đem nhân với 6,36 ta sẽ được lượng mg đồng, sau đó tra bảng Bectran (Phụ lục 12, 13) ta sẽ biết lượng đường chứa trong 20 ml dịch thí nghiệm và gọi là a

5. Kết quả

Hàm lượng đường trong mật rỉ (X, % m/m) được tính theo công thức:

$$X = \frac{a}{m} \times 100 \%$$

Trong điều kiện thí nghiệm đã mô tả ở trên, m là số mật rỉ tham gia trong thí nghiệm:

$$m = \frac{5}{250} \times \frac{100}{250} \times \frac{100}{250} \times 20 = 0,064 \text{ g}$$

Ví dụ, khi định phân lượng dung dịch KMnO_4 tiêu tốn là 10,2 ml tương đương với lượng đồng là $10,2 \times 6,36 = 64,87 \text{ mg}$. Tra bảng Bectran (phụ lục 12, 13) ta thấy ứng với 64,8 mg đồng ta có 33 mg đường invertaza hay 0,033 g.

Hàm lượng đường trong mật rỉ là:

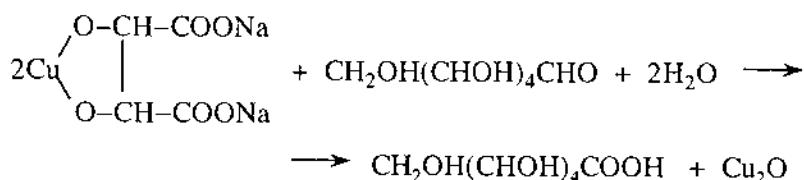
$$\frac{0,033}{0,064} \times 100 = 51,56 \%$$

Hàm lượng đường lên men được trong mật rỉ phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, có thể từ 40 đến 60% khối lượng. Nhưng hàm lượng chất hoà tan trong mật rỉ có thể đạt 85 - 90%, vì ngoài đường, mật rỉ còn chứa các chất hoà tan khác.

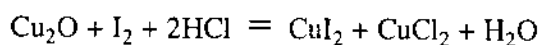
4.2.3. Phương pháp Opnhe

1. Nguyên tắc

Dung dịch Opnhe gồm CuSO_4 , tartrat kép. Khi tác dụng với đường khử tạo ra oxit đồng I theo phản ứng



Lượng đồng (I) oxit tạo ra được cho phản ứng với lượng I_2 dư. Lượng I_2 dư sẽ được định phân bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Các phản ứng này như sau:



Dựa vào lượng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ tiêu tốn có thể tính được lượng I_2 dư, lượng Cu_2O tạo ra và từ đó tính được lượng đường khử có trong mật rỉ đường.

2. Hoá chất

- Dung dịch Opnhe: Cân 5 g CuSO_4 vào cốc, thêm vào đó 50 đến 60 ml nước, đồng thời cân vào cốc khác 300 g tartrat kép, 10 g Na_2CO_3 và 30 g Na_2HPO_4 . Tất cả chứa trong cốc 1 lít cùng 500 ml nước cất 50°C . Sau khi hoà tan, rót vào bình định mức 1 lít, lắc đều và làm lạnh đến 20°C rồi thêm nước cất tới gần bình và đem lọc. Dung dịch Opnhe nhận được phải trong suốt và bảo quản trong bình nâu đậy kín.

- Dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/30.
- Dung dịch I_2 N/30.
- Dung dịch HCl 1N.
- Dung dịch tinh bột 0,5%.

3. Tiến hành

- Lấy 10 ml dịch đường vừa xử lý ở trên cho vào bình tam giác 250 ml, sau đó cho vào 50 ml dung dịch Opnhe và một ít thủy tinh vụn. Đặt bình vào nồi nước đang sôi và cho sôi 10 phút, làm nguội tới nhiệt độ phòng rồi cho thêm 15 ml HCl 1N. Tiếp đó cần nhanh chóng cho vào bình 25 ml dung dịch I_2 N/30. Đậy kín bình và để vào chỗ tối, sau 2 phút đem định phân lượng iot dư bằng dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/30 với chỉ thị là dung dịch tinh bột 0,5%.

- Song song với thí nghiệm chính, ta làm thí nghiệm kiểm chứng để biết lượng I_2 tiêu hao do tác dụng với chất khử khác. Thí nghiệm kiểm chứng cũng làm tương tự, chỉ khác không có giai đoạn đun sôi để tạo Cu_2O .

4. Kết quả

Hàm lượng đường trong mật rỉ được xác định theo công thức :

$$X = \frac{(a - b) \times 100}{m}, \%$$

trong đó:

- a - số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ tiêu hao trong thí nghiệm trắng (kiểm chứng);
- b - số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ tiêu hao trong thí nghiệm thực;
- l - số mg đường glucoza ứng với 1 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/30;
- m- lượng mật rỉ có trong mẫu pha loãng, g.

Ví dụ: a = 20,2; b = 3,8 ml. Như vậy lượng đường chứa trong 10 ml dịch phân tích sẽ là:

$$(20,2 - 3,8) \times 1 = 16,4 \text{ mg}$$

Lượng mật rỉ chứa trong mẫu thí nghiệm :

$$m = \frac{5}{250} \times \frac{100}{250} \times \frac{100}{250} \times 10 = 0,032 \text{ g}$$

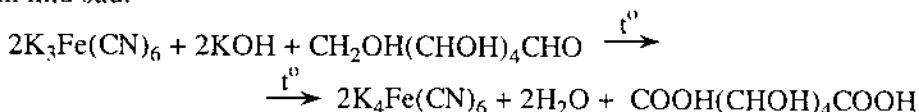
Vậy hàm lượng đường trong mật rỉ:

$$X = \frac{0,0164}{0,032} \times 100 = 51,2 \%$$

4.2.4. Phương pháp Graxianop

1. Nguyên tắc

Đường khử khi đun nóng với dung dịch kiềm cùng với ferixyanua sẽ khử ferixyanua thành feroxyanua và đường khử chuyển thành axit đường. Dùng metylen xanh làm chất chỉ thị sẽ mất màu xanh khi phản ứng kết thúc. Phản ứng chính như sau:



2. Dụng cụ

- Bình tam giác.
- Pipét.
- Bếp điện.

3. Hoá chất

- Dung dịch ferixyanua kali 1%: 11 g $K_3Fe(CN)_6$ hoà tan trong nước cất và định mức tới 1 lít.
- Dung dịch KOH 2,5N: cân 140 g KOH hoà tan trong 1 lít nước cất.
- Dung dịch xanh metylen 0,5%.

4. Tiến hành

Dùng pipet lấy đúng 20 ml dung dịch ferixyanua kali cho vào bình tam giác 250 ml, thêm vào đó 5 ml dung dịch KOH 2,5N và 3 - 4 giọt xanh metylen (nếu nồng độ dịch đường thấp hơn 0,25% thì lấy 10ml ferixyanua kali và 2,5 ml dung dịch KOH). Lắc nhẹ và đặt trên bếp điện hoặc bếp ga, đun sao cho sau 1 - 2 phút thì sôi. Tiếp đó dùng dung dịch đường loãng để chuẩn tới mất màu của xanh metylen. Chú ý màu của hỗn hợp phản ứng sẽ thay đổi từ xanh sang phớt hồng và cuối cùng là vàng da cam thì kết thúc. Nếu để nguội màu của hỗn hợp sẽ trở lại tím hồng do bị oxy hoá.

Khi trong hỗn hợp phản ứng còn ferixyanua thì khi nhỏ dịch đường vào, đường sẽ khử ferixyanua kali, khi vừa hết ferixyanua thì ngay lập tức 1 giọt đường dư sẽ khử và làm mất màu của xanh metylen - chất chỉ thị của phản ứng.

5. Kết quả

Hàm lượng đường trong dịch đường pha loãng tính theo công thức:

$$D = \frac{a}{x} \times 100 \text{ (g/100 ml)}$$

Muốn xác định chỉ số a của 20 ml (hoặc 10 ml) ferixyanua kali ta phải chuẩn bị dung dịch glucoza tinh khiết. Cân 0,5 g glucoza tinh khiết đã sấy đến khối lượng không đổi, hoà tan trong nước cất rồi cho vào bình định mức 100ml, tráng sạch bằng nước cất rồi thêm đến gần bình. Cân chính xác và thao tác cẩn thận ta sẽ có dung dịch glucoza chuẩn chứa 5 mg/ml

Muốn xác định xem 20 ml ferixyanua kali tương ứng với bao nhiêu mg glucoza, ta làm thí nghiệm như trên nhưng dung dịch chuẩn là dung dịch glucoza đã biết trước nồng độ.

Giả sử 20 ml ferixyanua 1% cộng với 5 ml KOH 2,5 N cộng 3 - 4 giọt xanh metylen khi đun sôi và chuẩn hết 5 ml dung dịch glucoza 0,5 g/100 ml. Như vậy 20 ml ferixyanua 1% tương đương với $5 \times 5 \text{ mg} = 25 \text{ mg}$ hay 0,025 g.

4.2.5. Xác định đường theo phương pháp DNS

1. Nguyên tắc

Dựa trên phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử axit dinitrosalicylic DNS. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ đường khử trong phạm vi nhất định. Dựa trên đồ thị đường chuẩn đối với glucoza tinh khiết tính được hàm lượng đường khử trong mẫu phân tích.

2. Dụng cụ

- Máy so màu

3. Hóa chất

- Axit dinitrosalicylic DNS.
- Muối tartrat kép $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- NaOH dung dịch 4N

Cho 5 g DNS và 300 ml nước cất vào cốc , hoà tan hoàn toàn ở 50°C. Sau đó cho thêm 50 ml dung dịch NaOH 4N. Cuối cùng thêm 150 g muối tartrat kép, hoà tan hoàn toàn rồi cho vào trong bình định mức 500 ml. Thêm nước cất tới vạch định mức. Đựng trong lọ thuỷ tinh màu sẫm. Nếu 1-2 ngày sau thấy xuất hiện cặn lắng thì đem lọc cặn. Chuẩn 3 ml thuốc thử DNS bằng HCl 0,1N với chỉ thị phenolphthalein, nếu hết 5-6 ml HCl là được. (Nếu cần thêm NaOH để đạt môi trường mạnh cho thuốc thử).

4. Tiến hành

- Dụng đồ thị chuẩn glucoza:

+ Cân glucoza tinh khiết 99% bằng cân phân tích (lấy 3 chữ số thập phân sau dấu phẩy) từ 0,12-0,42 g. Hoà tan đường glucoza bằng nước cất và định mức tới 1 lít.

+ Tiến hành đo OD ở bước sóng 540 nm với các mẫu phân tích, trong đó mẫu phân tích là : 2 ml dịch đường + 1 ml DNS , cho vào ống nghiệm nút chặt, bỏ vào đun sôi cách thuỷ 5 phút, lấy ra làm nguội rồi đem đo OD. Mẫu đối chứng là nước cất.

+ Vẽ đồ thị chuẩn với trục tung là OD, trục hoành là nồng độ đường (mg/l).

- Xác định hàm lượng đường khử trong mẫu.

+ Pha loãng mẫu sao cho hàm lượng đường khử trong khoảng 0,12-0,42 mg/ml rồi tiến hành đo xác định như trong phần dùng đồ thị chuẩn.

+ Dựa vào đồ thị chuẩn tra được hàm lượng đường khử trong mẫu phân tích.

Chú ý: Màu của hỗn hợp chỉ tạo ra trong môi trường kiềm, do vậy những mẫu axit phải được trung hoà trước khi đem phân tích. Các mẫu đun có thể để được một thời gian (20 phút trước khi đo).

5. Kết quả

Lượng đường được tính:

$$X = a.n.V$$

trong đó:

X - lượng đường trong dung dịch cần xác định, g;

a - lượng đường khử trong mẫu đo, g;

n - hệ số pha loãng dịch;

V - số thể tích dịch đo, ml.

4.3. ĐỘ THUẦN KHIẾT CỦA RỈ ĐƯỜNG

Để đánh giá chất lượng mật rỉ người ta đưa ra khái niệm độ thuần khiết và biểu diễn theo % như sau:

$$\text{Độ thuần khiết} = \frac{\text{Hàm lượng đường}}{\text{Hàm lượng chất tan}} \times 100, \%$$

Ví dụ mật rỉ đem phân tích có hàm lượng đường là 51,56%, nồng độ chất hoà tan là 85%. Do đó độ thuần khiết của mật rỉ sẽ là :

$$\frac{51,56}{85} \times 100 = 60 \%$$

Độ thuần khiết của mật rỉ thủ công luôn cao hơn so với rỉ đường nhận được theo phương pháp sản xuất đường hiện đại.

4.4. NITƠ TỔNG SỐ

Hàm lượng nitơ tổng số có trong rỉ đường nằm trong khoảng từ 0,5 - 3%. Xác định theo phương pháp Kjeldahl.

Tiến hành

- Cân 1 g rỉ đường vào một cốc nhỏ, sau đó chuyển vào bình Kjeldahl, tráng cốc bằng nước cất để chuyển hết rỉ đường vào (nên dùng càng ít nước cất càng tốt), thêm vào 0,5 g đồng sulfat, 1 g K₂SO₄ và 2 ml H₂SO₄ đậm đặc.

- Các bước tiến hành tiếp theo tương tự như phần 1.3

4.5. NITƠ HOÀ TAN

Hàm lượng nitơ hoà tan có trong rỉ đường nằm trong khoảng từ 0,4 - 1%.

Cách tiến hành: xem phần 2.6.

4.6. NITƠ AMIN

Hàm lượng nitơ amin có trong rỉ đường nằm trong khoảng 0,1 - 0,5%.

Phương pháp “đồng” được dùng để xác định hàm lượng N amin có trong rỉ đường có ưu điểm là nhanh và đơn giản.

1. Nguyên tắc

Khi cho một lượng phosphat đồng dư vào trong dung dịch có độ kiềm yếu chứa các hỗn hợp axit amin thì các axit amin có khả năng kết hợp với đồng tạo thành phức chất hoà tan. Lọc bỏ lượng photphat đồng còn dư, lấy dịch trong và cho axit axetic và KI.

Lượng đồng được xác định dựa vào lượng iot được giải phóng ra bằng cách chuẩn bằng Na₂S₂O₃.

2. Dụng cụ

- Bình định mức 25 ml, 100 ml, 1000 ml.
- Phễu, giấy lọc.
- Bình tam giác 100 ml.
- Pipet.

3. Hoá chất

- Dung dịch NaOH 1N.
- Dung dịch axetic 80%.
- Dung dịch thymolphthalein: 0,25 g thymolphthalein hoà tan trong 100 ml cồn 90%.

- Dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01N: lấy 2,2482 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hoà tan trong nước và định mức tới gần bình 1000 ml.

- Dung dịch tinh bột: Lấy 1 g tinh bột hoà tan vào trong 5 ml nước cất, sau đấy cho vào 80 ml KCl bão hoà và đun sôi trong 5 phút. Làm nguội tới nhiệt độ phòng, chuyển sang bình định mức 100 ml và dùng dung dịch KCl bão hoà định mức tới gần bình. Dung dịch tinh bột phải có pH trung tính ($\text{pH} = 7$).

- Dung dịch phosphat đồng:

+ Dung dịch $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Cân 27,3 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ cho vào bình định mức 1 lít và hoà tan trong nước cất, định mức tới gần bình (dung dịch A)

+ Dung dịch phospho natri: Cân 64,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, hoà tan với 50 ml nước cất và cho 7,2 g NaOH, sau đó chuyển toàn bộ sang bình định mức 1 lít và thêm nước cất tới gần bình (dung dịch B).

+ Dung dịch đệm borat: Cân 57,21 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ hoà tan trong 1500 ml nước cất. Thêm 100 ml HCl 1N và thêm nước cất cho đủ 2000 ml (dung dịch C).

+ Dung dịch phosphat đồng được chuẩn bị từ hỗn hợp bao gồm 1 phần dung dịch A, 2 phần dung dịch B, 2 phần dung dịch C và lắc đều.

4. Tiến hành

- Lấy chính xác 10 g ri đường, hoà tan với nước cất và định mức trong bình 100 ml.

- Lấy 5 ml cho vào bình định mức 25 ml, cho dung dịch NaOH 1 N tới khi có màu xanh hơi trắng với chỉ thị là thymolphthalein. Cho 15 ml dung dịch

phosphat đồng và dùng nước cất định mức tới gần bình.

- Lọc và lấy 5 ml dịch lọc trong, cho 0,25 ml axit axetic 80% và 0,5 g KI.
- Dùng dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N để chuẩn lượng I_2 được giải phóng ra, với chỉ thị là dung dịch tinh bột

5. Kết quả

Hàm lượng nitơ amin được tính theo công thức sau:

$$\text{Nitơ amin} = \frac{n \times 0,28 \times 1000 \times 100}{m}, \%$$

trong đó:

- n - số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N dùng để chuẩn;
- m - lượng mẫu lấy để phân tích;
- 0,28 - số mg nitơ amin ứng tương ứng với 1 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01N.

4.7. AXIT BAY HƠI

Hàm lượng axit bay hơi có trọng rí đường thường nhỏ hơn 1,0%.

1. Nguyên tắc

Chuẩn độ các axit bay hơi có trong dịch ngưng tụ sau khi chưng cất lôi cuốn bởi hơi nước.

2. Dụng cụ

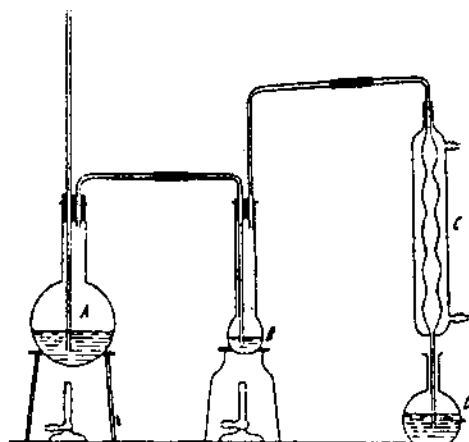
- Máy chưng cất lôi cuốn hơi nước (sơ đồ).
- Pipet.
- Buret.

3. Hoá chất

- Dung dịch axit phosphoric 10%.
- NaOH 0,1N.
- Phenolphthalein 1%.

4. Tiến hành

- Cho vào bầu cất (B) 20 g rí đường, thêm vào 200 ml nước cất và 1 ml dung dịch H_3PO_4 10%



Hình 4.1: Hệ thống chưng cất theo hơi nước:

A - bình tạo hơi nước; B - bình đựng mẫu;
C - sinh hàn; D - bình đựng dịch ngưng

(hoặc 0,5 - 1 ml H_2SO_4 đậm đặc) để đẩy axit bay hơi ra khỏi dạng kết hợp.

- Bình A và bầu cất B được đun trực tiếp trên bếp. Bình A chứa nước cất đã được đun sôi 1 giờ để đuổi hết CO_2 . Hơi từ bình A liên tục sang bầu cất B, sau đấy qua ống làm lạnh và dịch ngưng được thu vào bình D.

- Lấy 300 ml dịch ngưng và đem chuẩn độ bằng NaOH 0,1N với 5 giọt chỉ thị phenolphthalein, đến khi chuyển sang màu hồng nhạt.

5. Kết quả

Lượng axit bay hơi tính theo axit axetic xác định bằng công thức:

$$A_x = \frac{n \times 0,006 \times 100}{m}, \%$$

trong đó:

A_x - lượng axit bay hơi có trong rĩ đường tính theo axit axetic, %;

n - số ml NaOH 0,1N dùng để chuẩn dịch ngưng;

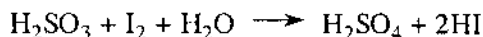
0,006 - số g axit axetic tương ứng với 1 ml NaOH 0,1 N;

m - lượng mẫu, g.

4.8. HÀM LƯỢNG SO_2

1. Nguyên tắc

Dùng iot làm chất oxy hoá trong môi trường axit:



Sau đó dùng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ để chuẩn độ iot dư:



Phản ứng thực hiện trong môi trường axit yếu. Nếu môi trường axit mạnh dùng Na_2CO_3 hoặc NaOH để trung hoà. Nếu môi trường kiềm dùng HCl hoặc axit axetic để trung hoà.

2. Dụng cụ

- Pipet.
- Buret.
- Cốc.
- Bình tam giác.

3. Hoá chất

- Dung dịch I_2 0,1N.
- $Na_2S_2O_3$ 0,1N.

4. Tiến hành

Lấy 50 g mẫu rỉ hoà tan trong nước cất đun sôi, sau đó làm lạnh, định mức đến 100ml, rồi dùng dung dịch này xác định SO_2 .

a - Chuẩn độ trực tiếp

- Kiểm tra độ axit tự do của dung dịch rồi điều chỉnh đến môi trường axit yếu. Sau đó lấy 10 ml dung dịch, chuẩn độ bằng dung dịch iot 0,1N với chỉ thị hồ tinh bột đến màu xanh tươi.

b - Chuẩn độ gián tiếp

- Lấy 10ml dung dịch I_2 0,1N cho vào bình tam giác. Hút 10ml dung dịch mẫu (cắm đầu nhọn của pipet vào dung dịch I_2 trong bình rồi cho từ từ dung dịch mẫu vào để tránh SO_2 bị oxy hoá) Đậy kín bình tam giác lại lắc đều 2 - 3 phút. Chuẩn độ I_2 dư bằng $Na_2S_2O_3$ N/10 (dung dịch từ màu xanh tươi đến mất màu với chất chỉ thị là hồ tinh bột).

5. Kết quả

- Phương pháp trực tiếp:

$$\text{Hàm lượng } SO_2 = \frac{n \cdot 0,0032 \cdot 100}{m}, \%$$

- Phương pháp gián tiếp:

$$\text{Hàm lượng } SO_2 = \frac{(10 - a) \cdot 0,0032 \cdot 100}{m}, \%$$

trong đó :

n - số ml I_2 0,1N dùng để chuẩn (phương pháp chuẩn độ trực tiếp);

a - số ml $Na_2S_2O_3$ 0,1N dùng để chuẩn (phương pháp chuẩn độ gián tiếp);

0,0032 - g SO_2 tương ứng với 1 ml I_2 0,1 N;

m - khối lượng mẫu đã lấy.

4.9. CHẤT KEO

1. Nguyên tắc

Dựa trên tính chất keo tụ của keo háo nước khi thêm 1 lượng lớn rượu

etylic vào. Rượu sẽ lấy đi vỏ hydrat hoá bền vững của keo háo nước. Ngoài ra rượu còn làm giảm độ bền vững của keo do điểm đẳng điện của nó thấp hơn của nước. Quá trình keo tụ tốt trong môi trường axit yếu (pH 4 - 4,5) Vậy cần axit hoá dung dịch rỉ đường bằng HCl đến pH 4 - 4,5. Nồng độ dung dịch khi phân tích tốt nhất là 10 - 12%

2. Dụng cụ

- Bình tam giác.
- Ống sinh hàn.
- Bếp cách thuỷ.
- Giấy lọc.

3. Hoá chất

- Cồn 95% v/v.
- HCl 0,1N.
- Ete etylic.
- Phenolphatalein.

4. Tiến hành

- Cân 15 g rỉ đường, pha loãng tới 10%. Sau đó cứ 100 ml mật rỉ trung tính thêm 5 ml HCl 0,1N sao cho pH của dịch dao động trong khoảng 4-6. Pha loãng thêm nước 1 lần nữa đến nồng độ 5%.

- Lấy 5 ml dung dịch cho vào bình tam giác 100 ml đã có sẵn 50 ml rượu 95% và 2,5 ml ete etylic. Đun cách thuỷ trong nước sôi có ống sinh hàn trong 10 - 20 phút, sau đó làm lạnh và lọc qua giấy lọc đã sấy và cân.

- Rửa kết tủa bằng 80-100 ml hỗn hợp gồm 50 phần cồn, 2,5 phần ete và 5 phần nước và sấy đến trọng lượng không đổi ở $t^0 = 100 - 101^0\text{C}$.

5. Kết quả

Hàm lượng keo (%) tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng keo} = \frac{a \times 5 \times 100}{m}, \%$$

trong đó:

a - trọng lượng cặn kết tủa sau khi sấy, g;

m - khối lượng mẫu có trong dịch phân tích, g;

Chú ý: Có thể lắng keo bằng nước lạnh nhưng lọc và rửa sẽ chậm.

6. Ví dụ

Cân khoảng 15 g rỉ đường, pha loãng với nước cất đến nồng độ 10%. Do đó thu được 110 ml. Cho thêm 5 ml dung dịch HCl 0,1N. Tổng lượng dịch thu được là 115 ml. Lấy 50 ml dịch này để pha loãng thành 100 ml. Lấy 5ml dung dịch này mang đi phân tích.

Lượng rỉ đường có trong 5 ml dịch đem phân tích:

$$m = \frac{15 \times 50 \times 5}{115 \times 100} = 0,325 \text{ , g}$$

Nếu giả sử lượng kết tủa thu được là 0,0215 g thì ta có: Hàm lượng keo trong mật rỉ:

$$x = \frac{0,0215}{0,325} \times 100 = 6,6 \text{ \%}$$

4.10. CHẤT TRO

1. Nguyên tắc

Khi nung nguyên liệu hay sản phẩm thực phẩm ở nhiệt độ 400 - 600°C, các chất hữu cơ cháy và bay hơi, chất vô cơ còn lại, đó là thành phần tro.

2. Dụng cụ

- Cân phân tích có độ chính xác 0,001 g.
- Lò nung điều chỉnh nhiệt độ 600°C.
- Chén nung.
- Bình làm khô.

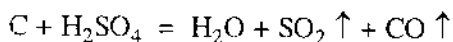
3. Tiến hành

- Lấy 1 hoặc 2 g mật rỉ cho vào chén nung đã được nung trước đến trọng lượng không đổi, thêm 1 ml H₂SO₄ đậm đặc (d=1,84), trộn đều bằng đũa thủy tinh rồi lau đũa bằng 1 ít giấy lọc không tan và bỏ vào chén nung, hoặc chờ cho đến khi H₂SO₄ thấm ướt sản phẩm (mật rỉ), đun cẩn thận trên bếp điện tránh trào đến khi bay hơi hết (sản phẩm màu đen), rồi cho vào lò nung t° = 500 - 600°C (không nên nung ở t° cao quá để tránh tổn thất), đến trọng lượng không đổi trong 1 - 2 giờ. Tro phải trắng hoặc hơi hồng.

Độ tro xác định theo phương pháp này gọi tro sulfat.

$$\text{Độ tro carbonat} = \text{tro sulfat} \times 0,9.$$

Dùng H_2SO_4 là chất oxy hoá để tăng nhanh sự cháy của hợp chất C, bản thân nó khử đến SO_2



Ta nhận được tro gọi là tro sulfat. Vì tro carbonat và clorit chuyển vào sulfat nên trọng lượng tro tăng lên và lớn hơn thực tế.

4. Kết quả

Hàm lượng chất tro T (%) tính theo công thức :

$$T = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100, \%$$

trong đó:

m_2 - trọng lượng chén nung và mẫu trước khi nung, g;

m_3 - trọng lượng chén nung và mẫu sau khi nung, g;

m_1 - trọng lượng chén nung, g.

4.11. HÀM LƯỢNG CANXI

1. Nguyên tắc

Một số chất màu hữu cơ phức tạp tác dụng với các ion Ca^{2+} và Mg^{2+} cho một phức chất hoà tan có màu thẫm. Những chất này được dùng làm chất chỉ thị. Thường là eriocrom đen (ET-OO), hoặc cromogen xanh đen. Nếu có ion Ca^{2+} hoặc Mg^{2+} chúng cho màu đỏ nho, nếu không có cho màu xanh.

Muối natri của axit ethylen diamin tetraaxetic (EDTA) tác dụng với Ca^{2+} và Mg^{2+} cho 1 phức chất không màu bền vững. Nếu cho EDTA vào dung dịch có Ca^{2+} và Mg^{2+} đã cho chất chỉ thị (dung dịch có màu đỏ nho), EDTA sẽ tác dụng với Ca^{2+} và Mg^{2+} tạo thành 1 phức chất khác không màu, dung dịch chuyển thành màu xanh (không còn Ca^{2+} và Mg^{2+}).

Hàm lượng Ca^{2+} và Mg^{2+} trong dung dịch càng nhiều thì lượng EDTA cần để thay đổi màu càng nhiều. Do đó dựa vào lượng EDTA dùng định phân tính ra được lượng Ca^{2+} và Mg^{2+} .

Phương pháp này xác định được cả Ca^{2+} và Mg^{2+} .

Đối với các sản phẩm trong sản xuất đường điều này có ý nghĩa thực tế vì cả Ca^{2+} và Mg^{2+} đều ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm. Tuy vậy muốn xác định ion Ca^{2+} riêng nên dùng chất chỉ thị Murexit.

Phản ứng xác định Ca^{2+} và Mg^{2+} thực hiện trong môi trường $\text{pH} = 8 - 10$. Vì vậy phải cho dung dịch đệm vào dung dịch là hỗn hợp $\text{NH}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$

2. Hoá chất

- Dung dịch EDTA N/28: cân 6,7 g EDTA định mức trong 1 lít nước cất. Chuẩn lại dung dịch bằng clorua canxi N/28. (Điều chế bằng cách cân 1,7 g CaCO_3 đã sấy ở 110°C cho thêm 1 ít nước vào bình định mức 1 lít, thêm 2 ml HCl đậm đặc, sau đó cho từng giọt axit đến khi hoàn toàn không còn CO_2 và CaCO_3 hoà tan hết, rồi rót nước cất đến vạch định mức). Trilon B là dung dịch bền trong thời gian bảo quản.

- Dung dịch đệm amoniac: 100 ml NH_4Cl 20% và 100 ml amoniac 20% cho nước cất đến vạch bình định mức 1 lít (lưu ý chỉ cần pha 100 ml dung dịch đệm amoniac vì không dùng nhiều).

- Chất chỉ thị ET-OO (dung dịch eriocrom đen 0,5%): 0,5 g eriocrom đen hoà tan trong 10 ml dung dịch đệm amoniac, thêm rượu etylic đến 100 ml. Sau 24 giờ rót sang bình chứa, cặn bỏ đi.

3. Dụng cụ

- Bình tam giác 250 ml.
- Pipet.
- Buret.
- Ống đong.

4. Tiến hành

- Lấy 1 g mẫu ri cho vào bình tam giác 250ml + 100ml nước cất, thêm 5ml dung dịch đệm + 7 đến 8 giọt chỉ thị ET-OO. Định phân bằng EDTA N/28 đến khi dung dịch có màu xanh lá cây. Làm thí nghiệm trắng với nước cất.

- Nếu muốn chính xác lấy 1g ri đường tro hoá dung dịch bằng cách nung trong lò nung đến 800°C . Hoà tan bằng axit và trung hoà đến $\text{pH} 8 - 10$ rồi tiến hành như trên

5. Kết quả

Hàm lượng CaO tính theo % trọng lượng là:

$$\text{CaO} = \frac{a - b}{A} \times 100, \%$$

trong đó:

- a - lượng EDTA dùng định phân trong thí nghiệm thực, ml;
- b - lượng EDTA dùng định phân trong thí nghiệm trắng, ml;
- A - lượng mẫu thí nghiệm, g;
- 1 ml EDTA (trilon B) N/28 $\approx$ 1 mg CaO.

Chú ý:

- Màu của dung dịch rất khó nhận, do đó phải có thói quen và thận trọng.
- Khi làm thí nghiệm trắng: Nếu cho chỉ thị ET-OO vào 100 ml nước cất nó có màu đỏ nho thì chuẩn bằng EDTA vì có Ca^{2+} , nếu không có cho màu xanh.

Chương 5

PHÂN TÍCH HOA HOUBLON

5.1. ĐỘ ẨM

5.1.1. Phương pháp sấy

1. Mục đích

Xác định hàm lượng ẩm trong hoa houblon dạng bột hoặc dạng viên bằng trọng lượng mất đi khi sấy khô.

2. Nguyên tắc

Các mẫu hoa houblon bột hoặc viên được sấy trong 1h với nhiệt độ 103 – 104°C. Hàm lượng ẩm của mẫu được tính từ khối lượng mất đi trong quá trình sấy.

3. Dụng cụ

- Bình hút ẩm có silicagel.
- Cốc cân có nắp đậy kín.
- Tủ sấy, điều chỉnh nhiệt độ 103 – 104°C.
- Cân phân tích, độ chính xác đạt $\pm 0,001$ g

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Các mẫu hoa cánh hoặc dạng bột thì sử dụng nguyên mẫu, hoa viên nghiền ngay trước khi phân tích. Chú ý thời gian để mẫu tiếp xúc không khí càng ít càng tốt, khi lấy mẫu từ bao vào đĩa cân (đậy nắp ngay). Nếu hoa được bảo quản trong tủ lạnh, thì phải làm ấm tới nhiệt độ phòng trước khi cân.

- Lấy khoảng 3 – 5 g hoa houblon vào cốc cân đã biết trước trọng lượng. Đậy nắp và cân với độ chính xác 0,001 g.

- Mở nắp và đặt cốc vào tủ sấy đã đạt nhiệt độ 103 – 104°C. Sau 1 giờ sấy, đậy nắp lại và lấy ra khỏi tủ sấy, làm nguội trong bình hút ẩm ít nhất 20 phút để đạt nhiệt độ phòng. Cân lại với độ chính xác 0,001 g.

5. Kết quả

Độ ẩm (%) của mẫu tính theo công thức:

$$\text{Độ ẩm} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100, \% \text{ (m/m)}$$

trong đó:

m_1 - khối lượng mẫu trước khi sấy, g;

m_2 - khối lượng mẫu sau khi sấy, g.

Phương pháp này cho biết lượng tiêu hao trong quá trình sấy mà không phải hàm lượng ẩm thực và có thể làm mất tinh dầu trong hoa.

Đối với hoa tươi (độ ẩm khoảng 80%) phải sấy sơ bộ trong 3 giờ.

5.1.2. Phương pháp trích ly

1. Mục đích

Xác định hàm lượng ẩm trong cho các loại nguyên liệu như hoa houblon - chứa nhiều chất bay hơi.

1. Nguyên tắc

Phương pháp này dựa vào tính chất và khả năng của một số dung môi hữu cơ dễ bay hơi và kéo theo lượng nước chứa trong nguyên liệu. Các dung môi thường dùng là toluen, xylene $C_6H_4(CH_3)_2$, v.v...

3. Hoá chất

- Toluen, $d = 0,78$.

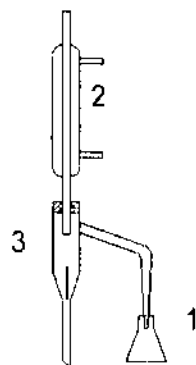
2. Dụng cụ:

- Bộ trích ly (hình 5.1).

- Cân phân tích.

4. Tiến hành

- Cân 10 - 25 g hoa houblon đã nghiền nhỏ và cho vào bình (1), rót 100 - 150 ml toluen. Nối bình với ống (3) và sinh hàn (2) (như hình bên). Tiến hành đun sôi



Hình 5.1: Bộ trích ly.

dịch trong bình với tốc độ cao sao cho mỗi phút có 2 giọt chất lỏng rơi xuống ống (3). Tiếp tục đun cho đến lúc lượng nước trong ống (3) không tăng nữa. Thời gian đun tùy thuộc vào độ ẩm và lượng nguyên liệu, thường vào khoảng 30 - 45 phút.

- Đun xong ta thấy nước trong ống (3) chia thành 2 lớp: toluen có tỷ trọng $d = 0,78$ nhẹ hơn nước nên nổi lên trên còn nước lắng xuống dưới. Căn cứ mặt phân cắt giữa 2 chất lỏng ta biết được lượng nước đã trích ly ra từ nguyên liệu.

Kết quả

Độ ẩm (W) của hoa tính theo công thức sau:

$$W = \frac{a}{m} \times 100, \%$$

trong đó: a - số ml nước đọc trong ống chia độ (3) (coi khối lượng riêng của nước bằng 1 g/ml);

m - số gam hoa houblon đã dùng.

Các loại hoa houblon bảo quản tốt có độ ẩm từ 6 - 8%. Trong sản xuất thì độ ẩm của hoa có thể tăng lên từ 10% tới 14%, vì vậy cần xác định độ ẩm trước khi sử dụng để định lượng chất khô trong hoa chính xác hơn. Hoa houblon được bảo quản ở nơi mát, lạnh, khô ráo để chất lượng hoa không bị thay đổi nhiều trong điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm.

5.2. CHẤT ĐẮNG TRONG HOA VÀ CÁC SẢN PHẨM CỦA HOA HOUBLON

5.2.1. Phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ

1. Mục đích

Xác định hàm lượng chất đắng tổng số trong hoa houblon. Áp dụng cho mọi loại sản phẩm của hoa houblon.

2. Nguyên tắc

Các axit đắng trong hoa houblon được chiết ra bằng ete etylic và cho phản ứng với dung dịch KOH. Lượng chất đắng suy ra từ lượng KOH đã phản ứng.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác có nút mài, 100 ml.
- Bình tam giác 250 ml.
- Buret chuẩn độ 10 ml.

3. Hóa chất

- Ete etylic.

- Dung dịch KOH 0,02N trong cồn. Cân 1,2 g KOH pha thành 1 lít với cồn 90% (v/v). Nếu có sẵn dung dịch KOH 0,1N trong nước thì lấy 20 ml cho vào bình định mức 100 ml rồi thêm cồn 90% (v/v) đến vạch.

- Chất chỉ thị phenolphthalein 0,05% pha trong cồn 96 độ.

4. Tiến hành

Cân 2 g hoa houblon đã nghiền nhỏ hoặc xé nát, cho vào bình tam giác nút mài 100 ml. Cho tiếp vào bình 60 ml ete etylic, đậy kín bình, lắc đều, cứ 5 phút lắc 1 lần trong vòng 1 h đầu. Sau đó để yên 1 h cho lắng trong. Dùng pipet hút lấy 2 mẫu, mỗi mẫu 10 ml dịch trong cho vào bình tam giác 250 ml (sạch, khô) và chuẩn độ bằng dung dịch KOH 0,02N đến xuất hiện màu gạch sẫm với chỉ thị là 3 - 4 giọt phenolphthalein.

5. Kết quả

Hàm lượng chất đắng chung được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng chất đắng} = \frac{a \times 0,008 \times 60 \times 100}{m \times 10}, \%$$

trong đó:

a - thể tích dung dịch KOH 0,02N tiêu hao khi chuẩn độ, ml;

m - số gam mẫu đã lấy;

60 - thể tích ete etylic đã dùng trong thực nghiệm, ml;

10 - số ml mẫu được chuẩn độ bằng dung dịch KOH 0,02N;

0,008 - số gam chất đắng tương đương 1 ml dung dịch KOH 0,02N (lấy trọng lượng phân tử chất đắng là 400).

5.2.2. Phương pháp Ganzlin cải tiến từ phương pháp Wollmer

1. Mục đích

Xác định các thành phần nhựa trong hoa houblon và giá trị độ dẫn chì trên dung dịch gốc của hoa houblon và các sản phẩm hoa dạng bột, viên hoặc cao hoa. Phương pháp được áp dụng cho mọi loại sản phẩm của hoa houblon.

Chú ý: loại hoa dạng ép, bột, viên phải nghiền trong máy nghiền thích hợp. Có thể dùng máy nghiền gia vị hoặc cà phê để nghiền mịn hoa viên. Nguyên liệu được đồng nhất ngay trước khi phân tích và lấy một mẫu đại diện.

Hệ số đối với dung dịch axetat chì phải kiểm tra thường xuyên. Các điện cực platin trắng phải rửa sạch bằng dung dịch rửa điện cực. Các bình tam giác phải có nắp kín để không làm bay hơi chất chiết.

Nhiệt độ bình cách thủy và áp suất chân không của bơm chân không (20mbar) phải được điều chỉnh chính xác. Hạt hút ẩm phải sạch, mới. Trong khi phân tích cần tránh ánh sáng, nhiệt và oxy.

2. Nguyên tắc

Nghiền mịn các mẫu hoa, chiết các chất đáng bằng hỗn hợp dietyl ete-methanol. Các cấu tử chiết ra phân bố giữa dung dịch axit methanolic và dietyl ete. Sau đó các chất đáng chiết ra bằng ete sẽ bị cắt tùy theo độ hòa tan khác nhau của chúng trong methanol lạnh và hexan tạo thành nhựa tổng số, nhựa cứng, nhựa mềm.

- Giá trị độ dẫn chì của những chất đáng chiết được và hàm lượng nhựa β bằng hiệu số giữa hàm lượng nhựa mềm và độ dẫn chì.

- Hàm lượng nhựa cứng bằng hiệu số giữa hàm lượng nhựa tổng số và nhựa mềm.

3. Dụng cụ

- Bình tam giác 250 ml có nút mài, bình tam giác 100 ml.
- Phễu thủy tinh miệng rộng kích thước phù hợp, có nắp đậy, giấy lọc.
- Ống ly tâm 100 - 110 ml có nắp kín.
- Pipet 10, 30, 40, 50 và 100 ml.
- Bơm hút chân không, cùng các ống nối.
- Bình tam giác có vạch định mức, 50 ml.
- Chai chứa dung dịch rửa.
- Cốc thủy tinh có mỏ, dáng cao, 100 ml.
- Bông thấm nước.
- Bình hút ẩm, silicagel.
- Dụng cụ chuẩn độ đo độ dẫn tự động hoặc kèm theo điện cực và thanh dẫn, dùng điện cực platin trắng. Nếu các điện cực có lớp thủy tinh bảo vệ thì lớp vỏ đó phải có lỗ để không khí thoát ra hết và dung dịch phản ứng ngập toàn bộ bề mặt điện cực. Chú ý: Giữ gìn cẩn thận bộ chuẩn độ để không gây sai số.
- Máy khuấy từ và microburet vạch chia 0,01 ml để chuẩn độ bằng tay.
- Cân phân tích với độ chính xác 0,05 g.
- Máy lắc.
- Máy ly tâm.

- Bình ổn nhiệt đặt 20°C và bình làm nguội 0°C.
- Thiết bị bốc hơi quay tròn với bình cách thủy đặt 70°C.
- Bơm nước để tạo áp suất chân không ít hơn 20 mbar cho máy hút chân không.

4. Hóa chất

- Axit clohydric 0,1 N.
- Dietyl ete, hàm lượng nước $\leq 0,2\%$, không có peroxit.
- Clorua metylen.
- Methanol.
- *n*-Hexan, độ tinh khiết dựa vào các chất còn dư sau khi chưng cất và phân tích sắc ký khí.
- Hỗn hợp ethanol dimethylsulfoxid 94 + 6 (v/v). Trộn 6 phần dimethylsulfoxid với 94 phần ethanol 96 % (v/v).
- Dung dịch axetat chì 20 g/l.
- Dung dịch rửa điện cực với chất lỏng màu vàng hỗn hợp axit axetic methanol đậm đặc 1 + 1 (v/v).
- Dung dịch rửa điện cực có chất lỏng màu trắng. Hòa tan 2 g EDTA (ethylen-diamin-tetraaxetic disodium salt dihydrat) $(\text{CH}_2\text{N})_2(\text{CH}_2\text{COOH})$. $(\text{CH}_2\text{COOHNa}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong 100 ml dung dịch NaOH 0,2 mol/l. Dung dịch này chỉ ổn định trong vài ngày.
- CO_2 hoặc N_2 (áp suất 0,2 bar).

Chuẩn bị dung dịch gốc

- Nghiền hoa houblon hoặc hoa viên. Cân chính xác 10 g hoa đã nghiền mịn hoặc hoa dạng bột cho vào bình tam giác dung tích 250 ml đã chuẩn bị trước. Cho vào đó 20 ml methanol và 100 ml dietyl ete (20°C). Đậy nắp bình và đặt vào máy lắc, lắc trong 30 phút. Thêm 40 ml HCl 0,1 N. Đậy nắp bình và lắc mạnh khoảng 10 phút với tốc độ cao nhất. Giữ yên trong 10 phút để phân tách các pha. Hút 40 ml ete trong vào bình đáy bằng và thêm 20 ml clorua metylen, cho thêm dung môi này để nước không bay hơi khỏi ete.

- Loại bỏ các dung môi bằng cách lắc ở 70°C. Bật bơm hút chân không để đun sôi liên tục. Sau khi bay hơi, phun 5 ml methanol xung quanh chỗ mở ống hút khí nối với bình, giảm độ nghiêng của bình. Lắc bình tới khi methanol hoà

tan hết chất chiết trên thành bình. Tháo bình, thêm 5 – 10 ml methanol. Gạn dung dịch methanolic trong dịch chiết vào bình thể tích 50 ml. Rửa kỹ bình tam giác bằng methanol.

- Trộn đều dung dịch trong bình bằng cách lắc nhẹ và thêm methanol tới vạch định mức. Chính hỗn hợp tới 20°C và thêm methanol tới gần bình. Đậy nắp bình, để yên trong bồn nước 0°C trong một giờ để lắng các chất nhựa của hoa. Lọc dịch chiết methanol lạnh vào một bình 50 ml khác, đậy nắp phễu. Chính nhiệt độ dịch lọc trong bình tới 20°C. Không cần dịch lọc tới vạch định mức. Đây là dịch gốc.

5. Tiến hành

a) Xác định nhựa tổng số

- Lấy 10 ml dịch gốc vào bình tam giác 100 ml sạch khô (bình được để trong bình hút ẩm ít nhất 30 phút). Loại bỏ methanol bằng cách chưng cất, dùng thiết bị bốc hơi quay tròn, tại nhiệt độ khoảng 70°C với áp suất chân không nhỏ.

- Để làm khô phần kết tủa, tháo bình khỏi thiết bị bốc hơi quay và nối vào máy hút chân không. Làm khô phần kết tủa ở 70°C trong 6 phút với áp suất chân không cao (nhỏ hơn 20 bar). Xả áp và hút hết không khí ra khỏi bình. Làm khô bình cẩn thận bằng vải mềm, để yên 30 phút trong bình hút ẩm và cân.

b) Xác định nhựa mềm

- Hút lấy 10 ml dịch gốc vào một ống ly tâm (100 – 110 ml). Thêm 5 ml methanol và 40 ml *n*-hexan bằng pipet. Đậy nắp ống ly tâm, lắc kỹ, mở nắp và thêm 10 ml dung dịch HCl 0.1N. Đậy nắp ống ly tâm và lắc mạnh trong khoảng 30 giây bằng tay, sau đó lắc tiếp bằng máy lắc trong 5 phút. Ly tâm trong 2 phút với tốc độ 2000 vòng/phút để phân tách các pha.

- Hút 30 ml phần hexan trong ở phía trên vào bình tam giác 100 ml sạch và khô (để 30 phút trong bình hút ẩm). Dùng thiết bị bốc hơi quay để làm bay hơi hexan dưới áp suất thấp ở 70°C (đóng van khí). Nhấc bình ra khỏi thiết bị bốc hơi quay và nối vào máy hút chân không làm khô phần kết tủa trong bình ở 70°C trong 6 phút dưới áp suất chân không cao (< 20 mbar). Xả áp suất từ từ, hút hết không khí ra khỏi bình. Làm khô bình bằng vải mềm và đặt vào bình hút ẩm trong 30 phút. Cân bình.

c) *Xác định giá trị độ dẫn chì*

- Hút 10 ml dịch gốc vào cốc thủy tinh 100 ml và thêm 40 ml hỗn hợp ethanol/DMSO. Nhúng ngập đầu điện cực, khuấy bằng máy khuấy từ. Chú ý không để bọt khí bám xung quanh điện cực. Đặt microburet có chứa dung dịch axetat chì sao cho đầu buret ngập vào dung dịch 3 - 4 cm, tiến hành chuẩn độ.

- Chuẩn độ tự động hoặc chuẩn độ bằng tay: Thả dung dịch axetat chì từ buret vào cốc từng phần 0,25 ml và ghi độ dẫn sau mỗi lần thêm dung dịch. Tiếp tục cho qua điểm nhảy tới khi đạt một đường thẳng. Dựng đồ thị giá trị độ dẫn tương ứng với thể tích dung dịch axetat chì đã dùng chuẩn độ.

d) *Xác định điểm cân bằng*

- Vẽ đồ thị giữa độ dẫn và thể tích dung dịch axetat chì đã dùng, bao gồm điểm đầu tiên của đường thẳng thể hiện tăng độ dẫn liên tục.

- Ghi điểm cuối điểm cắt của 2 đường thẳng.

6. Kết quả

$$\text{- Hàm lượng nhựa tổng số \%} = \frac{\text{Khối lượng phần kết tủa (g)} \times 1250}{\text{Khối lượng mẫu}}$$

$$\text{- Hàm lượng nhựa mềm \%} = \frac{\text{Khối lượng phần kết tủa (g)} \times 1660}{\text{Khối lượng mẫu}}$$

$$\text{- Độ dẫn chì \%} = \frac{\text{Thể tích axetat chì (ml)} \times T \times 23,58}{\text{Khối lượng mẫu}}$$

Với T = hệ số của dung dịch axetat chì.

$$\text{- } \beta\text{-fraction \%} = \text{Hàm lượng nhựa mềm} - \text{Độ dẫn chì.}$$

$$\text{- Hàm lượng nhựa cứng \%} = \text{Hàm lượng nhựa tổng} - \text{Hàm lượng nhựa mềm.}$$

5.3. CHẤT ĐẮNG TRONG CAO HOA

1. Mục đích

Xác định các thành phần nhựa đắng và độ dẫn chì của cao hoa, sử dụng phương pháp Wöllmer đã được Ganzlin cải tiến. Phương pháp áp dụng cho mọi loại cao hoa.

2. Nguyên tắc

Các chất đắng của hoa phân bố giữa pha dung dịch axit và methanolic, diethyl ete. Chất đắng sau khi chiết ra bằng ete được phân cất tùy theo tính hòa tan trong methanol và hexan lạnh như nhựa tổng số và nhựa mềm.

Hàm lượng nhựa cứng bằng hiệu số giữa hàm lượng nhựa tổng và nhựa mềm. α -axit được phân tách khỏi nhựa β trong nhựa mềm do α -axit có thể chuyển thành dạng muối chì (giá trị độ dẫn chì).

2. Dụng cụ

- Xem phần 5.2.2

3. Hóa chất

Chuẩn bị dung dịch gốc:

- Dùng thìa lấy một lượng mẫu tương ứng khoảng 0,6 - 0,7 g nhựa tổng (vết), gạt lên thành ống ly tâm thủy tinh và cân đủ 1 mg. Cho 20 ml HCl 0,1 N và 50 ml ete vào, đậy chặt nắp, lắc đều trong 5 phút, rồi lắc (dùng tay hoặc máy lắc) cho tới khi toàn bộ lượng mẫu tan hoàn toàn. Mở nắp và thêm 10 ml methanol. Đậy nắp chặt và lắc đều hỗn hợp ít nhất 15 phút. Ly tâm trong 2 phút với tốc độ 2000 vòng/phút.

- Hút 40 ml phần ete trong phía trên vào bình tam giác, thêm vào đó 20 ml clorua methylen, dung môi này để tránh làm bay hơi nước khỏi ete khi bốc hơi.

4. Tiến hành

- Các bước tiếp theo giống như phần 5.2.2.

5. Kết quả

$$\text{- Hàm lượng nhựa tổng} = \frac{\text{Khối lượng phần kết tủa (g)} \times 625}{\text{Khối lượng mẫu}}, \%$$

$$\text{- Hàm lượng nhựa mềm} = \frac{\text{Khối lượng phần kết tủa (g)} \times 1660}{\text{Khối lượng mẫu}}, \%$$

$$\text{- Độ dẫn chì} = \frac{\text{Thể tích axetat chì (ml)} \times T \times 23,58}{\text{Khối lượng mẫu}}, \%$$

T - hệ số của dung dịch axetat chì.

$$\text{- Hàm lượng nhựa } \beta \% = \text{Hàm lượng nhựa mềm} - \text{Độ dẫn chì.}$$

$$\text{- Hàm lượng nhựa cứng \%} = \text{Hàm lượng nhựa tổng} - \text{Hàm lượng nhựa mềm.}$$

5.4. α VÀ β -AXIT ĐẰNG

(Phương pháp HPLC)

1. Mục đích

Phương pháp này dùng phép phân tích sắc ký lỏng cao áp để xác định α và β -axit đắng cho mọi loại chế phẩm hoa houblon dạng bột, cao hoa.

2. Nguyên tắc

Hoa houblon và các chế phẩm hoa dạng bột, α và β -axit được chiết ra bằng hỗn hợp dietyl ete/methanol và dung dịch axit HCl từ hoa houblon nghiền mịn và hoa dạng bột. Ete hòa tan α và β -axit tách bởi pha nghịch đảo HPLC và đo quang phổ ở bước sóng 314 nm.

Cao hoa hòa tan trong methanol, α và β -axit được phân tách bằng pha nghịch đảo HPLC và đo quang phổ ở bước sóng 314 nm.

3. Dụng cụ

- Cân phân tích với độ chính xác 0,1 mg.
- Máy nghiền hoa thích hợp cho mỗi loại hoa.
- Máy lắc.
- Bồn siêu âm.
- Chai thủy tinh 250 ml, có nắp chặt.
- Bình định mức 50 – 100 ml.
- Máy HPLC có bộ dò UV với bước sóng tới 314 nm và bộ tích phân điện tử.
- Cột phân tích HPLC, 250 $\times$ 4 mm, được nạp đầy 5 μ m ODS RP18.
- Tiền cột HPLC thích hợp để bảo vệ cột phân tích.

4. Hóa chất

- Dietyl ete không có peroxyt, kiểm tra bằng que thử.
- Methanol.
- Axit phosphoric 85%, d= 1,71.
- Dung dịch HCl, c= 0,1 N.
- Dung dịch tách rửa làm pha động, trộn methanol/ nước/ axit H₃PO₄ theo tỷ lệ 85:17:0,25 (theo thể tích).
- Cao hoa chuẩn với thành phần α và β -axit biết trước.

5. Tiến hành

- Kiểm tra cao hoa: trộn đều mẫu. Cân lượng cao tương ứng với 0,5 g nhựa tổng cho vào cốc dung tích 50 ml.

- Thêm 300 ml methanol và hoà tan cao hoa trong bồn siêu âm.

- Đổ toàn bộ dung dịch cao đó vào bình định mức 100 ml và định mức bằng methanol. Lắc trộn kỹ hỗn hợp. Lấy 10 ml dung dịch vào bình định mức 50 ml, định mức bằng methanol.

- Trộn đều hỗn hợp. Lọc hoặc ly tâm dung dịch. Dịch lọc thu được chính là mẫu để xác định HPLC. Bảo quản mẫu ở nhiệt độ thấp và tránh ánh sáng. Mẫu ổn định trong vòng 24 giờ. Chú ý: Việc dùng cao hoa chuẩn có hàm lượng α và β axit đã biết được sử dụng để hiệu chỉnh thiết bị HPLC.

- Chạy máy với mẫu cao hoa chuẩn ít nhất 2 lần trước và sau khi tiến hành đo các mẫu khác. Bảo quản cao hoa chuẩn trong tủ lạnh.

a) Hoa houblon và các sản phẩm hoa dạng bột

- Nghiền hoa, bột hoa hoặc hoa viên bằng máy nghiền phù hợp. Cân chính xác 10 g mẫu đã nghiền thành bột mịn (m_x) cho vào chai thủy tinh 250 ml, thêm vào 20 ml methanol và 100 ml dietyl ete. Đậy chặt nắp bình, lắc kỹ trong 30 phút. Mở nắp bình và thêm 40 ml dung dịch HCl 0,1 N. Đậy nắp và lắc trong khoảng 10 phút. Để yên trong 10 phút để phân tách các pha dung môi.

- Lấy 5 ml pha ete phía trên vào bình định mức 50 ml, định mức bằng methanol. Trộn đều hỗn hợp rồi lọc hoặc ly tâm. Phân tích mẫu bằng HPLC. Bảo quản mẫu ở nhiệt độ thấp, tránh ánh sáng. Mẫu ổn định trong 24 giờ.

b) Cao hoa

Những loại cao hoa có nhựa tinh khiết cũng tiến hành như phương pháp trên.

Phân tích sắc ký

- Bật máy HPLC. Cho dung dịch rửa chảy với tốc độ 0,8 ml/ phút. Kiểm tra toàn bộ hệ thống. Bật bộ dò UV tới 314 nm. Nối đường dẫn mẫu 10 microlít. Để dung dịch rửa chạy ít nhất 30 phút trước khi chạy bất kỳ một mẫu nào.

- Bật bộ ghi/ hệ thống. Cho mẫu chạy. Rửa khoảng 35 phút. Thực hiện ít nhất 2 lần cho mỗi mẫu.

6. Kết quả

- Các cấu tử riêng biệt, cohumulon, n+adhumulon, colupulon, và n+adlupulon, được tính theo công thức:

$$C_i = \frac{DF \cdot m_{cs} \cdot C_{ic} \cdot A_i}{m_s \cdot A_{ic}}$$

trong đó:

C_i - nồng độ cấu tử i trong mẫu tính theo phần trăm khối lượng;

DF - hệ số pha loãng, DF = 1 đối với cao hoa hoặc DF = 2 đối với các sản phẩm khác của hoa houblon và hoa dạng bột;

m_{cs} - khối lượng cao hoa chuẩn, g;

C_{ic} - nồng độ cấu tử i trong cao hoa chuẩn tính theo phần trăm khối lượng;

A_i - diện tích pic của cấu tử i khi phân tích mẫu (tính trung bình);

m_s - khối lượng mẫu;

A_{ic} - diện tích pic của cấu tử i khi chạy mẫu chuẩn (tính trung bình).

- Tính hàm lượng α -axit: C_α của mẫu theo % khối lượng bằng tổng các cấu tử α -axit cohumulon, C_{coh} và n- adhumulon, C_{n+adh}

$$C_\alpha = C_{coh} + C_{n+adh}$$

- Tính hàm lượng β -axit: C_β của mẫu theo % khối lượng bằng tổng các cấu tử β -axit colupulon, C_{col} , và n + adlupulon, C_{n+adl} :

$$C_\beta = C_{col} + C_{n+adl}$$

Chú ý:

- Khi phân tích sắc ký có một pic nhỏ ở thời gian lưu khoảng 13,5 phút, điều đó chứng tỏ quá trình phân tách hoàn toàn. Pic nhỏ đó cần được tách khỏi pic cohumulon trước khi nhận xét kết quả. Nếu độ phân giải không đủ, đặc biệt đối với pic này thì có thể thay đổi hàm lượng nước của dung dịch rửa.

- Cohumulon có thời gian lưu khoảng 12,5 phút, n+ adhumulon: 15,5 phút, Colupulon: 23,0 phút, n+ adlupulon: 30 phút.

- Cao hoa chuẩn phải bảo quản trong tủ lạnh và phải thay hàng năm.

Chương 6

PHÂN TÍCH QUẢ

6.1. HÀM ẨM

Xác định hàm lượng nước có trong quả cho phép dự đoán khả năng thu hồi dịch quả và đánh giá sơ bộ hàm lượng chất khô có trong quả. Để xác định hàm ẩm, có thể sử dụng phương pháp sấy đến trọng lượng không đổi.

1. Nguyên tắc

Quả được sấy sơ bộ ở nhiệt độ 50°C, sau đó sấy tiếp ở nhiệt độ 105°C ± 1,5°C đến trọng lượng không đổi. Hàm lượng nước được tính toán dựa trên khối lượng mất đi của quả trong quá trình sấy.

2. Dụng cụ và thiết bị

- Tủ sấy có điều chỉnh nhiệt độ.
- Cốc nhôm sấy có nắp đậy.
- Bình hút ẩm.
- Cân với độ chính xác 0,001 gam.

3. Tiến hành

Cân 20 g quả bỏ hạt, sấy sơ bộ trong tủ sấy ở 50°C trong 1 giờ và tiếp tục sấy ở 105°C trong 30 phút. Để nguội trong bình hút ẩm và cân lại. Sau đó đem nghiền nhỏ và lấy 5 g cho vào cốc cân đã biết trước trọng lượng, sấy ở 105°C trong thời gian khoảng 3 giờ, làm nguội trong bình hút ẩm và cân. Đặt cốc vào tủ sấy, sấy tiếp 30 phút, sau đó lại làm nguội và cân. Quá trình sấy coi như kết thúc khi sai số giữa 2 lần cân không quá 0,001 g.

4. Kết quả

Hàm lượng nước trong quả (W) được tính theo công thức sau:

$$W = 100 \times \left(1 - \frac{m_2 \times m_4}{m_1 \times m_3} \right), \%$$

trong đó:

m_1 - khối lượng quả mang đi sấy sơ bộ, g;

m_2 - khối lượng quả còn lại sau khi sấy sơ bộ, g;

m_3 - khối lượng quả mang đi sấy lần 2, g;

m_4 - khối lượng quả còn lại sau khi sấy lần 2, g.

6.2. KHỐI LƯỢNG TRUNG BÌNH 1 QUẢ

1. Nguyên tắc

Đếm số quả có trong mẫu phân tích. Cân để biết khối lượng của mẫu. Khối lượng trung bình của 1 quả có được bằng cách chia khối lượng của mẫu cho số quả có trong mẫu phân tích.

2. Dụng cụ

- Cân phân tích với độ chính xác 0,01 g.

3. Tiến hành

- Lấy số lượng quả thích hợp tùy thuộc từng loại quả, khối lượng của mẫu lấy tối thiểu là 50 g. Với các quả có kích thước nhỏ (nho, mơ...) thì nên lấy số lượng quả ít nhất là từ 50 – 100 quả.

- Đem số lượng quả đã chọn mang đi cân.

5. Kết quả

Tính khối lượng trung bình 1 quả theo công thức sau:

$$m = \frac{M}{n}$$

trong đó:

m - khối lượng trung bình 1 quả, g;

M - khối lượng toàn lô mẫu đã cân, g;

n - số lượng quả trong lô mẫu đã cân.

6.3. CHIẾT DỊCH QUẢ

Phân tích hàm lượng chất hoà tan, axit hay các thành phần khác có trong quả đều xác định trên dịch quả vì vậy cần phải chiết dịch quả từ mẫu quả phân tích và làm trong bằng cách lọc (nếu thấy cần thiết).

6.3.1. Dụng thiết bị

Dùng máy nghiền ly tâm hoặc máy lọc ép phòng thí nghiệm để tách dịch quả ra khỏi bã. Nếu dịch quả nghiền hay ép còn đục thì cần lọc bằng giấy lọc và đồng nhất dịch lọc trước khi mang đi phân tích.

6.3.2. Dùng nhiệt

Cân 25-30 g quả (bỏ hạt nếu có), nghiền nhỏ và chuyển vào bình định mức 250 ml, thêm nước cất đến 3/4 thể tích bình và đun cách thủy ở 70 - 80°C trong vòng 30 - 45 phút, thỉnh thoảng lắc đều để hoà tan tốt hơn. Sau đó làm nguội đến 20°C, dùng nước cất định mức đến gần bình và đem lọc. Lấy dịch trong mang đi phân tích.

6.4. HÀM LƯỢNG CHẤT HÒA TAN

6.4.1. Phương pháp lý học

6.4.1.1. Đo tỷ trọng

1. Nguyên tắc

Thông thường giữa tỷ trọng của dịch quả với lượng chất hoà tan có trong đó liên quan mật thiết với nhau. Do vậy, từ tỷ trọng của dịch có thể xác định được hàm lượng chất hoà tan. Hàm lượng chất hoà tan có trong dịch càng lớn thì tỷ trọng của dịch sẽ càng lớn.

2. Dụng cụ

- Thiết bị dùng để đo tỷ trọng (tỷ trọng kế, bình đo tỷ trọng).
- Nhiệt kế.

3. Tiến hành

- Chiết dịch quả theo một trong các phương pháp nêu trên (xem 6.3).
- Đo nhiệt độ của dịch quả.
- Đo tỷ trọng của dịch quả bằng các thiết bị đo như tỷ trọng kế hoặc bình tỷ trọng.

4. Kết quả

Dựa trên các kết quả đo được và nhiệt độ của dịch để xác định tỷ trọng thực của dịch.

Nếu nhiệt độ của dịch khác 20°C phải dựa vào phụ lục 4 (bảng hiệu chỉnh tỷ trọng đo được về 20°C) để chọn các hệ số hiệu chỉnh quy tỷ trọng của dịch về nhiệt độ chuẩn 20°C.

Tỷ trọng của dịch quả ở nhiệt độ 20°C (d_{20}^{20}) được tính như sau:

Khi nhiệt độ đo < 20°C thì d_{20}^{20} = giá trị tỷ trọng đo được - c/1000.

Khi nhiệt độ đo $> 20^{\circ}\text{C}$ thì $d_{20}^{40} =$ giá trị tỷ trọng đo được $+ c/1000$.

c- hệ số hiệu chỉnh tra trong phụ lục 4.

Tra phụ lục 5 (*Bảng tra hàm lượng đường g/l trong dịch quả nho theo tỷ trọng của dịch quả*) sẽ xác định được nồng độ chất hòa tan trong dịch quả. Nếu là quả nho thì có thể coi hàm lượng chất hoà tan chính là hàm lượng đường có trong dịch quả.

5. Ví dụ

Đọc giá trị trên tỷ trọng kế là 1,050, nhiệt độ dịch quả đo được là 24°C .

Tra phụ lục 4 thì thấy hệ số $c = 1,15$

Do đó, hệ số hiệu chỉnh $= c/1000 = 1,15/1000 = 0,00115$

$$d_{20}^{20} = 1,050 + 0,00115 = 1,05115$$

Tra phụ lục 5 sẽ xác định được nồng độ đường trong dịch quả là 113,2 g/l.

6.4.1.2. Đo bằng chiết quang kế cầm tay

1. Nguyên tắc

Dựa vào chỉ số đo được trên chiết quang kế ($^{\circ}\text{Bx}$) để biết tỷ lệ % chất khô hoà tan có trong dịch. Tra bảng phụ lục mối quan hệ giữa nồng độ chất hòa tan với hàm lượng đường có trong dịch quả để từ giá trị chất hoà tan này biết được hàm lượng đường có trong dịch quả.

2. Dụng cụ hóa chất

Xem phần 4.2.2.

3. Cách tiến hành

Xem phần 4.2.2.

4. Kết quả

- Hàm lượng chất hoà tan sẽ bằng chỉ số tương ứng trên giải phân cách. Đơn vị đo là $^{\circ}\text{Bx}$ hoặc %.

- Trong trường hợp nhiệt độ dịch khác 20°C , nên dùng phụ lục 3 để hiệu chỉnh độ Bx đo được về nhiệt độ chuẩn 20°C .

- Tra phụ lục 6 (*Bảng chuyển đổi nồng độ chất khô % thành nồng độ đường g/l trong dịch nho ép*) để chuyển đổi $^{\circ}\text{Bx}$ thành nồng độ đường tương ứng trong dịch quả, tính theo g/l.

5. Ví dụ

Nồng độ chất khô của dịch quả được trên chiết quang kế là 16°Bx hay 16%. Nhiệt độ dịch đo được là 25°C.

Nhờ có phụ lục 3 biết được hệ số hiệu chỉnh nhiệt độ bằng 0,4, do đó nồng độ chất khô tương ứng ở nhiệt độ 20°C là: $16 + 0,4 = 16,4\%$

Tra phụ lục 6 sẽ biết được hàm lượng đường tương ứng là 153 g/l.

6.4.2. Phương pháp hóa học

Trước khi xác định đường có trong quả hay dịch quả, cần thủy phân lượng đường có trong dịch quả thành đường khử. Lấy dịch đường đã thủy phân để xác định hàm lượng đường khử theo một trong các phương pháp xác định đường. Các bước tiến hành chính như sau:

- Chiết dịch quả (Xem phần 6.3).

- Thủy phân đường: Lấy chính xác 25 ml dịch quả cho vào bình định mức 50 ml. Cho thêm 10 ml dung dịch HCl (tỷ lệ HCl đậm đặc/ nước cất = 1/1). Đặt bình vào nồi cách thủy ở nhiệt độ 60°C trong 15 phút (hoặc 70 - 80°C trong 5 phút), sau đó làm nguội nhanh bằng nước lạnh đến 20°C. Cho 10 ml dung dịch NH₄OH (pha với nước theo tỷ lệ 1: 1,5) hoặc có thể dùng dung dịch NaOH 30% trung hòa tới pH=7 với sự trợ giúp của pH mét. Dùng nước cất định mức đến gần bình.

Lấy dịch đường đã thủy phân để xác định hàm lượng đường khử theo một trong các phương pháp xác định đường. Dưới đây là phương pháp hay được sử dụng khi xác định lượng đường có trong dịch quả.

6.4.2.1. Phương pháp Lane- Eynon

1. Nguyên tắc

Dùng dung dịch đường glucoza 0,5% để khử hỗn hợp Fehling A và B. Khi lượng Fehling có trong hỗn hợp phản ứng vừa hết thì lập tức đường sẽ khử và làm mất màu dung dịch chất chỉ thị xanh methylen, nhờ đó ta biết được điểm kết thúc phản ứng. Hiệu số ml dịch đường 0,5 % cần để chuẩn mẫu trắng (nước cất) và mẫu thực (dịch quả) sẽ tỷ lệ thuận với lượng đường khử có trong mẫu thực.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác.
- Bình định mức 1 lít.
- Buret, pipet.

3. Hóa chất

Dung dịch Fehling A: hoà tan 69,3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tinh khiết trong 900 ml nước cất, sau đấy định mức tới 1 lít (cần bảo quản trong tủ lạnh để sử dụng thường xuyên).

- Dung dịch Fehling B: Hoà tan 346 g muối tartrat kép và 100 g NaOH trong 1000 ml nước cất (không cần thiết dùng cân phân tích để pha hoá chất này).

- Dung dịch glucoza 0,5 %.

- Dung dịch xanh methylen 1%: Hoà tan 1g xanh methylen vào trong 100 ml nước cất.

4. Tiến hành

a. Mẫu trắng

- Cho 70 ml nước cất vào bình tam giác 250 ml. Dùng pipet lấy chính xác 10 ml Fehling A và 10 ml Fehling B thêm vào bình tam giác.

- Lắc đều và đặt bình lên bếp điện, cho nhanh 18 ml dịch đường glucoza 0,5%.

- Khi dung dịch bắt đầu sôi, cho 5 giọt xanh methylen và dùng dịch đường glucoza 0,5% để chuẩn từng giọt cho tới khi mất màu xanh và xuất hiện màu đỏ trong dịch đang sôi (chú ý là toàn bộ thời gian chuẩn kéo dài không quá 3 phút. Theo lý thuyết thì lượng dịch đường glucoza 0,5% cần để chuẩn là 21,8 ml).

- Lặp lại thí nghiệm trên cho tới khi nào sai số giữa 2 mẫu chuẩn không quá 0,2 ml.

Gọi n_1 là số ml dịch đường glucoza 0,5% tiêu hao trong khi chuẩn mẫu trắng.

b. Mẫu thực

- Cho 70 ml nước cất vào bình tam giác 250 ml. Dùng pipet lấy chính xác 10 ml Fehling A và 10 ml Fehling B thêm vào bình tam giác.

- Lắc đều, đặt bình lên bếp điện và lấy chính xác 1 ml dịch quả đã qua xử lý (hoặc 1 ml rượu vang), khi dung dịch bắt đầu sôi, cho 5 giọt methylen xanh và dùng dịch đường glucoza 0,5% để chuẩn từng giọt cho tới khi đạt điểm kết thúc của phản ứng (mất màu xanh và xuất hiện màu đỏ trong dịch đang sôi).

- Lập lại thí nghiệm trên cho tới khi nào sai số giữa 2 mẫu chuẩn không quá 0,2 ml. Kết quả sẽ chính xác khi thời gian chuẩn độ kéo dài không quá 3 phút.

Gọi n_2 là số ml dịch đường glucoza 0,5% tiêu hao trong khi chuẩn mẫu thực.

5. Kết quả

Hàm lượng đường (g/l) trong dịch được tính theo công thức sau:

$$\text{Đường} = \frac{(n_1 - n_2) \times 0,005 \times 1000}{V \times f}, \text{ g/l}$$

trong đó:

n_1 - số ml dịch đường glucoza 0,5 % dùng chuẩn mẫu trắng;

n_2 - số ml dịch đường glucoza 0,5 % dùng chuẩn mẫu thực;

0,005 - số gam glucoza tương ứng 1 ml hỗn hợp Fehling A và B;

V - số ml dịch quả (hoặc rượu vang) đưa vào mẫu thực;

f - hệ số pha loãng mẫu phân tích trong quá trình xử lý quả.

Chú ý:

- Trong khi chuẩn, đặt buret gần dịch đến mức có thể để giảm sự tiếp xúc với không khí.

- Nếu mẫu dịch quả có nồng độ đường lớn hơn 5 % thì cần pha loãng.

6.5. AXIT TỔNG SỐ

1. Nguyên tắc

Dựa trên phản ứng trung hoà các axit có trong mẫu bằng dung dịch kiềm NaOH 0,1N với chất chỉ thị là bromothymol xanh. Từ lượng dịch kiềm tiêu hao, ta tính được lượng axit tổng số có trong mẫu (không tính lượng axit carbonic và SO_2 tự do và liên kết có trong mẫu).

2. Dụng cụ

- Bình tam giác.

- Pipet.

- Máy đo pH.

3. Hóa chất

- Dung dịch NaOH 0,1N.

- Dung dịch bromothymol xanh: Hoà tan 4 g bromothymol xanh trong 200 ml cồn 95°, cho 200 ml nước cất đã khử CO_2 , sau đó cho vài ml NaOH 1N cho

tới khi dung dịch có màu xanh da trời – xanh lá cây (khoảng 7,5 ml NaOH 1N).
Dùng nước cất định mức đủ 1 lít.

- Dung dịch đệm pH = 7: Hoà tan 107,3 g phosphatmonopotasíc (KH_2PO_4) vào 500 ml dung dịch NaOH 1N, sau đó định mức bằng nước cất cho đủ 1 lít.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị dịch phân tích:

+ Đối với quả: dịch phân tích axit được chuẩn bị tương tự như phần chiết dịch quả (xem phần 6.3).

+ Đối với dịch quả hoặc dịch lên men thì dùng trực tiếp nhưng dịch lên men cần được loại bỏ CO_2 trước khi tiến hành phân tích bằng cách lắc đều dịch trong khoảng 5 phút (vì CO_2 hoà tan trong rượu kết hợp với nước tạo thành axit yếu, axit này sẽ tác dụng với NaOH làm kết quả thí nghiệm thiếu chính xác).

a) Dùng chất chỉ thị là bromothymol xanh

- Xây dựng mẫu có màu chuẩn:

+ Lấy 25 ml nước cất vào bình tam giác, cho 1 ml bromothymol xanh và cho chính xác 5 ml dịch quả

+ Dùng NaOH 0,1N để định phân cho tới khi có màu xanh lá cây, đây là điểm gần pH trung tính.

+ Cho 5 ml dung dịch đệm pH = 7. Giữ mẫu này làm mẫu có màu chuẩn để so sánh với các mẫu khác.

- Xác định độ axit của dịch quả:

+ Lấy 25 ml nước cất vào bình tam giác, cho 1 ml bromothymol xanh và cho chính xác 5 ml dịch quả.

+ Dùng NaOH 0,1N để định phân cho tới khi có màu giống với màu của mẫu chuẩn. Như vậy số ml cần để trung hoà là n ml.

b) Dùng chất chỉ thị là phenolphthalein (phương pháp AOAC)

- Lấy 100 ml nước cất (đã tách khí bằng cách đun sôi, làm nguội) cho vào bình tam giác 250 ml, và cho 1 ml dung dịch chỉ thị phenolphthalein. Đặt bình tam giác lên máy khuấy từ và khuấy đều.

- Nhẹ nhàng đặt đầu cực đo của máy pH vào dung dịch (tránh va chạm với cánh khuấy từ) và dùng dung dịch NaOH 0,1N chuẩn tới pH = 8,2 (có xuất hiện

màu hồng nhạt bền trong khoảng 1 phút). Lượng NaOH 0,1N tiêu hao này không cần tính.

- Cho chính xác 5 ml dịch quả và tiếp tục chuẩn bằng dung dịch NaOH 0,1N đến khi đạt pH = 8,2 (có màu hồng nhạt bền trong khoảng 1 phút). Như vậy số ml cần để trung hoà là n ml.

5. Kết quả

a) Với trường hợp dùng chất chỉ thị là *bromothymol xanh*

Hàm lượng axit tổng số trong dịch quả tính theo mg đương lượng trên 1 lít dịch quả (mEq/l) hoặc g axit trên 1 lít (g/l). Có thể tính theo axit sulfuric hoặc tính theo axit tartric (theo CEE).

$$A_e = (n \times 1000) / V, \text{ mEq/l};$$

$$A_x = (n \times K \times 1000) / V, \text{ g/l}.$$

trong đó:

A_e - lượng axit có trong 1 lít sản phẩm tính theo mg đương lượng, mEq/l;

A_x - lượng axit có trong 1 lít sản phẩm, g/l;

n - số ml NaOH 0,1N tiêu hao khi định phân mẫu thực, ml;

V - lượng mẫu mang đi phân tích (trong bài này V = 5 ml);

K - số g axit tương ứng với 1 ml NaOH 0,1N. Với:

Axit sulfuric K = 0,0049; Axit tartric K = 0,0075;

Axit axetic K = 0,0060; Axit malic K = 0,0067;

Axit lactic K = 0,0090; Axit citric K = 0,0064.

b) Đối với trường hợp sử dụng chất chỉ thị *phenolphthalein*: cách tính kết quả tương tự như với chất chỉ thị *bromothymol xanh*.

6.6. NITƠ AMIN

(Bằng phương pháp chuẩn độ formol).

1. Nguyên tắc

Đây là phương pháp thường dùng để xác định nhanh lượng nitơ amin hoà tan có trong dịch quả, dịch lên men hay trong rượu vang.

Khi cho formaldehyt vào, các nhóm amin sẽ bị methylen hoá và mất tính kiềm. Nhờ đó amino axit trở nên axit mạnh hơn và có thể tác dụng với kiềm. Căn cứ vào lượng NaOH tiêu hao ta tính được lượng axit và do đó biết được lượng nitơ có trong mẫu.

2. Dụng cụ

- Máy đo pH.
- Bình tam giác 250 ml.
- Bình định mức 200 ml
- Ống đong, phễu lọc, giấy lọc.
- Buret.
- Pipet.

3. Hóa chất

- Dung dịch NaOH 1 N và 0,1N.
- Dung dịch BaCl₂ 6,5 g/l.
- Ống chuẩn HCl 0,1 N.
- Formaldehyt 40%.

4. Tiến hành

- Lấy chính xác từ 10 đến 100 ml dịch quả (tùy thuộc vào lượng nitơ amin có trong mẫu) cho vào bình tam giác 250 ml (nếu lượng mẫu ít nên cho thêm nước cất), dùng NaOH 1N chuẩn đến pH = 8,0, có sử dụng pH mét.

- Cho thêm 10 ml dung dịch BaCl₂. Sau 15 phút chuyển toàn bộ hỗn hợp sang bình định mức 200 ml và thêm nước cất định mức đến gần bình. Lắc đều và lọc qua giấy lọc

- Cho 25 ml dung dịch formaldehyt, lắc đều và để yên trong khoảng 2 phút. Sau đó đem chuẩn bằng dung dịch NaOH 0,1N nhờ pH mét đến pH = 8.

5. Kết quả

Hàm lượng nitơ amin (N₂) được xác định theo công thức sau:

$$N_2 = \frac{(n \times 0,0014) \times 1000}{V} \text{ , g/l}$$

trong đó:

- n - số ml dung dịch NaOH 0,1N tiêu hao ở mẫu thí nghiệm;
- V - số ml dịch quả đã lấy phân tích;
- 0,0014 - số g N₂ tương ứng 1ml dung dịch NaOH 0,1N.

Chú ý: Dung dịch BaCl₂ dùng để kết tủa SO₂ có trong mẫu phân tích. Nếu dịch quả hoặc rượu vang không bị sulfit hoá thì không cần dùng BaCl₂.

6.7. POLYPHENOL

(Theo phương pháp so màu).

1. Nguyên tắc

Các chất phenol có trong dịch quả (hay rượu vang) bị hấp thụ ở các bước sóng cực tím và các bước sóng nhìn thấy được. Giá trị này biểu thị hàm lượng phenol tổng số, lượng anthocyanin tạo màu, hydroxyxinnamit tổng số và axit cafeic tương ứng có trong mẫu phân tích.

2. Dụng cụ

- Máy ly tâm.
- Máy so màu đo được độ hấp phụ ở các bước sóng từ 280 đến 520 nm
- 4 loại cuvet có chiều dày 1, 2, 5 và 10 mm.
- Pipet và micropipet.

3. Hóa chất

- Dung dịch metabisulfit natri 20 % (m/v): Hoà tan 2 g NaHSO_3 vào 10 ml nước cất.
- Dung dịch axetaldehyt 10% (m/v): Hoà tan 1,26 ml dung dịch axetaldehyt với 10 ml nước cất. Bảo quản dung dịch này trong tủ lạnh.
- Dung dịch HCl 1M: Lấy 89 ml HCl đậm đặc (35-37 %) pha trong 1 lít nước.
- Dung dịch ethanol 50% đã axit hoá: pha dung dịch ethanol 50 %, dùng dung dịch HCl 1M để chỉnh pH đến 2,8.
- Dung dịch tartrat hydrogen kali bão hòa.

4. Tiến hành

- Ly tâm dịch quả (hoặc rượu vang) ở vận tốc 4000 vòng/phút trong thời gian 10 phút, sau đó đặt mẫu đã ly tâm vào bình cách thủy 25°C .
- Chuẩn bị mẫu trắng từ dung dịch tartrat hydro kali bão hoà với 11% ethanol (trong trường hợp xác định mẫu rượu vang) hoặc 20% đường glucoza (trong trường hợp xác định mẫu dịch quả). Xử lý mẫu trắng được thực hiện giống như phần trên.

a) Với dịch quả màu sẫm và rượu vang đỏ

- Mẫu được cho vào các cuvet có chiều dày 1, 2 hoặc 5 mm. Đo độ hấp thụ ở các bước sóng tương ứng là 280 ($A_{280\text{nm}}$), 420 ($A_{420\text{nm}}$) và 520 ($A_{520\text{nm}}$). Dùng

mẫu trắng để hiệu chỉnh độ hấp thụ của máy về 0.

- Cho 20 μ l dung dịch metabisulfit natri 20 % vào trong mẫu thực, lắc đều bằng cách dốc ngược trong 1 phút và đo lại độ hấp thụ ở bước sóng 520 nm ($A_{520}^{SO_2}$).

- Cho 20 μ l dung dịch axetaldehyt vào trong mẫu thực, lắc đều và để yên trong 45 phút ở nhiệt độ 25°C, sau đó đo lại độ hấp thụ ở bước sóng 520 nm ($A_{520}^{CH_3CHO}$).

- Pha loãng 100 μ l mẫu (200 μ l mẫu nếu mẫu có màu đỏ nhạt) với 10 ml dung dịch HCl 1M. Để 3 - 4 giờ ở nhiệt độ 25°C, sau đó đo lại độ hấp thụ ở bước sóng 520 nm trong cuvet có chiều dày 10 mm (A_{520}^{HCl}).

- Hiệu chỉnh tất cả các giá trị đo về cùng một loại cuvet có chiều dày 10 mm (nhân với các hệ số tương ứng 10/1, 10/2, 10/5 tùy vào chiều dày cuvet đã sử dụng).

b) Với dịch quả màu sáng hoặc rượu vang trắng

- Mẫu được cho vào các cuvet có chiều dày 1 hoặc 2 mm. Đo độ hấp thụ ở các bước sóng tương ứng là 280nm (A_{280nm}) và 320 nm (A_{320nm}). Dùng mẫu trắng để hiệu chỉnh độ hấp thụ của máy về 0.

- Hiệu chỉnh tất cả các giá trị đo về cùng một loại cuvet có chiều dày 10 mm (nhân với các hệ số tương ứng 10/1 hoặc 10/2 tùy vào chiều dày cuvet đã sử dụng).

c) Với quả có nhiều hạt nhỏ nằm trong thịt quả (cà chua, chuối...)

- Chọn các quả tươi hoặc đã đông lạnh, bỏ hạt.

- Cân mẫu và đồng hoá bằng máy đồng hoá phòng thí nghiệm

- Ly tâm ở vận tốc 2000 vòng/phút trong thời gian 20 phút.

- Tách lấy dịch quả và bảo quản

- Chiết tách bã bằng dung dịch HCl 1M và sau đó bằng dung dịch ethanol 50 % đã axit hoá (10 ml/g).

- Hàm lượng anthocyanin của dịch quả, dịch chiết từ HCl và dung dịch cồn được đo ở bước sóng 520 nm giống như cách tiến hành cho các quả màu đỏ. Hàm lượng phenol tổng số cũng được xác định tương tự như cho các quả màu đỏ.

5. Kết quả

a) Với dịch quả màu sẫm hoặc rượu vang đỏ:

$$+ \text{Cường độ màu} = A_{420\text{nm}} + A_{520\text{nm}}$$

$$\text{Sắc thái màu} = A_{420\text{nm}} / A_{520\text{nm}}$$

$$+ \text{Lượng phenol tổng số (tính theo đơn vị hấp phụ)} = A_{280\text{nm}} - 4$$

$$+ \text{Lượng anthocyanin tổng số} = 20 \times \left[A_{520\text{nm}}^{\text{HCl}} - \frac{5}{3} A_{520\text{nm}}^{\text{SO}_2} \right], \text{ mg/l}$$

+ Lượng anthocyanin có màu đã bị ion hoá

$$= 20 \times \left[A_{520\text{nm}} - A_{520\text{nm}}^{\text{SO}_2} \right], \text{ mg/l}$$

+ Tỷ lệ anthocyanin có màu so với lượng anthocyanin tổng số %

$$= \frac{A_{520\text{nm}} - A_{520\text{nm}}^{\text{SO}_2}}{A_{520\text{nm}}^{\text{HCl}} - (5/3) A_{520\text{nm}}^{\text{SO}_2}} \times 100, \%$$

$$+ \text{Lượng anthocyanin bị mất màu do liên kết với SO}_2 = A_{520\text{nm}}^{\text{CH}_3\text{CHO}} - A_{520\text{nm}}$$

+ Tỷ lệ anthocyanin tổng số có màu đã hiệu chỉnh dưới tác động của SO₂

$$= \frac{A_{520\text{nm}}^{\text{CH}_3\text{COOH}} - A_{520\text{nm}}^{\text{SO}_2}}{A_{520\text{nm}}^{\text{HCl}} - (5/3) A_{520\text{nm}}^{\text{SO}_2}} \times 100$$

$$+ \text{Hệ số hoá học (mức độ các chất màu ở dạng polyme thay thế cho các chất màu ở dạng mono)} = A_{520\text{nm}}^{\text{SO}_2} / A_{520\text{nm}}^{\text{HCl}}$$

b) Với dịch quả màu sáng hoặc rượu vang trắng:

$$+ \text{Lượng phenol tổng số (tính theo đơn vị hấp phụ)} = A_{280\text{nm}} - 4$$

$$+ \text{Lượng hydroxinnamat tổng số (tính theo đơn vị hấp phụ)} = A_{320\text{nm}} - 1,4$$

+ Lượng hydroxinnamat tổng số (tính theo mg/l axit cafeic tương ứng) =

$$= \frac{A_{320\text{nm}} - 1,4}{0,90} \times 10 \text{ (mg/l)}$$

+ Lượng flavanoit tổng số (tính theo giá trị đo hấp phụ) =

$$= [A_{280\text{nm}} - 4] - (2/3) \times [A_{320\text{nm}} - 1,4]$$

Chú ý:

- Lượng phenol tổng số đo được ở bước sóng A_{280nm} là bao gồm cả các chất phi phenol có trong dịch quả và rượu vang

- Ở pH thấp, các anthocyanin đơn giản ở dạng flavilium có màu là nguyên nhân làm tăng độ hấp phụ. Khi xử lý với SO_2 , các anthocyanin ở dạng mono bị mất màu.

6.8. HÀM LƯỢNG TANIN

1. Nguyên tắc

Trong môi trường axit, tanin bị oxy hoá bởi permanganat kali với chỉ thị màu là indigocarmin. Trước tiên, xác định lượng $KMnO_4$ tiêu hao để oxy hoá tất cả các chất trong dung dịch. Tiếp theo, xác định lượng $KMnO_4$ tiêu hao để oxy hoá các chất còn lại trong dung dịch sau khi đã dùng than hoạt tính để hấp thụ hết tanin. Từ hiệu số $KMnO_4$ giữa 2 lần xác định, tính được hàm lượng tanin có trong mẫu phân tích.

2. Dụng cụ

- Cốc 1000 ml.

3. Hóa chất

- Dung dịch $KMnO_4$ 0,1 N.

- Dung dịch axit oxalic 0,1 N.

- Dung dịch indigocarmin: hoà tan 6 g indigocarmin vào 1 lít dung dịch axit sulfuric 50 g/l.

- Than hoạt tính.

4. Tiến hành

- Lấy 10 - 50 ml dịch quả (lượng mẫu lấy phân tích tùy thuộc vào loại quả hay lượng tanin có trong dịch quả) cho vào cốc 1000 ml, cho 25 ml dung dịch indigocarmin và 750 ml nước cất. Dùng dung dịch $KMnO_4$ 0,1 N để chuẩn, cho từ từ đồng thời khuấy đều cho tới khi xuất hiện màu xanh lơ. Tiếp tục cho từng giọt dung dịch $KMnO_4$ 0,1N cho tới khi màu chuyển từ xanh lơ sang xanh lá mạ và cuối cùng là màu vàng. Lượng ml $KMnO_4$ 0,1N dùng để chuẩn là n_1 (ml).

- Kiểm tra nồng độ $KMnO_4$ bằng cách thay thế lượng dịch quả đưa vào bằng 10 ml dung dịch $C_2H_2O_4$ 0,1N chuẩn và thực hiện giống như trên.

- Lấy 10 - 50 ml dịch quả và 5 g than hoạt tính, đun cách thủy khoảng 10 - 15 phút rồi lọc. Dịch lọc thu vào cốc 1000 ml, rửa bã than nhiều lần bằng nước cất ở 40 - 50°C. Lọc xong, thêm nước cất cho đủ 750 ml. Cho tiếp 25 ml dung dịch indigocarmin. Chuẩn bằng dung dịch KMnO_4 0,1N đến khi dung dịch chuyển sang màu vàng thì dừng. Lượng ml KMnO_4 0,1N dùng để chuẩn là n_2 (ml).

5. Kết quả

Hàm lượng tanin (T, g/l) trong dịch quả được tính theo công thức sau:

$$T = \frac{0,042 \times (n_1 - n_2)}{V \times a} \times 1000, \text{ g/l}$$

trong đó:

n_1 - số ml dung dịch KMnO_4 0,1N tiêu hao trong lần đầu chuẩn tanin và các chất không phải tanin có trong dịch quả;

n_2 - số ml dung dịch KMnO_4 0,1N tiêu hao trong khi chuẩn các chất không phải tanin có trong dịch quả;

0,042 - số gam tanin tương ứng 1ml KMnO_4 0,1N;

a - số ml dung dịch permanganat cần thiết để chuẩn hết 10 ml dung dịch axit oxalic 0,1N;

V - số ml dịch quả đã lấy để phân tích.

6.9. PECTIN

6.9.1. Định tính

1. Nguyên tắc

Trong cồn nếu có pectin thì có khả năng tạo gel hay xuất hiện keo vẩn đục hoặc có kết tủa. Đây là phương pháp đơn giản để nhận biết sự có mặt pectin trong dịch quả.

2. Hoá chất

- Dung dịch ethanol 95 % (v/v) đã axit hoá: dùng dung dịch HCl 1% để axit hoá cồn 95 % đến pH = 2,8.

3. Tiến hành

- Lấy 25 ml dịch quả, cho thêm vào 50 ml hỗn hợp ethanol đã axit hoá.

- Quan sát khả năng bị đục hay kết tủa của hỗn hợp dịch.

4. Kết quả

- Nếu thấy có tạo gel hoặc bị đục chứng tỏ trong mẫu phân tích có pectin.

6.9.2. Định lượng theo phương pháp pectat canxi

1. Nguyên tắc

Trong môi trường kiềm loãng, pectin hoà tan sẽ giải phóng ra nhóm methoxyl thành rượu methylic và axit pectic tự do. Axit pectic tự do trong môi trường có mặt axit axetic sẽ kết hợp với CaCl_2 thành dạng muối kết tủa canxi pectat. Từ hàm lượng muối kết tủa có thể tính được hàm lượng pectin có trong mẫu phân tích.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác.
- Giấy lọc.
- Tủ sấy.

3. Hoá chất

- Dung dịch NaOH 0,1N.
- Dung dịch CH_3COOH 0,1N.
- CaCl_2 1N.
- Dung dịch AgNO_3 1%.

4. Tiến hành

- Lấy 20 ml dịch quả cho vào bình tam giác 250 ml, cho thêm 100 ml NaOH 0,1N, để hỗn hợp trong 7 giờ cho pectin bị xà phòng hoá hoàn toàn thành thành axit pectic. Sau đó, thêm vào 50 ml dung dịch axit axetic 0,1N và để yên 5 phút, thêm 50 ml CaCl_2 1N để 1 giờ. Sau đó đun sôi 5 phút rồi lọc qua giấy lọc đã được sấy khô đến trọng lượng không đổi, rửa kết tủa canxi pectat bằng nước cất nóng cho đến khi không còn ion Cl^- nữa (thử nước rửa với dung dịch nitrat bạc 1%). Sau khi rửa xong, đặt giấy lọc có kết tủa vào cốc, cân và sấy ở 105°C đến trọng lượng không đổi.

5. Kết quả

Hàm lượng pectin trong dịch quả được tính theo công thức sau:

$$\text{Pectin} = \frac{m_1 \times 0,92}{V} \times 1000, \text{ g/l}$$

trong đó:

- m_1 - khối lượng cặn pectat canxi thu được, g;
- 0,92 - hệ số chuyển từ canxi pectat sang pectin;
- V - số ml dịch quả đã lấy mang đi phân tích.

6.10. AXIT ASCORBIC (VITAMIN C)

1. Nguyên tắc

Axit L-ascorbic có tính khử mạnh được oxy hóa bằng dung dịch I_2 với chỉ thị là dung dịch tinh bột. Điểm kết thúc của phản ứng nhận biết được nhờ chỉ thị dung dịch tinh bột. Đây là phương pháp xác định nhanh và cho kết quả gần đúng.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác.

3. Hoá chất

- Dung dịch H_2SO_4 1:10 hay 180 g/l.
- Dung dịch I_2 0,01N.
- Dung dịch tinh bột 5 g/l.

4. Tiến hành

Lấy 10 ml dịch quả cho vào bình tam giác 250 ml, cho 5 ml dung dịch H_2SO_4 và thêm vào vài giọt tinh bột, lắc nhẹ rồi chuẩn độ bằng I_2 0,01N tới khi bắt đầu xuất hiện màu xanh.

5. Kết quả

Lượng axit ascorbic hay vitamin C được tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng axit ascorbic} = \frac{n \times 0,88 \times 1000}{V}, \text{ mg/l}$$

trong đó:

- n: số ml dung dịch I_2 0,01 N dùng để chuẩn độ;
- 0,88: số mg axit ascorbic tương ứng với 1 ml I_2 0,01N;
- V: số ml dịch quả đã lấy để phân tích.

Chương 7

PHÂN TÍCH NƯỚC

7.1. CHUẨN BỊ MẪU

Dụng cụ lấy mẫu để phân tích cần được rửa sạch, khử trùng. Mỗi khi lấy mẫu, cần tráng bằng mẫu nước 2-3 lần. Để phân tích tất cả các chỉ tiêu của nước thì cần lượng mẫu 3 - 5 lít, nếu chỉ xác định các chỉ tiêu chính thì cần là 1 lít.

7.2. ĐÁNH GIÁ SƠ BỘ

7.2.1. Mùi

Lấy 100 ml nước cho vào bình tam giác 250 ml lắc mạnh và nhận biết mùi. Có thể đun nóng tới 40 - 60°C và lắc mạnh để dễ dàng nhận biết mùi hơn.

Thông thường nhận xét mùi của nước là mùi bình thường hoặc có mùi lạ. Nếu có mùi thì nên ghi rõ loại mùi ví dụ: mùi clo, mùi phenol, mùi đất, mùi thối...

7.2.2. Màu

Xác định màu bằng cách cho nước vào trong cốc trắng với chiều cao nước trong cốc là 10 cm. Đặt trên nền trắng và nhận xét màu. Nhận xét về màu cần chỉ rõ màu của nước: trắng, vàng, hồng.. và cường độ màu nếu có.

Nếu nước bị đục thì cần lọc trước khi quan sát.

7.2.3. Độ trong

Nước thông thường có thể trong, đục nhẹ, đục hoặc rất đục. Có thể xác định độ đục bằng máy đo độ đục.

7.3. HÀM LƯỢNG CẶN

1. Tiến hành

- Lấy chính xác từ 100 - 500 ml nước, cho vào khay bằng platin đã biết trước khối lượng và cho bốc hơi toàn bộ nước trong bình cách thủy. Sau đấy sấy khay này trong tủ sấy ở nhiệt độ 105°C.

- Làm nguội trong bình hút ẩm và cân. Chú ý cân thật nhanh vì cặn này rất dễ hút ẩm

- Đặt khay vào sấy lại và sấy tiếp 0,5 giờ.

- Làm nguội và cân lại

- Làm tương tự như vậy cho tới khi 2 lần cân liên tiếp nhau có khối lượng bằng nhau.

2. Kết quả

Hàm lượng cặn có trong nước (mg/l) được tính theo công thức sau :

$$\text{Cặn} = \frac{m_1}{V} \times 1000, \text{ mg/l}$$

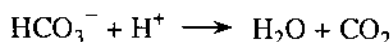
trong đó:

m_1 - khối lượng cặn được sau khi sấy tính theo mg;

V - số ml nước lấy để phân tích;

7.4. ĐỘ KIỀM

Ion HCO_3^- thường làm kiềm hoá nước đặc biệt là trong quá trình nấu dịch đường dưới tác dụng của nhiệt. Phản ứng xảy ra như sau:

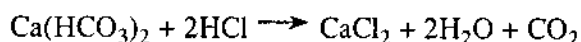


Ngược lại ion Ca^{2+} (hoặc Mg^{2+}) thì axit hoá nước nhưng sẽ làm kết tủa các ion phosphat bậc 2 theo phản ứng sau:



1. Nguyên tắc

Độ kiềm của nước chỉ phụ thuộc vào hàm lượng các ion bicarbonnat có trong nước. Có thể xác định độ kiềm này bằng cách định phân với axit có chỉ thị là methyl da cam cho tới lúc đổi màu. Phản ứng xảy ra như sau:



2. Hoá chất

- Dung dịch methyl da cam: Hoà tan 0,5 g methyl da cam với 1 lít cồn trung tính 50 %.

- HCl 0,1N.

3. Tiến hành

Lấy 100 ml nước cho vào bình tam giác và cho tiếp 4 - 5 giọt chỉ thị meryl da cam, dùng HCl 0,1 N định phân cho tới khi xuất hiện màu vàng da cam.

3. Kết quả

- Độ kiềm của nước có thể tính hoặc theo mg đương lượng/l hoặc mg CaO/l theo công thức sau:

- Độ kiềm của nước (mg đương lượng/l) = n. 10.
- Độ kiềm của nước (mg CaO/l) = n. 2,8.

trong đó:

n: số ml HCl 0,1N đã dùng để chuẩn.

7.5. ĐỘ CỨNG CỦA NƯỚC

Nước tự nhiên chứa rất nhiều các ion ở cả 2 dạng cation như H^+ , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} hay Fe^{3+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , và các anion như OH^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- , SiO_3^{2-} . Trong đó các ion như: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- đóng vai trò quan trọng ảnh hưởng tới chất lượng nước đặc biệt là nước dùng trong sản xuất bia.

Độ cứng của nước gây nên bởi sự có mặt của các ion như Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} và một số ion kim loại khác có trong nước và biểu diễn theo độ cứng hoặc mg đương lượng.

Độ cứng của nước được quy chuẩn có khác nhau tùy theo các nước:

- 1°F (Pháp) tương đương với 10 mg $CaCO_3$ trong 1000 ml nước.
- 1°H (Đức) tương đương với 10 mg CaO hoặc 14 mg MgO trong 1000 ml nước.
- 1°E (Anh) tương đương với 10 mg CaO trong 700 ml nước.

Một mg đương lượng tương đương với 20 mg Ca^{2+} (hoặc 28 mg CaO hoặc 50 mg $CaCO_3$) hoặc 12 mg Mg^{2+} (hoặc 20 mg MgO hoặc 42 mg $MgCO_3$) hoặc 23 mg Na^+ (hoặc 31 mg Na_2O) hoặc 39 mg K^+ (hoặc 47 mg K_2O) trong 1 lít nước.

Quy đổi mg đương lượng sang đơn vị độ cứng của các nước như sau:

- $1^{\circ}\text{F} = \text{mg đương lượng} \times 5$.
- $1^{\circ}\text{H} = \text{mg đương lượng} \times 2,8$.
- $1^{\circ}\text{E} = \text{mg đương lượng} \times 4$.

Quy đổi giữa các đơn vị độ cứng như sau:

- $1^{\circ}\text{F} = 0,56^{\circ}\text{H} = 0,7^{\circ}\text{E}$.
- $1^{\circ}\text{H} = 1,784^{\circ}\text{F} = 1,25^{\circ}\text{E}$.
- $1^{\circ}\text{E} = 1,43^{\circ}\text{F} = 0,8^{\circ}\text{H}$.

Ở nước ta thường sử dụng độ cứng của Đức do đó nước được phân loại theo độ cứng (bảng 7.1):

Bảng 7.1: Phân loại nước theo độ cứng

<i>Loại nước</i>	<i>Độ cứng tương ứng ($^{\circ}\text{H}$)</i>
Nước mềm	0 - 5 $^{\circ}$
Nước tương đối mềm	5 - 10 $^{\circ}$
Nước cứng	10 - 20 $^{\circ}$
Rất cứng	20 - 30 $^{\circ}$
Nước cứng khác thường	> 40 $^{\circ}$

Độ cứng của nước gồm:

- Độ cứng chung gây nên bởi tổng lượng Ca^{2+} , Mg^{2+} , thường nằm trong khoảng 10 - 20 $^{\circ}$.
- Độ cứng tạm thời gây nên bởi các muối bicarbonnat của các ion Ca^{2+} , Mg^{2+} . Khi đun sôi các muối này chuyển thành carbonnat và kết tủa. Độ cứng này thường nằm trong khoảng 5 - 15 $^{\circ}$.
- Độ cứng vĩnh cửu gây nên bởi các muối Ca^{2+} , Mg^{2+} còn lại sau khi đun sôi, thường là các muối của các axit vô cơ.

7.5.1 Phương pháp Wartha-Preiffer

1. Nguyên tắc

Dựa trên khả năng kết tủa cặn của nước dưới tác dụng của nhiệt khi cho dư lượng dung dịch chuẩn NaOH và Na_2CO_3 . Dùng axit để xác định lượng kiềm còn lại trong dịch lọc. Cần loại bỏ lượng CO_2 tự do và HCO_3^- trước khi xác định.

2. Hoá chất

- HCl 0,1N.
- Dung dịch NaOH 0,1N + Na₂CO₃ 0,1N (theo tỷ lệ 1 : 1), chỉ pha lẫn trước khi dùng.

3. Tiến hành

Xác định độ cứng tạm thời

- Lấy 100 ml nước cho vào bình tam giác 250 ml, thêm vào đó 4 - 5 giọt metyl da cam 0,1% rồi dùng HCl 0,1N định phân đến khi xuất hiện màu hồng nhạt. Gọi số ml đã định phân là n_1 .

Xác định độ cứng chung

- Sau khi xác định độ cứng tạm thời, đun sôi dung dịch trong 2 - 3 phút để đuổi hết axit carbonic.
- Cho thêm vào 40 ml dung dịch NaOH 0,1N + Na₂CO₃ 0,1N đã chuẩn bị ở trên rồi đun sôi trong 10 phút để kết tủa toàn bộ lượng Ca²⁺, Mg²⁺ dưới dạng carbonat. Làm nguội dịch.
- Dùng nước cất định mức tới 250 ml rồi đem lọc. Loại bỏ 50 - 60 ml dịch lọc ban đầu. Lấy 100 ml và dùng HCl 0,1 N để chuẩn đến khi đổi màu da cam sang hồng nhạt. Gọi số ml đã định phân là n_2 .

4. Kết quả

- Độ cứng tạm thời của nước được tính theo công thức:

$$\text{Độ cứng tạm thời (}^{\circ}\text{H)} = n_1 \times 2,8$$

- Độ cứng chung của nước được tính theo công thức:

$$\text{Độ cứng chung (}^{\circ}\text{H)} = (40 - 2,5 \times n_2) \times 2,8$$

- Độ cứng vĩnh viễn là hiệu số giữa độ cứng chung và độ cứng tạm thời.

trong đó:

- n_1 - số ml HCl 0,1 N đã dùng để định phân khi xác định độ cứng tạm thời;
- n_2 - số ml HCl 0,1 N đã dùng để định phân khi xác định độ cứng chung;
- 2,8 - số mg CaO tương đương với 1 ml HCl 0,1 N.

7.5.2. Phương pháp Schwarzenback

1. Nguyên tắc

Ethylen diamin tetra axetat (EDTA) cũng có khả năng tạo phức chất với Ca

và Mg, và phức chất này bền vững hơn rất nhiều so với các phức chất của 2 chỉ thị ET hoặc murexit với Ca và Mg, đặc biệt là tại pH = 10.

Do vậy nếu ta đưa pH của mẫu nước cần phân tích đến 10, nếu có chỉ thị ET hoặc murexit thì dung dịch có màu đỏ rượu vang (hoặc đỏ cá hồi) do sự tạo phức của 2 chất này với Ca và Mg có trong nước. Nếu thêm EDTA vào, thì ban đầu EDTA sẽ liên kết với Ca và Mg tự do, sau đó sẽ lấy Ca và Mg đang ở dạng liên kết với các chỉ thị trước, do đó các chỉ thị này trở về trạng thái tự do, làm cho màu của dung dịch trở thành màu của chỉ thị (màu xanh da trời hoặc màu xanh tím). Lượng EDTA đã sử dụng chính bằng độ cứng của nước.

2. Hoá chất

- Dung dịch EDTA 0,1N: Hoà tan 18,613 g EDTA ($C_{10}N_2H_{14}O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) có khối lượng phân tử $M = 372,254$ (g/mol) vào nước cất, định mức tới 1 lít rồi đem lọc. Để kiểm tra nồng độ dung dịch này, có thể chuẩn lại bằng dung dịch hỗn hợp $CaCl_2$ và $MgSO_4$ 0,01 N. Hỗn hợp này được pha theo tỷ lệ 3:1. Lấy 100 ml hỗn hợp này cho vào bình tam giác 250 ml, thêm vài giọt chỉ thị eriocrom đen, lắc mạnh và định phân bằng dung dịch EDTA vừa pha đến khi màu đỏ nhạt chuyển thành màu xanh da trời. Từ lượng EDTA sử dụng có thể xác định được nồng độ EDTA đã pha được

- Dung dịch đệm amoniac: Cân 2 g NH_4Cl hoà tan với nước cất và cho vào bình định mức 1 lít, thêm vào đó 8,8 ml amoniac 25 %, sau đó định mức tới gần bình.

- Dung dịch chỉ thị eriocrom đen: Cân 0,5 g chỉ thị rồi hoà tan bằng cồn 96%, chuyển vào bình định mức 100ml, thêm 10 ml dung dịch đệm amoniac rồi định mức tới gần bình bằng cồn 96%.

3. Tiến hành

- Xác định độ cứng chung:

+ Lấy 100 ml nước có độ cứng nhỏ hơn $14^{\circ}H$ (Nếu độ cứng lớn hơn thì lấy 50 ml nước cần xác định với 50 ml nước cất) cho vào bình tam giác 250 ml.

+ Thêm 5 ml dung dịch đệm amoniac.

+ Thêm 1 ml chỉ thị eriocrom đen.

+ Dùng dung dịch EDTA định phân tới khi chuyển sang màu xanh da trời.

Chú ý: vì sự đổi màu xảy ra rất nhanh do đó lúc đầu nên lấy 80 ml nước,

chuẩn nhanh cho tới khi đổi màu, sau đó thêm 20 ml nước còn lại và chuẩn thật chậm cho tới lúc dung dịch đổi màu. Số ml dung dịch EDTA đã định phân là n_1 .

- Xác định độ cứng vĩnh viễn:

- + Lấy 500 ml nước cho vào bình cầu 1 lít rồi đem cân để biết trọng lượng.
- + Sau đó nổi sinh hàn khí và đun sôi khoảng 1 h.
- + Làm lạnh bình tới nhiệt độ phòng, lau khô và đem cân lại. Sau khi cân thêm nước cất để sao cho đạt được trọng lượng ban đầu.
- + Đem lọc kỹ, lấy 100 ml nước để xác định độ cứng theo các bước tương tự như trên. Số ml dung dịch EDTA đã định phân là n_2 .

4. Kết quả

- Độ cứng chung của nước được xác định như sau:

$$\text{Độ cứng chung (}^{\circ}\text{H)} = n_1 \times 2,8$$

- Độ cứng vĩnh viễn ($^{\circ}\text{H}$) = $n_2 \times 2,8 \times 5$

- Độ cứng tạm thời bằng hiệu giữa độ cứng chung và độ cứng vĩnh viễn trong đó:

n_1, n_2 - số ml EDTA đã dùng để định phân;

2,8 - số mg CaO tương ứng với 1 ml EDTA 0,1N.

7.6. CANXI

7.6.1. Định tính

1. Nguyên tắc

Trong dung dịch amoniac hoặc axetic, canxi liên kết với oxalat và tạo kết tủa trắng. Kết tủa hoà tan trong dung dịch axit mạnh và không tan trong dung dịch axit axetic.

2. Tiến hành

- Lấy 10 ml nước, cho vài giọt axit axetic đậm đặc và vài giọt dung dịch oxalat amoni bão hoà trong điều kiện lạnh.

3. Kết quả

- Nếu lượng Ca lớn thì sẽ có một lớp kết tủa mịn màu trắng.
- Nếu lượng Ca không nhiều thì chỉ tạo cặn sau khi đun nóng hoặc để tĩnh thời gian dài.

7.6.2. Định lượng theo phương pháp chuẩn độ complexon III

1. Nguyên tắc

Phức chất Ca và Mg với EDTA, erichrom đen T hay murexit (không có cùng độ bền vững. Thường thì phức của Ca-EDTA bền hơn phức của Mg-EDTA. Tuy nhiên ở pH = 12, phức EDTA-murexit kém bền hơn phức EDTA-Ca nhưng bền hơn so với phức EDTA-Mg.

Trong điều kiện như vậy, tại pH = 12, murexit, có màu xanh tím ở trạng thái không liên kết, sẽ phân huỷ và chuyển sang màu đỏ bởi phức EDTA-Ca, mà không phải bởi Mg-EDTA. Như vậy nếu đưa nước về pH = 12, và chuẩn bằng EDTA có mặt chất chỉ thị là murexit thì có thể xác định được riêng lượng Ca có trong nước.

2. Hoá chất

- Dung dịch NaOH 30%.
- Dung dịch chỉ thị murexit.
- Dung dịch EDTA 0,1N.

3. Tiến hành

- Lấy một lượng mẫu nước, bổ sung thêm dung dịch NaOH để có pH=12 (thường chỉ cần 0,2 ml dung dịch NaOH 30%).
- Cho 1 ml dung dịch murexit vừa mới pha.
- Dùng dung dịch EDTA để định phân cho tới khi chuyển sang màu xanh da trời.
- Chú ý: Cần thực hiện nhanh chóng để tránh hiện tượng tạo kết tủa Ca(OH)_2 .

4. Kết quả

- Hàm lượng CaO có trong nước được tính theo công thức sau:

$$\text{CaO} = n \times 2,8 \times 10, \text{ mg/l}$$

trong đó:

- n - số ml EDTA đã dùng để định phân;
- 2,8 - số mg CaO tương ứng với 1 ml EDTA 0,1N.

7.7. MAGIE

7.7.1. Định tính

1. Tiến hành

- Lấy 10 ml, cho 0,2 ml dung dịch titan vàng (methylbenzothiazol) 1 % và

1 giọt NaOH 10%. Nếu có Mg trong nước sẽ có màu từ đỏ tới nâu tùy theo lượng Mg có trong đó. Phương pháp này có thể dùng để phát hiện lượng Mg rất nhỏ, khoảng 0,5 mg/l ngay cả khi trong nước có chứa hàm lượng canxi cao.

7.7.2. Định lượng

Sau khi đã xác định độ cứng chung và lượng canxi theo các phương pháp nêu trên, có thể tính toán lượng Mg như sau :

mg đương lượng Mg = mg đương lượng độ cứng chung – mg đương lượng Ca

$$\text{Lượng MgO (mg/l)} = \text{mg đương lượng Mg} \times 20$$

PHẦN 2

PHÂN TÍCH SẢN PHẨM LÊN MEN

Chương 8

KIỂM TRA DỊCH LÊN MEN BIA VÀ BIA THÀNH PHẨM

8.1. KIỂM TRA DỊCH ĐƯỜNG VÀ DỊCH LÊN MEN BIA

8.1.1. Xác định tỷ trọng dịch đường

Trong vòng một giờ sau khi lấy mẫu phải xác định tỷ trọng dịch đường tại $20 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$, kết quả lấy 5 số sau dấu thập phân. Tỷ trọng có thể xác định theo hai phương pháp:

- Tỷ trọng kế xác định tỷ trọng của dịch đường ở 20°C .
- Bình tỷ trọng (xem phần 2.4).

8.1.2. Chất hoà tan

Từ giá trị tỷ trọng của dịch đường tra phụ lục 1 (*Bảng tra hàm lượng chất khô hoà tan theo tỷ trọng của dịch, Goldiner và Klemann*) ta được hàm lượng chất hoà tan trong đó.

8.1.3. Nitơ tổng số

1. Mục đích

Xác định hàm lượng nitơ tổng số trong dịch đường bằng phương pháp Kjeldahl. Phương pháp được áp dụng cho mọi loại dịch đường.

2. Nguyên tắc

Xem phần 1.3.

3. Dụng cụ

Xem phần 1.3.

4. Hóa chất

Xem phần 1.3.

5. Tiến hành

Dùng pipet lấy 20 ml dịch đường vào bình Kjeldahl. Cho 2 - 3 ml axit

sulfuric đậm đặc vào. Nếu cần, cho thêm chất chống tạo bọt (nếu cần). Cho bốc hơi nhẹ cho đến khi gần như khô hoàn toàn.

Thêm vào 20 ml axit sulfuric đậm đặc và 10 g chất xúc tác, hòa tan hoàn toàn và tiến hành chưng cất giống như đã trình bày ở phần 1.3 (sử dụng H_2SO_4 để thu nhận NH_3).

6. Kết quả

Tính hàm lượng nitơ tổng số trong dịch đường theo công thức:

$$N_t = \frac{n \cdot 1,42}{V} \times 1000, \text{ mg/l}$$

trong đó:

- n - số ml H_2SO_4 0,1N dùng để chuẩn độ;
- V - thể tích mẫu phân tích, ml;
- 1,42 - số mg nitơ ứng với 1 ml H_2SO_4 0,1N;
- 1000 - hệ số chuyển thành lít.

8.1.4. Màu của dịch đường bằng phương pháp quang phổ

Xác định màu dịch đường bằng phương pháp quang phổ. Áp dụng cho mọi loại dịch đường dùng trong sản xuất.

1. Nguyên tắc

Đo độ hấp thụ của dịch đường ở bước sóng 430 nm. Màu dịch đường tính theo đơn vị EBC bằng độ hấp thụ nhân với hệ số pha loãng.

2. Dụng cụ, hóa chất

- Máy quang phổ đo được độ hấp thụ $430 \pm 0,5$ nm, cuvet 5, 10 mm.
- Bộ lọc màng $0,45 \mu m$.
- Bột trợ lọc Kieselguhr (diatomit).

3. Tiến hành

- Pha loãng mẫu để đo độ hấp thụ ở 430 nm nằm trong giới hạn của máy quang phổ. Có thể dùng cuvet 5 hoặc 10 mm để đo. Dùng cuvet 5 mm có ưu điểm nếu bia đậm màu không cần pha loãng.

- Mẫu được lọc bằng bộ lọc màng, nếu độ đục của mẫu pha loãng nhỏ hơn 1 đơn vị EBC thì có thể bỏ qua công đoạn này. Nếu cần thiết có thể lọc dịch đường bằng bột trợ lọc Kieselguhr (1 g/l) trước khi lọc màng.

- Đặt máy quang phổ bước sóng $430 \pm 0,5$ nm. Chỉnh máy về 0,00 bằng nước cất trước khi đo mẫu. Tráng cuvet và đổ đầy mẫu dịch đường. Đo độ hấp thụ.

4. Kết quả

Màu của dịch đường không pha loãng (đơn vị EBC) = $A \cdot f \cdot 25$ hoặc $A \cdot f \cdot 50$ trong đó:

A - độ hấp thụ ở 430 nm đo trong cuvet 10 mm hoặc 5 mm;

f - hệ số pha loãng.

8.1.5. Độ nhớt

1. Mục đích

Xác định độ nhớt của dịch đường sử dụng nhớt kế ống mao dẫn thủy tinh. Phương pháp dùng cho mọi loại dịch đường. Cần phân tích trong vòng 50 phút kể từ khi bắt đầu lọc dịch đường.

2. Nguyên tắc

Xác định độ nhớt ở 20°C bằng nhớt kế đã được hiệu chuẩn.

3. Dụng cụ

- Nhớt kế hoặc Ostwald.
- Bình ổn nhiệt, $20,0 \pm 0,05^\circ\text{C}$.
- Đồng hồ bấm giây 0,2 s.

4. Hoá chất

- Dung dịch đường sucroza 20% (m/m).

5. Tiến hành

- Hiệu chuẩn: Hiệu chuẩn dụng cụ đo độ nhớt theo chỉ dẫn, đảm bảo thực hiện ở nhiệt độ không đổi 20°C. Kiểm tra độ chuẩn của dụng cụ bằng cách đo độ nhớt ở 20°C của nước = 1,002 mPa.s, độ nhớt của dung dịch đường sucroza 20% (m/m) = 1,945 mPa.s.

- Chuẩn bị mẫu: Lọc trong dịch đường, đảm bảo không còn bất kỳ hạt cặn nhỏ nào.

- Tiến hành đo: đổ đầy dịch đường vào nhớt kế và đo độ nhớt theo chỉ dẫn. Lặp lại thí nghiệm nhiều lần và lấy giá trị trung bình.

6. Kết quả

Tính độ nhớt của dịch theo mPa.s theo công thức được đưa ra tùy thiết bị sử dụng.

8.1.6. Độ đắng của dịch đường

1. Mục đích

Xác định các chất đắng, chủ yếu là các axit iso-alpha có trong dịch đường. Áp dụng cho mọi loại dịch đường.

2. Nguyên tắc

Các chất đắng được trích ly từ dịch đường đã axit hoá bằng iso-octan, sau đó xác định bằng phương pháp đo quang phổ.

3. Tiến hành

Hút 5 ml dịch đường và 5 ml nước vào ống ly tâm 35 ml. Sau đó tiến hành tương tự như xác định độ đắng trong bia (phần 8.2.6).

4. Kết quả

Đơn vị đắng (BU = Bitterness units) = $100 \cdot A_{275}$

trong đó: A_{275} - độ hấp thụ ở bước sóng 275 nm.

8.1.7. Polyphenol

1. Mục đích

Xác định hàm lượng polyphenol tổng số trong dịch đường hoặc bia bằng phương pháp quang phổ. Phương pháp này áp dụng cho mọi loại dịch đường.

2. Nguyên tắc

Các chất polyphenol phản ứng với các ion sắt trong dung dịch kiềm. Đo độ hấp phụ của dung dịch màu đỏ ở 600 nm, so với mẫu trắng.

3. Tiến hành

Các bước tiến hành phân tích tương tự như phần 8.2.7: xác định polyphenol tổng số trong bia.

8.1.8. Độ lên men, khả năng lên men

1. Mục đích

Xác định độ lên men biểu kiến của dịch đường lên men bằng nấm men. Phương pháp áp dụng cho mọi loại dịch đường.

2. Nguyên tắc

Vô hoạt hệ enzym amylolytic (nếu có) trong dịch đường ở nhiệt độ cao. Làm nguội dịch đường và lên men với nấm men. Độ lên men của dịch đường được xác định bằng sự biến đổi tỷ trọng của dịch trong quá trình lên men.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác 500 ml có nắp đậy.
- Máy lắc, máy khuấy từ.
- Phễu lọc, giấy lọc.

3. Hoá chất

- Chủng nấm men đã được tuyển chọn. Mỗi chủng nấm men có thể cho những kết quả khác nhau.

4. Tiến hành

Chuẩn bị mẫu:

Để có kết quả tốt nhất, dịch đường dùng để lên men nên có tỷ trọng là 1,025. Để vô hoạt enzym diastaza, nhanh chóng cân khối lượng 300 - 400 ml mẫu và đun sôi trong 5 phút, làm nguội và thêm nước cất để đạt khối lượng ban đầu. Gạn lấy phần dịch trong, rồi lọc qua giấy lọc.

a) Phương pháp thông thường

Xác định tỷ trọng của dịch đường ban đầu ở 20°C (d_1). Lấy 200 ml vào bình 500 ml, thêm 15 g nấm men sữa đã rửa sạch bằng dịch đường mẫu và đậy nắp chặt. Đặt bình lên máy lắc, lắc liên tục làm sao giữ nấm men ở dạng huyền phù, trong 24 giờ, 25°C ± 1°C.

Lọc một nửa số mẫu, đậy phễu để tránh bay hơi, và đo tỷ trọng ở 20°C. Lắc tiếp phần còn lại trong 24 giờ nữa và xác định tỷ trọng (d_2).

b) Phương pháp lên men nhanh

Xác định tỷ trọng của dịch đường ban đầu ở 20°C (d_1), lấy 300 - 400 ml dịch đường cho vào bình 500 ml, cho tiếp 30 g men sữa vào và lắc với vận tốc 100 - 150 vòng/phút, đậy bình bằng giấy nhôm. Sau 6 giờ lấy một phần dịch lên men và xác định tỷ trọng của dịch lọc ở 20°C. Phần còn lại tiếp tục cho lên men 1 giờ nữa để khẳng định dịch đã lên men hoàn toàn (d_2).

5. Kết quả

(Tính theo EBC)

Đổi giá trị tỷ trọng ban đầu (d_1) và cuối cùng (d_2) thành phần trăm khối lượng thể tích (g trong 100 ml) bằng cách tra phụ lục 1 (*Bảng tra hàm lượng chất khô hoà tan theo tỷ trọng của dịch (Goldiner và Klemann)*)

Độ lên men biểu kiến được tính theo công thức:

$$\text{Độ lên men biểu kiến (\%)} = \frac{(E_1 - E_2)}{E_1} \times 100$$

trong đó:

E_1 - lượng chất hoà tan (g) trong 100 ml dịch đường trước khi lên men;

E_2 - lượng chất hoà tan biểu kiến (g) trong 100 ml dịch đường đã lên men.

- Độ lên men thực = Độ lên men biểu kiến $\times$ 0,81.

- Tính khả năng lên men:

$$\text{Khả năng lên men biểu kiến (\%)} = \frac{(d_1 - d_2) \cdot 100}{d_1 - 1000}$$

d_1 - tỷ trọng của dịch đường trước khi lên men;

d_2 - tỷ trọng của dịch đường sau khi lên men;

Khả năng lên men thực = khả năng lên men biểu kiến $\times$ F

F = 0,819 đối với dịch đường hoặc xirô dịch đường;

F = 0,857 đối với dịch glucoza hoặc đường nghịch đảo.

8.2. KIỂM TRA BIA THÀNH PHẨM

8.2.1. *Nồng độ rượu và chất hoà tan ban đầu*

1. Mục đích

Xác định hàm lượng chất hoà tan thực và hàm lượng cồn của các loại bia vàng và bia đen bằng cách chưng cất và xác định tỷ trọng. Xác định hàm lượng chất hoà tan ban đầu dựa vào hàm lượng chất hoà tan thực và hàm lượng cồn. Xác định hàm lượng chất hoà tan biểu kiến bằng cách đo tỷ trọng của bia.

Phương pháp được áp dụng cho các loại bia vàng, bia đen nhưng không dùng cho các loại bia không cồn hoặc có độ cồn thấp. Giá trị đo được có thể có sai số do các axit bay hơi trong quá trình chưng cất.

2. Nguyên tắc

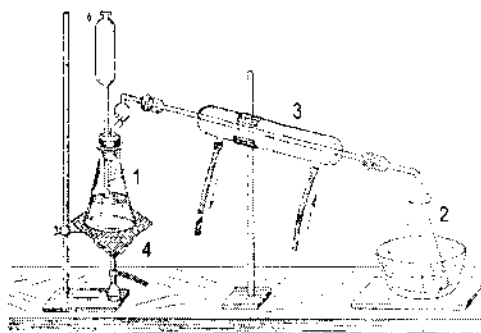
Chưng cất bia, xác định tỷ trọng 20°C/20°C của dịch cất. Xác định tỷ trọng 20°C/20°C của phần dịch chưng cất còn lại sau khi cân hoàn lại trọng lượng ban đầu. Xác định tỷ trọng của bia đã lọc 20°C/20°C. Và sử dụng các công thức tính toán.

3. Hoá chất

- Nước cất.

4. Dụng cụ

- Bình tam giác 750 ml.
- Bộ cất cồn đơn giản có bình cất dung tích 300 - 500 ml.
- Bình tỷ trọng.
- Phễu và giấy lọc.
- Bình ổn nhiệt $20^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$.
- Cân phân tích, độ chính xác 0,0001 g.



Hình 8.1: Bộ chưng cất cồn đơn giản:

1. bình chứa dịch thí nghiệm; 2. bình chứa dịch ngưng tụ (đặt trong nước đá); 3. sinh hàn nước; 4. bếp

5. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu:
 - + Loại CO_2 bằng cách lắc 300 ÷ 500 ml bia trong bình 750 ml ở nhiệt độ $17 \div 20^{\circ}\text{C}$.
 - + Lọc bia.
- Chưng cất:

Cân 100 g ($\pm 0,1$ g) bia vào bình cất (1), bổ sung 50 ml nước cất. Lắp vào bộ cất cồn (hình 8.1). Chú ý: đầu ra của ống ngưng phải dưới khoảng 5 ml nước cất trong bình thu dịch cất (2). Bật bếp để bắt đầu chưng cất cồn. Khi thu được 80 - 90 ml dịch cất thì ngừng chưng cất.

- Làm nguội phần dịch còn lại sau chưng cất (trong bình 1) và thêm nước cất để đạt 100 g, khuấy đều, xác định tỷ trọng $20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$, ký hiệu d_{ER} .
- Xác định tỷ trọng $20^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ của bia đã lọc, ký hiệu d_{EA} .

6. Kết quả

- a. Để xác định hàm lượng cồn có thể dùng hai cách:

- Từ tỷ trọng d_A của dịch cất, tra phụ lục 9 (Bảng tra độ rượu % (v/v) theo tỷ trọng của dung dịch ethanol ở 20°C). Nếu nhiệt độ dung dịch khác 20°C thì hiệu chỉnh theo phụ lục 10 (Bảng hiệu chỉnh tỷ trọng về 20°C , $d < 1$).

- Hoặc tính theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng cồn } A = 517,4(1 - d_A) + 5084(1 - d_A)^2 + 33503(1 - d_A)^3, \% \text{ (m/m)}.$$

Hàm lượng cồn của dịch cất chính là hàm lượng cồn của bia.

Để chuyển đổi từ % (m/m) sang % (v/v) sử dụng công thức:

$$\text{Hàm lượng cồn A \% (v/v)} = \frac{A \% (m/m) \times d_{EA}}{0,791}$$

trong đó:

d_{EA} - tỷ trọng của bia đã lọc;

0,791 - tỷ trọng của ethanol ở 20°C/20°C.

b. Để xác định hàm lượng chất hoà tan thực có thể dùng hai cách:

Từ tỷ trọng d_{ER} , tra phụ lục 1 hoặc tính theo công thức sau:

$$E_R = -460,234 + 662,649 d_{ER} - 202,414 d_{ER}^2, \% (m/m)$$

c. Để xác định hàm lượng chất hoà tan biểu kiến $E_A \% (m/m)$ có thể xác định bằng hai cách:

- Từ giá trị tỷ trọng của mẫu bia lọc, d_{EA} , tra phụ lục 1 hoặc tính theo công thức:

$$E_A = -460,234 + 662,649 d_{EA} - 202,414 d_{EA}^2$$

- Hàm lượng chất hoà tan ban đầu của dịch đường tính theo công thức:

$$P = \frac{2,0665 \cdot A + E_R}{100 + 1,0665 \cdot A} \times 100, \%$$

trong đó:

E_R - hàm lượng chất hoà tan thực của bia (% Plato);

A - hàm lượng cồn của bia % (theo khối lượng);

P - hàm lượng chất hoà tan ban đầu của dịch đường (% Plato);

2,0665 - lượng gam chất hòa tan thực tế để tạo ra 1 gam rượu etylic khi lên men;

1,0665 - lượng CO_2 (0,9565 g) và men (0,11 g) thu được khi lên men 2,0665 g chất hòa tan.

8.2.2. Nồng độ rượu trong bia không cồn hoặc độ cồn thấp

Xác định hàm lượng cồn trong bia bằng phương pháp phân tích enzym. Áp dụng cho các loại bia sau khi đã pha loãng thành bia không cồn hoặc độ cồn thấp. Mẫu phân tích phải có hàm lượng cồn nằm trong phạm vi 0,005 – 0,06 g/l (tương ứng với nồng độ 0,00063 - 0,0078 % (v/v)).

Theo định nghĩa của Anh, bia không cồn là loại bia có chứa hàm lượng cồn dưới 0,05% (v/v) hay 0,04% (m/m) và bia có độ cồn thấp là loại có hàm lượng

cồn dưới 0,5% (v/v) hay 0,4% (m/m). Với loại bia không cồn, nên pha loãng 10 lần trước khi phân tích, còn với loại độ cồn thấp thì nên pha loãng 100 lần để phân tích.

1. Nguyên tắc

Đầu tiên oxy hoá ethanol thành axetaldehyt bằng nicotinamid adenin dinucleotit (NAD^+) khi có alcohol dehydrogenaza. Mặc dù cân bằng phản ứng này không thuận lợi, nhưng nó xảy ra hoàn toàn nếu loại bỏ axetaldehyt. Oxy hoá axetaldehyt thành axêtat bằng NAD^+ với enzym aldehyt dehydrogenaza. NAD^+ trong cả 2 phản ứng đều bị khử thành NADH và được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 340 nm. Hàm lượng ethanol tính dựa vào hệ số hấp thụ phân tử gam của NADH ở 340 nm.

2. Dụng cụ

- Máy quang phổ có thể đo ở bước sóng 340 nm.
- Cuvet 1 cm bằng thuỷ tinh hoặc nhựa dùng 1 lần, dung tích 4 ml.
- Pipet 3 và 10 ml.
- Micropipet 0,1 ml; 0,05 ml.
- Bình định mức 100 ml.
- Bình tam giác 250 ml.

3. Hoá chất

- Bộ hoá chất Boehringer (Boehringer Mannheim GmbH), bao gồm các hoá chất sau (bảo quản ở 4°C):

3a. Dung dịch đệm phosphat kali pH = 9,0.

3b. Viên có chứa 0,4 mg NAD và enzym aldehytdehydrogenaza với hoạt độ 0,8U. Thêm 1 viên vào 3 ml dung dịch đệm phosphat kali và khuấy nhẹ để hoà tan. Mỗi một mẫu và mẫu trắng cần 3 ml dung dịch này, pha ngay khi sử dụng hoặc bảo quản 4°C trong 1 ngày.

3c. Enzym alcohol dehydrogenaza hoạt độ 1200 U trong 1,6 ml.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu:

+ Điều chỉnh nhiệt độ bia đến 20°C , loại khí bằng cách lắc bình. Pha loãng bia không cồn 10 lần. Hút 10 ml mẫu vào bình định mức 100 ml và định mức bằng nước cất.

+ Pha loãng bia có độ cồn thấp 100 lần bằng hai lần pha loãng 10 lần. Lấy 10 ml mẫu vào bình định mức 100 ml, định mức bằng nước cất, tiếp tục pha loãng hai lần. Chú ý độ pha loãng trên chỉ áp dụng cho những mẫu có hàm lượng ethanol gần 0,05% và 0,5% (v/v), nếu nồng độ thấp hơn thì pha loãng ít hơn.

- Mẫu thực: Lấy chính xác 3 ml dung dịch 3b và 0,1 ml mẫu đã pha loãng vào cuvet, khuấy bằng đũa sạch, tránh không để nhiễm vi sinh vật vào các mẫu.

- Mẫu trắng: Chuẩn bị giống như mẫu thực, nhưng thay mẫu bia bằng nước cất.

- Để yên 3 phút rồi đo độ hấp thụ của mẫu thực và mẫu trắng tại bước sóng 340 nm, A_{1s} và A_{1b} .

- Thêm 0,05 ml dung dịch 3c vào các mẫu. Khuấy đều, để yên 10 phút và đo độ hấp thụ ở bước sóng 340 nm, A_{2s} và A_{2b} .

- Tính chênh lệch độ hấp thụ của mẫu thực DA_s và của mẫu trắng DA_b :

$$DA_s = A_{2s} - A_{1s}$$

$$DA_b = A_{2b} - A_{1b}$$

- Chênh lệch độ hấp thụ tổng số (DA_t) bằng hiệu số giữa chênh lệch độ hấp thụ của mẫu thực (DA_s) và chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng (DA_b):

$$DA_t = DA_s - DA_b$$

5. Kết quả

Hàm lượng ethanol trong mẫu bia tính theo công thức:

$$A = \frac{3,15 \times 46,07 \times DA_t \times F}{6300 \times L \times 0,1 \times 2} = 0,1152 \times DA_t \times F$$

trong đó:

DA_t - chênh lệch độ hấp thụ tổng số;

F - độ pha loãng mẫu ban đầu (thường là 10 hoặc 100);

L - đường cuvet 1 cm thì $L = 1$ cm;

2 - từ 1 mol ethanol tạo thành từ 2 mol NADH

0,1 - thể tích mẫu đã pha loãng, ml;

3,15 - thể tích cuối của các chất phản ứng, ml;

6300 - hệ số hấp thụ phân tử lượng của NADH tại 340 nm, lit/mol/cm;

46,07 - phân tử lượng của ethanol.

Chuyển đổi sang % (v/v) hoặc % (m/m) theo công thức:

$$\% (v/v) = \frac{c}{0,78816 \times 10}$$

$$\% (m/m) = \frac{c}{0,99715 \times 10 \times d}$$

trong đó:

- d - tỷ trọng biểu kiến của mẫu bia;
- 10 - hệ số chuyển đổi g/l thành g/100 ml;
- 0,7881 - tỷ trọng của ethanol ở 20°C, g/ml;
- 0,99715 - tỷ trọng của nước ở 20°C, g/ml.

Chú ý:

- Đậy nắp cuvet chứa mẫu trong thời gian chờ và trong khi đo độ hấp thụ.
- Các hoá chất bảo quản ở 4°C, cần điều chỉnh tới 20°C trước khi dùng.
- Kiểm tra độ chính xác của phương pháp bằng cách đo nồng độ ethanol của dung dịch 0,05% (v/v).

8.2.3. Nitơ tổng

(Xem phần 8.1.3).

8.2.4. Độ nhớt

Xác định độ nhớt của bia bằng nhớt kế. Áp dụng cho các loại bia.

Các bước tiến hành và tính toán kết quả tương tự như phần 8.1.5.

8.2.5. Độ màu

a) *Phương pháp quang phổ*: xem phần 8.1.4.

b) *Phương pháp chuẩn độ iot*:

1. Hóa chất

- Dung dịch I₂ 0,1N.

2. Tiến hành

- Lấy 150 đến 200 ml bia cho vào bình tam giác lắc ở nhiệt độ 17 - 20°C cho đến khi ngừng tách khí. Lọc qua giấy lọc đã biết trước trọng lượng khô.
- Dùng ống đong cho vào cốc thủy tinh 100 ml nước cất và một cốc khác 100 ml bia. Để 2 cốc trên nền đá trắng, quan sát màu từ trên xuống. Dùng micropipet nhỏ thật từ từ dung dịch I₂ 0,1N vào cốc nước cất vừa nhỏ vừa dùng

đũa thủy tinh khuấy đều cho đến khi màu của dung dịch trong 2 cốc như nhau.

- Lặp 2 - 3 lần thí nghiệm, chênh lệch giữa các lần không nên quá 0,15 ml dung dịch I_2 0,1N cho 100 ml nước cất.

3. Kết quả

- Độ màu của bia được tính bằng số ml dung dịch I_2 0,1N đã thêm vào 100 ml nước cất. Lấy kết quả trung bình của các lần thí nghiệm lặp, tính chính xác đến 0,01 ml. Đây là cách biểu thị độ màu của bia theo thang điểm Brand.

Hiện nay theo quy chuẩn cho phép thì thường có ba loại bia:

- Bia vàng: tương ứng 0,6 - 1,0 ml I_2 0,1 N.
- Bia nâu tương ứng 1,0 - 2,5 ml I_2 0,1N.
- Bia đen: tương ứng 4 - 8 ml I_2 0,1N.

Hiện nay người ta thường biểu diễn độ màu bằng đơn vị EBC. Để chuyển đổi đơn vị màu số ml I_2 0,1N và EBC có thể sử dụng công thức sau:

$$\text{Độ màu tính theo ml } I_2 \text{ 0,1N} = \frac{\text{EBC}}{18} + \left(\frac{\text{EBC}}{36} \right)^2$$

8.2.6. Độ đắng

(Xác định bằng phương pháp so màu - Spectrophotometric method = IM)

Xác định các hợp chất đắng của bia, chủ yếu là iso- α - axit. Phương pháp có thể dùng cho mọi loại bia đã lọc. Bia đục phải được làm trong bằng máy ly tâm.

Các kết quả chỉ có giá trị nếu bia không chứa những hợp chất sau: *n*-heptyl-4-hydroxybenzoat, saccharin, axit xalicylic, axit sorbic. Vì các hợp chất này được chiết ra bằng iso-octan và đo độ hấp thụ ở 275 nm.

1. Nguyên tắc

Các chất đắng trong bia được chiết sẽ bị axit hoá bằng iso-octan. Sau khi ly tâm, độ hấp thụ của lớp iso-octan được đo tại bước sóng 275 nm, so với 1 mẫu iso-octan tinh khiết.

2. Dụng cụ

- Quang phổ kế UV, cuvet silica 10 mm.
- Máy ly tâm, vận hành với tốc độ 3000 vòng/phút.

- Máy lắc tròn, biên độ dao động 2 – 3 cm.
- Hạt hình cầu thủy tinh.
- Pipet, 0,5 ml, 10 ml và 20 ml.

3. Hoá chất

- Iso-octan (2,2,4-trimetyl pentan) dùng cho máy đo quang phổ UV, độ hấp thụ của dung môi này phải dưới 0,010 khi đo ở 275 nm trong cuvet 10 mm, hiệu chỉnh bằng nước cất.

- Axit HCl 6 M.

4. Tiến hành

- Loại bỏ CO₂ trong các mẫu bia nhưng không để mất bọt và chỉnh nhiệt độ tới khoảng 20°C trước khi phân tích. Dùng pipet lấy chính xác 10 ml mẫu vào ống ly tâm. Thêm 0,5 ml HCl, tiếp theo là 20 ml iso-octan và 2-3 hạt thủy tinh. Vặn nắp chặt, lắc ống trong 15 phút ở 20°C ± 1°C, dùng máy lắc tròn đặt ở 130 ± 5 vòng/phút. Ly tâm trong 3 phút ở 3000 vòng/phút. Đo độ hấp thụ của lớp iso-octan ở 275 nm so với iso-octan tinh khiết.

5. Kết quả

Đơn vị độ đắng (BU) = 50. A_{275} ,

trong đó:

A_{275} - độ hấp thụ ở 275nm so với iso-octan tinh khiết.

8.2.7. Polyphenol tổng số

(Phương pháp quốc tế –IM)

1. Mục đích

Xác định hàm lượng polyphenol tổng số có trong bia bằng phương pháp quang phổ. Phương pháp này có thể áp dụng cho mọi loại bia.

2. Nguyên tắc

Xử lý mẫu với dung dịch cacboxymetyl xenluloza và EDTA. Phản ứng của các polyphenol với các ion sắt trong dung dịch kiềm. Đo độ hấp thụ ở 600 nm của dung dịch màu đỏ so với mẫu trắng.

3. Dụng cụ

- Máy quang phổ.

- Cuvet 10 mm.
- Máy ly tâm.
- Bình định mức có nút mài 25 ml, 50 ml, 100 ml, 1000 ml.
- Pipet chia độ 0,5 ml; 1 ml; 10 ml; 25 ml.

4. Hoá chất

- Hỗn hợp carboxymetyl xenluloza/axit ethylendiamintetraaxetic (CMC/EDTA). Thêm từ từ 10 g Na-CMC và 2 g Na₂-EDTA vào 500 ml nước, khuấy liên tục. Khi đã hoà tan các chất, để yên 1 – 3 h. Sau đó khuấy hoặc dùng máy đồng hoá để hoà tan hoàn toàn, rồi chuyển vào bình định mức 1 lít và định mức bằng nước cất. Có thể ly tâm để làm trong dung dịch. Dung dịch dùng trong 1 tháng.

- Dung dịch chứa ion sắt Fe³⁺, 5,6 g/l. Hoà tan 3,5 g xitrat sắt amoni xanh (16% sắt) với 100 ml nước, dung dịch phải hoàn toàn trong, pha dung dịch dùng trong tuần.

- Dung dịch chứa amoniac, pha loãng 100 ml amoniac đậm đặc (d = 0,92 g/ml) với nước cất thành 300 ml.

5. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Lắc để loại bỏ khí CO₂ trong bia. Ly tâm làm trong bia (dịch đường), không dùng cách lọc. Điều chỉnh nhiệt độ bia tới 20°C.

- Mẫu thực:

+ Lấy 10 ml bia (dịch đường) và 8 ml hỗn hợp CMC/EDTA vào định mức 25 ml, đầy nắp, lắc kỹ.

+ Thêm 0,5 ml dung dịch chứa ion sắt vào mẫu phân tích, lắc đều. Thêm 0,5 ml dung dịch amoniac và lắc đều. Định mức tới 25 (hoặc 50 ml nếu cần pha loãng khi mẫu có hàm lượng polyphenol > 400 mg/l) với nước cất, lắc đều. Sau 10 phút, đo độ hấp phụ ở 600 nm, phải đảm bảo dung dịch đo trong.

- Mẫu trắng:

Hoà 10 ml bia (dịch đường) và 8 ml CMC/EDTA trong bình định mức 25 ml (hoặc 50 ml). Thêm 0,5 ml dung dịch amoniac, lắc đều. Định mức bằng nước cất. Để yên trong 10 phút và đo độ hấp phụ. Đảm bảo dung dịch đo phải trong.

6. Kết quả

Tính hàm lượng polyphenol theo công thức:

$$P = A.820.f$$

trong đó:

P - hàm lượng polyphenol (mg/l);

A - độ hấp phụ ở 600 nm;

f - hệ số pha loãng (= 2 nếu pha loãng tới 50 ml).

8.2.8. Flavanoit

Xác định hàm lượng các chất flavanoit trong bia hoặc dịch đường bằng phương pháp quang phổ, áp dụng cho các loại bia kiểu Pilsner, bia được phân tích phải có hàm lượng flavanoit trong khoảng 3,0 – 200 mg/l tính theo (+) catechin. Nếu hàm lượng flavanoit cao cần pha loãng bia hơn 10 lần.

1. Nguyên tắc

Trong môi trường axit, chromogen *p*-dimethyl aminocinnamaldehyt phản ứng với các flavanoit như (+) catechin thành các chất có màu.

Phương pháp này cho phép định lượng catechin và proanthocyanidin, mà không tính đến các flavanol và flavanol glycozit.

Hoà trộn bia đã pha loãng vào dung dịch axit chromogen và xác định các chất màu tạo thành bằng cách đo độ hấp phụ của hỗn hợp ở bước sóng 640 nm. Nồng độ các flavanoit xác định theo giá trị trung bình của đường chuẩn đo bằng (+) catechin, do đó kết quả thu được sẽ quy về (+) catechin.

2. Dụng cụ

- Máy quang phổ và cuvet thuỷ tinh 10 mm.
- Ống đong 250 ml.
- Bình định mức 100 và 500 ml.
- Pipet 1, 5 và 10 ml.
- Bình tam giác 1000 ml.

3. Hoá chất

- Axit chlohydric đậm đặc, $d = 1,19$.
- Methanol.
- *p*-Dimethylaminocinnamaldehyt 98%.

- Dung dịch chromogen 1 g/l. Hoà tan 500 mg *p*-dimethyl aminocinnamaldehyt trong hỗn hợp gồm 125 ml axit chlohydric đậm đặc và 350 ml methanol (đã làm nguội trước). Pha loãng dung dịch tới 500 ml bằng methanol. Dung dịch dùng trong 1 tuần và bảo quản trong bình tối màu.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Điều chỉnh nhiệt độ bia về 20°C. Loại khí trong bia bằng cách lắc bình chứa bia, lúc đầu lắc nhẹ, rồi lắc mạnh dần cho tới khi bia hết khí. Không loại bỏ khí bằng cách lọc vì giấy lọc hấp phụ các chất flavanoit.

- Pha loãng: Hút 10 ml bia đã loại sạch khí vào bình định mức 100 ml, định mức tới 100 ml bằng nước cất.

- Mẫu thực: Hút 1 ml bia đã pha loãng vào ống nghiệm. Thêm vào 5 ml dung dịch chromogen, lắc đều. Sau 10 phút, chuyển vào cuvet và đo độ hấp thụ ở bước sóng 640 nm (A_{640s}).

- Mẫu trắng: Hoà 1 ml nước cất với 5 ml dung dịch chromogen, rồi đo độ hấp thụ ở 640 nm (A_{640b}), làm 2 mẫu lặp.

5. Kết quả

$$\text{Hàm lượng flavanoit} = 335 \cdot (A_{640s} - A_{640b}) \quad (\text{mg/l (+) catechin})$$

trong đó:

A_{640s} - độ hấp thụ trung bình của mẫu thực;

A_{640b} - độ hấp thụ trung bình của mẫu trắng.

8.2.9. Diacetyl ($\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$)

1. Mục đích

Xác định các chất vicinaldixeton trong bia bằng máy đo quang phổ đo ở bước sóng cực tím.

2. Nguyên tắc

Tách các chất dixeton từ bia bằng cách chưng cất. Cho phản ứng phân chưng cất được với dung dịch O-fenilendiamin và tạo được chất dẫn xuất của quinoxalin. Axit hoá và đo quang phổ các chất thu được từ phản ứng. Tính nồng độ các chất dixeton nhờ một hệ số được xác định qua chất chuẩn.

3. Dụng cụ

- Dụng cụ chưng cất Parnas hay Markam, để chưng cất hơi nước có thể chứa 100 ml mẫu.

- Ống đong 25 ml và 100 ml.

- Quang phổ kế đo ở bước sóng cực tím.

- Các cuvet 10 mm.

3. Hóa chất

- Axit HCl 4M.
- O-fenilendiamin dung dịch có nồng độ 10 g/l trong axit HCl 4M, chuẩn bị cùng một ngày và bảo quản chỗ tối. O-fenilendiamin độc và có thể gây dị ứng nên cần phải thao tác rất cẩn thận và phải đi găng tay cao su.
- Dung dịch diaxetyl gốc, 5 g/l trong nước, bảo quản dung dịch này trong lọ thủy tinh màu nâu và để ở trong tủ lạnh. Thời gian bảo quản là 6 tháng.
- Dung dịch diaxetyl chuẩn, 250 mg/l: hút 5 ml dung dịch gốc vào bình định mức 100 ml và định mức bằng nước cất tới gần bình. Bảo quản dung dịch trong lọ thủy tinh màu nâu, trong tủ lạnh, 6 tháng.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu: Ly tâm hoặc lọc mẫu còn chứa nấm men để được dịch bia tinh khiết.
- Lấy 100 ml mẫu bằng ống đong và đưa mẫu vào bình cất. Chung cất mẫu đến khi thu được 25 ml dịch cất sao cho thời gian đun nóng không quá 6 phút và thời gian chung cất từ 8 -10 phút. Dùng pipet lấy 10 ml dịch cất được cho vào ống nghiệm khô. Thêm 0,5 ml dung dịch O-fenilendiamin vào lắc đều hỗn hợp. Để yên trong chỗ tối khoảng 20 - 30 phút. Thêm 2 ml axit HCl 4M vào hỗn hợp phản ứng. Đo trên quang phổ kế ở bước sóng hấp thụ là 335 nm so sánh với nước cất (A_{335}).
- Song song làm 1 mẫu trắng bằng cách thay dịch cất bằng nước cất. Tiến hành như đã chỉ dẫn ở trên. Đo trên quang phổ kế với bước sóng hấp thụ là 335 nm so sánh với nước (A_b).
- Làm mẫu chuẩn: Dùng pipet cho 9,9 ml nước vào ống nghiệm khô, thêm 0,1 ml dung dịch diaxetyl chuẩn và lắc đều. Tiến hành như đã chỉ dẫn ở các mục trên. Đo trên quang phổ kế ở bước sóng hấp thụ là 335 nm so sánh với nước (A_{st}).

5. Kết quả

Tính hàm lượng các chất diaxetyl theo công thức sau:

$$\frac{A_{335} - A_b}{A_{st} - A_b} \times 0,625 \text{ , mg/l}$$

Mẫu số ($A_{st} - A_b$) phải xấp xỉ 0,230, nếu không phải chuẩn bị mẫu và dung dịch mới.

8.2.10. Độ chua

(Xác định bằng phương pháp đo pH).

Độ axit toàn phần bao gồm các axit có thể định lượng bằng dung dịch kiềm chuẩn. Những axit này chủ yếu là các axit hữu cơ như axit axetic, malic, citric, tartaric, lactic... Các axit carbonic và SO_2 dưới thể tự do hay kết hợp đều không tính trong độ chua thực phẩm. Do đó, bia, nước ngọt, hoa quả... có chứa CO_2 hoặc SO_2 đều được loại trừ trước lúc chuẩn độ để xác định độ axit.

Trong sản xuất bia, độ chua được biểu thị bằng số ml dung dịch NaOH 1N cần thiết để trung hòa lượng axit tự do chứa trong 100 ml dịch bia.

1. Nguyên tắc

Lượng axit tổng số có trong bia là tổng lượng axit có thể định lượng bằng dung dịch kiềm chuẩn để đưa pH của dịch bia tới 8,2 trong đó không tính đến axit carbonic.

2. Dụng cụ - hóa chất

- Máy đo pH.
- Dung dịch NaOH 0,1 N hoặc KOH 0,1N.
- Dung dịch đệm pH = 7: hoà tan 107,3 g KH_2PO_4 vào 500 ml dung dịch NaOH 1N, định mức tới 1 lít bằng nước cất.

3. Tiến hành

- Lấy 150 – 200 ml bia cho vào bình tam giác 500 – 1000 ml, lắc ở nhiệt độ 20°C cho đến khi ngừng tách khí. Lọc bia qua giấy lọc.
- Đưa nhẹ nhàng đầu cực đo vào dung dịch đệm pH = 7, nhiệt độ 20°C , chỉnh máy sao cho pH = 7. Lấy đầu cực ra và dùng bình tia rửa cẩn thận.
- Lấy chính xác 50 ml dịch bia đã tách CO_2 vào bình tam giác 150 ml, đưa nhẹ nhàng đầu cực đo vào và cho dung dịch NaOH 0,1N để chuẩn tới khi đạt pH = 8,2 ở nhiệt độ 20°C , lắc nhẹ trong khi chuẩn độ.

4. Kết quả

Độ axit được tính theo công thức:

$$Ax = 2 \cdot n, \quad (\text{ml}/100 \text{ ml bia})$$

trong đó:

- n - số ml dung dịch NaOH 0,1N;
- 2 - hệ số quy chuẩn cho 100 ml bia.

8.2.11. CO₂

a) Phương pháp áp lực

1. Nguyên tắc

Đo áp suất khí trong cổ chai bia, kết quả đo được thể hiện trên áp kế. Tại nhiệt độ xác định, áp suất sẽ tỷ lệ với nồng độ CO₂ có trong bia.

2. Dụng cụ

- Dụng cụ đo áp lực hình vẽ 8.2.
- Bình cách thủy.
- Nhiệt kế.

3. Tiến hành

- Trước khi xác định, chai bia cần được làm lạnh hoặc làm ấm tới nhiệt độ $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Muốn vậy, cần nhúng chai bia lạnh vào bình cách thủy nhiệt độ 25°C khoảng 1 giờ. Sau đó, lấy ra lau khô phía ngoài rồi đặt chai vào giá (1). Tiếp đó vặn vít (2) để nâng dần chai lên, khi nút chai gần tiếp xúc với đuôi áp kế (3) ta điều chỉnh để đuôi áp kế cắm thẳng vào giữa nút chai. Chỉnh xong, ta vặn vít và nâng chai cho nút chạm vào đuôi áp kế, cao su bọc đuôi áp kế sẽ bị nén và do đó đuôi nhọn của áp kế sẽ chọc thủng nút chai và áp lực CO₂ sẽ được biểu thị trên áp kế.

- Đánh dấu mức bia trong chai, sau đó rót bia ra cốc tráng sạch rồi đổ nước tới gần đã đánh dấu. Tiếp theo, dùng pipet hay rót thêm nước đến đầy tràn như ban đầu. Lượng nước cho thêm vào chính là thể tích CO₂ và cả không khí chiếm trong chai (tính theo ml).

4. Kết quả

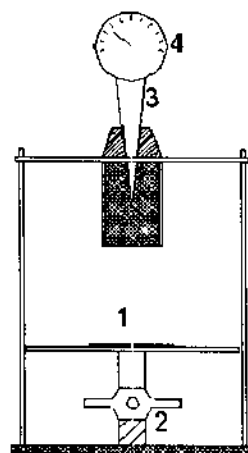
Hàm lượng CO₂ trong bia được tra bảng dưới hoặc tính theo công thức sau: (tương ứng 2 loại chai 0,33 l và 0,5 l).

$$\text{CO}_2 = (P + 1) \times (0,122 + A)$$

trong đó:

P - chỉ số đọc trên áp kế = atm;

0,122 g/l - hằng số hòa tan của CO₂ trong bia;



Hình 8.2: Thiết bị đo áp lực CO₂.

1. giá đỡ; 2. vít xoắn;
3. đầu nhọn của áp kế;
4. áp kế.

A - hệ số phụ thuộc lượng CO₂ chiếm trong chai.

Hệ số A đối với các loại chai cho theo bảng thực nghiệm (bảng 8.1).

5. Ví dụ

Áp kế đọc 2,05 atm. Thể tích CO₂ chiếm là 2 ml. Do đó hàm lượng CO₂ (theo % trọng lượng) là:

$$\text{CO}_2 = (2,05 + 1) \times (0,122 + 0,001) = 0,41\%$$

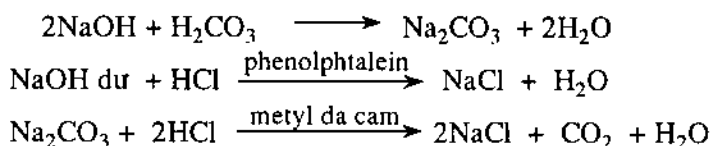
Bảng 8.1: Hệ số A để xác định CO₂ tùy theo loại chai

Thể tích CO ₂ chiếm (ml)	Chai 0,5l	Chai 0,33l
2 - 7	0,001 - 0,002	0,002 - 0,004
8 - 12	0,003	0,005
13 - 17	0,005	0,008
18 - 22	0,007	0,011
23 - 27	0,009	0,013
28 - 32	0,011	0,016
33 - 37	0,013	0,019
38 - 42	0,014	0,022
43 - 47	0,016	0,024
48 - 52	0,018	0,028

b) Phương pháp hóa học

1. Nguyên tắc

Dùng NaOH tác dụng với H₂CO₃ (tức là với CO₂ và H₂O) để tạo ra muối carbonat natri. Định lượng carbonat natri tạo thành suy ra lượng CO₂. Phản ứng chính:



2. Hóa chất

- Dung dịch NaOH 2N, pha 80 g NaOH/ 1 lít.
- Dung dịch phenolphthalein 1% trong cồn.
- Dung dịch metyl da cam 1% trong cồn.
- Dung dịch HCl 0,1 N.

3. Tiến hành

- Lấy chai bia (hay chai nước giải khát) còn đầy nút kín rồi buộc choàng vào cổ chai 1 đoạn săm xe đạp dài khoảng 30 cm. Buộc chặt đầu choàng vào cổ chai bằng dây cao su sau đó cho vào ống cao su khoảng 30 ml dung dịch NaOH 2N và 1 cái mở nút chai. Khẽ lần mở nút ra, dốc đi dốc lại chai nhiều lần và để yên khoảng 10 phút.

- Mặt khác làm thí nghiệm trắng như sau: Dùng pipet lấy 33 ml dịch bia cho vào cốc 100 ml rồi khuấy liên tục bằng đĩa thủy tinh để tách hết CO_2 (trong 30 phút), tiếp đó cho 3 ml NaOH 2N lắc đều và để yên 10 phút.

- Chuẩn bị 2 cốc 100 hay 150 ml sạch và khô, dùng pipet lấy 10 ml bia trong cốc trên (sau khi lọc hoặc đã lắng trong) cho vào cốc thứ nhất, cho 10 ml nước cất vào cốc thứ 2 thêm vào mỗi cốc 5 giọt phenolphthalein rồi dùng dung dịch HCl 0,1N trung hòa đến mất màu hồng. Lượng dung dịch tiêu hao trong giai đoạn này là do tác dụng với NaOH dư không tính. Tiếp tục cho thêm vào mỗi cốc vài giọt methyl da cam rồi định phân tiếp đến khi màu da cam chuyển thành màu phớt hồng. Ta đánh dấu lượng dung dịch HCl tiêu hao cho mỗi cốc.

4. Kết quả

- Giả sử ở cốc thí nghiệm thực, lượng HCl 0,1 N tiêu hao là a ml, ở thí nghiệm trắng là b ml thì $V = (a - b)$ ml chính là lượng dung dịch HCl 0,1 N tham gia phản ứng với Na_2CO_3 tức là phản ứng với CO_2 .

Hàm lượng CO_2 trong bia tính theo công thức:

$$\text{CO}_2 \text{ (g/100 ml)} = \frac{0,0044 \times V (V_0 + 30)}{V_0 \times 10}$$

trong đó:

0,0044 - lượng gam CO_2 tương ứng 1 ml dung dịch HCl 0,1 N;

V - thể tích HCl để kiểm hóa;

30 - số ml NaOH 2 N cho vào kiểm hóa;

V_0 - thể tích bia trong chai, thường khoảng 250 - 330 ml hoặc 500 ml;

10 - số ml bia đã kiểm hoá lấy đi phân tích.

Kết quả phân tích là trung bình cộng ít nhất 3 lần các kết quả xác định song song và cho phép sai số giữa các lần không lên quá 0,1.

Phương pháp này có nhược điểm là kém chính xác, tốn thời gian, tốn bia và hóa chất nhưng nó dễ thực hiện ở các cơ sở sản xuất bia.

8.2.12. Dự đoán độ bền keo

1. Mục đích

Xác định khả năng gây đục bia. Áp dụng cho mọi loại bia đã lọc.

2. Nguyên tắc

Độ đục của bia được đo ở 0°C. Mẫu được để trong bồn nước 60°C trong 48 giờ, sau đó làm nguội và giữ 0°C qua đêm, rồi đo độ đục.

3. Dụng cụ

- Bồn lạnh, đặt 0°C.
- Bình ổn nhiệt, đặt $60 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Máy đo độ đục.

4. Tiến hành

- Lấy mẫu: Lấy chai bia hoặc lon ở cuối dây chuyền.
- Chuẩn bị mẫu: Đo ngay mẫu trong chai hoặc phải chuyển bia vào chai thích hợp để đo, chú ý không để không khí vào mẫu.
- Thực hiện cùng một lúc 6 mẫu lặp. Đặt các chai mẫu đã chuẩn bị trong bồn lạnh 0°C, để qua một đêm. Đo độ đục ban đầu ngay trong buổi sáng. Giữ chai đứng thẳng, không làm khuấy động bia trong chai trong bồn 60°C trong 48 giờ, rồi để vào bồn lạnh 0°C qua đêm. Đo độ đục cuối ở 0°C.

5. Kết quả

Ghi giá trị trung bình độ đục đầu và cuối.

Chú ý:

Thời gian 48 giờ để so sánh các kết quả giữa các nhà máy bia và các vùng khác nhau. Các điều kiện phân tích có thể theo mỗi nhà máy cho mỗi loại bia. Phương pháp mô tả trên là phương pháp kiểm tra nhanh. Để phù hợp với thực tế, thường bảo quản mẫu bia trong thời gian 3 – 6 tháng ở nhiệt độ giao dịch trên thị trường.

Chương 9

KIỂM TRA DỊCH ĐƯỜNG, DỊCH LÊN MEN VÀ CỒN THÀNH PHẨM

9.1. DỊCH ĐƯỜNG VÀ DỊCH LÊN MEN RƯỢU

9.1.1. *Nồng độ chất hoà tan của dịch đường và giấm chín*

Trong dịch đường hoá luôn chứa một lượng chất hoà tan, chủ yếu là tinh bột tan, dextrin và đường oligo có số gốc glucoza khác nhau. Ngoài ra còn chứa một lượng các chất hoà tan khác như: protein, chất khoáng. Các chất này mang tên chung là chất hoà tan hay chất khô của dịch đường và được đo bằng đường kế, khúc xạ kế hoặc Bomé kế ở điều kiện 20°C.

Đường hoá xong ta đem lọc dịch đường rồi lấy dịch trong cho vào ống đong để đo theo loại thước như đường kế, Bx hoặc Bomé kế, cũng có thể dùng khúc xạ kế. Nếu nhiệt độ mẫu khi đo khác 20°C thì cần hiệu chỉnh theo phụ lục 2 hoặc 3 về nhiệt độ 20°C.

Nồng độ chất hoà tan sau lên men cũng được đo bằng đường kế, hoặc Bomé kế ở 20°C..

9.1.2. *Đường và tinh bột sót trong giấm chín*

Sau khi lên men trong giấm chín còn chứa một lượng nhỏ các chất bao gồm dextrin, maltoza, pentoza và đôi khi có cả glucoza.

Hàm lượng chất khử chung nhiều hay ít tùy thuộc nguyên liệu và điều kiện kỹ thuật khi đường hoá và lên men, có thể từ 0,2 đến 1 g/100 ml. Glucoza, maltoza và dextrin thuộc dạng gluxit có khả năng lên men được, còn đường pentoza không thể biến thành rượu dưới tác dụng của hệ enzym zymaza.

9.1.2.1. Phương pháp thuỷ phân bằng axit

1. Nguyên tắc

Sử dụng axit thuỷ phân tinh bột và các đường phức thành các đường đơn giản, sau đó xác định đường bằng phương pháp hóa học dựa vào tính dễ oxy hoá của đường đơn giản trong môi trường kiềm.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác 250ml, đỉnh định mức 250 ml.
- Ống đong.
- Ống sinh hàn khí.
- Giấy lọc, phễu.
- Pipet, buret.

3. Hoá chất

- HCl đậm đặc (hoặc 25%)
- Giấy quỳ (hoặc phenolphthalein).
- NaOH 10%.
- $K_3Fe(CN)_6$ 1%.
- Metylen xanh.
- KOH 2,5N.

4. Tiến hành

- Lấy 50 ml giấm chín cho vào bình tam giác 250 ml, thêm vào đó 50 ml nước cất và 6 ml HCl đậm đặc (hoặc 10 ml HCl 25%), nối bình với ống sinh hàn khí dài ít nhất 50 cm. Mặt khác lấy 50 ml dịch lọc giấm chín rồi cho vào một bình khác, cũng thêm nước và axit như mẫu giấm chưa lọc. Sau khi nối ống sinh hàn khí, đặt cả hai bình tam giác vào nồi cách thuỷ và đun sôi 2 giờ. Tiếp đó làm nguội tới nhiệt độ phòng rồi trung hoà bằng NaOH 10% tới khi màu của giấy quỳ chuyển sang xanh lơ. Chuyển toàn bộ dịch vào hai bình định mức 250 ml rồi thêm nước tới gần bình, đem lọc qua giấy vào hai bình khô khác nhau.

- Dịch lọc của hai bình dùng để xác định đường theo các phương pháp khác nhau.

5. Kết quả

Tuỳ theo phương pháp xác định đường khử mà ta có cách tính toán kết quả khác nhau.

- Nếu xác định đường theo phương pháp feryxanua ta có:

$$x = \frac{a}{m} \times 100, \text{ g/100 ml}$$

trong đó:

a - số gam glucoza tương ứng với 20 ml feryxyanua kali;
m - số ml giấm chín ở mẫu thí nghiệm.

• Số ml giấm chín chưa lọc ở mẫu thí nghiệm $m = \frac{50}{250} \times b$;

• Số ml giấm chín lọc ở mẫu thí nghiệm $m = \frac{50}{250} \times b_0$.

b và b_0 - số ml dịch đường loãng tiêu hao khi định phân ở mẫu giấm chín chưa lọc và đã lọc.

6. Ví dụ

$$a = 0,025 \text{ g}; b = 10 \text{ ml}; b_0 = 12,5 \text{ ml}$$

Tổng tinh bột và đường sót sẽ là:

$$x = \frac{0,025 \times 250}{10 \times 50} \times 100 = 1,25 \text{ g/100 ml}$$

Như vậy lượng chất khử sót trong 100 ml giấm chín đã lọc là:

$$\frac{0,025 \times 250}{12,5 \times 50} \times 100 = 1 \text{ g/100ml}$$

Hàm lượng tinh bột sót: $(1,25 - 1,0) \times 0,9 = 0,225 \text{ g/100 ml}$

9.1.2.2. Phương pháp antron: ($\text{C}_6\text{H}_4\text{COCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$)

1. Nguyên tắc

Trong dung dịch axit sulfuric đậm đặc, antron sẽ phản ứng với glucit lên men, với cả đường đơn giản lẫn phức tạp, vì thế không cần thuỷ phân dextrin và disacarit thành đường đơn. Điều này cho phép ta rút ngắn được thời gian phân tích rất nhiều - nhưng ưu điểm chủ yếu của phương pháp là ở chỗ cho phép ta xác định lượng đường lên men được mà không phụ thuộc sự có mặt của đường pentoza. Nhờ đó kết quả thu được chỉ đặc trưng cho tổn thất thực của sản xuất.

2. Dụng cụ

- Cốc, bình định mức 100, 250 ml.
- Ống nghiệm.
- Máy so màu.

3. Hoá chất

- Dung dịch antron được chuẩn bị ngay trước khi phân tích: Hoà tan 200 mg antron [$\text{C}_6\text{H}_4\text{COCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$] trong 100 ml axit sulfuric đậm đặc.

- ZnSO_4 30%.
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 15%.
- H_2SO_4 0,5%.

4. Tiến hành

- Cân 2 mẫu giảm chín, mỗi mẫu 20 g trong cốc khô đã biết trước khối lượng. Lấy một mẫu cho vào bình định mức 250 ml, tráng sạch bằng nước cất và rót tất cả vào bình. Mẫu này dùng để xác định đường chưa lên men, còn mẫu thứ hai dùng để xác định tổng lượng đường cộng tính bột sót.

- Ở mẫu thứ nhất ta cho vào bình định mức 2 ml dung dịch ZnSO_4 30% và giữ từ 2 đến 3 phút để kết tủa protein. Sau đó cho 2 ml dung dịch $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 15% rồi thêm nước cất tới gần bình và đem lọc vào cốc khô. Dịch lọc ban đầu còn đục bỏ đi, lấy dịch trong dùng để phân tích.

- Để tiến hành phản ứng, dịch lọc cần pha loãng sao cho trong 10 ml đem phân tích chứa từ 5 đến 12 mg đường. Muốn vậy dùng ống hút lấy 5 hoặc 10 ml dịch lọc cho vào bình định mức 100 ml rồi thêm nước cất tới gần bình.

- Lấy ít nhất hai ống nghiệm có nút mài đã sấy khô đặt vào giá. Sau đó dùng pipet lấy 10 ml dung dịch antron cho vào các ống nghiệm (Cẩn thận vì antron hoà tan trong H_2SO_4 đậm đặc). Tiếp theo cho vào ống nghiệm thứ nhất 5 ml nước cất (mẫu kiểm chứng), các ống nghiệm khác cho 5 ml dịch đường loãng. Khi cho nước và dịch đường phải từ từ nhỏ theo thành ống sao cho dịch không bị xáo trộn và chia thành hai lớp rõ rệt. Dùng nút mài đậy kín và quấn chặt bằng dây cao su nhỏ. Lắc đều các ống rồi đặt giá cùng ống nghiệm vào nồi nước đang sôi, sao cho sau 1/2 phút thì sôi trở lại và giữ thêm 5,5 - 6 phút nữa. Lấy giá cộng ống nghiệm nhúng ngay vào nước lạnh.

- Đo mật độ quang của các dung dịch trên máy so màu quang điện với cuvet 5 mm với hai kính lọc sáng khác nhau.

- Kết quả khi dùng kính lọc màu da cam ($\lambda = 610 \text{ nm}$) ta có D_1 , sau đó đo với kính lọc sáng màu tím ($\lambda = 413 \text{ nm}$) ta có mật độ quang D_2 .

- Mẫu giảm thứ hai để xác định tổng cả tinh bột và đường, vì vậy cần chuyển tinh bột sang trạng thái hoà tan. Muốn vậy ta chuyển toàn bộ 20 g giảm vào bình định mức 250 ml rồi cho thêm 80 ml dung dịch H_2SO_4 0,5% để rửa và tráng cốc. Nồng độ H_2SO_4 trong dung dịch sẽ là 0,4%. Đặt bình vào nước đang

sôi và cho sôi 15 phút. Sau đó làm nguội, thêm nước tới gần bình và đem cho lọc trong.

- Dung dịch trong đem pha loãng và tiến hành cho phản ứng với antron như trên. Sau đó cũng đo mật độ quang D_3 và D_4 .

5. Kết quả

Hàm lượng đường sót trong giấm chín được tính theo công thức :

$$Đ_s = \frac{18,9 (D_1 - D_2)}{1000} \times f, \%$$

Tổng lượng tinh bột và đường trong giấm chín cũng xác định theo công thức:

$$Đ_t = \frac{18,9 (D_3 - D_4)}{1000} \times f, \%$$

trong đó: f - hệ số pha loãng của giấm chín.

6. Ví dụ

Lúc đầu cân 20 g, pha loãng thành 250 ml, lần sau lấy 10 ml pha thành 100ml. Hệ số pha loãng f sẽ là :

$$f = \frac{250 \times 100}{20 \times 10} = 125$$

Đo mật độ quang được $D_1 = 0,525$ và $D_2 = 0,156$

Hàm lượng đường sót sẽ là:

$$Đ_s = \frac{18,9 (0,525 - 0,156)}{1000} \times 125 = 0,86\%$$

Khi đo mật độ quang của mẫu đã thủy phân bằng axit được $D_3 = 0,742$; $D_4 = 0,202$.

Lượng tinh bột cộng đường trong giấm sẽ là:

$$Đ_t = \frac{18,9 (0,742 - 0,202)}{1000} \times 125 = 1,27\%$$

Hàm lượng tinh bột sót sẽ là:

$$(1,27 - 0,86) \times 0,9 \% = 0,37\%$$

9.1.3. Đường sót trong giấm chín từ rỉ đường

1. Nguyên tắc

Trong giấm chín rỉ đường chứa chủ yếu là sacaroza và hỗn hợp đường hoàn

nguyên gồm glucoza và fructoza, vì thế trước khi xác định cần thuỷ phân sacaroza thành đường khử. Sau đó xác định đường bằng một trong các phương pháp xác định đường (xem phần 4.3).

2. Dụng cụ

- Bình định mức 100 ml.
- Bình tam giác 250 ml.
- Ống sinh hàn khí.
- Ống đong.

3. Hoá chất

- Axetat chì trung tính.
- Na_2HPO_4 10%.
- HCl 25%.
- NaOH 10%.
- Phenolphtalein 0,5%.
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%.
- KOH 2,5N.
- Xanh metylen 0,5%.

4. Tiến hành

- Lấy 50 ml dung dịch lọc giấm chín cho vào bình định mức 100 ml. Sau đó cho 8 ml dung dịch axetat chì trung tính để kết tủa protein, lắc đều rồi thêm vào 16 ml dung dịch Na_2HPO_4 10%, thêm nước cất tới gần bình rồi đem lọc.

- Lấy 50 ml dịch lọc cho vào bình tam giác 250 ml, sau đó thêm 5 ml HCl 25% rồi nối với ống sinh hàn khí và đun sôi cách thuỷ trong 10 phút để biến đường saccaroza thành glucoza và fructoza. Làm lạnh đến nhiệt độ phòng rồi trung hoà bằng dung dịch NaOH 10% đến xuất hiện màu hồng nhạt với chỉ thị là phenolphtalein. Trung hoà xong ta chuyển toàn bộ dịch vào bình định mức 100 ml rồi thêm nước cất tới gần bình.

- Xác định đường khử trong dung dịch có thể tiến hành theo phương pháp Graxianop.

5. Kết quả

$$X = \frac{a}{m} \times 100, \text{ g/100 ml}$$

trong đó:

a - số g glucoza tương ứng với 20 ml ferixyanua kali;

m - số ml giấm chín ở mẫu thí nghiệm.

Ví dụ: giả sử khi xác định đường theo phương pháp ferixyanua kali ta thấy lượng dịch tiêu hao là 10 ml. Biết 20 ml ferixyanua tương đương a = 0,025 g đường glucoza.

Do đó hàm lượng đường sót trong giấm chín sẽ là:

$$X = \frac{0,025}{m} \times 100 \text{ g/100ml}$$

$$\text{Với } m = \frac{50}{100} \times \frac{50}{100} \times 10 = 2,5 \text{ ml giấm chưa pha.}$$

Đường sót tính theo glucoza (chất khử) sẽ là:

$$\frac{0,025}{2,5} \times 100 = 1 \text{ g/100ml}$$

9.1.4. Độ chua của giấm chín

1. Nguyên tắc

Độ chua của giấm cho biết mức độ nhiễm tạp khuẩn trong quá trình lên men và có thể biểu diễn theo 2 cách:

- Biểu diễn theo số gam axit H_2SO_4 chứa trong 1 lít giấm như các nhà máy rượu của ta vẫn làm.

- Biểu diễn theo độ: Một độ chua là số ml NaOH có nồng độ 1N cần thiết để trung hoà axit tự do chứa trong 20 ml giấm. Nếu số ml NaOH quy về 1N là bằng 1, ta nói giấm chín có độ chua bằng 1 độ. Một độ chua tương đương 2,45 g H_2SO_4 /lít.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác.
- Cốc.
- Pipet.
- Buret.

3. Hoá chất

- NaOH 0,1N.
- Phenolphtalein 0,5%.

4. Tiến hành

Lấy 20 ml dung dịch lọc của giấm chín hoặc dịch lên men cho vào bình tam giác 250 ml chứa sẵn 50 hoặc 100 ml nước cất trung tính. Tiếp theo dùng dung dịch NaOH 0,1N để chuẩn đến xuất hiện màu hồng nhạt với chỉ thị là phenolphtalein hoặc màu chuyển từ hồng nhạt sang màu xanh nếu chỉ thị là giấy quỳ.

5. Kết quả

Độ chua của giấm chín (độ) được tính theo công thức:

$$\text{Độ chua (độ)} = \frac{n}{10}, \text{ độ}$$

trong đó:

n - số ml NaOH 0,1N tiêu hao khi định phân 20 ml dịch lọc.

Trường hợp tính theo gam H_2SO_4 thì độ chua sẽ tính theo công thức :

$$\frac{0,049 \times n \times 1000}{20} = 2,45 n, \text{ g/l}$$

Trong điều kiện lên men bình thường, độ chua của giấm chín tăng khoảng 0,5 đến 0,7 g/l so với độ chua của dịch đường hoá.

9.1.5. Nồng độ rượu

a) Xác định độ rượu theo phương pháp chưng cất

Sau lên men trước hết ta cần kiểm tra nồng độ rượu trong giấm đồng thời thỉnh thoảng phải kiểm tra rượu sót ở đáy tháp thô và tháp tinh. Muốn xác định nồng độ rượu trong dung dịch bất kỳ trước hết phải tách rượu khỏi các chất hoà tan khác bằng chưng cất, rồi đo nồng độ rượu bằng một trong các phương pháp sau: rượu kế thuỷ tinh, cân tỷ trọng hoặc theo phương pháp hóa học.

1. Dụng cụ

- Hệ thống cất cồn (xem phần 8.2.1), bình định mức 100 ml.
- Các dụng cụ đo nồng độ rượu: rượu kế thuỷ tinh hoặc cân tỷ trọng.

2. Tiến hành

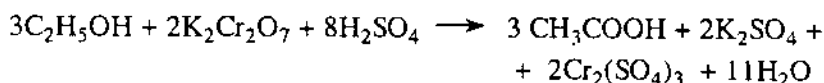
Lấy 100 ml dịch lọc giấm chín có nhiệt độ xấp xỉ 20°C cho vào bình định mức 100 ml, rót dịch giấm vào bình cất 1 rồi tráng bình bằng 100 ml nước cất rồi cũng đổ vào bình 1 có dung tích khoảng 500 ml.

Nối bình với hệ thống cất như ở hình 8.1 (chú ý là ở đây bình 2 được thay bằng bình định mức 100ml), tiến hành chưng cất cho tới khi nước ngưng ở bình 2 còn 2 - 3 ml nữa thì dừng tới gần 100 ml. Cất xong đặt bình 2 vào nồi điều nhiệt và giữ ở nhiệt độ 20°C (cùng nhiệt độ khi lấy dịch giấm chín).

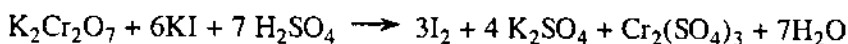
Sau 10 đến 15 phút thêm nước cất tới gần bình, đậy kín và chuẩn bị đo nồng độ rượu trong dung dịch như đã trình bày ở phần kiểm tra độ rượu trong cồn.

b) Xác định nồng độ rượu theo phương pháp hoá học

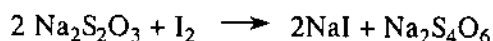
Đối với kiểm tra rượu sót (nồng độ thấp), sau khi thu được dịch cất ta đem xác định rượu theo phương pháp hoá học và dựa trên cơ sở phản ứng sau :



Lượng bicromat kali dư được xác định theo phương trình phản ứng:



Lượng I_2 giải phóng ra được định phân bằng $Na_2S_2O_3$:



3. Hoá chất

- Dung dịch bicromat kali 0,1N.
- Axit sulfuric đậm đặc ($d = 1,83 \div 1,84$).
- KI tinh thể.
- Dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N.
- Chỉ thị tinh bột 0,5%.

4. Tiến hành

- Lấy 20 ml bicromat kali cho vào bình cầu 500 ml cộng thêm 5 ml H_2SO_4 . Tiếp theo dùng ống hút cho vào bình 10 ml dung dịch rượu đã pha loãng tới 0,3 - 0,6 % hay 20 ml dịch cất từ bã rượu hoặc nước thải, lắc đều và để cho phản ứng 15 phút. Sau đó cân khoảng 1 - 2 g KI hoà với ít nước rồi cho cả vào bình phản ứng, lắc đều rồi đặt vào chỗ tối để tránh tác dụng của ánh sáng. Sau 10

phút pha thêm vào bình khoảng 100 ml nước cất rồi định phân I_2 vừa được tạo thành bằng dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N (hoặc 0,01N) với chỉ thị là dung dịch tinh bột 0,5% cho đến xuất hiện màu xanh da trời (màu của $Cr_2(SO_4)_3$).

- Song song với mẫu thí nghiệm, ta làm mẫu thí nghiệm trắng và thay dung dịch rượu bằng nước cất.

5. Kết quả

Căn cứ vào số lượng $Na_2S_2O_3$ giữa mẫu thí nghiệm và mẫu kiểm chứng, ta suy ra lượng rượu chứa trong mẫu thí nghiệm và lượng rượu sót sẽ là:

$$\frac{(A - A_0) \cdot 1,15}{20} \times 100, \text{ mg/100 ml}$$

trong đó:

A_0 - số ml $Na_2S_2O_3$ tiêu hao trong thí nghiệm;

A - số ml $Na_2S_2O_3$ tiêu hao trong kiểm chứng;

1,15 - lượng rượu tương ứng với 1 ml $Na_2S_2O_3$ 0,1N hay 1 ml $K_2Cr_2O_7$ 0,1N.

Giả sử $A = 22,8$ ml; $A_0 = 19,8$. Lượng rượu sót trong nước thải sẽ là:

$$\frac{(22,8 - 19,8) \times 1,15}{20} \times 100 = 17,25 \text{ mg/100 ml hay } 0,017\% \text{ khối lượng.}$$

(ở nồng độ thấp nồng độ g/100 ml $\approx$ % khối lượng).

9.2. CỒN SẢN PHẨM

9.2.1. Nồng độ rượu

1. Tiến hành

Dùng rượu kế

Hay dùng nhất là rượu kế thủy tinh, còn gọi là tửu kế hay thước đo độ rượu. Thước đo độ rượu cũng được thiết lập theo định luật Acsimet và có nhiều loại. Loại dùng để đo nồng độ từ 0 đến 10%, 10 đến 20, ..., 90 đến 100%, mỗi vạch trên thước đo thường ứng với 1% thể tích. Đối với loại cần đo chính xác lại chia thành vạch nhỏ hơn 0,1% (0 – 10%), thường dùng để đo độ rượu trong giấm sau khi cất.

Tiêu chuẩn Việt Nam được thiết lập ở 20°C nhưng thước đo lại chia từ 0 đến 100%, do khoảng cách quá hẹp nên kém chính xác, nhất là khi đo dung dịch rượu có nồng độ thấp.

Muốn đo độ rượu bằng rượu kế ta tiến hành như sau:

- Rót cồn hoặc rượu vào ống đo đặt thẳng đứng, ống đo phải sạch, khô và phải tráng qua dung dịch đo. Nhiệt độ khi đo cần làm lạnh hoặc gia nhiệt đến xấp xỉ 20°C.

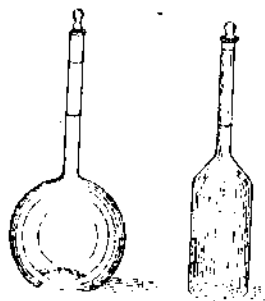
- Từ từ nhúng thước đo vào, buông tay để thước nổi tự do rồi đọc kết quả. Đọc 2 đến 3 lần để lấy kết quả trung bình. Khi đọc phải đặt mắt ngang tầm mức chất lỏng và không đọc ở phần lồi (hoặc lõm). Trong mỗi dung dịch đều chứa các chất hoạt động bề mặt và do đó làm ảnh hưởng tới sức căng bề mặt, chỉ số đọc được trên thước đo, dẫn đến làm tăng hoặc giảm so với nồng độ thực tế.

Bình tỷ trọng

Bình tỷ trọng có nhiều loại khác nhau nhưng đều dựa trên nguyên tắc xác định tỷ số giữa khối lượng của chất lỏng và nước cất có cùng thể tích.

- Để đo bằng bình tỷ trọng, đầu tiên ta rửa bình thật sạch, sấy khô và làm lạnh trong bình hút ẩm, sau đó đem cân bình không ta được m_1 gam.

- Tiếp theo rót nước cất vào bình đến trên ngấn định mức, đặt bình vào nồi cách thủy, có nhiệt độ 20°C. Sau 15 phút dùng giấy lọc thấm nước tới ngấn bình đồng thời thấm khô phần không chứa nước, lau khô nút và đáy lại. Lấy bình ra khỏi nồi điều nhiệt, lau khô phía ngoài bình rồi đem cân ta được m_2 gam. Tiếp theo đổ nước khỏi bình, tráng bình 2 đến 3 lần bằng dung dịch cần đo tỷ trọng rồi cũng rót chất lỏng tới trên vạch, sau đó làm tương tự như khi bình chứa nước cất, giả sử bình chứa dịch cân được m_3 gam.



Hình 9.1: Bình tỷ trọng.

Chú ý: Sau khi định mức chất lỏng ở 20°C vừa tới ngấn, nhiệt độ sẽ tăng và mức chất lỏng sẽ cao hơn ngấn cũ. Điều này không làm ảnh hưởng tới kết quả.

2. Kết quả

Tỷ trọng chất lỏng so với nước cùng nhiệt độ 20°C sẽ là:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

Căn cứ vào tỷ trọng tra phụ lục 9, ta sẽ biết được % rượu trong chất lỏng.

Trường hợp khi đo nhiệt độ chất lỏng khác 20°C nhưng biết rõ nhiệt độ khi

cân nước vẫn là 20°C , ta có thể chuyển d_{20}^I sang d_{20}^{21} theo phụ lục 10 (Bảng hiệu chỉnh tỷ trọng đo được về 20°C) rồi tiếp đó mới tra phụ lục 7 để biết nồng độ rượu.

Ví dụ, khi cân bình không và nước ở 20°C ta được $m_2 = 45,8942\text{ g}$, khi cân bình và rượu ở 25°C ta được $m_3 = 45,6252\text{ g}$. Bình không có khối lượng $m_1 = 30,8442\text{ gam}$, ta có:

$$d_{20}^{25} = \frac{45,6252 - 30,8442}{45,8942 - 30,8482} = 0,9821$$

Tra bảng phụ lục để quy về d_{20}^{20} ta cần cộng 0,0014:

$$d_{20}^{20} = 0,9821 + 0,0014 = 0,9835$$

Căn cứ vào $d_{20}^{20} = 0,9835$ tra phụ lục 9 ta biết được nồng độ rượu trong dung dịch đo là 12,54% thể tích hay 10,06% khối lượng.

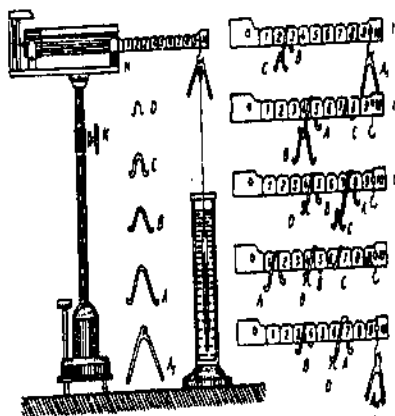
Cân tỷ trọng

1. Nguyên tắc

Cân tỷ trọng cũng dựa trên sức đẩy Acsimet và có cấu tạo như ở hình 9.2.

2. Tiến hành

- Dung dịch rượu hoặc chất lỏng bất kỳ được rót vào ống đóng, sau đó nhúng thỏi thủy tinh được treo trên móc thăng bằng. Chất lỏng sẽ đẩy vào thỏi thủy tinh một lực m , tùy theo tỷ trọng d của chất lỏng lớn hay bé, cân cân sẽ bị lệch so với thăng bằng với nước cất lúc ban đầu. Bằng cách đặt và thay đổi các quả cân A_1, A, B, C, D , vào các vị trí sao cho cân trở lại trạng thái thăng bằng. Đọc trên cán cân và vị trí các quả cân ta sẽ có tỷ trọng trực tiếp của chất lỏng ở nhiệt độ t . Tỷ trọng của chất lỏng có thể lớn hơn hoặc nhỏ hơn 1. Khi treo A_1 vào để cân các chất có $d > 1$, còn đối với rượu và các chất lỏng có $d < 1$ thì không cần móc A_1 vào.



Hình 9.2: Cân tỷ trọng.

3. Kết quả

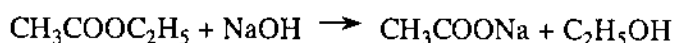
Khi thăng bằng với nước cất cần tiến hành ở nhiệt độ $t = 20^{\circ}\text{C}$, còn với dung dịch có thể đo ở nhiệt độ $t \neq 20^{\circ}\text{C}$, rồi cũng hiệu chỉnh theo bảng phụ lục 10 và sau đó làm tương tự khi xác định tỷ trọng bằng bình tỷ trọng kể trên.

9.2.2. Axit và este

1. Nguyên tắc

Trong cồn chứa rất nhiều loại axit khác nhau, đều tạo thành trong quá trình lên men, nhưng chủ yếu là axit axetic. Vì thế người ta thường biểu diễn độ axit trong cồn theo axit axetic và tính theo mg trong một lít cồn khan (cồn không chứa nước).

Sau khi xác định axit xong, ta tiếp tục xác định este trên cơ sở:



Xác định lượng NaOH đã tác dụng với este ta suy ra được lượng este trong cồn.

2. Dụng cụ

- Ống sinh hàn khí.
- Ống đong.
- Bình tam giác.
- Pipet.
- Buret.

3. Hóa chất

- NaOH 0,1N.
- Phenolphalein 0,5%.
- H_2SO_4 0,1N.

4. Tiến hành

- Dùng ống hút cho 100 ml cồn (pha loãng tới khoảng 50%) vào bình tam giác 250 ml. Nối bình với hệ thống làm lạnh ngược, đun sôi 15 phút để đuổi hết CO_2 rồi sau đó làm lạnh tới nhiệt độ phòng, cho vào 3 - 4 giọt phenolphalein, rồi dùng dung dịch NaOH 0,1N chuẩn đến xuất hiện màu hồng nhạt.

5. Kết quả

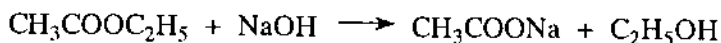
Hàm lượng axit tính theo công thức sau:

$$A_x = \frac{V \times 6 \times 10 \times 100}{C}, \text{ mg/l}$$

trong đó:

- V - số mg dung dịch NaOH 0,1N tiêu hao khi định phân;
- 6 - số mg axit axetic ứng với 1 ml NaOH có nồng độ 0,1N;
- 10 - hệ số chuyển thành 1 lít;
- 100 - hệ số chuyển thành cồn 100%;
- C - nồng độ cồn trong dịch đem phân tích.

Sau khi chuẩn hàm lượng axit, ta thêm vào hỗn hợp 5 ml NaOH 0,1N rồi nối bình với hệ thống làm lạnh ngược và đun sôi trong 1 giờ để tạo điều kiện cho phản ứng:



Đun xong đem làm nguội tới nhiệt độ phòng rồi cũng cho đúng 5 ml H_2SO_4 0,1N vào bình, sau đó chuẩn lại H_2SO_4 dư bằng dung dịch NaOH 0,1N tới xuất hiện màu hồng nhạt.

Chú ý: Không làm tắt bằng cách dùng H_2SO_4 0,1N để chuẩn lượng NaOH 0,1N dư sau phản ứng, vì như vậy sẽ dẫn tới sai số (xuất hiện màu hồng và làm mất màu hồng).

Hàm lượng este trong cồn được tính như sau:

$$E = \frac{V \times 8,8 \times 10 \times 100}{C}, \text{ mg/l}$$

trong đó:

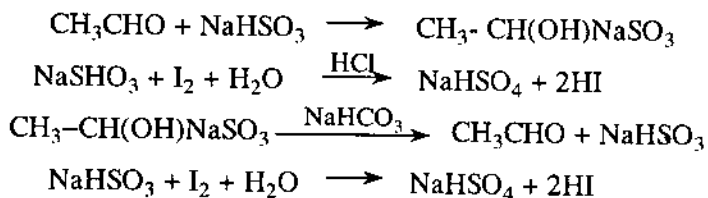
- V - số ml NaOH 0,1 N tiêu hao khi chuẩn lượng H_2SO_4 dư;
- 8,8 - số mg este etylic ứng với 1 ml NaOH có nồng độ 0,1N.

Chú ý: Muốn nhận được kết quả chính xác hơn, ta có thể dùng dung dịch NaOH có nồng độ 0,05N để chuẩn lần cuối cùng. Lúc đó 1 ml NaOH 0,05N chỉ tương đương 4,4 mg este etylic.

9.2.3. Aldehyt

Trong cồn chứa chủ yếu aldehyt axetic. Để xác định ta có thể dùng nhiều phương pháp khác nhau. Ở đây giới thiệu xác định hàm lượng aldehyt theo phương pháp iot.

1. Nguyên tắc



2. Dụng cụ - hóa chất

- Bình tam giác, ống đong, pipet, buret.
- Dung dịch NaHSO_3 1,2%.
- Dung dịch NaHCO_3 1N (42 g/l).
- Dung dịch HCl 1N.
- Dung dịch iot 0,1N và 0,01N.
- Dung dịch tinh bột 0,5 %.

3. Tiến hành

- Lấy 50 ml rượu hoặc cồn đã pha loãng ($\approx 50\%$), cho vào bình tam giác 250 ml. Sau đó thêm vào 25 ml NaHSO_3 1,2% lắc đều và để 1 giờ. Tiếp đó cho vào 5 - 7 ml dung dịch HCl 1N và dùng dung dịch I_2 0,1N để oxy hoá lượng NaHSO_3 dư với chỉ thị là dung dịch tinh bột 0,5%. (cuối giai đoạn nên dùng I_2 0,01N để lượng I_2 không dư nhiều). Lượng dung dịch I_2 1N và 0,01N tiêu hao trong giai đoạn này không tính đến. Tiếp theo ta thêm vào bình phản ứng 25 ml NaHCO_3 để giải phóng lượng NaHSO_3 và aldehyt. Sau 1 phút ta dùng dung dịch I_2 0,01N để chuẩn lượng NaHSO_3 vừa được giải phóng do kết hợp với aldehyt lúc ban đầu. Phản ứng được xem là kết thúc khi xuất hiện màu tím nhạt.

- Song song với thí nghiệm thực, ta làm một thí nghiệm kiểm chứng, thay 50 ml rượu bằng 50 ml nước cất.

5. Kết quả

Hàm lượng aldehyt tính theo mg/l được xác định theo công thức :

$$\text{Ad} = \frac{(\text{V} - \text{V}_0) \times 0,22 \times 1000 \times 100}{50 \times \text{C}}, \text{ mg/l}$$

trong đó:

V và V_0 - số ml dung dịch I_2 0,01N tiêu hao trong thí nghiệm thực và kiểm chứng;

0,22 - số mg aldehyt axetic tương ứng với 1 ml dung dịch I_2 0,01N.

Ví dụ: khi tiến hành thí nghiệm ta nhận được $V_1 = 1,8 \text{ ml}$, $V_0 = 0,3 \text{ ml}$.
Nồng độ rượu bằng 50%.

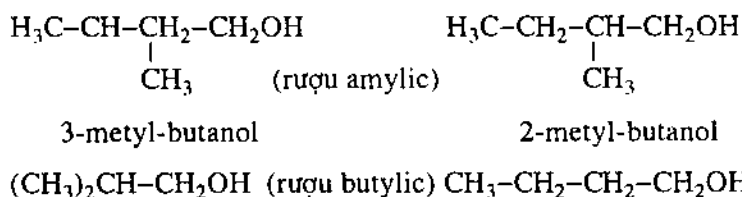
Hàm lượng aldehyt axetic trong 1 lít cồn tuyệt đối sẽ là:

$$\frac{(1,8 - 0,3) \times 0,22 \times 1000 \times 100}{50 \times 50} = 13,2 \text{ mg/l}$$

9.2.4. Dầu fusel

1. Nguyên tắc

Ở đây gọi rượu cao phân tử là rượu có số carbon lớn hơn hai. Rượu cao phân tử là sản phẩm trung gian của quá trình lên men rượu. Trong thành phần của nó chứa chủ yếu là rượu amylic và rượu butylic. Các rượu này thường gặp ở dạng izo, vì vậy khi phân tích người ta đem so sánh với hỗn hợp izobutylic và izoamylic 1:3.



Để xác định rượu cao phân tử, người ta dựa vào phản ứng màu giữa chúng với aldehyt salicylic. Trong môi trường axit H_2SO_4 , rượu etylic sẽ phản ứng với aldehyt salicylic ($\text{OHC}_6\text{H}_4\text{CHO}$) và có màu vàng, nhưng nếu trong rượu có chứa các rượu cao phân tử thì màu của hỗn hợp sẽ biến thành đỏ - da cam. Cường độ màu phụ thuộc vào hàm lượng rượu cao phân tử chứa trong hỗn hợp etylic, ngoài ra còn phụ thuộc vào hàm lượng aldehyt. Nếu trong cồn chứa không quá 0,00025% aldehyt theo thể tích (tương đương 2 mg/l) thì sự đổi màu do aldehyt xem như không đáng kể. Nếu hàm lượng aldehyt lớn hơn 0,00025% thì dung dịch mẫu cũng phải chứa aldehyt với nồng độ khác nhau.

2. Dụng cụ

- Ống đong 50, 25 ml.
- Pipet.

3. Hoá chất

- Dung dịch aldehyt salicylic 1% thể tích (nhiệt độ sôi $196 - 197^\circ\text{C}$). Dung dịch này được pha loãng bằng cồn 50% nhưng không chứa aldehyt lẫn rượu cao

phân tử. Pha xong cân bảo quản trong chỗ tối.

- Axit sulfuric đậm đặc, tinh khiết, không màu.

- Các dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ khác nhau của rượu izoamylic và izobutylic 3, 4, 15 và 20 mg/l. Ngoài ra các dung dịch mẫu chuẩn này cũng chứa aldehyt axetic với nồng độ khác nhau. Tất cả dung dịch mẫu đều được pha bằng cồn không chứa aldehyt axetic và rượu cao phân tử hoặc rất ít.

4. Tiến hành

- Dùng một số ống đong 50 ml hay 25 ml có nút nhám đã rửa sạch sấy khô. Sau đó cho vào ống thứ nhất 10 ml cồn hoặc rượu thí nghiệm, các ống khác chứa 10 ml dung dịch mẫu chuẩn có hàm lượng aldehyt axetic tương đương như trong mẫu thí nghiệm. Dùng ống hút cho vào mỗi ống 0,4 ml dung dịch aldehyt salicylic 1% và 20 ml H₂SO₄ đậm đặc (cho theo thành ống). Nút các ống đong rồi lắc đều và để yên 30 phút. Sau đó đem so màu bằng mắt thường, màu của ống thí nghiệm phù hợp với màu của ống mẫu nào thì hàm lượng rượu cao phân tử trong rượu thí nghiệm chính là hàm lượng rượu cao phân tử của mẫu đó.

5. Kết quả

Hàm lượng rượu cao phân tử được tính theo cồn tuyệt đối:

$$Rc = \frac{a \times 100}{C}, \text{ mg/l}$$

trong đó:

a - hàm lượng dầu fusel trong mẫu, mg/l;

C - nồng độ cồn trong mẫu thí nghiệm.

Chú ý: nếu dùng ống đong 25 ml thì các dung dịch đưa vào lấy bằng 1 nửa.

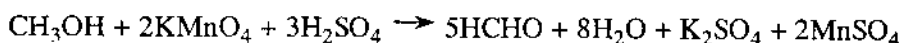
9.2.5. Rượu methylic

Rượu methylic là chất lỏng rất linh động và không màu, hoà tan trong nước theo bất cứ tỷ lệ nào. Nhiệt độ sôi 64,7°C. Rượu methylic là chất độc đối với cơ thể người. Nếu uống vào từ 8 đến 10 g thì có thể bị ngộ độc, mắt bị rối loạn và có thể bị mù loà. Nếu uống nhiều sẽ gây tử vong. Người ngửi lâu phải rượu methylic cũng bị ngộ độc.

Theo tiêu chuẩn của các nước tiên tiến và hiện nay ta cũng áp dụng, hàm lượng rượu methylic trong cồn thô không được quá 0,13%. Đối với cồn tinh chế không được quá 0,05% và đối với cồn hảo hạng không quá 0,03%.

1. Nguyên tắc

Trong môi trường axit, dưới tác dụng của KMnO_4 , rượu methylic sẽ bị oxy hoá theo phản ứng sau:



Sau đó aldehyt formic sẽ tác dụng với sulfit fuxin để tạo phản ứng màu.

2. Dụng cụ

- Ống nghiệm, pipet.

3. Hoá chất

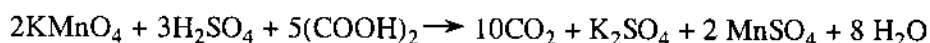
- Dung dịch axit oxalic bão hoà (8 g/100 ml).
- Dung dịch KMnO_4 1%.
- Axit sulfuric đậm đặc ($d = 1,83 - 1,84$).
- Dung dịch sulfit fuxin: Cân 0,1g fuxin rồi hoà với 20 - 30 ml nước nóng 80°C , xong chuyển toàn bộ vào bình định mức 100 ml và thêm nước cất tới gần bình. Tiếp đó chuyển dung dịch vào một bình khô khác lớn hơn, thêm vào đó 2,5 ml dung dịch NaHSO_3 vừa pha ($d = 1,262$). Lắc đều và để yên 3 đến 4 giờ. Khi dung dịch trở nên màu hồng nhạt hoặc không màu thì thêm 0,5 ml H_2SO_4 đậm đặc. Lắc đều và để bình ngoài chỗ sáng 2 đến 3 ngày cho tới khi màu của dung dịch trở nên vàng thì có thể đem dùng hoặc chuyển vào bình nâu và bảo quản nơi tối mát.

- Dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ methylic khác nhau được pha bằng cồn etylic 96% nhưng không chứa rượu methylic: Lấy 1 ml rượu methylic tinh khiết cho vào bình định mức mức 100 ml rồi dùng cồn etylic không chứa methylic đổ đầy đến gần bình. Từ dung dịch này ta pha thành các dung dịch có nồng độ methylic khác nhau:

- + 0,13% khi xác định hàm lượng methylic trong cồn thô.
- + 0,05% và 0,03% khi xác định cồn tinh chế.

4. Tiến hành

Lấy ống nghiệm to (18 x 180) khô và sạch, cho vào đó 0,1 ml dịch cồn hoặc rượu cộng 5 ml KMnO_4 0,1N và 0,4 ml H_2SO_4 đậm đặc. Lắc nhẹ và để yên, sau 3 phút thêm vào đó 1 ml axit oxalic bão hòa để khử lượng KMnO_4 dư:



Khi dung dịch có màu vàng, thêm vào đó 1 ml H_2SO_4 đậm đặc, khi mất màu dùng ống hút cho vào 5 ml dung dịch fucxin. Lắc nhẹ và để khoảng 25 đến 30 phút. Song song với thí nghiệm trên ta làm thí nghiệm với dung dịch mẫu chuẩn chứa rượu methylic đã biết trước. Sau 25 đến 30 phút nếu màu của ống chứa cồn thí nghiệm nhạt hơn hoặc bằng màu của dung dịch mẫu thì xem như cồn đạt tiêu chuẩn về hàm lượng rượu methylic. Nếu màu của mẫu thí nghiệm đậm hơn, nghĩa là không đạt.

9.2.6. Thời gian oxy hóa

1. Nguyên tắc

Cồn tinh khiết khử chất oxy hoá KMnO_4 rất chậm, nhưng nếu trong cồn chứa các hợp chất không no thì sẽ bị oxy hoá nhanh và do đó rút ngắn thời gian. Ví dụ nếu cồn chứa aldehyt không no như acrolein ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$) và aldehyt crotonovic ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$) sẽ làm tăng quá trình oxy hoá và màu KMnO_4 bị mất nhanh hơn. Cồn aldehyt axetic và furfurol không làm tăng phản ứng oxy hoá.

2. Dụng cụ

- Ống đong có nút nhám, pipet.

3. Hoá chất

- KMnO_4 0,02%
- Dung dịch mẫu chuẩn: Cân chính xác 0,25 g CoCl_2 và 0,28 g $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ hoà tan thành 100 ml. Dung dịch cần bảo quản trong bình màu nâu nơi thoáng mát.

4. Tiến hành

- Dùng ống đong 50 ml có nút nhám cho vào 50 ml cồn thí nghiệm rồi đặt vào nồi giữ nhiệt độ 20°C . Sau 15 phút dùng ống hút cho vào 1 ml dung dịch KMnO_4 0,02%. Đậy nút nhám và lắc đều rồi đặt vào nồi giữ tiếp ở nhiệt độ 20°C . Màu của KMnO_4 sẽ dần dần thay đổi cho tới khi đạt tới màu của dung dịch mẫu cùng rót đầy vào một ống đong khác.

- Thời gian từ khi cho KMnO_4 vào tới khi kết thúc được xem là thời gian oxy hoá. Khi so sánh màu cần đặt cả hai ống đong trên sứ trắng hoặc giấy trắng. Thời gian càng dài chứng tỏ cồn có chất lượng cao hơn.

9.2.7. Furfurol ($C_5H_4O_2$)

1. Nguyên tắc

Nếu cồn chứa furfurol thì khi phản ứng với anilin ($C_6H_5NH_2$) trong môi trường axit có màu hồng - da cam. Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng furfurol.

Theo tiêu chuẩn Việt Nam cồn được tinh chế không được chứa furfurol.

2. Dụng cụ

- Ống đong, pipet

3. Hoá chất

- Dung dịch HCl ($d = 1,19$)
- Anilin tinh khiết

4. Tiến hành

- Lấy ống nghiệm hoặc ống đong 25 ml có nút nhám, dùng ống hút nhỏ 10 giọt anilin tinh khiết vào ống đong và 3 giọt HCl ($d = 1,19$). Tiếp đó cho 10 ml cồn rồi lắc đều và để yên. Nếu sau 10 phút hỗn hợp phản ứng vẫn không màu thì cồn được xem là đạt tiêu chuẩn, nếu xuất hiện màu hồng thì xem như cồn có chứa furfurol nghĩa là không đạt.

Chương 10

PHÂN TÍCH RƯỢU VANG

10.1. NỒNG ĐỘ RƯỢU

10.1.1. Phương pháp chưng cất

Xem phần 9.2.1.

10.1.2. Phương pháp đo nhiệt độ sôi

1. Nguyên tắc

Mỗi dung dịch có hàm lượng rượu khác nhau thì có điểm sôi khác nhau. Xác định nhiệt độ sôi của dịch, từ đó có thể xác định được vào hàm lượng cồn trong dung dịch.

2. Dụng cụ

- Thiết bị đo nhiệt độ sôi (Ebulliametre electrique, Duajardin-Salleron).

Xem hình 10.1.

3. Hoá chất

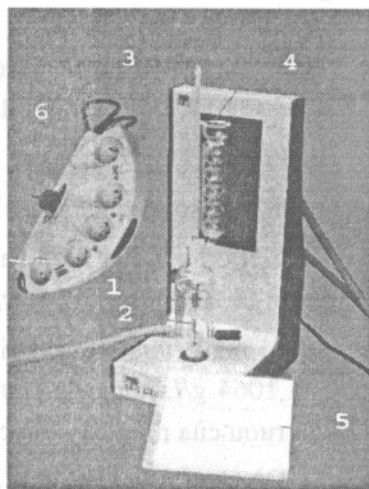
- Nước cất 2 lần.

4. Tiến hành

- Đo nhiệt độ sôi của nước cất:

+ Lắp nước làm mát ống sinh hàn (nước vào phía dưới, ra phía trên ống sinh hàn). Lắp nhiệt kế vào đầu bình gia nhiệt sao cho đầu trên của thanh gia nhiệt cách đầu thủy ngân dưới 1,5 – 2 cm.

+ Dùng nước cất hai lần để tráng bình



Hình 10.1. Thiết bị đo nhiệt độ sôi:

1. bình cất; 2. thanh gia nhiệt;
3. nhiệt kế; 4. sinh hàn; 5. bảng
tra độ rượu; 6. ổ áp.

+ Cho nước cất hai lần vào bình cất sao cho bề mặt lõm của nước cất tiếp xúc với mép trên của vạch định mức (thể tích mẫu khoảng độ 50-60 ml). Bật công tắc điện cho máy chạy, sau 6-10 phút khi nhiệt độ tăng dần và ổn định thì đọc nhiệt độ sôi và ghi lại. Tắt máy, tháo nước ra.

- Đo nhiệt độ sôi của rượu vang:

Tráng bình cất bằng mẫu rượu vang và thực hiện cất rượu vang giống như phân cất nước ở trên.

5. Kết quả

Dùng bảng tra (kèm theo máy) để xác định độ rượu. Cách tra như sau :

- Ta xoay vòng sao cho nhiệt độ sôi của nước cất hai lần trùng với giá trị độ rượu = 0%V. Sau đó từ giá trị nhiệt độ sôi của mẫu rượu vang đọc trên nhiệt kế tra bảng suy ra độ rượu theo %V.

- Với các mẫu rượu vang hay (dịch lên men) có nồng độ đường cao (>10 g/l) thì độ rượu thực có trong mẫu phân tích tính theo công thức sau:

$$\text{Độ rượu (\% v/v)} = A - B + C + 21,7623$$

trong đó:

A = 0,9592.TNC (TNC là độ rượu tra trong bảng tròn);

B = 0,0215.MV (MV là trọng lượng thể tích (g/l) của rượu vang);

C = 0,0019.T (T là nhiệt độ tại đó ta xác định MV, $10 < T < 30^{\circ}\text{C}$).

6. Ví dụ

- Nhiệt độ sôi của nước cất hai lần là $100,1^{\circ}\text{C}$. Hiệu chỉnh trên bảng đo là -1,5.

- Nhiệt độ sôi của rượu vang phân tích là $91,30^{\circ}\text{C}$. Nồng độ rượu đọc trên bảng tròn là 12,00^o hay 12 % v/v.

- Với mẫu rượu vang, khi xác định trọng lượng của 1 lít dịch ở nhiệt độ 25°C là 1064 g/l, nồng độ rượu sau khi xác định đọc trên bảng tròn là 12,4%. Vậy độ rượu của mẫu này được tính theo công thức:

$$\begin{aligned}\text{Độ rượu} &= 0,9592 \times 12,4 - 0,0215 \times 1064 + 0,0019 \times 25 + 21,7623 = \\ &= 10,83\% \text{ (v/v)}.\end{aligned}$$

Chú ý:

- Lần đầu tiên dùng máy hoặc trước mỗi kỳ thí nghiệm nên dùng mẫu rượu vang chuẩn đã biết trước độ rượu và nhiệt độ sôi (11,8 % v/v và $t^{\circ} = 91,5^{\circ}\text{C}$) để kiểm tra và hiệu chỉnh máy.

10.2. CHẤT HOÀ TAN

Xác định tỷ trọng

1. Nguyên tắc

Chung cất rượu vang để tách ethanol. Thu hồi dịch ngưng, cho thêm nước cất để đạt được thể tích bằng thể tích mẫu lúc ban đầu. Xác định tỷ trọng của rượu vang và dịch ngưng, từ đó tra bảng phụ lục 3 để biết được nồng độ các chất hoà tan có trong dịch.

2. Dụng cụ

- Tỷ trọng kế.
- Ống đong thể tích 250 ml (ống đong cần có đường kính ống lớn gấp 2 lần đường kính của thiết bị đo để tránh va chạm vào thành ống)

- Nhiệt kế.

3. Hoá chất

- Nước cất đã tách ion

4. Tiến hành

- Xác định tỷ trọng của rượu vang bằng bình tỷ trọng hoặc bằng tỷ trọng kế ở $t^0 = 20^0\text{C}$ (d_1). Tra phụ lục 8 để biết được một cách tương đối nồng độ đường có trong rượu vang.

- Lấy 200 ml rượu vang, cho thêm khoảng 30 ml nước cất và đem đi chưng cất. Lấy khoảng 195 ml dịch ngưng, bổ sung thêm nước cất và định mức 200 ml ở $t^0 = 20^0\text{C}$.

- Xác định tỷ trọng của dịch ngưng (d_2). Tra phụ lục 9 sẽ biết nồng độ ethanol trong dịch và cũng chính là nồng độ rượu có trong mẫu rượu vang.

5. Kết quả

- Tỷ trọng của rượu vang đã tách cồn (d_{20}^{20}) được tính theo công thức sau:

$$d_{20}^{20} = d_1 - d_2 + 1,000$$

trong đó:

- d_1 - tỷ trọng của rượu vang ở 20^0C so với nước 20^0C ;
- d_2 - tỷ trọng của dịch ngưng ở 20^0C so với nước 20^0C ;
- d_{20}^{20} - tỷ trọng của rượu vang đã tách cồn ở 20^0C so với nước 20^0C .

- Nồng độ chất hoà tan tính theo ^{0}Bx (g/100 g) có được nhờ tra bảng phụ lục 8 từ giá trị d_{20}^{20} .

- Nồng độ chất hoà tan rượu vang (g/l) = $d_{20}^{20} \times ^{0}\text{Bx} \times 10$
trong đó: 10 - hệ số chuyển thành đơn vị g/l.

10.3. HÀM LƯỢNG ĐƯỜNG KHỬ

Đường khử trong rượu vang nếu có thì phần lớn là đường fructoza (nếu rượu vang được lên men từ dịch quả là chính). Trong rượu vang khô, người ta đã tìm thấy đường pentoza không lên men như arabinoza và xyloza với nồng độ khoảng 1 g/l. Ngoài ra trong rượu vang còn chứa nhiều thành phần có thể ảnh hưởng tới hàm lượng đường có trong đó, vì vậy trước khi phân tích đường nên có công đoạn xử lý.

1. Hoá chất

- Dung dịch axetat chì kiểm tính:

+ Hoà tan 300 g axetat chì trung tính, 100 g oxit chì vào 700 ml nước. Để tiếp xúc trong nhiều ngày, thỉnh thoảng lắc đều. Sau đó lọc. Dung dịch thu được có tỷ trọng 1,32.

- Dung dịch I: Ferroxyanua kali:

Hoà tan 150 g ferroxyanua kali với nước cất và định mức tới 1000 ml bằng nước cất.

- Dung dịch II: Sulfat kẽm:

Hoà tan 300 g sulfat kẽm với nước và định mức tới 1000 ml bằng nước cất trong bình định mức 1000.

- NaOH 0,1N.

- Axit axetic 0,1N.

- Dung dịch Na_2HPO_4 7,6%.

2. Tiến hành

- Rượu vang đỏ:

+ Lấy 50 ml rượu vang cho vào bình định mức 100 ml.

+ Thêm (n - 0,5) ml dung dịch NaOH 0,1N (với n là số ml dung dịch NaOH 0,1N cần để xác định axit tổng số của 5 ml rượu vang).

- + Cho thêm 2,5 ml axit axetic 0,1N, lắc đều.
- + Cho thêm 2,5 ml dung dịch axetat chì kiểm tính. Để yên cho phản ứng xảy ra.
- + Thêm 5 ml dung dịch Na_2HPO_4 7,6 %. Lắc đều và cho thêm một ít nước cất. Để tiếp 15 phút thì định mức đến gần bình.
- + Đem lọc và dịch trong được dùng để xác định đường khử theo một trong các phương pháp thông thường như: Fehling, Bectran, Graxianop... (xem phần 4.3).
- Đối với vang trắng, hồng, rượu liquer hoặc dịch quả đục:
- + Với dịch quả: Pha loãng theo tỷ lệ 1/10 (10 ml dịch quả định mức thành 100 ml), sau đó lấy 10 ml.
- + Với vang ngọt có khối lượng thể tích trong khoảng 1,005 - 1,0038 thì pha loãng theo tỷ lệ 2/10 (20 ml vào bình định mức 100 ml), sau đó lấy 20 ml.
- + Với vang bọt hay nửa ngọt có khối lượng thể tích trong khoảng 0,997 - 1,006 thì lấy luôn 20 ml (không qua pha loãng).
- + Với vang khô: Lấy 50 ml rượu vang không pha loãng.

Các lượng mẫu trên được cho vào bình định mức 100 ml, sau đó cho thêm 5 ml dung dịch I và 5 ml dung dịch II. Lắc đều và dùng nước cất định mức tới gần bình. Sau 10 phút thì đem lọc và lấy dịch trong mang đi phân tích theo một trong các phương pháp xác định đường khử thông thường như: Fehling, Bectran, Graxianop. (Xem phần 4.3).

10.4. AXIT TỔNG SỐ

Rượu vang chứa nhiều axit hữu cơ nhưng phần lớn các axit này được tạo thành trong quá trình lên men rượu và lên men malolactic.

Axit tổng số là tổng các axit được chuẩn độ khi đưa pH của rượu vang về 7. Axit carbonic, SO_2 tự do và liên kết không được tính trong axit tổng số.

Xác định lượng axit tổng số trong rượu vang tương tự như xác định lượng axit tổng số trong quả hay dịch quả (xem phần 6.5). Tuy nhiên trước khi xác định cần xử lý để tách khí CO_2 và SO_2 có trong mẫu. Có thể sử dụng một trong những cách sau đây:

- Cách 1: lấy 100 ml rượu vang cho vào bình chân không, hút chân không và lắc trong 1 - 2 phút.

- Cách 2: lấy 100 ml rượu vang cho vào bình cầu và dùng khí nitơ sục trong thời gian 1 h.

10.5. AXIT BAY HƠI

Trong rượu vang axit bay hơi gồm phần lớn các axit axetic ở dạng tự do hoặc ở dạng liên kết (dạng muối).

Để tránh rượu vang bị hỏng, trong khi lưu thông trên thị trường, lượng axit bay hơi phải nhỏ hơn 0,98 g/l đối với rượu vang chất lượng cao, 1,0 g/l đối với vang bàn ăn, và 1,2 đối với rượu vang trắng hoặc rượu liquor.

1. Nguyên tắc

Axit bay hơi được tách ra bằng phương pháp chưng cất cuốn theo hơi nước. Dịch ngưng tụ được chuẩn độ bằng dung dịch iốt. Các axit được tạo thành từ CO_2 và SO_2 không được tính là axit bay hơi.

2. Dụng cụ

- Máy chưng cất cuốn hơi nước (xem phần 4.8).
- Bình tam giác.
- Bình định mức 1 lít.
- Pipet 10 ml, 50 ml.

3. Hoá chất

- NaOH 0,1N.
- I_2 0,01N.
- Axit tartric tinh thể.
- Chỉ thị tinh bột 1%.
- Chỉ thị phenolphthalein 1%.
- Dung dịch H_2SO_4 1 : 3 (v/v): Pha loãng 1 phần thể tích H_2SO_4 đậm đặc với 3 phần nước cất.

4. Tiến hành

- Tráng rửa thiết bị chưng cất lôi cuốn hơi nước bằng 30 ml nước cất.
- Lấy chính xác 20 ml rượu vang đã tách khí CO_2 cho vào bình, cho một ít axit tartric tinh thể (khoảng 0,5 g). Dùng một ít nước cất tráng mẫu và tráng bên trong bình. Lắp bình vào hệ thống cất.

- Tiến hành chưng cất cuốn theo hơi nước, thu 250 ml dịch ngưng tụ. Chuẩn độ dịch ngưng tụ bằng NaOH 0,1 N với chất chỉ thị phenolphthalein cho tới khi có màu hồng nhạt. Lượng NaOH 0,1 N đã chuẩn là n_1 .

- Cho 2 ml dung dịch chỉ thị tinh bột, vài hạt tinh thể KI và 1 ml dung dịch H_2SO_4 1 : 3. Dùng dung dịch I_2 0,01 N để chuẩn độ ngay lập tức lượng SO_2 tự do có trong mẫu cho tới khi có màu xanh nhạt. Lượng I_2 0,1 N đã chuẩn là n_2 .

- Cho thêm 20 ml dung dịch borat natri bão hoà (dịch trở lại màu hồng nhạt). Dùng dung dịch I_2 0,01 N để chuẩn độ ngay lập tức lượng SO_2 vừa được giải phóng cho tới khi có màu xanh nhạt. Lượng I_2 0,01 N đã chuẩn là n_3 .

5. Kết quả

Lượng axit bay hơi có trong rượu vang A_{bh} (g axit axetic/l) được tính theo công thức sau :

$$A_{bh} = \frac{\left[n_1 - \left(\frac{n_2 + n_3}{10} \right) \right] \times 0,006 \times 1000}{V} , \text{ g/l}$$

trong đó:

n_1 - số ml NaOH 0,1 N tiêu hao khi chuẩn độ lượng axit trong mẫu;

n_2 - số ml I_2 0,01 N tiêu hao khi chuẩn độ lượng SO_2 tự do;

n_3 - số ml I_2 0,01 N tiêu hao khi chuẩn độ lượng SO_2 liên kết;

V - số ml rượu vang mang đi cất;

0,006 - số gam axit axetic tương ứng với 1 ml NaOH 0,1N.

10.6. SO_2 TỰ DO VÀ TỔNG SỐ

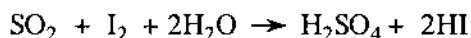
(Bằng phương pháp chuẩn độ iot).

SO_2 tồn tại trong rượu vang ở dạng tự do và kết hợp. Nó không chỉ có vai trò là chất chống oxy hoá, sát khuẩn mà còn ảnh hưởng đến tính hoà tan của các chất khác trong dung dịch cũng như tính chất cảm quan của rượu. Ở hàm lượng cao, SO_2 có thể gây độc đối với người tiêu dùng.

1. Nguyên tắc

Lượng SO_2 tự do được xác định bằng cách định phân trực tiếp với dung dịch iot trong môi trường axit. Dùng chỉ thị màu là dịch tinh bột để nhận biết điểm kết thúc phản ứng, dung dịch chuyển sang màu xanh nâu bền trong 5 - 10 giây.

Phương trình phản ứng:



2. Hoá chất

- Dung dịch H_2SO_4 (1:3) : Pha loãng một cách thận trọng 1 phần thể tích H_2SO_4 đậm đặc với 3 phần nước cất.
- Dung dịch NaOH 1N.
- Dung dịch I_2 0,01 N và 0,02 N.
- Dung dịch tinh bột 1%.
- KI tinh thể.
- Dung dịch H_2O_2 .

3. Tiến hành

- *Xác định lượng SO_2 tự do:* Lấy chính xác 25 ml rượu vang cho vào bình tam giác 250 ml, cho thêm 2 ml dịch tinh bột, một vài tinh thể KI, và sau cùng là cho 5 ml dung dịch H_2SO_4 1 : 3. Định phân bằng dung dịch I_2 0,02 N cho đến khi xuất hiện màu xanh nâu bền trong 10 - 20 giây (lượng ml I_2 đã sử dụng là n_1).

- *Xác định lượng SO_2 tổng số:* Cho vào bình tam giác 250 ml có nút nhám 25 ml rượu vang, cho thêm 25 ml dung dịch NaOH 1N, đậy nút, lắc đều và để yên trong 10 phút cho phản ứng xảy ra. Sau đó cho vào thêm 2 ml dung dịch tinh bột và một vài tinh thể KI, cho nhanh 10 ml H_2SO_4 (1 : 3) và lắc mạnh. Định phân ngay lập tức bằng dung dịch I_2 0,02 N cho đến khi xuất hiện màu xanh nâu bền trong 5 - 10 giây (lượng I_2 đã dùng là n_2 ml).

4. Kết quả

Lượng SO_2 tự do (mg/l) được tính theo công thức sau:

$$\text{SO}_{2\text{td}} = \frac{n_1 \times N \times 32 \times 1000}{V}, \text{ mg/l}$$

Lượng SO_2 tổng số (mg/l) được tính theo công thức sau:

$$\text{SO}_{2\text{ts}} = \frac{n_2 \times N \times 32 \times 1000}{V}, \text{ mg/l}$$

trong đó:

- n_1 - số ml I_2 tiêu hao khi chuẩn độ lượng SO_2 tự do;
- n_2 - số ml I_2 tiêu hao khi chuẩn độ lượng SO_2 tổng số;
- N - nồng độ đương lượng của dung dịch I_2 chuẩn;

V - số ml rượu vang mang đi phân tích;

32 - số mg SO_2 tương ứng với 1 ml dung dịch I_2 chuẩn 1N.

10.7. POLYPHENOL

10.7.1. Phương pháp so màu

Xem phần xác định phenol tổng số của quả (phần 6.7).

10.7.2. Phương pháp Folin-Ciocalteu

Các chất phenol và tanin có trong rượu vang rất khó định lượng cụ thể vì cấu trúc của các chất này rất khác với cấu trúc của các chất phenol và tanin chuẩn có bán trên thị trường. Do đó thường dùng chỉ số Folin-ciocalteau để biểu thị lượng phenol tổng số mà giá trị này cũng tương đương với độ chất của rượu vang.

1. Nguyên tắc

Oxy hoá toàn bộ lượng phenol trong rượu vang bằng dung dịch Folin-Ciocalteau (hỗn hợp axit phosphotungstic và axit phosphomolybdic). Các axit này sẽ bị khử thành các oxit vonfram (W_8O_{23}) và oxit molipden (Mo_8O_{23}) có màu xanh.

Màu xanh này bị hấp thụ nhiều nhất ở bước sóng 750 nm và cường độ màu tỷ lệ với hàm lượng phenol có trong mẫu.

2. Dụng cụ

- Máy so màu.
- Cuvet 10 mm.
- Bình định mức 100 ml.
- Pipet 1, 2, 3, 5, 10 ml.

3. Hoá chất

- Dung dịch Folin - Ciocalteau (sản phẩm thương mại).
- Na_2CO_3 20% .

4. Tiến hành

- Cho 1 ml rượu vang vào bình định mức 100 ml. Với vang trắng và hồng thì không cần pha loãng, còn rượu vang đỏ thì nên pha loãng theo tỷ lệ 1 : 5 bằng nước cất. Cho thêm 50 ml nước cất. Cho tiếp 5 ml dung dịch Folin-Ciocalteau và lắc đều trong 30 giây, cho 20 ml Na_2CO_3 và lắc đều. Dùng nước

cất định mức tới 100 ml. Lắc đều và để yên 2h ở 20°C để phản ứng đạt trạng thái ổn định.

- Dùng cuvet 10 mm để đo độ hấp thụ ở bước sóng 750 nm và lấy nước cất để hiệu chỉnh về 0.00.

5. Kết quả

Lượng phenol tổng số trong rượu vang được biểu thị bằng giá trị hấp thụ:

- Rượu vang trắng hoặc hồng: chỉ số Folin-Ciocalteu = $A_{750} \times 20$

- Rượu vang đỏ: Chỉ số Folin-Ciocalteu = $A_{750} \times 20 \times f$.

f - hệ số pha loãng.

Nếu chỉ số Folin-ciocalteau <30: hàm lượng phenol tổng số thấp và rượu vang dịu.

30-50: hàm lượng phenol tổng số trung bình và rượu vang có độ chất vừa phải.

>50: hàm lượng phenol tổng số cao và là rượu vang chất.

10.7.3. Chỉ số permanganat (Permanganate Index, PI)

1. Nguyên tắc

Phương pháp này do Lowenthal - Neubauer đưa ra để xác định lượng polyphenol. Lượng polyphenol có trong rượu vang được chuẩn độ bằng permanganat kali với chất chỉ thị màu là indigocacmin trong môi trường axit.

Chỉ số permanganat còn được gọi là chỉ số polyphenol.

2. Dụng cụ

- Bình tam giác 500 ml.
- Pipet 5, 10 ml.
- Buret 50 ml.

3. Hoá chất

- KMnO_4 0,01N: Cân 316 gam KMnO_4 và hoà với nước cất trong bình định mức 1 lít. Định mức bằng nước cất tới gần bình.

- Dung dịch chỉ thị indigocarmin: Cân 150 mg indigocarmin vào bình định mức 1 lít, thêm 50 ml dung dịch H_2SO_4 (1 : 2) hoà với 500 ml nước. Định mức tới 1 lít.

- Dung dịch H_2SO_4 (1 : 2): Lấy 1 phần thể tích axit sulfuric đậm đặc hoà với 2 phần thể tích nước.

4. Tiến hành

- Dùng pipet lấy 50 ml indigocarmin cho vào bình tam giác 500 ml. Dùng KMnO_4 0,01N định phân cho tới khi đổi màu (từ màu xanh sang màu hồng hoặc da cam). Đánh dấu mức KMnO_4 đã dùng là n_1 .

- Lấy 50 ml indigocarmin cho vào bình tam giác 500 ml khác. Cho thêm 2 ml rượu vang. Dùng KMnO_4 để định phân tương tự như trên. Lượng KMnO_4 đã dùng ký hiệu là n_2 .

5. Kết quả

Chỉ số permanganat (PI) được xác định theo công thức sau:

$$\text{PI} = 5 (n_2 - n_1)$$

Nếu giá trị PI là 25 thì sẽ tương ứng với 320 mg/l axit galic.

10.7.4. Phép thử pH với sulfatamoni sắt II

1. Nguyên tắc

Năm 1962, Schanderl đã đưa ra phương pháp để định tính hàm lượng phenol trong rượu vang trắng và rượu vang bọt.

Mẫu được chỉnh pH tới 7, sau đó chất chỉ thị sulfatamoni sắt II được thêm vào. Từ màu tạo ra có thể định tính được lượng phenol có trong mẫu.

2. Dụng cụ

- Ống nghiệm 15 - 20 ml.
- Máy đo pH.
- Pipet.

3. Hoá chất

- Dung dịch sulfatamoni sắt II 1 - 2 % (m/v).
- NaOH 1N.

4. Tiến hành

- Lấy 10 ml dịch quả đã làm trong hay rượu vang và dùng NaOH 1N chỉnh tới pH = 7. Cho thêm 2 giọt dung dịch sulfatamoni sắt II, lắc đều và quan sát màu.

5. Kết quả

Tùy theo màu của dung dịch mà ta có các kết luận về hàm lượng phenol :

- Màu vàng: hàm lượng phenol thấp.

- Đen hoặc tím đậm: Có axit galic trong mẫu phân tích.
- Đỏ hoặc đỏ nâu: Có catechin.
- Có kết tủa đỏ nâu: Có axit ellagic.

Có thể dùng dung dịch chuẩn có chứa lượng phenol xác định để so sánh.

10.8. TANIN TỔNG SỐ

1. Nguyên tắc

Dựa trên sự chuyển hoá hợp chất tiền anthocyanidin thành anthocyanidin dưới tác dụng của nhiệt trong môi trường axit.

2. Dụng cụ

- Máy ly tâm.
- Máy so màu.
- Ống sinh hàn khí.
- Bình cách thuỷ.

3. Hóa chất

- HCl 12N.
- Ethanol 95%.
- Gelatin 70 g/l.

4. Tiến hành

Lấy 2 bình tam giác và cho vào mỗi bình 4 ml rượu vang đỏ đã pha loãng (theo tỷ lệ 1 ml rượu vang + 49,2 ml nước cất) và 6 ml HCl 12 N.

Lắp ống sinh hàn khí cho một bình Δ và đặt trong bình cách thuỷ 100°C, đun trong 30 phút. Mẫu trong bình tam giác này được gọi là mẫu thực. Sau đó làm lạnh mẫu và cho thêm 1 ml ethanol 95% vào cả 2 bình.

Đo độ hấp phụ của cả 2 mẫu ở bước sóng 550 nm bằng cuvet có độ dày 1 cm, dùng nước cất để hiệu chỉnh về 0. Gọi giá trị hấp thụ của mẫu xử lý nhiệt (mẫu thực) là A_1 và của mẫu không xử lý nhiệt (mẫu trắng) là A_2 .

5. Kết quả

Nồng độ tanin được tính g/l bằng cách xác định hiệu số giữa giá trị hấp phụ của mẫu có xử lý nhiệt (mẫu thực) và mẫu không xử lý nhiệt (mẫu trắng) theo công thức sau:

$$\text{Tanin} = 19,33 (A_1 - A_2), \text{ g/l}$$

Chỉ số gelatin (Gelatin Index, G.I):

Nồng độ tanin đã xác định ở trên được dùng để tính toán chỉ số gelatin, chỉ số này biểu thị khả năng liên kết của tanin với protein và độ chất của chúng.

Cách xác định như sau: Cho 5 ml dung dịch gelatin 70 g/l vào 50 ml rượu vang, lắc đều và bảo quản trong 3 ngày ở nhiệt độ 4 - 7°C. Mẫu được mang đi ly tâm và pha loãng 1/50. Xác định lượng tanin trong dịch pha loãng như phần trên.

Chỉ số gelatin được xác định theo công thức sau:

$$G.I = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

trong đó:

m_1 - lượng tanin trong mẫu phân tích, g/l;

m_2 - lượng tanin trong dịch đã ly tâm, g/l.

10.9. MÀU

Đo độ hấp thụ ánh sáng là phương pháp xác định màu của rượu vang thường được dùng trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu về rượu vang của Pháp.

1. Nguyên tắc

Để xác định màu của rượu vang, có thể dựa theo giá trị đo được ở các bước sóng khác nhau. Trước khi đo, rượu vang phải trong tuyệt đối và loại bỏ phần lớn lượng CO₂ có trong đó.

Độ hấp thụ của rượu vang đỏ đạt giá trị lớn nhất ở bước sóng 520 nm (màu đỏ) và thấp nhất ở bước sóng 420 nm (màu vàng).

Rượu vang trắng không thể hiện sự hấp thụ cố định ở một bước sóng nào, tuy nhiên ở bước sóng 420 nm tương ứng với màu trắng vàng.

2. Dụng cụ

- Máy quang phổ.

3. Tiến hành

- Rượu vang cần được làm trong bằng cách ly tâm hoặc lọc bằng giấy lọc và tách CO₂ có trong rượu vang (lắc hoặc hút chân không).

- Đo cường độ màu: Đo độ hấp thụ của rượu vang đỏ và hồng ở các bước sóng 420, 520, 620 nm, dùng cuvet 1 mm khi đo rượu vang đỏ, còn rượu vang

hồng thì dùng cuvet 10 mm. Dùng nước cất để hiệu chỉnh độ hấp thụ về 0.

- Với rượu trắng, đo độ hấp thụ ở bước sóng 420 nm bằng cuvet 10 mm.

4. Kết quả

Cường độ màu của rượu vang đỏ = $(A_{420} + A_{520} + A_{620}) \times 10$

Cường độ màu của rượu vang hồng = $A_{420} + A_{520} + A_{620}$

Sắc thái màu của rượu vang đỏ và hồng = $\frac{A_{420}}{A_{520}}$

Với rượu vang trắng, giá trị A_{420} chỉ dùng để tham khảo mức độ oxy hoá cho mỗi loại rượu.

10.10. AXETALDEHYT

Theo phương pháp chuẩn độ liên kết sulfit.

1. Nguyên tắc

Axetaldehyt có ưu điểm là khả năng liên kết với SO_2 rất mạnh và bền.

Dịch thu được khi chưng cất rượu vang được chuẩn bằng Iot ở pH = 2 và pH = 9. Tại pH = 2, phức chất axetaldehyt-bisulfit ở dạng không phân ly.

Sự oxy hoá trong quá trình chuẩn ở pH kiềm có thể giảm xuống mức tối thiểu nếu bổ sung thêm EDTA và 1 lượng nhỏ rượu isopropyl.

2. Dụng cụ

- Hệ thống cất.
- Bình tam giác 750 ml.
- Bình định mức 1 lít.
- Pipet 10 ml, 50 ml.

3. Hoá chất

- Dung dịch metabisulfit kali, KHSO_3 : Hoà tan 15 g KHSO_3 vào nước đã tách ion. Cho 70 ml dung dịch HCl đậm đặc và định mức tới 1 lít.

- Dung dịch EDTA: hoà tan 4 g EDTA và 200 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ trong nước cất. Định mức 1 lít.

- Dung dịch borat natri: Hoà tan 100 g axit boric và 170 g NaOH với nước cất và định mức 1 lít.

- Dung dịch tinh bột 0,2%.
- Dung dịch I_2 0,1N và 0,02 N.
- HCl 3N.

4. Tiến hành

- Dùng pipet lấy 50 ml rượu vang có chứa lượng axetaldehyt ít hơn 30 mg/l và cho vào bình cất. Cho thêm 50 ml dung dịch borat natri. Chung cất và lấy 50 ml nước ngưng cho vào bình tam giác 750 ml có chứa 300 ml nước cất, 10ml dung dịch metabisulfit kali và 10 ml dung dịch EDTA. Trước khi cất, pH của dung dịch có trong bình khoảng 7 - 7,2.

- Sau khi cất xong, cho khoảng 10 ml dung dịch HCl 3N để giảm xuống pH = 2 và 10ml tinh bột 0,2% vào trong bình ngưng tụ, lắc đều và chuẩn ngay lập tức với dung dịch I₂ 0,1 N cho tới khi xuất hiện màu xanh. Cho thêm 10ml dung dịch borat natri và chuẩn ngay lập tức với dung dịch I₂ 0,02 N cho tới khi xuất hiện màu xanh, pH nằm trong khoảng 8,8 - 9,5.

5. Kết quả

Lượng axetaldehyt (mg/l) được tính theo công thức sau :

$$\text{Axetaldehyt} = \frac{n_2 \times N \times 22 \times 1000}{V}, \text{ mg/l}$$

trong đó:

n_2 - số ml I₂ (0,02 N) tiêu hao khi chuẩn độ lần thứ 2;

N - nồng độ đương lượng của dung dịch I₂ chuẩn (N = 0,02);

22 - số mg axetaldehyt tương ứng với 1 ml dung dịch I₂ 1N;

V - số ml rượu vang mang đi phân tích.

Chú ý:

- Để chính xác các mẫu rượu vang phân tích phải có hàm lượng axetaldehyt < 30 mg/l. Với rượu vang bàn ăn thường có lượng axetaldehyt nằm trong khoảng 70 - 80 mg/l, do đó khi phân tích cần pha loãng.

- Lượng ml I₂ 0,1 N tiêu hao khi chuẩn độ lần đầu với mục đích để oxy hoá lượng SO₂ còn dư trong rượu vang. Lượng này không cần tính.

10.11. CÁC CHẤT HUYỀN PHÙ RẮN

Chất rắn không hoà tan (Non Soluble Solide - NSS) đóng vai trò quan trọng ảnh hưởng tới chất lượng cảm quan của rượu vang. Lượng NSS cao (>2,5%) có thể ảnh hưởng tới cả độ bền hoá lý của rượu vang.

Trong sản xuất rượu vang trắng, trước khi lên men nên giảm hàm lượng

NSS nhỏ hơn 1,5% để tránh ảnh hưởng tới quá trình lên men của nấm men. Tùy thuộc vào loại rượu vang, đôi khi còn cần giảm tới < 0,5%.

1. Nguyên tắc

Ly tâm một lượng thể tích mẫu xác định (dịch quả hoặc rượu vang) sau đó xác định thể tích hoặc trọng lượng cần thu được. Tùy thuộc vào điều kiện, có thể biểu thị theo % thể tích hay khối lượng.

2. Dụng cụ

- Máy ly tâm siêu tốc và ống ly tâm có chia vạch 0,1 ml
- Pipet

3. Tiến hành

- Cân hoặc dùng pipet lấy mẫu và cho vào ống ly tâm. Làm 2 mẫu song song.
- Ly tâm trong khoảng 5 -10 phút tùy thuộc vào lượng mẫu đã lấy.
- Gạn lượng dịch trong ở trên một cách cẩn thận, đo thể tích hoặc cân khối lượng cần còn lại dưới đáy ống.

4. Kết quả

Lượng chất rắn không hoà tan (NSS) được tính theo công thức sau :

$$NSS = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \cdot 100, \% (v/v)$$

trong đó:

- V_1 - thể tích mẫu trước khi ly tâm;
- V_2 - Thể tích cần thu được sau ly tâm.

Chú ý:

- Có thể tính lượng cần theo % khối lượng (m/m).
- Nếu không có máy ly tâm thì có thể tiến hành theo cách lấy 100 ml mẫu đưa cho vào ống chia độ và để lắng trong tủ lạnh. Khi dịch trong và có thể thấy được thể tích cần (lượng chất rắn không hoà tan) theo vạch chia độ thì kết thúc.

10.12. KIỂM TRA ĐỘ BỀN VỮNG BITARTRAT KALI

1. Nguyên tắc

Rượu vang có độ bền vững kém khi để ở nhiệt độ đông lạnh, nếu để trong khoảng thời gian nhất định sẽ bị kết tinh.

2. Dụng cụ

- Tủ lạnh hay tủ lạnh đông có nhiệt độ ổn định.

3. Tiến hành

- Cho mẫu rượu vang vào bình. Đặt mẫu vào tủ lạnh hoặc tủ lạnh đông trong thời gian nhất định. Cần đặt thêm mẫu đối chứng ở nhiệt độ phòng.

4. Kết quả

So sánh mẫu đặt trong tủ lạnh và mẫu đối chứng. Xác định thể tích bị kết tinh (chú ý phân biệt giữa lượng bị kết tinh và lượng kết tủa của mẫu phân tích). Để lại mẫu ở nhiệt độ phòng để kiểm tra sự hoà tan lại của lượng bitartrat kali bị kết tinh.

Nếu tất cả lượng kết tinh tạo thành lại hoà tan ở nhiệt độ phòng, có thể đánh giá rượu vang có độ ổn định tốt. Tuy nhiên nên kiểm tra lại sự kết tinh lại của mẫu bằng cách để lại ở nhiệt độ đông lạnh một lần nữa.

10.13. KIỂM TRA SỰ ỔN ĐỊNH PROTEIN

10.13.1. Thuốc thử Bentotest

1. Nguyên tắc

Bentotest là dung dịch được chuẩn bị từ axit phosphomolipidic pha trong axit HCl để phân huỷ và kết tủa protein có trong dịch quả (hoặc rượu vang). Phương pháp này có ưu điểm là nhanh và không sử dụng nhiệt. Mức độ đục tạo thành tỷ lệ với hàm lượng protein có trong mẫu và có thể sử dụng để xác định lượng bentonit cần thiết bổ sung vào quá trình làm trong rượu vang.

Theo Rankine và Pocock (1971) thì phương pháp kiểm tra Bentotest có độ nhạy lớn hơn phương pháp thử bằng nhiệt (70°C trong 15 phút) và phương pháp TCA (trichloaxetic axit).

2. Dụng cụ:

- Ống đong 100 ml.
- Bông thủy tinh.
- Giấy lọc Whatman No. 1.
- Hệ thống lọc và màng lọc 0,45 µm.
- Máy đo độ đục.
- Ống nghiệm 20 ml.

3. Hoá chất

- Thuốc thử Bentotest 5% (axit phosphomolybdic): Hoà tan 5 g axit photphomolybdic, 5g sulfat natri và 0,25 g glucoza vào 15 g axit sulfuric, cho nước cất tới đủ 1 lít. Có thể mua thuốc thử này trên thị trường.

4. Tiến hành

Có thể thử nghiệm tách protein bằng cách cho 100 ml mẫu vào ống đong 100 ml. Cho bentonit theo lượng đã định (thường cho từ 6 - 36 g/hl rượu vang, với dịch quả có thể nhiều hơn). Để yên trong khoảng 15 phút và gạn lấy dung dịch trong. Lọc sơ bộ lấy khoảng 20 ml. Lọc tiếp mẫu qua màng lọc 0,45 μ m và lấy khoảng 15 ml.

Lấy chính xác bằng pipet 10 ml dịch lọc và cho vào ống nghiệm. Cho vào 1 ml dung dịch bentotest và lắc đều. Quan sát dưới ánh sáng có cường độ cao và so sánh với mẫu kiểm chứng.

5. Kết quả

Những mẫu nào không bị đục được coi là protein bền vững. Mức độ đục có thể đo bằng máy đo độ đục.

Chú ý: Màu xanh da trời hoặc màu xanh lá cây có thể xuất hiện là do có phản ứng của SO_2 và tanin với thuốc thử bentotest. Tuy nhiên điều này không ảnh hưởng tới kết quả vì kết quả dựa trên sự tạo thành độ đục chứ không phải tạo màu.

Phương pháp kiểm tra này được dùng để xác định nồng độ bentonit cần thiết đưa vào thùng lên men để đạt được sự ổn định độ bền keo của rượu vang.

10.13.2. Kết quả trong cồn

Lấy rượu vang hoà trộn với cồn theo tỷ lệ 1 : 1 (v/v) và quan sát mức độ đục của dịch (khả năng tạo thành lớp sương mù trong dịch) hoặc dùng máy đo độ đục để xác định mức độ đục.

Kết quả

Nếu hỗn hợp trở nên đục hoặc tạo thành lớp sương mù chứng tỏ protein có trong mẫu phân tích không bền. Có thể đo mức độ đục của hỗn hợp bằng máy so màu.

10.13.3. Phương pháp axit trichloaxetic (TCA)

1. Dụng cụ

- Bình cách thuỷ.
- Ống nghiệm 20 ml.
- Pipet.
- Máy đo độ đục (nếu có).

2. Hoá chất

- Dung dịch trichloroaxetic 55%: hòa tan 55 g axit này vào nước cất và định mức tới 100 ml.

3. Tiến hành

- Cho vào 2 ống nghiệm, mỗi ống chứa 10 ml mẫu rượu vang đã lọc trong. Kiểm tra độ trong các mẫu dưới đèn có cường độ sáng cao.

- Cho vào mỗi ống nghiệm 1 ml dung dịch TCA 55% và đặt các ống nghiệm vào bình cách thuỷ và đun sôi trong thời gian 2 phút. Sau đó lấy mẫu ra và quan sát độ đục của các ống nghiệm, có so sánh với mẫu kiểm chứng (rượu vang).

4. Kết quả

- Nếu dung dịch bị đục chứng tỏ protein có trong mẫu không bền.
- Nếu dung dịch không bị đục, nên chờ khoảng 15 phút tính từ lúc lấy ống nghiệm ra khỏi bình cách thuỷ và làm lại để khẳng định độ bền của protein có trong mẫu.

Chú ý:

- Có thể dùng máy so màu xác định ở bước sóng 430 nm để đo độ hấp thụ của dịch. So sánh với mẫu kiểm chứng (rượu vang).

- Có thể đo trên máy đo độ đục (so với mẫu kiểm chứng) và dùng đơn vị "nephlos" - để biểu thị độ đục của máy đo độ đục. Theo gợi ý của Rankine và Pocock (1971) thì giá trị nephlos cần nhỏ hơn 19 - đây là giá trị giới hạn biểu thị độ bền protein có trong rượu vang bàn ăn.

10.14. AXIT SORBIC

(Xác định bằng chưng cất và so màu).

1. Nguyên tắc

Tách axit sorbic bằng chưng cất và oxy hoá thành maloandehyt. Cho chất

tạo thành tác dụng với axit thiobacbituric sẽ tạo thành sản phẩm ngưng tụ có màu ở bước sóng 530 nm.

2. Dụng cụ

- Máy so màu.
- Bình cách thuỷ.
- Bình định mức 100 ml, 500 ml.
- Ống Pyrex 15 ml.

3. Hoá chất

- Axit sorbic gốc (100 mg/l): cân chính xác 134 mg kali sobat và cho vào bình định mức 1 lít. Hoà tan bằng nước cất và định mức tới gần bình. Dung dịch này có nồng độ tương đương 100 mg/l.

- Axit H_2SO_4 0,3N: Hoà tan 15 ml H_2SO_4 2N vào nước và định mức tới 100 ml.

- Dung dịch Kali bichromat: Hoà tan 147 mg $K_2Cr_2O_7$ với nước và định mức tới 100 ml

- Axit thiobacbituric 0,5%: Hoà tan 250 mg axit thiobacbituric với 5 ml NaOH 0,5N trong bình định mức 50 ml. Có thể đun nóng bình để tốc độ hoà tan nhanh hơn. Khi đã hoà tan hoàn toàn, cho nước cất với 3 ml HCl 1N, định mức tới gần bình. Dung dịch này được chuẩn bị và chỉ dùng trong ngày.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị đường chuẩn:

+ Từ dung dịch axit sorbic gốc 100 mg/ml chuẩn bị thành các dung dịch chuẩn có nồng độ 1, 2, 3,... mg/l. Lấy 2 ml mỗi dung dịch này cho vào ống nghiệm. Mẫu trắng thay bằng 2 ml nước cất.

- Chuẩn bị mẫu rượu vang:

+ Lấy 2 ml rượu vang cho vào bình cất. Tráng bằng nước cất nhiều lần để đảm bảo chuyển hết mẫu. Cất và thu hồi khoảng 190 ml dịch chưng cất và dùng nước cất định mức tới gần bình 200 ml. Lấy 2 ml dịch chưng cất cho vào ống nghiệm để tiến hành phân tích.

- Phân tích các mẫu:

+ Cho vào mỗi ống nghiệm 1 ml H_2SO_4 0,3 N và 1 ml dung dịch kali

bichromat, rồi cho các ống nghiệm vào bình cách thuỷ đang sôi và đun chính xác trong 5 phút. Lấy các ống nghiệm ra và làm nguội bằng nước đá. Cho 2 ml dung dịch axit thiobacbituric vào mỗi ống nghiệm. Đưa vào bình cách thuỷ và đun sôi trong 10 phút. Làm nguội xuống nhiệt độ phòng. Xác định độ hấp phụ trên máy so mẫu ở bước sóng 532 nm.

5. Kết quả

Dựa vào đường chuẩn, từ giá trị OD_{532nm} xác định nồng độ chưa biết. Kết quả này được nhân với 100 (2ml mẫu pha trong 200 ml) được kết quả (mg/l).

Chương 11

PHÂN TÍCH MÌ CHÍNH - NƯỚC CHẤM

11.1. MÌ CHÍNH

11.1.1. Độ ẩm

Chú ý khi thực hiện các bước bởi mẫu rất dễ hút nước, dễ chảy nước để đảm bảo quá trình phân tích mẫu không hút ẩm.

1. Dụng cụ

- Cốc sấy có nắp.
- Tủ sấy đảm bảo nhiệt độ 100 - 105°C.
- Bình hút ẩm.
- Cân có độ chính xác đến 0,001 g.

2. Tiến hành

Cân chính xác 1 - 2 g mẫu cần phân tích (đã trộn đều từ trước) trong cốc cân đã được sấy khô. Nếu mẫu dạng tinh thể phải nghiền thành bột mịn. Mở nắp cốc cân, cho cả nắp và cốc vào tủ sấy, tiến hành sấy ở $80 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 3 giờ, lấy cốc cân, đậy ngay nắp và đặt vào bình hút ẩm, để nguội tới nhiệt độ phòng trước khi cân lại khối lượng. Tiếp tục tiến hành sấy ở $80 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 30 phút, rồi cân mẫu sau khi sấy cho đến lúc kết quả của hai lần sấy liên tiếp không chênh nhau quá 0,001 g thì dừng lại.

3. Kết quả

Hàm lượng nước (W, %) tính theo công thức:

$$W = \frac{a - b}{a} \cdot 100, \%$$

trong đó:

- a - khối lượng mẫu trước khi sấy, g ;
- b - khối lượng mẫu sau khi sấy, g.

Làm hai mẫu song song, kết quả của hai phép xác định song song không được chênh nhau quá 0,1%. Kết quả cuối cùng là trung bình cộng của hai kết quả xác định được.

11.1.2. Độ pH

1. Dụng cụ

- Máy đo pH.

2. Tiến hành

- Hoà tan 1 g mì chính mẫu vào 30 ml nước cất.
- Khuấy đều.
- Đo pH dung dịch.

11.1.3. Glutamat natri

1. Mục đích

Xác định hàm lượng glutamat natri có trong mì chính bằng phương pháp Kjeldahl.

2. Nguyên tắc

Xem phần 1.3.

3. Dụng cụ

Xem phần 1.3.

4. Hoá chất

Xem phần 1.3.

- Phenolphtalein 1% (trong cồn).

5. Tiến hành

Cân chính xác 1 - 1,5 g mẫu rồi đổ mẫu vào bình đốt Kjeldahl sao cho không để dính mẫu vào thành và cổ bình. Tiến hành vô cơ hoá giống như phần xác định nitơ tổng số của đại mạch (phần 1.3), quá trình diễn ra trong 3 - 4 giờ, sau đó lấy bình ra và quan sát. Khi dung dịch trong bình trong và có màu xanh nhạt là đã vô cơ hoá xong, nếu không thì phải thêm vào bình 5 - 10 ml sulfuric đậm đặc nữa để vô cơ hoá tiếp cho đến khi đạt yêu cầu. Trong trường hợp vô cơ hoá không đạt yêu cầu phải tiến hành lại với lượng mẫu khác.

Sau khi vô cơ hoá, chuyển dung dịch trong bình Kjeldahl sang bình định mức 100 ml, tráng nước cất 3 - 4 lần, cho nước tráng vào bình định mức và thêm nước cất tới gần bình, lắc đều. Dùng pipet lấy 50 ml dung dịch cho vào bình Kjeldahl, thêm vài giọt phenolphtalein. Tiến hành chưng cất và chuẩn độ giống phần 1.3 (sử dụng H_2SO_4 thu nhận NH_3).

6. Kết quả

Hàm lượng natri glutamat (Na, %) tính theo công thức:

$$\text{Na} = \frac{2.(n_1 - n_2).8,8.100}{m(100 - w).1000}, \%$$

trong đó:

n_1 - số ml dung dịch H_2SO_4 0,1N cho vào bình chứa;

n_2 - số ml dung dịch NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ số axit dư;

m - khối lượng mẫu đã lấy để vô cơ hóa, g;

w - độ ẩm của mẫu, % (m/m);

2 - hệ số pha loãng ;

8,8 - số mg natri glutamat tương ứng với 1 ml H_2SO_4 0,1N ;

1000 - đổi ra g.

Tiến hành hai phép xác định song song, kết quả không được chênh nhau quá 0,5%. Kết quả cuối cùng tính trung bình cộng của kết quả hai phép xác định.

11.2. NƯỚC CHẤM

11.2.1. Nitơ tổng số

1. Mục đích

Xác định hàm lượng nitơ tổng số trong dịch đường bằng phương pháp Kjeldahl. Phương pháp được áp dụng cho mọi loại nước chấm.

2. Nguyên tắc

Xem phần 1.3.

3. Dụng cụ

Xem phần 1.3.

4. Hóa chất

Xem phần 1.3.

5. Tiến hành

Dùng pipet lấy 5 ml nước chấm vào bình Kjeldahl. Tiến hành vô cơ hóa giống phần 1.3.

Sau khi vô cơ hóa, chuyển mẫu vào bình định mức 100 ml, tráng nhiều lần bằng nước cất và định mức đến gần bình, lắc đều. Tiến hành chưng cất giống phần 1.3 (sử dụng H_2SO_4 để thu nhận NH_3).

6. Kết quả

Hàm lượng nitơ tổng số (N_t , g/l) tính theo công thức:

$$N_t = \frac{(n_1 - n_2) \times 0,0014 \times 100 \times 1000}{5 \times 10} = 2,8(V_1 - V_2), \text{ g/l}$$

trong đó :

n_1 - số ml dung dịch H_2SO_4 0,1N cho vào bình chứa ;

n_2 - số ml dung dịch NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ số axit dư ;

0,0014 - số gam nitơ tương ứng với 1 ml NaOH 0,1N ;

100 - dung tích bình định mức, ml ;

1000 - hệ số đổi ra g/l;

5 - số ml mẫu đã lấy để vô cơ hoá ;

10 - số ml mẫu đã pha loãng cho vào máy cất.

Chênh lệch kết quả giữa hai lần xác định song song không được quá 0,25 g/l.

11.2.2. Nitơ amoniac

1. Nguyên tắc

Giải phóng NH_3 ra khỏi dung dịch bằng NaOH. Dùng dung dịch axit sulfuric dư để hấp thụ amoniac, xác định lượng axit dư bằng dung dịch kiềm.

2. Hoá chất

- Axit sulfuric 0,1 N;

- NaOH 25%.

- Chỉ thị hỗn hợp.

3. Dụng cụ

- Bộ cất đậm Kjeldahl.

4. Tiến hành

- Lấy chính xác 20 ml axit sulfuric 0,1N và 0,5 ml hỗn hợp chỉ thị vào cốc 500 ml. Đặt cốc sao cho đầu ống sinh hàn của máy ngập hẳn vào dung dịch trong cốc.

- Lấy chính xác 5 ml nước chấm cho vào máy cất, cho tiếp 2 ml dung dịch NaOH 25%, sau đó thêm nước cất vào cho đủ 50 ml dung dịch. Tiếp tục tiến hành chưng cất giống phần 1.3, sử dụng H_2SO_4 để thu nhận NH_3 .

5. Kết quả

Hàm lượng nitơ amoniac (N_m , g/l) tính theo công thức:

$$N_m = \frac{(n_1 - n_2) \times 0,0014 \times 1000}{5}, \text{ g/l}$$

trong đó:

- n_1 - số ml H_2SO_4 0,1 N cho vào bình chứa ;
- n_2 - số ml NaOH cho vào bình để chuẩn ;
- 0,0014 - số g nitơ tương ứng với 1 ml H_2SO_4 0,1 N ;
- 1000 - hệ số đổi ra lít ;
- 5 - thể tích mẫu nguyên đã lấy để phân tích, ml.

11.2.3. Nitơ amin

(Xác định bằng phương pháp chuẩn độ formol).

1. Dụng cụ

- Bình định mức 250 ml.
- Pipet.

2. Hoá chất

- NaOH dung dịch 0,1N và 0,05N
- Chỉ thị hỗn hợp: 5 thể tích bromothymol xanh 0,04% và 4 thể tích phenolphthalein 0,5% (trong cồn).
- Formol trung tính 40%: 1 ml phenolphthalein vào 50 ml formol rồi dùng NaOH trung hoà đến màu hồng nhạt.

3. Tiến hành

- Lấy 10 ml nước chấm cho vào bình định mức 250 ml, thêm nước cất tới gần bình, lắc đều. Giữ dung dịch này để xác định hàm lượng muối. Dùng pipet lấy 10 ml, 15 giọt chỉ thị hỗn hợp sau đó cho vào từng giọt NaOH 0,1N đến khi dung dịch có màu phớt xanh; cho tiếp 5 ml formol trung tính (đun chuyển sang màu vàng xanh), chuẩn độ bằng NaOH 0,05N đến khi dung dịch chuyển từ màu vàng sang màu tím.
- Tiến hành xác định mẫu trắng, thay 10 ml nước chấm pha loãng bằng 10 ml H_2O .

4. Kết quả

Hàm lượng nitơ amin (N_{amin} , g/l) tính theo công thức:

$$N_{amin} = \frac{(n_1 - n_2) \times 0,0007 \times 250 \times 1000}{10 \times 10}, \text{ g/l}$$

trong đó:

n_1, n_2 - thể tích NaOH tiêu tốn khi chuẩn mẫu trắng và mẫu thí nghiệm, ml;

0,0007 - số gam nitơ tương ứng với 1 ml NaOH 0,05N ;

250 - dung tích bình định mức, ml ;

1000 - hệ số đổi ra g/l;

10 - thể tích mẫu nguyên, ml;

10 - thể tích mẫu đã pha loãng cho vào máy cất.

Chênh lệch kết quả giữa hai lần xác định song song không được quá 0,25 g/l.

11.3. MUỐI NaCl

1. Hoá chất

- Nitrat bạc 0,1N

- Chromat kali 10%

2. Tiến hành

- Lấy 5 ml dung dịch pha theo phần 11.2.3 cho vào bình tam giác 250 ml, cho tiếp nước cất cho đủ 100 ml. Thêm 1 ml dung dịch chromat kali. Chuẩn độ dung dịch bằng nitrat bạc 0,1N cho đến khi toàn bộ dung dịch có màu đỏ nâu bền vững.

3. Kết quả

Hàm lượng muối natri clorua (NaCl, g/l) tính theo công thức:

$$NaCl = \frac{n \times 0,00585 \times 250 \times 1000}{10 \times 5} = 29,25 \times n \text{ (g/l)}$$

trong đó:

n - thể tích $AgNO_3$ 0,1N tiêu tốn khi chuẩn mẫu thí nghiệm, ml ;

0,00585 - số gam natri clorua tương ứng với 1 ml $AgNO_3$ 0,1N ;

250 - dung tích bình định mức, ml ;

1000 - hệ số đổi ra lít;

10 - thể tích mẫu nguyên, ml ;

5 - thể tích mẫu đã pha loãng mang đi chuẩn độ, ml.

11.4. ĐỘ AXIT

1. Hoá chất

- NaOH 0,1N.
- Phenolphthalein 1% trong cồn.

2. Tiến hành:

Lấy 20 ml dung dịch pha theo 11.2.3. cho vào bình tam giác 100 ml, cho tiếp nước cất cho đủ 50 ml, thêm 5 giọt phenolphthalein. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi dung dịch chuyển sang màu phớt hồng (nên dùng mẫu đối chứng).

3. Kết quả:

Hàm lượng axit (Ax) tính theo số ml NaOH 0,1N dùng để trung hoà 1 ml mẫu, tính theo công thức:

$$Ax = \frac{n \times 250}{10 \times 20} , \text{ g/l}$$

trong đó:

- n - thể tích NaOH 0,1N tiêu tốn khi chuẩn mẫu thí nghiệm, ml ;
- 250 - dung tích bình định mức, ml ;
- 10 - thể tích mẫu nguyên, ml ;
- 20 - thể tích mẫu đã pha loãng mang đi chuẩn độ, ml.

Chương 12

XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ CÁC CHẾ PHẨM ENZYM

12.1. KHÁI QUÁT VỀ XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ ENZYM

12.1.1. Các khái niệm về hoạt độ enzym

Đơn vị hoạt độ enzym

Đơn vị enzym quốc tế (UI) là lượng enzym có khả năng xúc tác chuyển hoá được một micromol cơ chất sau một phút ở điều kiện tiêu chuẩn.

Trong những điều kiện xác định (bão hoà cơ chất), tốc độ phản ứng do enzym xúc tác tỷ lệ với lượng enzym trong hỗn hợp phản ứng. Lượng enzym ở đây không tính bằng mol hoặc miligam mà được biểu diễn bằng đơn vị enzym (U); mili đơn vị (mU) hoặc kilo đơn vị (kU).

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol cơ chất} (10^{-6} \text{ mol})/\text{phút}$$

Katal (Kat) là lượng enzym có khả năng xúc tác chuyển hoá được một mol cơ chất sau một giây ở điều kiện tiêu chuẩn.

$$1 \text{ Kat} = 1 \text{ mol cơ chất/giây}$$

$$1 \text{ UI} = \frac{1}{60} \cdot 10^{-6} \text{ Kat} = 16,67 \text{ nKat (nanokatal)}$$

Hoạt độ riêng của enzym

Hoạt độ riêng của một chế phẩm enzym đặc trưng cho độ thuần khiết của chế phẩm enzym. Hoạt độ riêng được biểu thị bằng số đơn vị enzym ứng với 1 ml dung dịch (nếu là dung dịch) hoặc 1 mg protein (nếu là bột khô) của chế phẩm. Nếu chế phẩm enzym đã tinh sạch, hoạt độ được biểu thị bằng số đơn vị enzym trên 1 mg enzym.

Hoạt độ phân tử của enzym

Hoạt độ phân tử của enzym là số phân tử cơ chất (hoặc số đương lượng các liên kết bị phân giải) được chuyển hoá bởi 1 phân tử enzym sau 1 phút. Hoạt độ phân tử được tính toán từ hoạt độ riêng và khối lượng phân tử của enzym.

Hoạt độ của trung tâm xúc tác enzym

Hoạt độ của trung tâm xúc tác enzym là số phân tử cơ chất (hoặc số đương lượng các liên kết bị phân giải) được chuyển hoá trên một trung tâm hoạt động sau 1 phút. Hoạt độ của trung tâm xúc tác enzym được tính toán từ hoạt độ phân tử và số trung tâm hoạt động của phân tử enzym.

12.1.2. Các phương pháp xác định hoạt độ enzym

Enzym là các chất xúc tác sinh học có bản chất protein và có tính đặc hiệu cao. Mỗi enzym có khả năng xúc tác cho một hoặc một số phản ứng nhất định. Hoạt độ xúc tác của enzym càng mạnh thì lượng cơ chất bị chuyển hoá hoặc lượng sản phẩm phản ứng tạo thành trên một đơn vị thời gian càng lớn. Vì vậy, có thể đánh giá hoạt độ xúc tác của enzym bằng cách xác định tốc độ chuyển hoá cơ chất hoặc tốc độ tích lũy sản phẩm phản ứng.

Về nguyên tắc có thể chia làm ba nhóm phương pháp sau:

- Đo lượng cơ chất bị mất đi hay lượng sản phẩm được tạo thành trong một thời gian nhất định ứng với một nồng độ enzym xác định.
- Đo thời gian cần thiết để thu được một lượng biến thiên nhất định của cơ chất hay sản phẩm ứng với một nồng độ enzym nhất định.
- Chọn nồng độ enzym như thế nào để trong một thời gian nhất định thu được sự biến thiên nhất định về cơ chất hay sản phẩm.

Để thực hiện được mục đích trên, nhiều phương pháp khác nhau được sử dụng: phương pháp đo quang phổ, phương pháp đo độ phân cực, phương pháp đo áp suất, phương pháp đo độ nhớt, phương pháp sắc ký và phương pháp hoá học.

12.1.3. Những điều lưu ý khi xác định hoạt độ enzym

- Khi tiến hành thực nghiệm cần tránh những yếu tố có thể gây biến tính protein enzym. Các điều kiện phản ứng (pH, nhiệt độ, các cation kim loại...) phải ở trong giới hạn enzym có thể tồn tại bền vững và giữ được ổn định trong suốt thời gian phản ứng.

+ Với những enzym cần có chất hoạt hoá hoặc chất làm bền thì phải cho các chất này vào enzym trước khi cho cơ chất vào hỗn hợp phản ứng.

+ Xác định hoạt độ cần tiến hành ở pH thích hợp và cố định. pH thích hợp có thể thay đổi khá nhiều tùy thuộc vào cơ chất và thành phần dung dịch đệm,

lực ion của dung dịch đệm (thường trong phạm vi 0,01 – 0,1).

+ Nhiệt độ dùng để xác định hoạt độ phải thấp hơn nhiệt độ tối ưu của enzym để để phòng tác dụng kìm hãm enzym do nhiệt độ cao.

- Nồng độ cơ chất trong phản ứng enzym phải ở trong giới hạn thích hợp đủ thừa để bão hoà enzym, nhưng không quá cao để đến mức kìm hãm enzym. Sau khi dùng phản ứng lượng cơ chất bị chuyển hoá nằm trong khoảng 20 – 30%.

- Thời gian xác định hoạt độ thường từ 5 – 30 phút. Tốt nhất là xác định tốc độ ban đầu của phản ứng (30 – 60 giây), vì giai đoạn này tốc độ phản ứng khá ổn định, sau đó bắt đầu giảm. Trong một số trường hợp hoạt độ của enzym quá thấp có thể kéo dài thời gian phản ứng đến 1 giờ hoặc lâu hơn. Trong trường hợp này cần phải cho thêm vào dung dịch các chất diệt vi sinh vật và tránh dùng dung dịch đệm thuận lợi cho sự phát triển của vi sinh vật.

- Khi xác định hoạt độ enzym phải làm mẫu kiểm chứng song song với mẫu thí nghiệm. Trong mẫu kiểm chứng enzym đã bị làm vô hoạt trước khi cho vào tiếp xúc với cơ chất.

- Khi chuẩn bị dung dịch enzym để xác định hoạt độ, tùy theo đặc tính và mức độ thuần khiết của chế phẩm enzym mà tiến hành chuẩn bị để có được dung dịch enzym trong suốt.

Trong phần trình bày các phương pháp xác định hoạt độ enzym của một số chế phẩm enzym, chúng tôi chỉ trình bày một vài phương pháp tách chiết enzym từ chế phẩm thô làm ví dụ. Trong thực tế tùy thuộc môi trường, kỹ thuật nuôi cấy và đặc tính của từng loại enzym mà chọn các phương pháp tách chiết, môi trường tách chiết và điều kiện tách chiết thích hợp.

12.2. HOẠT ĐỘ ENZYM THUỘC HỆ AMILAZA

12.2.1. Hoạt độ enzym α -amilaza theo Rukhliadeva

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân tinh bột bởi enzym có trong dịch chế phẩm nghiên cứu tới các dextrin có phân tử lượng khác nhau. Đo cường độ màu tạo thành giữa tinh bột và các sản phẩm thủy phân của nó với iot bằng máy so màu quang điện sẽ tính được hoạt độ enzym.

Đơn vị hoạt độ amilaza là lượng enzym chuyển hoá được một gam tinh bột tan thành các dextrin có phân tử lượng khác nhau ở 30°C trong thời gian một giờ (pH cho amilaza của malt là 4,8 – 4,9, của nấm mốc là 4,7, của vi khuẩn là 6,0...).

2. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch đậm

+ Dung dịch đậm axetat pH = 4,7 (dùng để xác định hoạt độ amilaza của nấm mốc): phối trộn một thể tích CH_3COOH 1N với một thể tích CH_3COONa 1N. Kiểm tra lại trên máy pH met.

+ Dung dịch đậm phosphat pH = 4,9 (dùng để xác định hoạt độ amilaza của malt): phối trộn 10 ml dung dịch Na_2HPO_4 1/15M với 990 ml dung dịch KH_2PO_4 1/15M nhận được 1 lít dung dịch đậm phosphat pH = 4,94. Kiểm tra lại trên máy pH met.

+ Dung dịch đậm glycine – NaOH 0,1M pH = 10 (dùng để xác định hoạt độ của amilaza kiềm).

- Dung dịch axit chlorhydric 0,1N.

- Dung dịch iot gốc: Hoà tan 0,5 gam iot và 5 gam KI với một lượng nhỏ nước cất trong chén cân có nút mài. Lắc nhẹ hỗn hợp để hoà tan hoàn toàn, sau đó chuyển dung dịch sang bình định mức 200 ml, bổ sung nước cất đến vạch mức. Bảo quản dung dịch trong bình màu nâu ở chỗ tối trong thời gian 1 tháng.

- Dung dịch iot phân tích: Pha loãng 2 ml dung dịch iot gốc với dung dịch HCl 0,1N trong bình định mức dung tích 100 ml. Trước khi sử dụng cần kiểm tra mật độ quang của nó trên máy so màu quang điện ở bước sóng $\lambda = 453 \text{ nm}$ với chiều dày cuvet 1 cm. Mật độ quang của dung dịch phải có giá trị 0,160 ($\pm 0,01$). Nếu có sự sai lệch mật độ quang phải hiệu chỉnh bằng cách thêm vài giọt axit HCl hoặc dung dịch iot gốc.

- Dung dịch tinh bột 1%: Hoà tan 1 gam tinh bột (theo chất khô tuyệt đối) với 50 ml nước cất trong bình định mức 100 ml, lắc đều. Đặt vào bếp cách thuỷ đang sôi, lắc liên tục cho tới khi tinh bột tan hoàn toàn. Sau đó làm nguội bình và bổ sung 10 ml dung dịch đậm axetat pH = 4,7 (hoặc 10 ml dung dịch đậm phosphat pH = 4,9) bổ sung nước cất tới vạch mức, lắc đều. Dung dịch được chuẩn bị trong ngày sử dụng.

- Chiết rút enzym: Enzym được chiết rút khỏi chế phẩm bằng dung dịch đệm có pH thích hợp.

- Dịch chiết enzym gốc từ vi khuẩn: Cân 0,1 gam chế phẩm nghiên cứu, chà cẩn thận chế phẩm bằng đũa thủy tinh trong một cốc có dung tích 25 – 30 ml với một lượng nước cất nhỏ. Sau đó chuyển toàn bộ hỗn hợp vào bình định mức dung tích 100 ml, bổ sung nước cất tới vạch mức. Lọc và thu hồi dịch chiết enzym. Bảo quản dịch chế phẩm gốc ở nhiệt độ +2°C đến +4°C trong thời gian 1 ngày.

- Dịch chiết enzym gốc từ canh trường nuôi mốc: Cân 5 gam canh trường nghiên cứu đã nghiền sơ bộ, chà cẩn thận bằng đũa thủy tinh trong một cốc có dung tích 50 ml. Sau đó chuyển toàn bộ canh trường vào bình nón dung tích 250 ml, bổ sung 90 ml nước cất và 10 ml dung dịch đệm axetat pH = 4,7. Giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 giờ, có khuấy đảo định kỳ. Lọc và thu hồi dịch chiết enzym. Bảo quản dịch chế phẩm gốc ở nhiệt độ +2°C đến +4°C trong thời gian 1 ngày.

- Dịch chiết enzym gốc từ malt: Cân 5 – 10 gam malt nghiên cứu đã nghiền nhỏ, cho vào bình nón dung tích 250 ml, bổ sung 90 ml nước cất và 10 ml dung dịch đệm phosphat pH = 4,9. Giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 giờ, có khuấy đảo định kỳ. Lọc và thu hồi dịch chiết enzym. Bảo quản dịch chế phẩm gốc ở nhiệt độ +2°C đến +4°C trong thời gian 1 ngày.

- Dịch chiết enzym phân tích: Chuẩn bị dịch chiết enzym phân tích từ dịch chiết enzym gốc bằng cách pha loãng sao cho trong 3 ml dịch chế phẩm enzym phân tích có chứa một lượng enzym đủ để thủy phân từ 20% tới 70% tinh bột trong dung dịch trong điều kiện xác định. Do đó tùy thuộc vào hoạt độ của chế phẩm enzym gốc mà tiến hành pha loãng theo tỷ lệ thích hợp.

3. Tiến hành

- Cho vào 2 ống nghiệm (đường kính 20 mm, chiều cao 100 mm), mỗi ống 10 ml dung dịch tinh bột 1%, đặt vào máy điều nhiệt có nhiệt độ 30°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) trong thời gian 10 phút để đưa nhiệt độ của dung dịch tới 30°C. Bổ sung vào ống nghiệm thứ nhất 5 ml nước cất (ống kiểm chứng), vào ống nghiệm thứ hai 5 ml dung dịch enzym phân tích (ống thí nghiệm), khuấy đều nhanh hỗn hợp và giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian 10 phút. Lấy từ hai ống nghiệm trên mỗi ống 0,5 ml hỗn hợp phản ứng cho vào hai ống nghiệm khác đã có sẵn 50 ml

dung dịch iot phân tích, lắc đều hỗn hợp trong bình. Các dung dịch nhận được có màu như sau:

+ Dung dịch kiểm chứng có màu xanh.

+ Dung dịch thí nghiệm có màu tím với cường độ màu khác nhau tùy thuộc lượng tinh bột chưa bị thủy phân.

- Đo cường độ màu của các dung dịch ở bước sóng $\lambda = 656 \text{ nm}$ so với nước cất.

4. Kết quả

Lượng tinh bột được thủy phân (C) tính theo công thức:

$$C = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 0,1$$

trong đó:

D_1 - mật độ quang đo được của dung dịch kiểm chứng;

D_2 - mật độ quang đo được của dung dịch thí nghiệm;

0,1 - lượng tinh bột đem phân tích, gam.

Hoạt độ amilaza của chế phẩm enzym nguồn gốc vi khuẩn tính theo đv/g:

$$\text{HdA} = \frac{5,885.C + 0,001671}{m} \times 1000$$

Hoạt độ amilaza của chế phẩm enzym nguồn gốc nấm mốc tính theo đv/g:

$$\text{HdA} = \frac{7,264.C - 0,03766}{m} \times 1000$$

Hoạt độ amilaza của chế phẩm enzym của malt tính theo đv/g:

$$\text{HdA} = \frac{6,889.C - 0,029388}{m} \times 1000$$

trong đó:

m - lượng chế phẩm nghiên cứu, mg;

C - lượng tinh bột bị thủy phân, gam;

1000 - hệ số chuyển mg thành gam;

5,885; 0,001671; 7,264; 0,03766; 6,889; 0,029388 là các hệ số của phương trình tính hoạt độ, thu được bằng phương pháp xử lý toán học số liệu thực nghiệm về sự phụ thuộc của lượng tinh bột bị thủy phân vào lượng enzym lấy để thí nghiệm. Trong các hệ số này đã có đưa vào thừa số tính chuyển ra 1 giờ tác dụng của enzym.

12.2.2. Hoạt độ enzym glucoamilaza (γ -amilaza)

a) Phương pháp vi lượng của V.Y. Rodzevich, O.P. Korenbiakina

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân tinh bột bởi enzym glucoamilaza có trong chế phẩm nghiên cứu. Xác định lượng glucoza tạo thành sẽ tính được hoạt độ enzym.

Đơn vị hoạt độ glucoamilaza là lượng enzym tác dụng lên dung dịch tinh bột tan pH = 4,7 ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 giờ giải phóng được 1 mg glucoza.

2. Hoá chất và dung dịch enzym

- Dung dịch Fehling I: hoà tan 34,64 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ trong 500 ml nước cất.
- Dung dịch Fehling II: hoà tan 173 g kali natri tartrat kép và 50 g NaOH trong 500 ml nước cất.
- Dung dịch axit sulfuric 25%.
- Dung dịch KI 30%.
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N.
- Dung dịch tinh bột 1%.
- Chiết rút enzym: Cân 3 gam chế phẩm nghiền nhỏ chuyển toàn bộ vào bình tam giác 250 ml, bổ sung 90 ml nước cất và 10 ml dung dịch đệm axetat pH = 4,7. Giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 giờ, có khuấy đảo định kỳ. Lọc và thu hồi dịch chiết enzym. Bảo quản dung dịch chế phẩm gốc ở nhiệt độ +2°C đến +4°C trong thời gian 1 ngày.

4. Tiến hành

- Mẫu thí nghiệm: Hút 1 ml dung dịch tinh bột 1% cho vào bình tam giác 50 ml, bổ sung 1,5 ml nước cất và 0,5 ml dịch chiết enzym (các dung dịch này đã được đưa về nhiệt độ 30°C), lắc đều và đặt lại vào máy điều nhiệt và giữ chính xác 10 phút. Định chỉ phản ứng bằng 1 ml Fehling I và 1 ml Fehling II. Đun sôi 2 phút (kể từ lúc xuất hiện bọt sôi đầu tiên), làm nguội và bổ sung 1 ml H_2SO_4 25% để hoà tan Cu_2O , sau đó bổ sung 2 ml KI 30% rồi chuẩn độ bằng dung dịch thiosulfit natri 0,1N.

+ Lưu ý hoạt độ dịch chiết enzym quá thấp (không có lớp Cu_2O màu đỏ ở đáy bình phải tăng lượng enzym, ngược lại nếu chỉ có Cu_2O mà không có màu

xanh của dung dịch Fehling ở trên phải pha loãng dịch chiết enzym).

- Mẫu kiểm chứng: Tiến hành như đối với mẫu thí nghiệm, nhưng thay thế 0,5 ml dịch chiết enzym bằng 0,5 ml dịch chiết enzym đã bị vô hoạt bằng cách đun sôi.

5. Kết quả

Hoạt độ glucoamilaza (HdG) tính bằng đv/g được xác định theo công thức :

$$\text{HdG} = \frac{a \times f \times 3,3 \times 60}{m \times 10}$$

trong đó:

a - hiệu số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N của mẫu kiểm chứng và thí nghiệm;

k - hệ số hiệu chỉnh nồng độ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N;

3,3 - hệ số chuyển đổi thành glucoza;

10 - thời gian thủy phân cơ chất, phút;

m - lượng enzym sử dụng, gam;

60 - hệ số chuyển thành giờ.

b) Phương pháp sử dụng enzym glucooxydaza

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân tinh bột bởi enzym glucoamilaza có trong dịch chế phẩm nghiên cứu. Xác định lượng glucoza tạo thành qua phản ứng xúc tác đặc hiệu của enzym glucooxydaza sẽ xác định được hoạt độ enzym.

Đơn vị hoạt độ glucoamilaza là lượng enzym tác dụng lên dung dịch tinh bột tan pH = 4,7 ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 1 phút giải phóng được 1 micromol glucoza.

2. Hoá chất và dung dịch enzym

- Dung dịch tinh bột 1%.

- Dung dịch đệm axetat pH = 4,7.

- Dung dịch đệm phosphat 1N, pH = 7,5: hoà tan 136 g KH_2PO_4 khan trong 1 lít nước cất và 56 g KOH trong 1 lít nước cất. Phối trộn hai dung dịch này theo tỷ lệ 1 : 1 (v/v). Kiểm tra pH của dung dịch đệm bằng pH met.

- Dung dịch ferroxyanua kali 0,1% (dung dịch A): dung dịch được pha trước lúc sử dụng.

- Dung dịch glucooxydaza (dung dịch B): hoà tan 5 - 6 mg glucooxydaza tương ứng 500 – 600 đơn vị (hoạt độ glucooxydaza là 100.000 đv/g) bằng dung dịch đệm phosphat 1N, pH = 7,5 trong bình định mức 50 ml, sau đó bổ sung 2 mg peroxydaza.

- Hỗn hợp các dung dịch ferroxynua kali và glucooxydaza (dung dịch C): phối trộn dung dịch A và dung dịch B theo tỷ lệ 1:1 (v/v), lắc đều. Dung dịch hỗn hợp được bảo quản trong bình màu nâu trong tủ lạnh trong thời gian 2 – 3 ngày.

- Dung dịch axit benzoic bão hoà: hoà tan 2,7 gam axit benzoic bằng nước cất trong bình định mức 1000 ml.

- Chiết rút enzym:

Cán 0,1 gam canh trường nghiền nhỏ chuyển toàn bộ vào cốc nhỏ 25 - 30 ml, đánh đều chế phẩm bằng đũa thuỷ tinh với một ít nước cất. Chuyển toàn bộ vào bình định mức 100 ml, bổ sung nước cất tới vạch mức. Lọc và thu hồi dung dịch enzym. Bảo quản dung dịch chế phẩm gốc ở nhiệt độ +2°C đến +4°C trong thời gian 1 ngày.

3. Tiến hành

- Mẫu thí nghiệm: Hút 10 ml dung dịch tinh bột 1% cho vào bình tam giác 50 ml, bổ sung 5 ml dung dịch enzym (các dung dịch này đã được đưa về nhiệt độ 30°C), lắc đều và đặt lại vào máy điều nhiệt và giữ chính xác 10 phút. Hút 1 ml dịch thuỷ phân cho vào ống nghiệm nhỏ đặt trong nồi cách thuỷ đang sôi trong thời gian 2 phút để vô hoạt enzym. Tiếp đó làm nguội bằng nước lạnh. Lượng glucoza tạo thành được xác định bằng cách bổ sung vào mỗi ống nghiệm 3 ml dung dịch C, lắc đều và giữ yên trong thời gian 45 phút ở nhiệt độ phòng. Đo cường độ màu ở bước sóng $\lambda = 400$ nm đối ngược với dung dịch hỗn hợp (3 ml dung dịch C và 1 ml nước cất).

+ Lưu ý mật độ quang của dung dịch nghiên cứu phải nằm trong vùng tuyến tính của đường chuẩn. Nếu không, cần phải làm lại thí nghiệm với một lượng enzym thích hợp.

- Mẫu kiểm chứng: Tiến hành như đối với mẫu thí nghiệm, nhưng thay thế 5 ml dung dịch enzym bằng 5 ml dung dịch enzym đã bị vô hoạt bằng cách đun sôi.

- Dung đường chuẩn với dung dịch glucoza tinh khiết: Pha dung dịch glucoza trong axit benzoic thì thời gian bảo quản sẽ lâu hơn (có thể 1 năm). Bổ sung 3 ml dung dịch C vào 1 ml dung dịch glucoza đã biết nồng độ. Để màu của dung dịch ổn định trong thời gian 45 phút, sau đó đo cường độ màu trên máy so màu. Dung đường chuẩn theo các số liệu đo được. Vùng biến thiên tuyến tính của đường chuẩn tương ứng với lượng glucoza từ 10 đến 150 μg .

4. Kết quả

Hoạt độ glucoamilaza (HdG) tính bằng đv/g được xác định theo công thức:

$$\text{HdG} = \frac{a}{b \times 180 \times 10}$$

trong đó:

- a - lượng glucoza tạo thành trong 1 ml dịch thủy phân, μg ;
- b - lượng enzyme có trong 1 ml dịch thủy phân, gam hay ml;
- 10 - thời gian thủy phân cơ chất, phút;
- 180 - phân tử lượng của glucoza (chuyển từ μg sang μM).

12.3. HOẠT ĐỘ ENZYM PROTEINAZA

12.3.1. Phương pháp Anson cải tiến

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân casein (hoặc hemoglobin) bởi enzyme có trong dịch chế phẩm nghiên cứu. Định lượng lượng axit amin được tạo thành trong phản ứng thủy phân bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin. Dựa vào đó thị chuẩn của tyrozin để tính lượng sản phẩm tương ứng do enzyme xúc tác tạo nên.

Đơn vị hoạt độ proteinaza là lượng enzyme chuyển hoá được một lượng caseinat natri thành dạng không bị kết tủa bởi axit trichloaxetic tương đương với một micromol tyrozin ở 30°C trong thời gian một phút. Một mol tyrozin bằng 0,181 mg.

2. Hoá chất và dịch chiết enzyme

- Dung dịch đệm vạn năng 0,1M:

+ Dung dịch axit axetic 0,1M (dung dịch A): hoà tan 5,7 ml axit axetic băng trong nước cất, định mức tới 1 lít dung dịch.

+ Dung dịch axit phosphoric 0,1M (dung dịch B): hoà tan 6,45 ml axit phosphoric đậm đặc ($d = 1,84$) trong nước cất, định mức tới 1 lít dung dịch.

+ Dung dịch axit *ortho*-boric 0,1M (dung dịch C): hoà tan 6,18 g axit *ortho*-boric trong nước cất, định mức tới 1 lít dung dịch.

+ Dung dịch natri hydroxit 1N (dung dịch D): hoà tan 40 g NaOH trong nước cất, định mức tới 1 lít dung dịch.

+ Trộn lẫn các dung dịch A, B, C với thể tích bằng nhau nhận được dung dịch đệm 0,1M có pH = 1,8. Điều chỉnh giá trị pH của dung dịch đệm trong khoảng pH = 1,8 tới pH = 12,0 bằng cách bổ sung dung dịch NaOH 1N.

- Các dung dịch đệm vạn năng nồng độ khác được chuẩn bị tương tự.

- Dung dịch axit trichloaxetic 0,3M: Hoà tan 50 g axit trichloaxetic trong nước cất, định mức tới 1 lít dung dịch, lắc đều và lọc.

- Dung dịch axit chlohydric 1N: Pha loãng 82,2 ml axit HCl đậm đặc trong nước cất, định mức tới 1 lít dung dịch.

- Dung dịch natri carbonat 0,5M: Hoà tan 53 g Na_2CO_3 trong nước cất, rồi định mức tới 1 l.

- Dung dịch axit chlohydric 1N.

- Thuốc thử:

+ Hoà tan 100 g natri vonframát ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) và 25 g natri molypdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) vào 800 ml nước cất. Thêm 50 ml axit phosphoric 80% (H_3PO_4) và 100 ml axit chlohydric đậm đặc. Đun sôi hỗn hợp trong thời gian 10 giờ (không cần liên tục) với ống sinh hàn ngược. Sau đó bổ sung vào hỗn hợp 105 g liti sulfat, 50 ml nước cất và 5 giọt nước brom. Đun sôi 15 phút để loại trừ brom dư. Dung dịch thuốc thử nhận được có màu vàng. Nếu dung dịch có màu xanh phải xử lý loại brom lần thứ hai. Dung dịch được làm nguội và bổ sung nước cất tới 1 lít, sau đó lọc qua ống Allin có chứa bóng thủy tinh.

+ Xác định nồng độ thuốc thử bằng cách pha loãng dung dịch thuốc thử 10 lần và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N với chỉ thị phenolphthalein.

+ Bảo quản dung dịch thuốc thử trong bình thủy tinh màu, ở nơi lạnh. Khi dung dịch ngả màu xanh, bổ sung vài giọt brom và lại tiến hành khử brom dư như phần trên.

- Chiết rút enzym:

Cân 1 g chế phẩm nghiên cứu, chà cẩn thận chế phẩm bằng đũa thủy tinh trong một cốc nhỏ với một ít dung dịch đệm vạn năng có nồng độ và pH thích hợp. Sau đó chuyển toàn bộ hỗn hợp vào bình định mức dung tích 100 ml, bổ sung dung dịch đệm tới vạch mức. Lọc và thu hồi dịch chiết enzym.

- Dung dịch đệm vạn năng thích hợp đối với:

- + Chế phẩm proteinaza axit: 0,1M và pH = $2,5 \pm 0,2$ hoặc 0,1M và pH = $5,5 \pm 0,2$.

- + Chế phẩm proteinaza trung tính: 0,1M và pH = $7,2 \pm 0,2$.

- + Chế phẩm proteinaza kiềm: 0,1M và pH = $9,5 \pm 0,2$.

- Dung dịch casein:

- + Đối với các chế phẩm có pH thích hợp cho phản ứng nằm trong khoảng pH = 5,5 tới pH = 9,5: Hoà tan 2 g caseinat natri khô trong 90 ml dung dịch đệm vạn năng 0,1M có pH tương ứng. Sau đó điều chỉnh pH dung dịch bằng cách bổ sung từng giọt HCl 1N hoặc NaOH 1N tới pH của dung dịch đệm ban đầu. Chuyển toàn bộ dung dịch sang bình định mức 100 ml và bổ sung dung dịch đệm tương ứng tới vạch mức.

- + Đối với các chế phẩm có pH thích hợp cho phản ứng là pH = 2,5: Hoà tan 2 g caseinat natri khô trong 90 ml dung dịch đệm vạn năng 0,01M, pH = 5,5. Sau đó đưa pH của dung dịch xuống pH = 3,0 bằng cách bổ sung nhanh axit HCl 1N kết hợp khuấy mạnh, vì trong quá trình axit hoá dung dịch xảy ra hiện tượng vẩn đục. Các vẩn đục này được hoà tan dần khi pH xuống dưới pH = 3,0. Tiếp tục điều chỉnh pH dung dịch xuống pH = 2,5. Chuyển toàn bộ dung dịch sang bình định mức 100 ml, bổ sung dung dịch đệm vạn năng 0,1M, pH = 2,5 tới vạch mức.

- + Để rút ngắn thời gian chuẩn bị dung dịch caseinat natri, người ta có thể thực hiện quá trình hoà tan ở nhiệt độ 70°C trên máy khuấy từ.

- + Dung dịch caseinat natri 2% nhận được có thể bảo quản trong tủ lạnh không quá 2 ngày.

3. Tiến hành

- Xác định hoạt độ enzym:

- + Mẫu thí nghiệm: Cho vào 2 ống nghiệm, mỗi ống 2 ml dung dịch caseinat natri, sau đó đặt vào máy điều nhiệt trong thời gian 10 phút để đưa

nhệt độ của dung dịch tới 30°C. Bổ sung vào mỗi ống nghiệm 2 ml dịch chiết enzym, lắc đều và giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian 10 phút. Phản ứng enzym được đình chỉ bằng cách bổ sung 4 ml axit trichloaxetic 0,3M vào mỗi ống nghiệm. Khuấy trộn nhanh hỗn hợp và giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian 20 phút để kết tủa hoàn toàn các hợp chất cao phân tử trong dung dịch thủy phân. Lọc qua giấy lọc thu hồi dịch trong thủy phân. Lấy 1 ml dịch trong nhận được cho vào ống nghiệm, đồng thời bổ sung 5 ml dung dịch Na_2CO_3 0,5M, khuấy liên tục và bổ sung thêm 1 ml thuốc thử Folin phân tích. Để yên hỗn hợp phản ứng 20 phút. Dung dịch sau phản ứng có màu xanh da trời. Đo cường độ màu của dung dịch ở bước sóng $\lambda = 656 - 670$ nm đối ngược với mẫu kiểm chứng.

+ Mẫu kiểm chứng: Cách tiến hành như đối với mẫu thí nghiệm, nhưng dịch chiết enzym sử dụng trong thí nghiệm này là dịch chiết enzym đã bị vô hoạt bằng cách: cứ 2 ml dịch chiết enzym được phối trộn với 4 ml axit trichloaxetic 0,3M ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 10 phút.

- Dụng đường chuẩn theo tyrozin:

+ Chuẩn bị dung dịch tyrozin chuẩn: chuẩn bị dung dịch gốc tyrozin có nồng độ 10^{-3} M (1 $\mu\text{mol}/1\text{ml}$): cân 181,19 mg tyrozin tinh khiết hoà tan trong dung dịch HCl 0,2N, chuyển vào bình định mức 1 lít và định mức đến gần. Từ dung dịch gốc này pha thành dãy dung dịch chuẩn có nồng độ trong khoảng $0,2 \cdot 10^{-4}\text{M} - 3,0 \cdot 10^{-4}\text{M}$.

+ Xây dựng đường chuẩn: Lấy 1 ml dung dịch chuẩn, 5 ml Na_2CO_3 0,5M và 1 ml thuốc thử Folin phân tích cho vào ống nghiệm khô, khuấy đều và để yên trong thời gian 20 phút. Đo cường độ màu của dung dịch hỗn hợp đối ngược với mẫu đối chứng (1 ml nước cất thay thế 1 ml dung dịch chuẩn) ở bước sóng $\lambda = 656 - 670$ nm. Từ số liệu thu được dựng đường chuẩn tyrozin. Trục hoành biểu thị hàm lượng tyrozin ($\mu\text{mol}/\text{ml}$), trục tung biểu thị mật độ quang tương ứng (D). Từ đường chuẩn xác định đương lượng tyrozin (TE): là mật độ quang mà 1 μmol tyrozin có trong 1 ml dung dịch chuẩn khi phản ứng với thuốc thử Folin.

4. Kết quả

Hoạt độ proteinaza (HdP) tính bằng đv/g hay đv/ml được xác định theo công thức:

$$\text{HdP} = \frac{D \times 4}{\text{TE} \times 10 \times m} \times 1000$$

trong đó:

- D - mật độ quang đo được của mẫu;
- 4 - tỷ lệ giữa thể tích của hỗn hợp phản ứng và thể tích của dung dịch enzym sau khi bổ sung axit trichloaxetic;
- TE - đương lượng tyrozin xác định theo đường chuẩn;
- 10 - thời gian thủy phân cơ chất, phút;
- m - lượng enzym sử dụng (mg có trong ml dung dịch enzym);
- 1000 - hệ số chuyển sang gam chế phẩm.

12.3.2. Phương pháp Babakina

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân casein (hoặc hemoglobin) bởi enzym có trong dung dịch chế phẩm nghiên cứu. Các liên kết peptit được thủy phân sẽ làm giảm khả năng liên kết của phân tử với HCl. Xác định sự giảm khả năng liên kết này sẽ cho phép xác định hoạt độ enzym. Phương pháp này được sử dụng để xác định hoạt độ enzym proteaza kiềm tính.

Đơn vị hoạt độ proteinaza là lượng enzym chuyển hoá được một lượng caseinat natri thành dạng không bị kết tủa bởi axit clorhydric tương đương với sự giảm khả năng liên kết với 1 ml HCl 0,1N ở 40°C, pH = 8,0 – 8,2 trong thời gian một giờ.

2. Hoá chất và dung dịch enzym

- Dung dịch casein 5%.
- Dung dịch HCl 0,2N.
- Dung dịch Na₂SO₄ 15%.
- Dung dịch crezol đỏ.
- Dung dịch NaOH 0,1N.
- Dung dịch enzym được tách chiết như ở phương pháp trên.

3. Tiến hành

- Mẫu thí nghiệm: Lấy 20 ml dung dịch casein 5% và 10 ml dung dịch chiết enzym (tất cả các dung dịch đều có nhiệt độ 40°C) cho vào bình tam giác 100 ml, lắc đều và đặt vào nồi cách thủy ở nhiệt độ 40°C và giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian 60 phút. Sau đó phản ứng được đình chỉ và kết tủa casein

bằng cách bổ sung 10 ml dung dịch axit clorhydric 0,1N và 10 ml dung dịch Na_2SO_4 15%, lắc đều và lọc bỏ kết tủa. Hút 10 ml dịch lọc nhận được cho vào bình tam giác 100 ml, bổ sung 2 giọt crezol đỏ và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N.

- Mẫu kiểm chứng: Lấy 10 ml dung dịch axit clorhydric 0,1N và 10 ml dung dịch Na_2SO_4 15% cho vào bình tam giác 100 ml, lắc đều. Sau đó, bổ sung 10 ml dịch chiết enzym (tất cả các dung dịch đều có nhiệt độ 40°C), bổ sung thêm 20 ml dung dịch casein 5%, lắc đều và lọc bỏ kết tủa. Hút 10 ml dịch lọc nhận được cho vào bình tam giác 100ml, bổ sung 2 giọt crezol đỏ và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N.

4. Kết quả

Hoạt độ proteinaza của 1 ml chế phẩm enzym được xác định theo công thức:

$$\Delta a = A_{\text{tn}} - A_{\text{kc}}$$

$$\text{HdP} = \frac{\Delta a \times 50}{10 \times b} \times K$$

trong đó:

Δa - hiệu số của số ml NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ mẫu thí nghiệm và mẫu kiểm chứng;

A_{tn} - lượng dung dịch NaOH 0,1N chuẩn độ mẫu thí nghiệm, ml;

A_{kc} - lượng dung dịch NaOH 0,1N chuẩn độ mẫu kiểm chứng, ml;

50 - số ml dịch hỗn hợp đem lọc;

10 - số ml dịch lọc dùng để chuẩn độ;

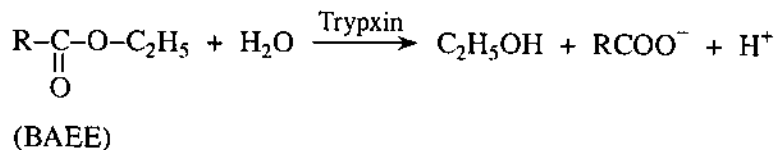
b - lượng enzym sử dụng (mg có trong 10 ml dịch chiết enzym);

K - hệ số hiệu chỉnh dung dịch kiểm.

12.4. HOẠT ĐỘNG CỦA CHẾ PHẨM TRYPXIN

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân cơ chất tổng hợp (N-benzoyl-L-arginyl-ethyl-este hay BAEE) bởi enzym trypsin, một endopeptidaza theo phản ứng sau:



Trong môi trường kiềm, nhóm carboxyl giải phóng sẽ được ion hoá hoàn toàn. Định lượng lượng proton tạo ra trong phản ứng cho phép xác định hoạt độ enzym.

Đơn vị hoạt độ trypsin là lượng enzym chuyển hoá được một micromol BAEE ở 25°C, pH = 8,0 trong thời gian một phút.

2. Hoá chất và dung dịch enzym

- Dung dịch BAEE $1,2 \cdot 10^{-2}$ mol/l được pha trong dung dịch KCl 0,2 M.
- Dung dịch KCl 0,2 M
- Dung dịch NaOH 0,005M
- Dung dịch đệm chuẩn của pH met
- Dung dịch enzym được tách chiết như ở phương pháp trên với pH = 8,0.

3. Tiến hành

- Lấy 25 ml dung dịch BAEE và 25 ml dung dịch KCl cho vào cốc chịu nhiệt 100 ml, để yên 10 phút để cân bằng nhiệt độ. Đặt cốc lên máy khuấy từ và nhúng điện cực pH met vào dung dịch. Bổ sung 1 ml dung dịch enzym trypsin (được lấy ra khỏi đá bảo quản trước một vài phút). Bổ sung NaOH vào dung dịch cho tới khi đạt giá trị pH 8,0. Bấm đồng hồ giây, trong quá trình phản ứng điều chỉnh pH của dung dịch phản ứng bằng dung dịch NaOH 0,1N bằng micro buret. Khi thời gian phản ứng đạt 1 phút, ghi lượng NaOH 0,1N sử dụng để điều chỉnh pH.

4. Kết quả

Hoạt độ trypsin của 1 ml chế phẩm enzym chính là lượng micromol NaOH được sử dụng để hiệu chỉnh pH trong phản ứng

12.5. HOẠT ĐỘ ENZYM PECTINAZA

Hoạt độ polygalacturonaza (HdPg)

a. Phương pháp chuẩn độ iot

1. Nguyên tắc

Trên cơ sở gia tăng các nhóm aldehyt ở cuối mạch do thủy phân các liên kết glucosit, tính toán số lượng các liên kết bị thủy phân.

Đơn vị hoạt độ polygalacturonaza là lượng enzym xúc tác thủy phân được

một micro đương lượng các liên kết glucosid trong phân tử axit pectic ở 30°C trong thời gian một phút.

2. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch axit pectic 1%: Hoà tan 10 g polygalacturonat natri bằng dung dịch đệm axetat 0,05N, pH = 5,25 trong bình định mức 1000 ml, bổ sung dung dịch đệm tới vạch mức.

- Dung dịch enzym:

- + Đối với môi trường nuôi cấy rắn: Cân 5 gam môi trường rắn đã nghiền nhỏ cho vào cốc 200 ml. Bổ sung 100 ml dung dịch toluen 0,33%, khuấy trộn đều và tiến hành tách chiết ở 4°C trong thời gian 1 giờ. Sau đó, lọc thu nhận dịch chiết enzym qua giấy lọc.

- + Đối với tế bào vi khuẩn: Khối tế bào được làm lạnh đông trong thời gian 12 giờ, sau đó được nhả lạnh đông và bổ sung dung dịch đệm axetat 0,2M, pH = 7,9 với tỷ lệ (tế bào: dung dịch đệm) 1: 2,5. Hỗn hợp được tiến hành đồng hoá trên máy và được giữ trong tủ lạnh trong thời gian 24 giờ, sau đó được ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong thời gian 40 phút. Bổ sung amoni sulfat vào dịch trong nhận được để đạt nồng độ 40% để kết tủa và loại protein nhiễm tạp bằng ly tâm với tốc độ 4500 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Sau đó, bổ sung amoni sulfat một lần nữa để đạt độ bão hoà 70% kết tủa enzym. Cuối cùng thu nhận enzym bằng ly tâm với tốc độ 4500 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Hoà tan kết tủa enzym bằng 5 ml dung dịch đệm phosphat 0,1M, pH = 7,0.

- + Đối với chế phẩm enzym kỹ thuật: Cân 1 gam chế phẩm nghiên cứu đã nghiền nhỏ cho vào cốc 200 ml. Bổ sung 100 ml nước cất, khuấy trộn đều và giữ nguyên 1 giờ. Sau đó, lọc thu nhận dịch enzym qua giấy lọc.

Hoặc

- + Đối với chế phẩm enzym thuần khiết: Cân 0,1 g chế phẩm nghiên cứu đã nghiền nhỏ cho vào cốc 20 - 25 ml. Chà cẩn thận bằng đũa thuỷ tinh, sau đó chuyển toàn bộ vào bình định mức 100 ml, bổ sung nước cất tới vạch mức, khuấy trộn đều, nếu cần thì tiến hành lọc.

(Dung dịch enzym có thể bảo quản 1 ngày ở nhiệt độ +2°C đến +4°C.)

- Dung dịch natri carbonat 1M.

- Dung dịch axit sulfuric 2M.

- Dung dịch iot 0,1N

- Dung dịch hyposulfit 0,05N: Hoà tan 12,5 gam $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ với nước cất không chứa CO_2 trong bình định mức 1000 ml. Dung dịch phải được bảo quản trong bình thuỷ tinh màu nâu có ống xi phong và buret với ống canxi chlorua nạp đầy vôi. Trước khi sử dụng xác định lại nồng độ chuẩn xác của dung dịch.

- Dung dịch tinh bột tan 1% trong dung dịch natri clorua bão hoà (chất chỉ thị màu): Cho 1 gam tinh bột tan (đã trừ hàm ẩm) vào bình định mức 100 ml, bổ sung dần 50 ml dung dịch NaCl bão hoà, lắc đều, sau đó nhúng bình định mức vào nồi cách thuỷ sôi, lắc liên tục cho tới khi hoà tan hoàn toàn tinh bột. Tiếp đó làm nguội bình và bổ sung 10 ml dung dịch đệm (dung dịch đệm axetat pH 4,7 hoặc dung dịch đệm phosphat pH 6,0). Định mức tới vạch ngăn bằng NaCl.

Kiểm tra mật độ quang của dung dịch : Phối trộn 10 ml dung dịch với 5 ml nước cất, trộn đều. Hút 0,5 ml dung dịch nhận được cho vào 50 ml dung dịch iot, lắc đều và đo cường độ màu của dung dịch ở bước sóng $\lambda = 656 \text{ nm}$ với cuvet 10 mm đối ngược với mẫu trắng là nước cất. Giá trị mật độ quang nhận được phải lớn hơn 0,690.

3. Tiến hành

- Mẫu thí nghiệm: Lấy 10 ml dung dịch axit pectic 1% cho vào bình nón nút mài 100 ml và đặt vào bình điều nhiệt có nhiệt độ $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$, sau 10 phút bổ sung 5 ml dung dịch enzym (nếu cần phải pha loãng dung dịch enzym bằng nước cất). Sau một thời gian nhất định (10; 20; 30 hoặc 60 phút tùy thuộc hoạt độ enzym), thêm vào bình phản ứng mỗi bình 1,8 ml dung dịch Na_2CO_3 1M và 10 ml dung dịch iot 0,1N. Lắc đều và đậy nút thuỷ tinh, để yên đứng 29 phút trong chỗ tối. Cuối cùng bổ sung 2 ml H_2SO_4 2M và định phân lượng iot dư bằng dung dịch hyposulfit 0,05N với sự có mặt của tinh bột tan. Kết quả chuẩn độ được biểu thị bằng số ml dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N.

- Mẫu kiểm chứng: Mẫu kiểm chứng được tiến hành như mẫu thí nghiệm, chỉ khác là dung dịch enzym được bổ sung vào sau khi bổ sung NaCO_3 và trước khi bổ sung dung dịch iot.

4. Kết quả

Hoạt độ polygalacturonaza (HdPg) tính bằng đv/g được xác định theo công thức:

$$\text{HdPg} = \frac{51,3 \times e}{t \times m}, \text{ dv/g}$$

trong đó:

5,13 - số micro đương lượng các nhóm andehit tương ứng với 1 ml dung dịch iot 0,1N (hoặc 1 ml hyposulfit);

e - lượng dung dịch iot 0,1N tiêu tốn để oxy hoá các nhóm andehit được tạo thành (tính theo hiệu số các lượng hyposulfit dùng để chuẩn mẫu thí nghiệm và mẫu kiểm chứng), ml;

t - thời gian thủy phân, phút;

m - lượng chế phẩm enzym sử dụng, g.

b. Xác định hoạt độ theo độ nhớt của dung dịch phản ứng

1. Nguyên tắc

Trên cơ sở sự giảm độ nhớt của dung dịch pectin do thủy phân các liên kết glucosit bởi enzym.

Đơn vị hoạt độ polygalacturonaza là lượng enzym xúc tác thủy phân các liên kết glucosit có thể làm giảm 50% độ nhớt của dung dịch pectin 0,2 - 2% ở 37°C, pH = 5,25 trong thời gian 10 phút.

2. Hoá chất

- Dung dịch natri polygalacturonat 0,2 - 2%: Hoà tan 2 g - 20 g natri polygalacturonat bằng dung dịch đệm axetat 0,05N, pH = 5,25 trong bình định mức 1000 ml, bổ sung dung dịch đệm tới vạch mức.

3. Tiến hành

- Hút 10 ml dung dịch natri polygalacturonat 0,2 - 2%, bổ sung 1 ml dung dịch enzym (tất cả các dung dịch đã có nhiệt độ 30 - 37°C), lắc đều và đặt vào máy điều nhiệt có nhiệt độ 30 - 37°C, giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian đúng 10 phút. Đo độ nhớt của dung dịch phản ứng bằng nhớt kế Ostwald.

4. Kết quả

Hoạt độ enzym được xác định thông qua sự giảm độ nhớt của dung dịch phản ứng nhận được.

c. Phương pháp so màu

1. Nguyên tắc

Trên cơ sở thủy phân các axit galacturonic bởi enzym giải phóng các nhóm

khử. Các nhóm khử tạo thành sẽ tham gia vào phản ứng với 2-cyanoaxetamit.

Đơn vị hoạt độ polygalacturonaza là lượng enzym xúc tác thủy phân giải phóng 1 μmol nhóm khử ở 45°C trong thời gian một phút.

2. Tiến hành

- Hút 0,5 ml dung dịch hỗn hợp phản ứng chuẩn có chứa 0,5 mg axit polygalacturonic hoà tan trong dung dịch đệm axetat pH = 3 - 5 cho vào ống nghiệm. Phản ứng được khởi động bằng cách bổ sung 20 μl dịch chiết enzym, lắc đều và đặt vào máy điều nhiệt có nhiệt độ 45°C, giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian đúng 20 phút. Bổ sung 1,2 ml dung dịch chất phản ứng TBC (natri tetraborat 100 mM, axit boric 100 mM và 2-cyanoaxetamit 0,1%), đun sôi trong thời gian 10 phút để dừng phản ứng, sau đó làm nguội. Màu của dung dịch sau phản ứng được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng $\lambda = 270 \text{ nm}$.

- Xây dựng đường chuẩn: Đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ 0 - 0,4. mol/l axit polygalacturonic mỗi khi thí nghiệm.

3. Kết quả

Hoạt độ enzym được xác định thông qua đường chuẩn vừa được xây dựng.

12.6. HOẠT ĐỘ PECTINESTERAZA (HDPE)

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân dung dịch pectin bởi enzym nghiên cứu. Định lượng các nhóm carboxyl được giải phóng khi thủy phân bằng phương pháp chuẩn độ. Trị số hoạt độ pectinesteraza xác định phụ thuộc rất nhiều vào mức độ este hoá của pectin, do đó cần lưu ý khi so sánh các kết quả thu được trên các cơ chất khác nhau.

Đơn vị hoạt độ pectinesteraza là lượng enzym xúc tác thủy phân được một micro đương lượng các liên kết este trong phân tử pectin ở 30°C trong thời gian một phút.

2. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch pectin 1% có độ metoxy hoá cao:

Pectin sử dụng làm cơ chất phải có độ metoxy hoá không thấp hơn 80%. Cân một lượng pectin cần thiết để có nồng độ 1%. Rắc từ từ pectin vào cốc có sẵn nước cất, đồng thời khuấy đều bằng đũa thủy tinh. Để yên 2 giờ ở nhiệt độ

phòng để pectin trương nở và hoà tan, sau đó để khoảng 12 giờ ở nhiệt độ +4°C đến +6°C. Sau đó dung dịch được làm nóng đến 20°C và chuyển vào bình định mức có dung tích thích hợp và định mức tới vạch ngăn bằng nước cất, lắc đều và lọc qua hai lớp vải màn có bông ở giữa. Bảo quản dung dịch nhận được trong tủ lạnh trong thời gian 2 ngày.

- Dịch chiết enzym:

+ Đối với chế phẩm enzym kỹ thuật: Cân 5 g chế phẩm nghiền cứu đã nghiền nhỏ cho vào cốc 200 ml. Bổ sung 100 ml nước cất, khuấy trộn đều và giữ nguyên 1 giờ, cứ 10 phút lại khuấy đều một lần. Sau đó, lọc thu nhận dịch chiết enzym qua giấy lọc.

+ Đối với chế phẩm enzym thuần khiết: Cân 0,5 gam chế phẩm nghiền cứu đã nghiền nhỏ cho vào cốc 20 - 25 ml. Chà cẩn thận bằng đũa thủy tinh với một thể tích nhỏ nước cất, sau đó chuyển toàn bộ vào bình định mức 50 ml, bổ sung nước cất tới vạch mức, khuấy trộn đều, nếu cần thì tiến hành lọc.

Dịch chiết enzym nhận được sử dụng ngay trong ngày.

- Dung dịch natri hydroxyt 0,1N.

3. Tiến hành

- Cho vào 4 cốc nhỏ dung tích 50 ml, mỗi cốc 20 ml dung dịch pectin 1% đầy cốc bằng kính đồng hồ và đặt vào bình điều nhiệt có nhiệt độ $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$, sau 15 phút bổ sung 10 ml dung dịch enzym vào 2 cốc (nếu cần phải pha loãng dung dịch enzym bằng nước cất), còn 2 cốc khác bổ sung 10 ml dung dịch enzym đã bị vô hoạt (mẫu kiểm chứng). Sau một thời gian đúng 1 giờ, lấy các cốc phản ứng ra và chuẩn nhanh bằng dung dịch NaOH 0,1N tới pH = 7,5 bằng micro buret. Kiểm tra giá trị pH bằng pH mét.

Kết quả

Hoạt độ pectinesteraza (HdPe) tính bằng đv/g hay đv/ml được xác định theo công thức :

$$\text{HdPe} = \frac{100 \times a \times 100}{t \times m \times e}$$

trong đó:

a - lượng NaOH 0,1N dùng để định phân, có giá trị bằng hiệu số giữa lượng cần thiết để chuẩn độ mẫu thí nghiệm và mẫu kiểm chứng;

100 - số micro đương lượng các liên kết este bị thủy phân ứng với 1 ml NaOH 0,1N;

100 - mức độ este hoá của pectin dùng làm chuẩn để tính toán;

t - thời gian thủy phân, phút;

m - lượng chế phẩm enzym sử dụng, g;

e - mức độ este hoá của pectin dùng làm cơ chất phản ứng.

12.7. HOẠT ĐỘ ENZYM PEROXIDAZA

Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên sự oxy hoá peroxit thành purpurogalin khi có mặt của H_2O_2 . Purpurogalin tạo thành dưới dạng kết tủa màu nâu không tan trong nước, nhưng rất dễ tan trong este và dung dịch H_2SO_4 đậm đặc. Lượng purpurogalin tạo thành được xác định theo hai phương pháp :

- Kết tủa purpurogalin sau khi đã lọc và rửa sạch, hoà tan trong H_2SO_4 80%, sau đó chuẩn độ bằng $KMnO_4$ 0,1N.

- Kết tủa purpurogalin rửa sạch, hoà tan trực tiếp vào este và xác định bằng phương pháp so màu đối ngược với dung dịch purpurogalin tinh khiết tan trong este.

Tùy thuộc cơ chất sử dụng mà pH tối thích của peroxydaza có thay đổi chút ít. Thường thực nghiệm được tiến hành trong môi trường kiềm yếu.

Peroxydaza rất nhạy cảm với nhiệt độ. Enzym có thể bị vô hoạt ngay khi đun tới nhiệt độ sôi. Thực nghiệm nên tiến hành ở nhiệt độ thường (20°C).

Peroxydaza cũng rất nhạy cảm với H_2O_2 dư, do đó cần tiến hành xác định hoạt độ trong môi trường pha rất loãng. Đặc biệt cần lưu ý khi dùng pirogalol làm cơ chất, thì lượng pirogalol và H_2O_2 dùng trong thí nghiệm không được quá một giới hạn xác định.

12.7.1. Phương pháp chuẩn độ $KMnO_4$

1. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch H_2O_2 1%.
- Dung dịch pirogalol 1% pha trước khi dùng.
- Dung dịch H_2SO_4 80%.
- Dung dịch H_2SO_4 đậm đặc ($d = 1,84$).

- Dung dịch KMnO_4 0,1N.
- Ete etylic.
- Purpurogalin tinh khiết.
- Dung dịch đệm phosphat pH = 8 – 9.
- Dịch chiết enzym:

Cân 2 - 3 gam nguyên liệu nghiên cứu (lá, rễ, hạt), cho vào cối sứ và nghiền cẩn thận với 20 ml dung dịch đệm phosphat pH = 8 ÷ 9 và bột thủy tinh hoặc cát sạch (không có Fe), bổ sung thêm 4 – 5 giọt toluen hoặc chloroform. Chuyển toàn bộ hỗn hợp vào bình định mức 100 ml, bổ sung dung dịch đệm tới vạch mức. Lắc đều và lọc thu nhận dịch chiết enzym qua giấy lọc.

2. Tiến hành

- Mẫu thí nghiệm: Cho 10 ml dung dịch pirogallol 1% và 1 ml dung dịch H_2O_2 1% vào bình tam giác 250 ml, sau đó bổ sung 40 ml dịch chiết enzym (tất cả các dung dịch đều có nhiệt độ 20 - 25°C). Đặt vào máy điều nhiệt và giữ yên trong một khoảng thời gian xác định (15 phút tới 20 giờ) tùy thuộc hoạt độ của enzym. Trong thời gian phản ứng purpurogalin được tạo thành ở dạng kết tủa màu nâu.

- Thêm vào hỗn hợp phản ứng 1 – 2 ml H_2SO_4 đậm đặc. Lọc kết tủa qua phễu lọc xốp (G-Z). Rửa kết tủa bằng nước cất cho tới khi nước rửa không còn khử KMnO_4 . Sau đó hoà tan kết tủa trên phễu lọc bằng dung dịch H_2SO_4 80% (10 – 20 ml). Rửa phễu lọc bằng nước cất (lượng nước rửa gấp 7 – 20 lần lượng axit đem dùng). Nếu pha loãng ít sẽ khó định phân, nhưng pha loãng nhiều quá sẽ làm cho purpurogalin kết tủa trở lại.

- Đun nóng dung dịch thu được tới 50 – 60°C và chuẩn độ bằng dung dịch KMnO_4 0,1N tới khi dung dịch có màu hồng bền trong 30 giây.

- Mẫu kiểm chứng: Tiến hành như đối với mẫu thí nghiệm, nhưng thay thế 40 ml dịch chiết enzym bằng 40 ml dịch chiết enzym đã được vô hoạt bằng cách đun sôi trong thời gian 10 phút với ống sinh hàn thu hồi.

3. Kết quả

Đơn vị hoạt độ của peroxidaza được biểu thị bằng số ml KMnO_4 0,1N dùng để chuẩn độ purpurogalin tạo thành ứng với 1 g phẩm vật nghiên cứu khô ở 20°C trong thời gian 15 phút.

Hoạt độ peroxydaza (HdPer) được xác định theo công thức :

$$\text{HdPer} = \frac{(a - b)}{m}$$

trong đó:

- a - số ml KMnO_4 0,1N dùng để định phân mẫu thí nghiệm;
- b - số ml KMnO_4 0,1N dùng để định phân mẫu kiểm chứng;
- m - trọng lượng nguyên liệu của mẫu thí nghiệm, g.

12.7.2. Phương pháp so màu với purpurogalin

1. Hoá chất và dung dịch enzym

- Dung dịch H_2O_2 0,5%.
- Dung dịch pirogalol 1% pha trước khi dùng.
- Dung dịch H_2SO_4 10%.
- Ete etylic.
- Purpurogalin tinh khiết.
- Dịch chiết enzym: chiết rút enzym như phương pháp nêu ở trên.

2. Tiến hành

- Cho 190 ml nước cất, 10 ml dung dịch purpurogalin 1% và 1 ml dung dịch H_2O_2 0,5% vào bình tam giác 250 ml. Nâng nhiệt độ của hỗn hợp lên 20 – 25°C, bổ sung 1 - 5 ml dịch chiết enzym, lắc đều và giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 20 - 25°C trong thời gian 15 phút. Thêm vào hỗn hợp phản ứng 5 ml H_2SO_4 10% để vô hoạt enzym. Chuyển toàn bộ hỗn hợp vào phễu chiết, chiết lượng purpurogalin tạo thành bằng ete etylic. Chiết làm 3 lần với lượng 25 ml, 10 ml và 10 ml dung dịch ete etylic. Gộp chung các phần ete etylic hoà tan purpurogalin nhận được vào bình định mức 50 ml, bổ sung ete etylic tới vạch mức. Đo cường độ màu dung dịch nhận được đối ngược với dung dịch purpurogalin tinh khiết trong ete etylic (5 mg purpurogalin hoà tan trong 50 ml ete etylic).

- Xây dựng đường chuẩn purpurogalin để tính hệ số chuyển đổi.

3. Kết quả

Đơn vị hoạt độ của peroxidaza được biểu thị bằng số mg purpurogalin tạo thành ứng với 1 gam phẩm vật nghiên cứu khô ở 20°C trong thời gian 15 phút.

12.7.3. Phương pháp đo cường độ hấp thụ ánh sáng

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở oxy hoá một chất khử với sự có mặt của hydroperoxyt (H_2O_2). Đầu tiên enzym peroxydaza oxy hoá H_2O_2 để giải phóng oxygen. Oxygen tạo thành sẽ oxy hoá chất khử. Đo cường độ hấp thụ ở bước sóng $\lambda = 725$ nm cho phép xác định lượng H_2O_2 bị oxy hoá, từ đó tính được hoạt độ enzym.

2. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch đệm axetat 0,1M, pH 4,7 : phối trộn 529 ml axit axetic 0,1M với 471 ml dung dịch axetat natri 0,1M để nhận được 1000 ml dung dịch đệm.

- Dung dịch cơ chất : pha loãng 0,1 ml dung dịch H_2O_2 nồng độ 30% trong 250 ml nước cất.

- Dung dịch chất khử (ABTS) : hoà tan 56 mg axit 2,2-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic) trong 100 ml nước cất.

- Dịch chiết enzym:

Cân 2 - 3 gam nguyên liệu nghiên cứu (lá, rễ, hạt), cho vào cối sứ và nghiền cẩn thận với 20 ml dung dịch đệm citric 0,1M pH = 4,0 và bột thuỷ tinh hoặc cát sạch (không có Fe), bổ sung thêm 4 - 5 giọt toluen hoặc chloroform. Chuyển toàn bộ hỗn hợp vào bình định mức 100 ml, bổ sung dung dịch đệm tới vạch mức. Lắc đều và lọc thu nhận dịch chiết enzym qua giấy lọc.

3. Tiến hành

- Cho 1 ml chất khử, 0,5 ml dung dịch đệm axetat 0,1M, pH 4,7, 100 ml dung dịch H_2O_2 và 3 ml nước cất vào hộp cuvet của máy quang phổ, lắc đều. Đặt hộp cuvet vào máy và ấn nút điều chỉnh độ hấp thụ về giá trị 0. Sau đó, lấy hộp cuvet ra bổ sung chính xác 5 ml dịch chiết enzym, đậy hộp cuvet bằng miếng fim parafin mỏng, lắc kỹ. Lấy miếng fim parafin ra và đặt lại hộp cuvet vào máy quang phổ. Để yên chính xác 2 phút, đọc độ hấp thụ ở bước sóng $\lambda = 725$ nm.

- Xây dựng đường chuẩn với các nồng độ H_2O_2 để có hệ số chuyển đổi.

4. Kết quả

Đơn vị hoạt độ của peroxidaza được biểu thị bằng số mg H_2O_2 được oxy hoá bởi enzym có trong 1 g phẩm vật nghiên cứu khô ở 20°C trong thời gian 1 phút.

12.8. HOẠT ĐỘ ENZYM INVECTAZA (β -FRUCTOZIDAZA)

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân đường sacaroza bởi enzym có trong dịch chế phẩm nghiền cứu thành glucoza và fructoza. Xác định lượng đường khử tạo thành sẽ tính được hoạt độ enzym. Đường khử trong môi trường kiềm nóng sẽ khử axit 2-hydroxy 3,5-dinitrobenzoic hay axit 3,5-dinitrosalicylic (3,5-DNS) màu vàng thành axit 2-hydroxy 3-amino 5-nitrobenzoic màu đỏ da cam. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 575$ nm của dung dịch sau phản ứng sẽ xác định được lượng đường khử tạo thành.

Đơn vị hoạt độ invecataza là lượng enzym xúc tác thủy phân được một micro mol sacaroza ở 25°C trong thời gian một phút.

2. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch đệm axetat 0,1M; pH = 4,7.

Phối trộn 529 ml dung dịch axit axetic 1M với 471 ml dung dịch axetat natri 0,1M nhận được 1 lít dung dịch đệm. Kiểm tra lại trên máy pH met.

- Dung dịch phản ứng kiềm trong 3,5-DNS.

+ Hoà tan nóng 10 g axit 2-hydroxy 3,5-dinitrobenzoic trong 200 ml dung dịch NaOH 2M (dung dịch A).

+ Hoà tan 300 g natri kali tartrat trong 500 ml nước cất (dung dịch B).

+ Phối trộn hai dung dịch A và dung dịch B, bổ sung nước cất tới 1 lít và lọc.

- Dung dịch sacaroza 1 M.

- Dung dịch đường nghịch đảo 5 mM

Phối trộn hai dung dịch glucoza 5 mM và dung dịch fructoza 5 mM theo tỷ lệ 1 : 1 (v/v).

- Chiết rút enzym:

Cân 10 g nấm men cho vào 20 ml dung dịch NaHCO_3 0,1M hay dung dịch đệm pyrophosphat 66 mM, pH = 8,5. Nghiền tế bào bằng máy nghiền trong thời gian 2 phút. Để yên hỗn hợp trong thời gian 24 giờ (ít nhất một đêm) ở 40°C (hay ở nhiệt độ môi trường). Ly tâm tách xác tế bào thu hồi dung dịch chứa enzym với tốc độ 4000 vòng/phút trong thời gian 15 phút.

3. Tiến hành

- Mẫu thí nghiệm: Hút 100 μ l dung dịch sacaroza 1M và 350 μ l dung dịch đệm axetat pH = 4,7 cho vào cuvet 2 ml, đặt vào bình ổn nhiệt có nhiệt độ 25°C trong thời gian 5 phút, sau đó bổ sung 50 μ l dịch chiết enzym (nếu cần phải pha loãng dịch chiết enzym). Lắc mạnh và giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian đúng 20 phút. Bổ sung 500 μ l dung dịch 3-5DNS, lắc mạnh và đặt vào máy điều nhiệt 100°C (hoặc nhúng vào nước sôi) trong thời gian đúng 5 phút. Sau đó lấy cuvet ra và đặt ngay vào nước đá. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 575$ nm đối ngược với mẫu kiểm chứng.

- Mẫu kiểm chứng: Mẫu kiểm chứng được tiến hành như mẫu thí nghiệm, chỉ khác là dung dịch 3-5DNS được bổ sung vào trước khi bổ sung dịch chiết enzym.

- Xây dựng đường chuẩn của dung dịch đường nghịch đảo:

Hút X ml dung dịch đường nghịch đảo 5 mM và (2 – X) ml dung dịch đệm axetat pH = 4,7 cho vào các ống nghiệm, sau đó bổ sung 2 ml dung dịch chất phản ứng 3-5DNS. Lắc mạnh hỗn hợp và đặt vào máy điều nhiệt 100°C, giữ nguyên trong thời gian đúng 5 phút. Lấy hỗn hợp ra cho ngay vào nước đá. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 575$ nm đối ngược với mẫu trắng.

4. Kết quả

Hoạt độ enzym được xác định thông qua đường chuẩn xây dựng được.

12.9. HOẠT ĐỘ ENZYM PHYTAZA

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân phytat natri bởi enzym có trong dịch chế phẩm nghiên cứu thành phosphat vô cơ. Xác định lượng phosphat vô cơ tạo thành sẽ tính được hoạt độ enzym. Phosphat vô cơ trong môi trường axit yếu sẽ kết hợp với amoni heptamolyphdat và amoni monovanadat tạo phức màu vàng. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 415$ nm của dung dịch sau phản ứng sẽ xác định được lượng phosphat vô cơ tạo thành.

Đơn vị hoạt độ phytaza là lượng enzym xúc tác thủy phân phytat natri giải phóng một micro mol phosphat vô cơ ở 37°C, pH = 5,5 trong thời gian một phút.

2. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch đệm axetat pH = 5,5

Hoà tan 18,1 g CH_3COONa , 0,147 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 1,68 ml CH_3COOH bằng trong nước cất, sau đó định mức tới 1 lít dung dịch đậm. Kiểm tra lại trên máy pH met.

- Dung dịch đậm axetat pH = 5,5 với Tween 20

Hoà tan 18,1 g CH_3COONa , 0,147 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 1,68 ml CH_3COOH bằng trong nước cất, sau đó định mức tới 1 lít dung dịch đậm. Kiểm tra lại trên máy pH met. Bổ sung 100 mg Tween 20 vào dung dịch đậm nhận được.

- Dung dịch tạo phức màu

+ Dung dịch axit nitric (dung dịch A): phối trộn 70 ml dung dịch HNO_3 65% với 130 ml nước cất.

+ Dung dịch amoni monovanadat (dung dịch B): Hoà tan 2,35 g NH_4VO_3 trong 400 ml nước 60°C , bổ sung 20 ml dung dịch A, làm nguội và định mức tới 1 lít. Dung dịch có thể bảo quản 4 tuần ở nhiệt độ phòng.

+ Dung dịch amoni heptamolyphat tetrahydrat (dung dịch C): hoà tan 100 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ trong 900 ml nước cất, bổ sung thêm 10 ml NH_4OH 25%, sau đó định mức tới 1 lít. Dung dịch có thể bảo quản 4 tuần ở nhiệt độ phòng.

+ Dung dịch tạo phức màu: phối trộn 250 ml dung dịch B, 250 ml dung dịch C và 165 ml dung dịch HNO_3 65%, sau đó định mức tới 1 lít. Dung dịch được chuẩn bị trong ngày sử dụng.

- Dung dịch phytat natri 5 mM (pH = 5,5)

Hoà tan 7,03 g $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6\text{Na}_{12}$ trong 1 lít dung dịch đậm axetat pH = 5,5. Dung dịch được chuẩn bị vài phút trước khi tiến hành phản ứng.

- Dung dịch natri dihydrophosphat 2 mM

Hoà tan 15,601 mg natri dihydrophosphat trong dung dịch đậm axetat, định mức tới 100 ml.

- Tách chiết enzym

Dịch canh trường 4°C được bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tới độ bão hoà 65%, khuấy trộn đều và giữ ở nhiệt độ này trong 30 phút. Ly tâm tách kết tủa và thu hồi kết tủa phytaza trong 1 – 3 ml dung dịch đậm axetat pH = 5,5 với Tween20 tùy theo hoạt độ enzym thu được.

3. Tiến hành thực nghiệm

- Mẫu thí nghiệm: Hút 400 μl dung dịch phytat natri 5 mM cho vào cuvet

2 ml, đặt vào bình ổn nhiệt có nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 phút, sau đó bổ sung 200 μ l dịch chiết enzym (nếu cần phải pha loãng dịch chiết enzym). Lắc mạnh và giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian đúng 20 phút. Bổ sung 400 μ l dung dịch dừng phản ứng tạo màu, lắc mạnh và để trong 10 phút. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 415$ nm đối ngược với mẫu kiểm chứng.

- Mẫu kiểm chứng: Tiến hành như đối với mẫu thí nghiệm, nhưng dịch chiết enzym đã được vô hoạt bằng cách đun sôi.

- Xây dựng đường chuẩn của dung dịch natri dihydrophosphat.

Hút X ml dung dịch natri dihydrophosphat 1 mM và (2 – X) ml dung dịch đệm axetat pH = 5,5 cho vào các ống nghiệm, sau đó bổ sung 2 ml dung dịch tạo phức màu. Lắc mạnh hỗn hợp và để trong 10 phút. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 415$ nm đối ngược với mẫu trắng.

4. Kết quả

Hoạt độ enzym được xác định thông qua đường chuẩn xây dựng được.

12.10. HOẠT ĐỘ ENZYM β -GLUCOZIDAZA

1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân *p*-nitrophenylglucoza (*p*-NPG) bởi enzym có trong dung dịch chế phẩm nghiên cứu thành *p*-nitrophenol (*p*-NP). Xác định lượng *p*-nitrophenyl tạo thành sẽ tính được hoạt độ enzym. Đo độ hấp thụ của dung dịch sau phản ứng ở bước sóng $\lambda = 405$ nm sẽ xác định được lượng *p*-nitrophenyl tạo thành.

Đơn vị hoạt độ β -glucosidaza là lượng enzym xúc tác thủy phân *p*-nitrophenylglucoza giải phóng một micro mol *p*-NP ở 50°C, pH = 4,8 trong thời gian một phút.

2. Hoá chất và dịch chiết enzym

- Dung dịch đệm axetat 0,05 M, pH = 4,8

Phối trộn 529 ml dung dịch axit axetic 0,5 M với 471 ml dung dịch natri axetat 0,05 M nhận được 1 lít dung dịch đệm. Kiểm tra lại trên máy pH met.

- Dung dịch *p*-NPG 10 mM

Hoà tan 3,04 g *p*-NPG trong dung dịch đệm axetat pH = 4,8, sau đó định mức tới 1 lít dung dịch đệm.

- Dung dịch Na_2CO_3 1M

- Tách chiết enzym

Dịch canh trường được kết tủa enzym trong dung dịch etanol 4°C nồng độ 75% , hoặc kết tủa trong dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ độ bão hoà 80%. Hoà tan kết tủa nhận được trong dung dịch đệm axetat 0,05 M, pH = 4,8.

3. Tiến hành thực nghiệm

Đối với mẫu thí nghiệm

Hút 1 ml dung dịch *p*-NPG 10 mM cho vào ống nghiệm, đặt vào bình ổn nhiệt có nhiệt độ 50°C trong thời gian 3 phút, sau đó bổ sung 200 µl dịch chiết enzym (nếu cần phải pha loãng dịch chiết enzym). Lắc mạnh và giữ nguyên ở nhiệt độ này trong thời gian đứng 15 phút. Bổ sung 1 ml dung dịch Na_2CO_3 1M dừng phản ứng, lắc mạnh và để trong 10 phút. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 405$ nm đối ngược với mẫu kiểm chứng.

Đối với mẫu kiểm chứng

Enzym được vô hoạt bằng cách bổ sung 1 ml dung dịch Na_2CO_3 1M vào trước khi bổ sung 1 ml dung dịch *p*-NPG.

Xây dựng đường chuẩn của dung dịch p-nitrophenol

Đường chuẩn được xây dựng từ dung dịch *p*-NP pha trong dung dịch hỗn hợp (dung dịch đệm axetat pH = 4,8 và dung dịch Na_2CO_3 1M, tỷ lệ 1 : 1) nồng độ từ 0,1 µM tới 0,5 µM. Đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng $\lambda = 405$ nm đối ngược với mẫu trắng.

4. Kết quả

Hoạt độ enzym được xác định thông qua đường chuẩn xây dựng được.

PHẦN 3

PHÂN TÍCH VI SINH VẬT

Chương 13

KIỂM TRA MỨC ĐỘ KHỬ TRÙNG

13.1. KIỂM TRA PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG KHÔ

1. Nguyên tắc

Khử trùng các dụng cụ thủy tinh hoặc kim loại bằng khí nóng khô ở nhiệt độ 160°C trong thời gian 2 giờ (hoặc ở nhiệt độ 170°C trong thời gian 1 giờ).

2. Dụng cụ

- Tủ sấy (tốt nhất là dùng tủ sấy điện) có hệ thống điều khiển nhiệt độ gồm bộ phận ngắt nhiệt và nhiệt kế. Với nhiệt độ từ 150 đến 170°C thì độ chính xác cần thiết là $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3. Hóa chất

- Chế phẩm bào tử *Bacillus subtilis*.

4. Tiến hành:

- Bao gói dụng cụ trong giấy chống thấm dầu (giấy Kraft), giấy nhôm hay cho vào trong các túi tiệt trùng hoặc được xếp trong các hộp kim loại.

- Xếp dụng cụ vào lúc tủ sấy còn chưa nóng, không nên để quá đầy, cần có các khoảng trống để đảm bảo không khí có thể lưu thông được.

- Nâng nhiệt độ tủ sấy lên tới 160°C và giữ ở nhiệt độ này trong thời gian 2 h hoặc sấy ở nhiệt độ 170°C trong thời gian 1 h.

5. Kiểm tra mức độ tiệt trùng

- Mỗi lần sấy nên có thể đưa mẫu kiểm định vào sấy cùng. Mẫu kiểm định mức độ tiệt trùng bằng khí nóng là chế phẩm bào tử *Bacillus subtilis*. Sau khi sấy các mẫu chế phẩm này được để trong các điều kiện thích hợp cho vi khuẩn.

Nếu có sự phát triển vi khuẩn ở các mẫu này thì chứng tỏ việc khử trùng trên chưa đảm bảo.

13.2. KIỂM TRA PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG ẤM

Nồi hấp (autoclavage)

1. Nguyên tắc

Khử trùng bằng hơi ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút. Phương pháp này dùng để khử trùng các môi trường có khả năng chịu được nhiệt độ 121°C, các dụng cụ thủy tinh, các màng lọc, các dụng cụ làm từ cao su hoặc nhựa bền với nhiệt.

2. Hóa chất

- Các loại giấy đặc hiệu mà màu của nó có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ hoặc chế phẩm bào tử *Bacillus stearothermophilus*.

3. Thiết bị

- Nồi hấp được trang bị hệ thống điều khiển nhiệt độ gồm bộ phận ngắt nhiệt và nhiệt kế đặt trên đường ống hơi giữa thùng chứa dụng cụ và van kiểm tra. Với nhiệt độ nằm trong khoảng từ 115 đến 125°C thì độ chính xác cần thiết là $\pm 1^\circ\text{C}$.

4. Tiến hành

- Các bình chứa môi trường được nút kín bằng các nút đậy hoặc bằng bông không thấm nước và được bọc trong giấy chống thấm dầu (giấy Kraft) hoặc giấy nhôm. Nếu dùng nút đậy có vít xoắn thì nên xoắn nhẹ. Lượng dịch chứa trong bình không được quá 1 lít nếu hấp trong điều kiện nói trên. Với thể tích dịch lớn hơn thì cần hấp ở nhiệt độ cao hơn hoặc kéo dài thời gian hấp. Bình chứa dịch cần có khoảng trống khá lớn để đảm bảo không bị trào bọt ra ngoài.

- Các dụng cụ cần được bao bọc trong giấy chống thấm dầu (giấy Kraft) hoặc cho vào trong các túi tiệt trùng. Cần sắp xếp dụng cụ và các bình có chứa các môi trường không quá đầy để có các khoảng trống cho hơi có thể lưu thông được.

- Mở van xả, bật công tắc điện (cần xem kỹ các chỉ dẫn kèm theo cho mỗi nồi hấp).

- Khi nhiệt độ đạt 100°C, hơi nước bắt đầu thoát ra, để vài phút cho không khí trong nồi thoát hết ra, đóng van xả để nâng dần áp suất lên 1,05 kG/cm², giữ áp suất này trong thời gian 20 phút.

- Ngắt điện để áp suất tự giảm dần đến áp suất thường, mở van xả từ từ cho hơi nước thoát ra ngoài tránh làm bật nút các bình môi trường.

- Mở nắp thùng và để nhiệt độ giảm xuống, đóng chặt các nút xoay của các bình chứa môi trường và lấy các vật dụng đã khử trùng ra.

5. Kiểm tra mức độ tiệt trùng

- Mỗi lần hấp, có thể đưa mẫu kiểm định vào hấp cùng. Để kiểm tra mức độ tiệt trùng của nồi hấp, có thể dùng giấy chỉ thị đặc hiệu mà màu của nó có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiệt độ hoặc chế phẩm bào tử *Bacillus stearothermophilus* và một nhiệt kế chính xác được dùng để đảm bảo nhiệt độ đạt được tới 121°C.

13.3. KIỂM TRA PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG BẰNG NHIỆT GIÁN ĐOẠN

1. Nguyên tắc

Khử trùng bằng hơi ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 30 phút mỗi ngày và trong 3 ngày liên tiếp nhau. Nhiệt độ lần đầu có tác dụng diệt các vi sinh vật ở dạng vô tính. Bào tử sẽ hình thành trong khoảng thời gian giữa 2 lần xử lý nhiệt và những bào tử này sẽ bị tiêu diệt vào lần xử lý nhiệt thứ ba. Nếu thể tích môi trường lớn hơn 1 lít thì cần phải kéo dài thời gian ở mỗi lần gia nhiệt. Phương pháp này thường dùng để khử trùng các môi trường nuôi cấy có chứa các chất dễ bị phân hủy ở nhiệt độ lớn hơn 100°C.

2. Hóa chất

- Chế phẩm bào tử *Bacillus stearothermophilus*.

3. Thiết bị

- Thùng đun nóng (có thể là nồi hấp, thùng đun nóng bằng điện, bằng gaz hay bằng hơi).

4. Tiến hành

- Nung nhiệt độ tới 100°C và dùng nhiệt độ này trong 30 phút.
- Làm nguội và bảo quản ở nhiệt độ 25 - 30°C.
- Làm lại các bước nói trên trong 2 ngày tiếp theo.

5. Kiểm tra mức độ tiệt trùng

- Sử dụng chế phẩm bào tử *Bacillus stearothermophilus* thích hợp cho phương pháp khử trùng này. Sau khi quá trình khử trùng kết thúc, đem chế phẩm nuôi cấy ở điều kiện thích hợp. Nếu có sự phát triển của chúng thì có nghĩa là việc khử trùng chưa đảm bảo.

13.4. KIỂM TRA PHƯƠNG PHÁP LỌC KHỬ TRÙNG

1. Nguyên tắc

Với các lỗ lọc có kích thước 0,2 μm có thể lọc và giữ lại toàn bộ vi sinh vật trên màng lọc. Người ta có thể sử dụng lọc áp suất hoặc lọc hút chân không, trong đó lọc dưới áp suất sẽ tốt hơn là lọc chân không vì lọc chân không có nguy cơ dễ bị nhiễm tạp nếu lắp các bộ phận không kín.

Phương pháp này thường dùng để tiệt trùng các dung dịch dễ bị phân hủy bởi nhiệt.

2. Thiết bị

- Hệ thống lọc bao gồm:
 - + Màng lọc, kích thước các lỗ lọc 0,2 μm . Màng lọc có đường kính 142 mm dùng cho mẫu có thể tích lớn và đường kính 47 mm dùng cho mẫu có thể tích ≤ 2 lít.
 - + Giá đỡ màng lọc.
 - + Bình thu hồi dịch lọc.
 - + Bộ phận lọc sơ bộ (nếu mẫu phân tích có chứa nhiều cặn nhỏ).

3. Tiến hành

- Chuẩn bị hệ thống lọc: Bao gói và khử trùng các bộ phận lọc sau đây nối một cách vô trùng các ống dẫn với các bình (hình 13.1). Nếu thấy cần thiết có thể đặt thêm bộ phận lọc sơ bộ đặt giữa bình chứa mẫu và màng lọc. Các chỗ nối của hệ thống lọc cần được kiểm tra ít nhất 2 lần (trước và sau khi lọc).

- Xác định bọt khí:

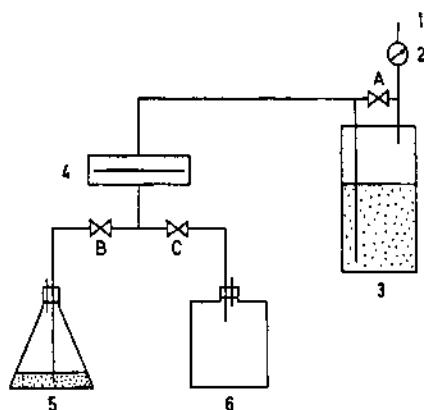
+ Bình kiểm tra bọt khí có 1 ống đưa khí vào, điểm cuối của ống này được đặt gần sát đáy bình, dưới mặt nước, còn ống thoát khí đặt phía trên và đáy bình bằng nút bông.

+ Đóng van A, để dịch chảy khá lâu đảm bảo thấm ướt màng lọc.

+ Mở van A và B, đóng van C.

+ Tăng dần áp suất khí cho tới khi nhìn thấy các bọt khí xuất hiện.

+ Kiểm tra áp suất trên áp kế: Nếu áp kế chỉ giá trị áp suất tương ứng với áp suất chỉ dẫn của nhà sản xuất thì mọi điểm của hệ thống lọc đều kín và màng lọc đang ở trạng thái tốt. Nếu áp kế chỉ giá trị áp suất lớn hơn với áp suất chỉ dẫn của nhà sản xuất thì có thể các điểm nối của hệ thống lọc chưa kín, còn nếu áp kế chỉ giá trị áp suất nhỏ hơn với áp suất chỉ dẫn của nhà sản xuất thì chứng tỏ màng lọc đã bị hỏng.



Hình 13.1: Hệ thống lọc màng:

1. ống dẫn khí;
 2. áp kế;
 3. bình chứa mẫu chịu áp ;
 4. màng lọc;
 5. bình kiểm tra bọt khí;
 6. bình thu hồi dịch lọc;
- A, B, C: van.

- Lọc:

+ Đóng van A và B, mở van C. Tăng dần áp suất khí cho tới khi dịch đi qua được màng lọc. Cần chú ý không để áp suất lớn hơn áp suất cho phép.

4. Kiểm tra mức độ khử trùng

- Lấy dịch đã lọc cho vào ống vô trùng và để vào trong tủ ấm để kiểm tra có sự phát triển của vi sinh vật hay không.

Chương 14

ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT

14.1. CHUẨN BỊ MẪU PHÂN TÍCH

1. Nguyên tắc lấy mẫu

Các mẫu lấy để kiểm tra vi sinh cần đảm bảo hai điều kiện sau:

- Số lượng mẫu lấy phải đảm bảo độ tin cậy, đại diện và đủ số lượng
- Mẫu lấy kiểm tra phải đảm bảo đúng tình trạng vi sinh trong mẫu có nghĩa là không bị nhiễm hoặc không có sự phát triển thêm của vi sinh vật đã có sẵn trong mẫu.

2. Pha loãng

Trước khi phân tích cần có cách xử lý mẫu hợp lý tùy theo loại sản phẩm. Nếu mẫu ở dạng rắn hay nửa rắn thì cần nghiền nhỏ hoặc đông hoá kỹ để tạo ra một dung dịch huyền phù và hoà tan trong một dung dịch có khả năng hoà tan tốt loại sản phẩm đó. Còn nếu mẫu ở dạng lỏng thì có thể dùng pipet để lấy mẫu.

Mẫu cần được pha loãng ở mức thập phân nối tiếp nhau theo bội số của 10 (ví dụ cần pha loãng 1/10 hay 10^{-1} có nghĩa là lấy 1ml sản phẩm ban đầu với 9 ml dịch pha loãng và độ pha loãng tiếp theo là 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} nếu cần thì phải pha loãng tới 10^{-8}).

Tùy theo sản phẩm mà có thể chọn một trong số dung dịch pha loãng sau (bảng 14.1):

- Nước cất.
- Nước muối sinh lý.
- Dung dịch Ringer.
- Dung dịch Trypton hay Trypton muối.
- Dung dịch Trypton đậm.

Bảng 14.1: Bảng thành phần các dung dịch pha loãng

Các chất	Hàm lượng (g)			
	Nước muối	Dung dịch Ringer	Trypton muối	Trypton đậm
Trypton hoặc Pepton			1	20
NaCl	8,5	8,5	8,5	5
KCl		0,25		
CaCl ₂		0,3		
Na ₂ HPO ₄				9
KH ₂ PO ₄				1
NaHCO ₃		0,2		
Nước cất hoặc nước đã loại ion	Pha đủ cho 1 lít			

14.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH VI SINH VẬT

14.2.1. Quan sát trên kính hiển vi

Phạm vi áp dụng

Kính hiển vi là thiết bị không thể thiếu được trong các phòng thí nghiệm vi sinh và có rất nhiều công dụng hữu hiệu. Tuy nhiên cũng có nhiều hạn chế do đó các kết quả đánh giá chất lượng tế bào vi sinh vật bằng kính hiển vi chỉ nên dùng để tham khảo. Để có kết luận chắc chắn thì cần có các phương pháp kiểm tra khác kèm theo.

Đây là phương pháp đơn giản, cho phép quan sát được hình dạng tế bào, khả năng di động và phương thức sinh sản của vi sinh vật.

1. Nguyên tắc

- *Kính hiển vi nền sáng*: Soi kính hiển vi nền sáng cho phép nghiên cứu các đối tượng quan sát trong chùm ánh sáng đi qua với các hình ảnh đã được phóng đại. Đặc biệt thường dùng kính hiển vi nền trắng để soi các đối tượng đã nhuộm màu.

- *Kính hiển vi nền đen*: Soi kính hiển vi nền đen dựa trên cơ sở chiếu sáng đối tượng quan sát bằng các tia sáng xiên vì trong kính hiển vi có 1 bộ phận tách các chùm ánh sáng trung tâm. Khi đó các ánh sáng ở trung tâm không đập thẳng vào đối tượng quan sát và mắt ta không thấy được do đó thị trường

vẫn hoàn toàn tối. Các tia sáng xiên gặp đối tượng sẽ phản xạ trở lại, trên nền đen nổi bật vật được chiếu có màu sáng lấp lánh. Các trường hợp đặc biệt thường soi kính hiển vi nền đen như nghiên cứu chuyển động của vật soi, xem xét các vi khuẩn có roi hay không, phân biệt một cách tốt nhất các hạt protein và cầu khuẩn.

- *Kính hiển vi với thiết bị tương phản pha*: Soi kính hiển vi với thiết bị tương phản pha cho phép thay đổi pha của các tia sáng khi đi qua đối tượng quan sát, sẽ làm thay đổi biên độ ánh sáng do đó mà vật được quan sát trở nên tương phản hẳn lên so với nền. Sự tăng độ tương phản này tác động đến sự tạo thành hình ảnh. Soi kính hiển vi với thiết bị tương phản pha cho một hình ảnh khách quan hơn, đặc biệt trong trường hợp kiểm tra các vật còn sống hay không (ví dụ nấm men đang tạo bào tử).

- *Kính hiển vi huỳnh quang*: Kính hiển vi huỳnh quang dựa trên một kỹ thuật đặc biệt mà các vật soi được nhìn thấy nhờ ánh sáng huỳnh quang của chính nó hoặc do được xử lý với các chất huỳnh quang. Các chất màu huỳnh quang nhìn thấy rất rõ trong ánh sáng cực tím, thậm chí ở nồng độ rất loãng và các ảnh hưởng xấu của ánh sáng hầu như bị loại bỏ hoàn toàn. Kỹ thuật này thường sử dụng trong các trường hợp đặc biệt như xác định các tế bào nấm men và vi khuẩn còn sống.

2. Thiết bị

- Phiến kính (lame) có kích thước $76 \times 26 \times 1,2$ mm và lá kính (lamelle) hình vuông cạnh 16 -18 mm với chiều dày tối đa 0,2 mm.

- Bộ lọc ánh sáng: dùng để nhận biết tốt hơn sự khác nhau giữa các cấu tử hoặc trong một số trường hợp đặc biệt.

- Bộ lọc xanh: dùng để chụp ảnh khi soi cũng như kiểm tra các đối tượng quan sát nhuộm màu đỏ.

- Bộ lọc vàng: dùng để chụp ảnh khi soi cũng như kiểm tra các đối tượng quan sát nhuộm màu xanh da trời.

- Bộ lọc xanh da trời: dùng để chụp ảnh các đối tượng quan sát không nhuộm màu cũng như tạo ra độ tương phản cho các vật có màu vàng và vàng xanh.

- Dụng cụ cấy: que cấy thẳng hoặc que cấy đầu tròn.

3. Hóa chất

- Dung dịch KOH 5%.
- Vaseline, parafin.

4. Tiến hành

- *Chuẩn bị tiêu bản giọt ép:* Trên phiến kính khô ta giở một giọt nước vô trùng và một giọt mẫu. Khi sử dụng mẫu có nồng độ tế bào nhỏ, không cần cho thêm giọt nước cất lên phiến kính. Cũng có thể cho một giọt KOH 5% để tách các cấu tử protein nếu có trong mẫu và cho phép phân biệt rõ hơn các tế bào vi sinh vật. Dùng lá kính đẩy lên, dàn đều mẫu tránh để có bọt khí. Với cách chuẩn bị như thế này cần soi ngay vì nước rất dễ bay hơi. Có thể kéo dài thời gian sử dụng bằng cách bôi vaselin hay parafin xung quanh mép lá kính cho giọt dịch không bị khô.

- *Chuẩn bị tiêu bản giọt treo:* Giọt mẫu được lấy bằng que cấy đầu tròn hay bằng que cấy thẳng được chấm lên lá kính. Lá kính này được đặt lên phiến kính đặc biệt có một chỗ lõm hình tròn ở giữa. Giọt mẫu này phải treo lơ lửng, không được tiếp xúc với các mép và đáy của chỗ lõm hình tròn trên phiến kính. Bôi vaselin hay parafin xung quanh mép lá kính. Giọt treo sẽ như là được bịt kín trong buồng kín và vì vậy cho phép quan sát được đối tượng nghiên cứu trong vài ngày.

- *Chuẩn bị tiêu bản vết khô:* Một giọt mẫu đặt lên phiến kính khô, sạch, không dính dầu mỡ. Dùng que cấy hay thành bên của lá kính dàn đều, càng mỏng càng tốt. Để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng hoặc có thể hơi nhẹ trên đèn cồn. Tiêu bản này thường dùng khi nhuộm màu bên trong tế bào.

5. Kết quả

Dựa trên hình ảnh quan sát được có thể xác định định tính về vi sinh vật như: hình dạng tế bào, khả năng tạo bào tử, nhuộm Gram...

14.2.2. Lọc màng

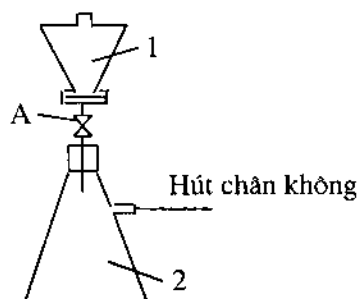
Dùng để xác định chất lượng và số lượng vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc) có trong thể tích dịch khá lớn đặc biệt là kiểm tra vi sinh trong quá trình sản xuất.

1. Nguyên tắc

Tăng số lượng vi sinh vật nhờ lọc trên màng lọc có kích thước lỗ lọc nhỏ hơn kích thước của vi sinh vật cần phát hiện. Có thể cố định và nhuộm màu tế bào ngay trên màng lọc. Màng lọc sấy khô sẽ trong suốt nếu được xử lý bằng rượu benzylic hoặc dầu thông, dầu quế.

2. Thiết bị

- Hệ thống lọc chân không (hình 14.1): Màng lọc có đường kính 47 - 50 mm, có kích thước lỗ 1,2 μm để tách nấm men và nấm mốc hoặc 0,45 μm để lọc vi khuẩn loại lớn (hình cầu, cầu khuẩn, hình que) hoặc 0,2 μm để lọc vi khuẩn loại nhỏ hoặc bào tử vi khuẩn. Bình chân không $V=1000\text{ ml}$. Nên dùng màng lọc có kích thước lỗ 12 μm để lọc sơ bộ nếu thấy cần.



Hình 14.1: Hệ thống lọc chân không:

- 1. phễu và màng lọc;
- 2. bình chân không;
- A. van.

3. Hóa chất

- Rượu benzylic hoặc dầu thông, dầu quế
- Dung dịch xanh methylen Loffer: Lấy 30 ml dung dịch xanh methylen đã bão hoà bằng cồn đưa vào bình định mức 100 ml, dùng nước cất định mức tới gần bình.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị hệ thống lọc chân không, chú ý màng lọc phải được hấp vô trùng.
- Lọc:
 - + Lọc sơ bộ nếu dung dịch có nhiều cặn hoặc vẩn đục.
 - + Mẫu cần đưa vào lọc một cách vô trùng và lượng mang đi lọc phụ thuộc vào nồng độ vi sinh vật có trong mẫu (ví dụ: bia chưa lọc thì chỉ cần dùng 1 ml; bia lọc rồi 50 - 200 ml; nước máy 500 ml).

- *Cố định tế bào*: Cần phải cố định các tế bào vi sinh vật trước khi nhuộm màu để tránh rửa trôi tế bào.

+ Ngay sau khi lọc xong, làm nóng màng ở nhiệt độ 50 - 60°C trong 20 phút hoặc để ở nhiệt độ phòng 1 - 2 giờ để làm khô màng lọc.

- *Nhuộm màu*:

+ Đặt màng lọc vào hệ thống lọc và ngâm trong dung dịch xanh methylen trong thời gian 15 phút, sau đó rửa bằng nước cất cho tới khi nước rửa không còn màu xanh.

+ Màng lọc đã nhuộm được sấy ở nhiệt độ 50 - 60°C trong 20 phút hoặc để ở nhiệt độ phòng thì thời gian làm khô màng lọc 1 - 2 giờ.

- *Làm mất màu màng lọc và soi kính hiển vi*: Màng lọc đã sấy khô vẫn có thể còn màu, có thể làm cho màng mất màu và trở nên trong suốt nếu rửa bằng dung môi hữu cơ. Để có thể quan sát tốt hơn khi soi kính hiển vi nên chọn dung môi có độ nhớt không thấp quá và có chỉ số khúc xạ thích hợp. Trong thực tế thì thường dùng các dung môi như dầu thông, dầu quế hay rượu benzylic.

+ Cho một giọt dung môi lên phiến kính.

+ Đặt một miếng màng lọc đã nhuộm màu có đường kính khoảng 6 mm lên phiến kính.

+ Dùng lá kính đẩy lên và tránh không để có bọt khí. Màng lọc trở nên trong suốt nhờ có dung môi.

+ Quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 600 - 1000.

- *Bảo quản mẫu làm tài liệu tham khảo*: Sau khi quan sát xong, tiêu bản có thể được bảo quản bằng cách cho vào đầu (thường dùng đầu cọ Canada) và đóng gói niêm phong.

5. Kết quả

Quan sát dưới kính hiển vi cho phép nhìn thấy rõ hình thái các tế bào và thấy được sự khác nhau giữa nấm men, nấm mốc, cầu khuẩn, trực khuẩn. Tuy nhiên phương pháp này không cho phép biết được trước khi lọc tế bào này còn sống hay chết và rất dễ bị nhầm lẫn các vết đen hay cặn với tế bào vi sinh vật.

Chú ý: Có thể tham khảo tài liệu để chọn dung dịch nhuộm màu thích hợp cho từng loại vi sinh vật. Để phát hiện *Pediococcus* và *Lactobacillus* có trong

nấm men giống, thường nhuộm màu Gram hoặc dùng xanh Victoria thay cho xanh methylen.

14.2.3. Nuôi cấy trong môi trường lỏng

1. Nguyên tắc

Lấy mẫu trong điều kiện vô trùng và cấy ngay vào môi trường thích hợp đã khử trùng. Sau một thời gian nuôi cấy, số lượng vi sinh vật có trong mẫu cần phân tích tăng lên, nhờ vậy dễ phát hiện sự có mặt của vi sinh vật bằng cách quan sát mức độ đục, sự tạo khí cũng như màu và mùi của dịch nuôi cấy.

2. Hóa chất

- Môi trường nuôi cấy lỏng đặc hiệu.
- Parafin.
- Các hoá chất cần thiết để nghiên cứu vi sinh vật.
- Chất nhuộm màu.

3. Thiết bị

- Ống Durham
- Pipet.
- Que cấy đầu tròn hoặc đầu thẳng.
- Đèn cồn.

4. Tiến hành

- Đưa một cách hoàn toàn vô trùng mẫu cần phân tích vào môi trường nuôi cấy đặc hiệu cho từng chủng vi sinh vật.

- Đặt môi trường nuôi cấy trong tủ ấm có nhiệt độ 25 - 37°C, trong 1 - 6 ngày ở điều kiện hiếu khí hoặc yếm khí tùy vào loại sinh vật cần phân tích.

- Trong thời gian nuôi cấy quan sát:

- + Độ đục môi trường
- + Sự tạo khí
- + Sự thay đổi màu
- + Có mùi lạ

5. Kết quả

Kết luận trong mẫu phân tích có loại vi sinh vật cần xác định nếu quan sát thấy có một hay nhiều các biểu hiện sau:

- Có khí tạo thành.
- Môi trường có bị đục, nếu có thì ít hay nhiều.
- Màu dịch có thay đổi hay không, cường độ màu như thế nào.
- Có mùi lạ không, mùi gì (nếu có thể xác định được).

14.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT

14.3.1. Xác định khối lượng khô

Nồng độ tế bào nấm men trong dịch có thể xác định bằng nhiều cách. Trong đó, phương pháp xác định khối lượng nấm men khô được coi là phương pháp tiêu chuẩn và kết quả thu được có thể chuyển đổi so sánh với các giá trị xác định bằng các phương pháp khác nhờ phép tính rất đơn giản. Tuy nhiên cũng cần thấy rằng mối tương quan giữa phương pháp xác định khối lượng nấm men khô và các phương pháp khác như dùng buồng đếm, đo độ đục là rất khác nhau phụ thuộc vào chủng giống và nhiều yếu tố khác.

1. Nguyên tắc

Thu hồi nấm men có trong dịch bằng máy ly tâm siêu tốc, rửa bằng dung dịch xút để tách bỏ các chất hữu cơ bám trên bề mặt tế bào và sau đó sấy tới trọng lượng không đổi.

2. Hóa chất

- Dung dịch amoniac 5 N.
- Nước cất vô trùng.
- Cồn.

3. Thiết bị

- Máy ly tâm siêu tốc.
- Hộp cân.
- Bình cách thủy, bình hút ẩm.
- Tủ sấy.
- Cân có độ chính xác $\pm 0,1$ mg.

4. Tiến hành

- Lấy một lượng dịch tùy ý có chứa khoảng 20 - 200 mg nấm men khô, cho vào ống ly tâm và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút, thời gian là 15 phút.

- Gạn bỏ nước trong và cho dung dịch amoniác 5N với thể tích tương tự, khuấy đều và ly tâm ở vận tốc 2000 vòng/phút trong 15 phút. Làm như vậy 2 lần.
- Gạn bỏ dung dịch amoniác và cho nước cất với thể tích tương tự vào, khuấy đều và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong thời gian là 15 phút.
- Gạn bỏ nước trong và dùng cồn để chuyển toàn bộ phần lắng ở dưới đáy sang hộp nhôm dùng để sấy. Cho bay hơi bớt trên nồi cách thủy.
- Sau đó sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 105°C trong 24 h. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân ngay.

5. Kết quả

Biểu thị theo % chất khô nấm men hoặc mg/ml với một chữ số thập phân.

14.3.2. Đo độ đục

Kỹ thuật này dùng để xác định nồng độ nấm men có trong bia hoặc trong dịch nuôi cấy trong quá trình lên men chính và phụ.

1. Nguyên tắc

Các tế bào nấm men ở dạng huyền phù được ly tâm, sau đó được hòa tan trong nước. Đo độ đục của dịch bằng máy đo độ đục hoặc máy so màu.

2. Thiết bị

- Máy ly tâm siêu tốc.
- Máy so màu.
- Ống ly tâm có chia vạch 15 ml.

3. Hóa chất

- Dung dịch amoniác 5N.
- Nước cất vô trùng.

4. Tiến hành

- Lấy 10 ml mẫu vào ống ly tâm có chia vạch và ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút, thời gian là 15 phút.
- Gạn bỏ dịch và dùng 8 ml nước để chuyển cặn nấm men sang cuvet.
- Cho thêm 0,1 ml dung dịch amoniác và cho thêm nước cất để đủ 10 ml.
- Khuấy đều dịch huyền phù và đo độ đục trên máy.

Chú ý: Để có kết quả chính xác thì mẫu phân tích cần chứa 0,2 - 5 mg/ml tính theo trọng lượng nấm men khô (khoảng 3.10^6 đến 75.10^6 tế bào/ml).

5. Kết quả

Lượng tế bào nấm men, có thể biểu diễn bằng giá trị mật độ quang (OD) đo được hoặc có thể xây dựng đường cong tiêu chuẩn, biểu thị mối liên quan giữa độ đục với nồng độ tế bào từ đây có thể biết được lượng tế bào/ml dịch.

Chú ý: Nấm men rất kết bông thường tạo thành từng mảng trên bề mặt dịch, gây khó khăn cho quá trình lắng và ly tâm. Cho dung dịch amoniac 5 N có mục đích làm giảm khả năng kết bông của nấm men.

14.3.3. Đếm trực tiếp số lượng tế bào

14.3.3.1. Buồng đếm

Phương pháp này cho phép xác định nồng độ nấm men đặc biệt là trong bia hoặc trong dịch lên men bia.

1. Nguyên tắc

Dùng pipet lấy 1 giọt mẫu cần xác định cho vào khe hở giữa buồng đếm và lá kính. Đếm số tế bào nấm men dưới kính hiển vi.

2. Hóa chất

- Nước cất vô trùng, đã qua lọc.

3. Thiết bị

- Lá kính hình vuông 22×22 mm.

- Kính hiển vi nền sáng.

- Buồng đếm Malassez hoặc buồng đếm Thoma. Đây là những phiến kính dày 2 đến 3 mm, trên bề mặt của nó được vạch sẵn những ô vuông và sau khi đã cho mẫu lên thì được phủ bằng một lá kính mỏng, phẳng. Buồng đếm này có thể chứa một thể tích mẫu nhất định.

+ Buồng đếm Malassez: Buồng đếm này có 25 hình chữ nhật, trong mỗi hình chữ nhật lại có 20 ô vuông. Kích thước của các hình như sau:

- Chiều sâu của các ô : $1/5$ mm

- Mỗi ô vuông có cạnh : $1/20$ mm

- Diện tích một ô vuông : $1/20 \times 1/20 = 1/400$ mm²

- Thể tích một ô vuông : $1/20 \times 1/20 \times 1/5 = 1/2000$ mm³

- Thể tích một hình chữ nhật: $20 \times 1/2000 = 1/100$ mm³

- Thể tích buồng đếm : $25 \times 1/100 = 0,25$ mm³

+ Buồng đếm Thomas: Buồng đếm này có 16 ô vuông lớn, trong mỗi ô vuông lớn có 16 ô vuông nhỏ. Kích thước của các hình như sau:

- Chiều sâu của các ô : $1/10 \text{ mm}$
- Mỗi ô vuông nhỏ có cạnh : $1/20 \text{ mm}$
- Diện tích một ô vuông nhỏ: $1/20 \times 1/20 = 1/400 \text{ mm}^2$
- Thể tích một ô vuông nhỏ : $1/20 \times 1/20 \times 1/10 = 1/4000 \text{ mm}^3$
- Thể tích một ô vuông lớn : $16 \times 1/4000 = 1/250 \text{ mm}^3$
- Thể tích buồng đếm : $16 \times 1/250 = 0,064 \text{ mm}^3$

4. Tiến hành

- Pha loãng mẫu sao cho khi quan sát ở mỗi ô vuông nhỏ có từ 5 đến 10 tế bào vi sinh vật

- Dùng pipet lấy rất nhanh 1 giọt mẫu để nhỏ lên buồng đếm, tránh không để tràn ra ngoài, rồi phủ lên 1 lá kính phẳng và để yên.

- Chính kính hiển vi, độ phóng đại khoảng 500 lần để thấy rõ được 1 ô lớn hình chữ nhật chứa 20 ô nhỏ trong đấy (nếu dùng buồng đếm Malassez) hoặc 1 ô lớn hình vuông chứa 16 ô nhỏ trong đấy (nếu dùng buồng đếm Thoma). Đếm tất cả số tế bào có trong trường quan sát.

- Để đảm bảo độ chính xác của kết quả, nên đếm lặp lại như vậy từ ít nhất 5 ô lớn. Nếu nồng độ tế bào quá lớn (lớn hơn 200 tế bào trong 1 ô lớn) thì nên pha loãng tiếp và nên chú ý tránh để nấm men lắng xuống trong thời gian lấy mẫu.

Chú ý: Mẫu cần được xác định ngay, không quá 30 phút kể từ khi lấy mẫu.

5. Kết quả

Số tế bào trên 1ml (hoặc 1 g) mẫu phân tích (N) được tính như sau:

$$N (\text{tế bào/ml hoặc g}) = \frac{n}{v \times f}$$

trong đó:

- n - số tế bào trung bình có trong 1 ô lớn;
- v - thể tích 1 ô lớn ($v = 1/100 \text{ mm}^3$ cho buồng đếm Malassez hoặc $v = 1/250 \text{ mm}^3$ cho buồng đếm Thoma);
- f - hệ số pha loãng mẫu.

Kỹ thuật này được ứng dụng đếm số tế bào nấm men là chính, với vi khuẩn vì kích thước quá nhỏ bé nên khó đếm hơn so với nấm men.

14.3.3.2. Nhuộm xanh methylen

Phương pháp này cho phép xác định số tế bào sống hay chết có trong mẫu phân tích.

1. Nguyên tắc

Các tế bào sống chứa các enzym có khả năng chuyển xanh methylen thành chất không màu. Khi ngâm tế bào vào dung dịch xanh methylen thì chất này đi qua màng tế bào và các enzym của tế bào sống làm mất màu xanh. Các tế bào chết thì các enzym không còn hoạt động nên không thể làm mất màu xanh methylen, do đó các tế bào này bị nhuộm màu xanh.

2. Hóa chất

- Nước cất vô trùng, đã qua lọc.
- $C_6H_7O_7Na.2H_2O$ (citrat natri).
- Dung dịch xanh methylen: Hoà tan 0,01 g xanh methylen vào 10 ml nước cất. Cho 2 g citrat natri, khuấy đều cho tới lúc hoà tan hoàn toàn. Lọc qua giấy lọc và cho thêm nước cất để có đủ 100 ml.

3. Thiết bị

- Buồng đếm.
- Lá kính hình vuông 22×22 mm.
- Kính hiển vi nền sáng.

4. Tiến hành

- Trộn đều dung dịch xanh methylen với mẫu (cho một giọt dung dịch xanh methylen và một giọt mẫu). Pha loãng sao cho nồng độ nấm men nằm trong khoảng 40-60 tế bào trên trường quan sát. Sử dụng độ phóng đại 600 lần.

- Đếm khoảng 1000 tế bào, với các chồi có kích thước $> 1/2$ kích thước tế bào mẹ được coi là một tế bào.

5. Biểu diễn kết quả

Biểu thị số lượng tế bào sống theo % so với tổng số tế bào có trong mẫu.

14.3.4. Đếm khuẩn lạc

14.3.4.1. Nuôi cấy trong hoặc trên môi trường thạch

Phương pháp này cho phép phát hiện những tế bào vi sinh vật còn sống có trong mẫu (ở cả dạng rắn hoặc lỏng). Mặc dù đây không phải là một phương pháp đếm vi sinh vật một cách nhanh chóng nhưng nó thường được dùng như là phương pháp chuẩn để xác định số lượng vi sinh vật thực phẩm.

1. Nguyên tắc

Cấy chính xác một thể tích mẫu (hoặc dịch pha loãng) vào trong hoặc lên trên bề mặt môi trường thạch. Từ mỗi độ pha loãng cần cấy lặp lại ít nhất là 2 hộp và mỗi mẫu cần làm ít nhất 2 độ pha loãng liên tiếp để làm sao trên mỗi hộp có từ 30 đến 300 khuẩn lạc. Nuôi cấy trong điều kiện thích hợp cho các vi sinh vật phát triển, sau đó đếm số lượng các khuẩn lạc mọc lên. Có thể coi mỗi khuẩn lạc là kết quả của sự phát triển từ một tế bào.

2. Thiết bị

- Hộp Petri.
- Que trang thủy tinh hoặc kim loại.
- Ống nghiệm dùng để pha loãng mẫu.

3. Hóa chất

- Nước cất vô trùng, đã qua lọc.
- Môi trường thạch thích hợp.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị môi trường thích hợp và dịch pha loãng, sau đấy khử trùng cùng với các dụng cụ cần dùng.

- Pha loãng mẫu đến nồng độ cần thiết.
- Cấy trong môi trường thạch:

+ Đưa một cách vô trùng 1 ml mẫu đã pha loãng đến nồng độ cần thiết vào đĩa Petri vô trùng.

+ Rót khoảng 15 -18 ml môi trường thạch đã hóa lỏng trên nền cách thủy (nhiệt độ khoảng 45°C) vào mỗi đĩa đã có mẫu. Mỗi mẫu cần làm ít nhất 2 độ pha loãng liên tiếp và từ mỗi độ pha loãng cần cấy lặp lại ít nhất là 2 hộp.

+ Trộn theo kỹ thuật được chuẩn hoá. Đĩa được xếp trên mặt phẳng ngang cho đến khi thạch nguội.

- Cấy trên môi trường thạch:

+ Rót khoảng 15 -18 ml môi trường thạch đã hóa lỏng trên nồi cách thủy (nhiệt độ khoảng 45°C) vào mỗi đĩa Petri đã vô trùng.

+ Đĩa được xếp trên mặt phẳng ngang cho đến khi thạch nguội. Sau đó thường để các hộp này ở nhiệt độ 30°C trong 2 - 3 ngày kiểm tra độ vô trùng của chúng.

+ Đưa một cách vô trùng một thể tích 0,05 - 0,1 ml mẫu đã pha loãng đến nồng độ cần thiết lên bề mặt thạch chứa trong đĩa Petri.

+ Dùng que trang vô trùng dàn đều thể tích này lên khắp bề mặt môi trường. Mỗi mẫu cần làm ít nhất 2 độ pha loãng liên tiếp sao cho trên mỗi hộp sẽ có từ 30 - 300 khuẩn lạc và từ mỗi độ pha loãng cần cấy lặp lại ít nhất là 2 hộp.

+ Lật hộp lại và đem nuôi cấy ở nhiệt độ và thời gian tùy theo sản phẩm cần nghiên cứu và tùy theo loại vi sinh vật mà người ta muốn đánh giá sự phát triển của nó. Nhiệt độ thường 22°C, 30°C hay 37°C và thời gian nuôi cấy là 24, 48 hay 72 giờ.

5. Kết quả

Sau khi khuẩn lạc đã mọc, đếm số lượng các khuẩn lạc mọc trên đĩa. Để có kết quả chính xác, người ta chỉ tính những hộp có 30 đến 300 khuẩn lạc (trên bề mặt và cả trong môi trường).

Số lượng vi sinh vật trung bình có trong 1 ml hay 1 g mẫu (N) được tính theo công thức:

$$N \text{ (khuẩn lạc/g hay khuẩn lạc/ml)} = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \times f_1 \times v}$$

trong đó:

$\sum C$ - tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa;

n_1 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1 (độ pha loãng thấp nhất);

n_2 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 2;

f_1 - hệ số pha loãng của đĩa ở nồng độ pha loãng thứ 1;

v - thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa Petri;

14.3.4.2. Nuôi cấy trên màng lọc

Kiểm tra nhanh chất lượng và số lượng vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc) ở nồng độ thấp trong thể tích dịch lớn.

1. Nguyên tắc

Tăng số lượng vi sinh vật có trong mẫu phân tích nhờ lọc trên màng lọc. Kích thước lỗ lọc phải nhỏ hơn kích thước của vi sinh vật cần phát hiện. Đặt màng đã lọc lên môi trường dinh dưỡng trong hộp Petri hoặc trên carton để các vi sinh vật phát triển ngay trên màng lọc. Quan sát màu, hình thái và đếm số khuẩn lạc.

2. Hóa chất

- Nước cất vô trùng, hoặc dung dịch để pha loãng mẫu.
- Cồn 60 - 70 % dùng để khử trùng.
- Môi trường nuôi cấy thích hợp.

3. Thiết bị

- Hệ thống lọc chân không như đã nêu trong phần 14.2.2.

4. Tiến hành

- Thực hiện quá trình lọc như trong phần 14.2.2.

Bảng 14.2: Lượng mẫu kiểm tra trong từng công đoạn sản xuất bia

Loại mẫu	Vi sinh vật cần xác định	Lượng dịch cần lọc (ml)
Nước sản xuất	- Tổng số vi sinh vật	1 - 10
	- Coliform và <i>E. coli</i>	10 - 100
	- Nấm men và nấm mốc	100 - 200
Nước rửa thùng	- Tổng số vi sinh vật	1 - 10
	- Nấm men và nấm mốc	1 - 50
	- Vi sinh vật gây bệnh	50 - 200
Kiểm tra mức độ khử trùng	- Tổng số vi sinh vật	100 - 200
	- Nấm men và nấm mốc	100 - 200
Dịch lên men	- Tổng số vi sinh vật	10 - 20
	- Nấm men và nấm mốc	10 - 25
Bia đã lọc	- Tổng số vi sinh vật	10 - 20
	- Nấm men và nấm mốc	10 - 20
	- Vi sinh vật có hại	50 - 100
Nước rửa chai	- Tổng số vi sinh vật	1 - 10
	- Nấm men và nấm mốc	10 - 50
	- Vi sinh vật có hại	100
Không khí phòng	- Tổng số vi sinh vật	20 - 50 lít
	- Nấm men và nấm mốc	20 - 50 lít
Khí nén*	- Tổng số vi sinh vật	200 lít
	- Nấm men và nấm mốc	200 lít

* Cần dùng màng lọc gelatin cho loại mẫu này

- Lượng dịch cần lọc có thể tham khảo theo bảng 14.2.
- Lọc xong, để màng lọc lên môi trường thạch trong hộp Petri (cũng có thể để màng lọc lên môi trường lỏng, nhưng trường hợp này rất ít dùng) và nuôi cấy trong điều kiện thích hợp.
- Sau một thời gian nhất định, đếm số khuẩn lạc phát triển ngay trên màng lọc.

5. Kết quả

Từ số khuẩn lạc mọc lên trên màng lọc, tính số lượng vi sinh vật trên đơn vị thể tích hoặc trọng lượng mẫu cần phân tích.

Số lượng tế bào có thể tính theo công thức:

$$N = \frac{n}{V} \cdot k$$

trong đó:

- N - số lượng tế bào trong 1 ml dịch lọc;
- n - số tế bào trung bình nhìn thấy trên trường quan sát;
- V - thể tích dịch đã lọc, ml;
- k - tỷ số D^2/d^2 ;
- D - đường kính màng lọc, m;
- d - đường kính kính trường quan sát, m.

Đường kính trường quan sát được xác định cho mỗi độ phóng đại. Trong thực tế có thể đếm 10 lần. Nếu số tế bào ít thì nên tăng số lần đếm. Phương pháp này có thể sử dụng với nồng độ tế bào vi sinh vật cao khoảng 10000 tế bào/ml.

14.3.5. Phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất (MPN)

Phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất (Most Probable Number, MPN) còn được gọi là phương pháp pha loãng tới hạn, thường dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo lượng vi sinh vật có xác suất lớn nhất có thể có trong mẫu.

1. Nguyên tắc

Dựa trên kết quả định tính của một loạt thí nghiệm được thực hiện ở nhiều độ pha loãng liên tiếp nhau theo bội số của 10 với số lần lặp lại cho mỗi độ pha loãng ít nhất là 3 ống. Vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường lỏng chọn lọc và có thể tạo đục, đổi màu, sinh khí trong môi trường nuôi cấy (đây là các ống

lượng tính). Xác định các ống có kết quả dương tính, xử lý các số liệu thu được theo phụ lục 4 (bảng Macgrady 1: Xác định giá trị MPN theo số đặc trưng) và từ đó tính ra số lượng tế bào sống có chứa trong 1 g hay 1 ml mẫu ban đầu.

2. Hóa chất

- Nước cất vô trùng, hoặc dung dịch để pha loãng mẫu.
- Môi trường nuôi cấy chọn lọc ở dạng lỏng.

3. Thiết bị

- Pipet, ống nghiệm, ống Durham.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị dịch pha loãng và các môi trường lỏng chọn lọc, lấy 9 ml cho vào trong các ống nghiệm và khử trùng.

- Pha loãng mẫu cần phân tích. Nên làm ít nhất 3 độ pha loãng liên tiếp nhau để làm sao ở một nồng độ pha loãng này thì vi sinh vật phát triển trong tất cả các ống nghiệm lặp lại, đồng thời ở các độ pha loãng tiếp theo thì không có hoặc không phát triển trong tất cả các ống nghiệm lặp lại. Mỗi độ pha loãng khác nhau cần được cấy vào ít nhất 3 ống với thể tích chính xác là 1 ml mẫu và cho vào 9 ml môi trường nuôi cấy thích hợp.

- Sau khi cấy xong, đặt các ống nghiệm ở nhiệt độ thích hợp với các vi sinh vật cần kiểm tra. Thời gian nuôi cấy phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng của các vi sinh vật.

- Kiểm tra xem vi sinh vật có phát triển hay không dựa vào các đặc tính lên men có thể quan sát được như làm đục, đổi màu, sinh khí trong môi trường nuôi cấy hoặc có thể bằng các phản ứng định tính.

5. Kết quả

- *Xác định số đặc trưng và chỉ số MPN*: Trước hết cần xác định số đặc trưng biểu thị số ống dương tính gồm 3 con số. Số đầu (bên trái) chỉ số ống nghiệm dương tính ở độ pha loãng thấp nhất (có nghĩa là môi trường nuôi cấy có nồng độ mẫu cao nhất khi dùng để cấy thì thấy có sự phát triển của vi sinh vật). Hai số tiếp theo chỉ số ống nghiệm dương tính của 2 độ pha loãng tiếp theo. Từ số đặc trưng tìm được, tra bảng Mac Grady 1 để tìm chỉ số MPN.

Lượng tế bào sống có chứa trong 1 g hay 1 ml mẫu ban đầu được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{\text{Chỉ số MPN}}{\text{Giá trị độ pha loãng thấp nhất}}$$

Phương pháp này cho kết quả dao động khá lớn nên thường biểu thị kết quả theo giới hạn tin cậy bằng cách tra phụ lục 15 (bảng Mac Grady 2).

Chú ý:

Cách chọn số đặc trưng như sau:

- Nếu có ít nhất 1 độ pha loãng cho cả 3 ống đều dương tính (phần a của bảng 14.3) thì nên chọn độ pha loãng cao nhất (có nghĩa là môi trường nuôi cấy có nồng độ mẫu thấp nhất) mà có cả 3 ống đều dương tính và lấy tiếp 2 độ pha loãng kế tiếp.

- Nếu không có độ pha loãng cho cả 3 ống đều dương tính nhưng có ít nhất 3 độ pha loãng đều có ống dương tính (phần b của bảng 14.3) thì nên chọn 3 độ pha loãng liên tiếp nhau có độ pha loãng cao nhất (có nghĩa là môi trường nuôi cấy có nồng độ mẫu thấp nhất) có các ống đều dương tính.

Bảng 14.3: Cách chọn số đặc trưng với 3 ống lặp lại

Các trường hợp	Số ống dương tính cho mỗi độ pha loãng					Số đặc trưng
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
a - Có ít nhất một độ pha loãng có 3 ống dương tính	3	3	3	3	3	333
	3	3	3	1	0	310
	3	3	2	0	0	320
	3	2	1	0	0	321
	3	0	1	0	0	301
b - Không có độ pha loãng nào có 3 ống dương tính	2	2	2	2	0	222
	2	2	1	1	0	211
	2	2	0	1	0	220
	0	1	0	0	0	010

6. Ví dụ

Xác định số lượng tế bào trong một sản phẩm rắn và kết quả thu được như sau:

Độ pha loãng mẫu phân tích	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Số ống đã cấy cho mỗi độ pha loãng	3	3	3	3	3
Số ống dương tính	3	3	2	1	0

Như vậy số đặc trưng cho 3 ống là 321 với độ pha loãng thấp nhất 10^{-2}

- Tra phụ lục 14: số đặc trưng 321 tương ứng với chỉ số MPN là 15.

Vậy số lượng tế bào sống có chứa trong 1 g hay 1 ml mẫu ban đầu sẽ là:

$$N = \frac{\text{Chỉ số MPN}}{\text{Giá trị độ pha loãng thấp nhất}} = \frac{15}{10^{-2}} = 1500$$

Để xác định giới hạn tin cậy, có thể tra bảng kèm theo. Giới hạn này phụ thuộc vào hệ số pha loãng, mức xác suất tin cậy (P) và số lượng ống nghiệm được cấy.

Trong ví dụ trên, số lượng ống nghiệm cấy lặp lại là 3, hệ số pha loãng cao nhất cho chỉ số MPN 321 là 10^{-2} . Từ phụ lục 15 với $P_{0,95\%}$ là 5 và 51.

Vậy số lượng tế bào sống có chứa trong 1 g hay 1 ml mẫu ban đầu sẽ nằm

$$\text{trong khoảng : } \frac{5}{10^{-2}} \div \frac{51}{10^{-2}} = 500 \div 5100 \text{ tế bào/g.}$$

14.4. PHÂN TÍCH ĐẶC TÍNH CÔNG NGHỆ CỦA NẤM MEN

14.4.1. Năng lực lên men của nấm men

Năng lực lên men biểu thị vận tốc lên men hay khả năng lên men các loại đường khác nhau của nấm men.

1. Nguyên tắc

Nuôi cấy nấm men trong môi trường thích hợp. Xác định lượng CO_2 tạo thành trong quá trình lên men yếm khí tương đối và lượng CO_2 tạo càng nhiều biểu thị năng lực lên men của nấm men càng lớn. Hoặc có thể đánh giá năng lực lên men theo thời gian cần thiết để tạo ra một lượng CO_2 xác định (5 ml CO_2). Thời gian càng ngắn chứng tỏ năng lực lên men càng lớn.

2. Dụng cụ

- Bình "Einhorn" (hình 14.2).



Hình 14.2.
"Einhorn"

3. Tiến hành

- Cho môi trường nuôi cấy đã tiệt trùng vào bình 'Einhorn'. Cho một lượng nấm men giống xác định ($2 \div 5\%$ so với thể tích dịch đường) và nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \div 30^{\circ}\text{C}$. Sau mỗi khoảng thời gian xác định (0,5 hay 1 giờ) thì quan sát lượng khí CO_2 tạo thành trong ống và ghi lại. Quan sát cẩn thận thời gian cuối để khi vừa đạt đúng 5 ml CO_2 thì dừng lên men. Ghi lại thời gian cần thiết để tạo ra 5 ml CO_2 .

4. Kết quả

Dựa vào thời gian lên men cần thiết để tạo ra 5 ml khí CO_2 để so sánh vận tốc lên men giữa các chủng nấm men với nhau cũng như với các loại đường khác nhau.

14.4.2. Kiểm tra độ kết lắng của nấm men bia

(Phương pháp của Burns do Helm, Nohr và Thorne cải tiến)

Sự kết lắng của nấm men bia có thể hiểu theo hai cách:

- Các tế bào nấm men kết tụ lại với nhau và không tách rời nhau sau quá trình nảy chồi.

- Sự kết đám lại của các tế bào sau khi đã lên men xong.

Ngoài ra, phương pháp này cũng cho phép dự đoán vận tốc kết lắng của các tế bào nấm men trong quá trình lên men bia.

1. Nguyên tắc

Xác định khối lượng nấm men kết lắng trong dung dịch đệm thích hợp.

2. Dụng cụ

- Ống đong có chia độ đáy còn thể tích 15 ml.

3. Hoá chất

- Dung dịch đệm axetat pH = 4,5: Hoà tan 6,8 g axetat natri, 4,05 g axit axetic và 0,5 g CaSO_4 (hoặc 0,4 g CaCl_2) với nước cất và cho đủ 1 lít.

4. Tiến hành

- Nấm men ép được rửa bằng nước sạch, vô trùng sau đó được tách nước bằng lọc chân không hoặc ly tâm. Cân chính xác 1 g và cho vào ống chia độ có thể tích 15 ml. Cho vào đó 10 ml dung dịch đệm axetat có pH = 4,5. Lắc đều và đặt các ống nghiệm vào trong bình cách thuỷ ở nhiệt độ 20°C trong khoảng 20 phút. Sau đó lắc đều để có một hỗn hợp đồng đều và để yên trong bình cách thuỷ 20°C . Sau 10 phút thì đọc thể tích nấm men lắng dưới đáy.

5. Kết quả

Phương pháp này cho phép phân biệt rất rõ nấm men kết bông và nấm men bụi. Nếu sau 10 phút mà phần lớn nấm men đều lắng xuống dưới tạo ra 2 lớp rất rõ là: dịch trong và nấm men thì đây là loại nấm men kết bông, có khả năng lắng tốt. Đối với nấm men bụi thì phải sau 30 phút mới có thể tạo được một lớp cặn phía dưới và nếu kéo dài thời gian để lắng thì lượng nấm men kết tủa cũng sẽ tăng lên.

14.4.3. Hoạt lực zimaza và maltaza của nấm men bánh mì

Hoạt lực zimaza biểu thị tốc độ lên men đường glucoza hoặc saccaroza còn hoạt lực maltaza biểu thị tốc độ lên men đường maltoza của nấm men.

Hoạt lực zimaza và maltaza được tính bằng thời gian cần thiết để sinh ra 10 ml CO₂ khi lên men 5% đường glucoza hoặc 5% đường maltoza bằng một lượng nấm men có trọng lượng bằng 2,5% so với thể tích dung dịch đường.

1. Nguyên tắc

Xác định thời gian mà 0,5 g men ép có khả năng lên men 20 ml dung dịch glucoza hoặc sacccharoza 5% (khi xác định hoạt lực zimaza) và 20 ml dung dịch maltoza 5% (khi xác định hoạt lực maltaza) tạo thành 10 ml CO₂.

2. Dụng cụ

- Thiết bị đo khí (microgazo metre Eleski) (hình 14.3).

3. Hóa chất

- Nấm men ép.
- Dung dịch đường 10% (glucoza, sacaroza hoặc maltoza).
- Dung dịch muối NaCl bão hoà.

4. Tiến hành

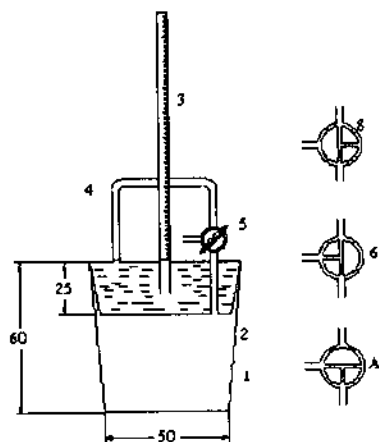
- Trước khi tiến hành thí nghiệm cho dung dịch muối bão hoà có nhuộm màu bằng vài giọt xanh metylen vào nắp dụng cụ đo cho tới đúng điểm 0.

- Cân 0,5 g men ép cho vào cốc 1 rồi thêm 10 ml nước ở nhiệt độ 35°C, khuấy đều. Cho 10 ml dung dịch đường 10 % (glucoza, saccaroza hoặc maltoza) vào và nhanh chóng đậy nắp đo áp suất. Van 5 đã đặt ở vị trí A. Sau đó vận van sang vị trí B để cân bằng áp suất với bên ngoài rồi vận sang vị trí C. Toàn bộ

dụng cụ đặt vào bình ổn nhiệt 35°C và bắt đầu tính thời gian cho tới khi tạo ra 10 ml CO₂ có nghĩa là dung dịch muối dâng lên trong ống đóng 10 ml

Hình 14.3: Thiết bị đo khí Eleski:

1. cốc có đường kính 50 mm, chiều cao 60 mm; 2. nắp đậy có đường kính trong 50 mm, chiều cao 25 mm; 3. ống đo có vạch chia với độ chính xác đến 1 ml, cao 250 mm, đường kính trong 8-10 mm; 4. ống gấp có đường kính trong 3 mm; 5. van 3 ngã; A, B, C: các vị trí mở van ba ngã.



Kết thúc quá trình đo, vận van sang vị trí B để dung dịch muối trong ống đóng hạ xuống sau đó nhắc nắp đo ra, rửa và sấy khô dụng cụ

5. Kết quả

Hoạt lực zimaza hoặc maltaza được tính theo phút và dựa vào kết quả có thể đánh giá chất lượng nấm men như sau:

Hoạt lực (phút)		Chất lượng nấm men
Zimaza	Maltaza	
40 - 60	85 - 110	Tốt
60 - 80	110 - 160	Trung bình
>80	>160	Kém

14.4.4. Lực nở của nấm men bánh mì

Lực nở của nấm men bánh mì là chỉ số chất lượng quan trọng của nấm men bánh mì. Thời gian nấm men làm cho bột nở càng ngắn thì chất lượng nấm men càng tốt. Nấm men chất lượng tốt thường làm nở bột sau 60 - 65 phút. Lực nở nấm men thành phẩm không quá 75 phút và cũng có thể cũng thay đổi phụ thuộc vào độ ẩm và chất lượng bột làm bánh.

1. Nguyên tắc

Nguyên tắc của phương pháp là dùng nấm men nhào với lượng bột nhất

định và bỏ vào khuôn, đáy êke cách mép trên của khuôn 1,5 cm. Thời gian bột nở chậm đến cách đáy êke sẽ được tính là lực nở của nấm men.

2. Dụng cụ

-Khuôn hình hộp bằng nhôm hay tôn có kích thước: Mặt trên 150 × 100 mm; mặt dưới 140 × 90 mm; chiều cao 84 mm. Êke kim loại để gắn với hộp nhôm.

- Máy trộn bột.

3. Hoá chất

- Bột mì chất lượng tốt.
- Nấm men ép hoặc men khô.
- Dung dịch muối ăn 2,5%.
- Tủ ổn nhiệt.

4. Tiến hành

- *Sử dụng men ép*: Cân 280 g bột mì, cho vào tủ ổn nhiệt 35°C trong 2 giờ. Trong thời gian đó chuẩn bị 160 ml dung dịch muối ăn 2,5%, cân 5g men ép (chính xác đến 0,01 g), cho dung dịch muối, nấm men vào tủ ấm 35°C. Hoà nấm men vào 15 - 20 ml nước muối đã làm ấm trong chén sứ, rót vào máy trộn bột tốc độ 135 vòng/phút. Dùng dịch muối còn lại tráng chén và cũng đổ vào máy. Rắc đều lượng bột nói trên vào máy và tiếp tục nhào bột. Sau 5 phút tắt máy, lấy bột nhào nặn thành hình bánh mì dài và đặt vào khuôn đã xoa một ít dầu ăn. Sau đó cho êke vào bên trong, sát khuôn sao cho đáy êke cách mép trên của khuôn 1,5 cm. Cho khuôn chứa bột nhào vào tủ ấm và bắt đầu tính giờ. Thời gian từ khi bắt đầu tính giờ đến khi bột nở chậm đến cạnh đáy êke được tính là lực làm nở bột của nấm men.

- *Đối với men khô*: Cân 2,5 g men khô và cho vào cốc có chứa 30 ml nước, cho vào tủ ổn nhiệt làm ấm đến 35°C và giữ 30 phút, sau đó cho vào 15 g bột và trộn đều rồi để lại trong tủ ấm 35°C trong vòng 2 giờ. Đồng thời đặt vào tủ ấm 265 g bột cùng loại, 130 ml nước có hoà 4 g muối ăn và khuôn cùng với êke. Sau 2 giờ cho bột vào máy trộn cùng với nước muối và sữa men nói trên. Nhào trong vòng 5 phút rồi cho bột vào khuôn đã xoa dầu ăn lót khuôn. Tiếp tục tiến hành như đối với men ép.

5. Kết quả

- Quan sát quá trình nở bột và lực nở của nấm men được tính bằng thời gian bắt đầu cho bột nhào vào khuôn cho đến khi bột nở chậm đến cách đáy êke.

Chương 15

PHÂN TÍCH CÁC CHỈ TIÊU VI SINH VẬT THỰC PHẨM

Yêu cầu về các chỉ tiêu vi sinh vật trong các sản phẩm thực phẩm được quy định theo các tiêu chuẩn do Bộ Y tế đưa ra 4/1998 trong đó bao gồm: Tổng số vi sinh vật, coliform, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, tổng số nấm mốc-men (phụ lục 16 - Bảng chỉ tiêu vi sinh vật trong các sản phẩm thực phẩm theo quyết định của Bộ trưởng Bộ Y tế, số 667/1998/QĐ-BYT).

15.1. VI SINH VẬT TỔNG SỐ

Vi sinh vật tổng số là tất cả các vi sinh vật có thể tồn tại và phát triển được trên môi trường dinh dưỡng chung, ở nhiệt độ 30°C sau một thời gian nuôi cấy nhất định (24 - 72 giờ).

Xác định tổng số vi sinh vật có trong sản phẩm thực phẩm để đánh giá mức độ nhiễm tạp của nguyên liệu và sản phẩm, từ đó đánh giá tình trạng vệ sinh và các điều kiện bảo quản sản phẩm và dự đoán khả năng hư hỏng của sản phẩm.

1. Nguyên tắc

Nuôi cấy một lượng mẫu nhất định hoặc mẫu đã pha loãng lên môi trường thạch dinh dưỡng ở nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$ trong điều kiện hiếu khí, thời gian 48 – 72 giờ. Đếm tất cả số khuẩn lạc mọc trên đó. Từ tổng số khuẩn lạc đếm được sẽ suy ra số lượng tế bào sống có trong mẫu phân tích.

Chú ý: Cần chọn độ pha loãng thích hợp sao cho số khuẩn lạc mọc trên mỗi hộp Petri nằm trong khoảng 30 – 300.

Theo phương pháp này không thể xác định được các loại vi sinh vật yếm khí nghiêm ngặt mà chỉ xác định những vi sinh vật hiếu khí và yếm khí tùy tiện.

2. Dụng cụ

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo ...).
- Hộp Petri, ống nghiệm dùng để pha loãng mẫu.

- Pipet 1 và 10 ml.
- Máy đếm khuẩn lạc (nếu có).

3. Hoá chất, môi trường

- Môi trường TGA (Trypton Glucoza Agar) : Trypton hoặc pepton 5 g; glucoza 4 g; cao nấm men 2,5 g; thạch 15 g; H₂O cho đủ 1000 ml. Môi trường hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

- Thạch màng: dung dịch nước thạch 1%
- Dung dịch pha loãng: nước cất hoặc nước muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl).

4. Tiến hành

- Rửa sạch và khử trùng các dụng cụ (hộp Petri, pipet, ống nghiệm, các đồ chứa mẫu) cũng như các dịch pha loãng.

- Pha loãng thập phân mẫu phân tích tới nồng độ thích hợp để dễ dàng cho việc quan sát đếm khuẩn lạc. Thời gian thao tác không quá 30 phút.

- Cấy giống có hai cách: Cấy trong môi trường thạch và cấy trên bề mặt thạch.

a) Cấy trong môi trường thạch

- Lấy 1 ml mẫu đã pha loãng cho vào hộp Petri (mỗi độ pha loãng nên làm đồng thời 2 - 3 hộp và nên làm hai độ pha loãng liên tiếp nhau).

- Rót môi trường thạch dinh dưỡng đã nóng chảy có nhiệt độ 45 - 50°C vào các đĩa Petri đã có mẫu, mỗi đĩa cho 15 - 18 ml môi trường.

- Xếp các đĩa trên mặt phẳng ngang, để yên (trong điều kiện vô trùng) cho đến khi thạch nguội và đông hoàn toàn. Nếu dự kiến sản phẩm nào đó có thể bị mọc lan thì nên khắc phục bằng cách: sau khi môi trường dinh dưỡng đã đông hoàn toàn, rót lên bề mặt mỗi đĩa khoảng 4 - 5 ml thạch màng và để cho đông lại hoàn toàn.

- Lật ngược đĩa, đặt vào tủ ẩm để nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian 48 - 72 giờ.

b) Cấy trên bề mặt thạch

- Môi trường sau khi đã hấp khử trùng thì rót vào các đĩa Petri, mỗi đĩa cho 15 - 18 ml môi trường. Xếp các đĩa trên mặt phẳng ngang, để yên cho đến khi

thạch nguội và đông hoàn toàn (có thể để 2 - 3 ngày ở nhiệt độ 30°C để kiểm tra độ vô trùng của các hộp). Khi cấy chọn các hộp Petri còn hoàn toàn vô trùng.

- Lấy 0,05 ml (hay 1 giọt) mẫu đã pha loãng cho vào hộp Petri (mỗi độ pha loãng nên làm đồng thời 2 - 3 hộp và nên làm hai cấp pha loãng liên tiếp nhau) đã chứa môi trường thạch dinh dưỡng, trang đều trên mặt thạch.

- Lật ngược đĩa, đặt vào tủ ấm để nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian 24 - 72 giờ.

5. Kết quả

Sau khi khuẩn lạc đã mọc, đếm số lượng các khuẩn lạc mọc trên các đĩa có số lượng nằm trong khoảng 30 - 300. Nếu ngay ở đĩa cấy mẫu nguyên chất (lòng) hoặc dung dịch huyền phù gốc mà có số lượng ít hơn 30 khuẩn lạc thì vẫn lấy kết quả đó.

Số lượng vi sinh vật trung bình có trong 1 ml hay 1 g mẫu được tính theo công thức:

$$N \text{ (khuẩn lạc/g hay khuẩn lạc/ml)} = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot f_1 \cdot v}$$

trong đó:

$\sum C$ - tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa;

n_1 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1 (độ pha loãng thấp nhất);

n_2 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 2 (độ pha loãng tiếp theo);

f_1 - hệ số pha loãng của đĩa đếm thứ 1;

v - thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa Petri.

15.2. NẤM MEN VÀ NẤM MỐC

Nấm men và nấm mốc là những vi sinh vật có rất nhiều trong tự nhiên và rất dễ nhiễm vào các sản phẩm lương thực và thực phẩm làm hỏng hoặc biến đổi chất lượng sản phẩm.

Xác định số lượng nấm men - nấm mốc có trong sản phẩm thực phẩm để đánh giá chất lượng, tình trạng vệ sinh và các điều kiện bảo quản sản phẩm và dự đoán khả năng hư hỏng của sản phẩm.

1. Nguyên tắc

Môi trường dinh dưỡng phải chứa chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn (chất kháng sinh như Oxytetracyclin hoặc Chloramphenicol).

Cấy lên bề mặt thạch của môi trường Yeast Glucose Chloramphenicol một lượng mẫu đã được pha loãng nhất định và nuôi ở nhiệt độ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong điều kiện hiếu khí, thời gian 48 – 72 giờ. Đếm tất cả số khuẩn lạc mọc trên đó từ đấy suy ra lượng nấm men và nấm mốc có trong mẫu phân tích.

2. Dụng cụ, thiết bị

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo ...)
- Hộp Petri, pipet
- Máy đếm khuẩn lạc (nếu có)

3. Hoá chất, môi trường

- Môi trường YGC (Yeast Glucose Chloramphenicol) : glucoza 20 g; cao nấm men 5 g; thạch 15 g; chloramphenicol (hoặc Tetracyclin hay Oxytetracyclin) 0,1 g; H₂O cho đủ 1000 ml. Môi trường hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

- Dung dịch pha loãng: nước cất hoặc nước muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl).

4. Tiến hành

- Pha loãng thập phân mẫu phân tích tới nồng độ thích hợp để dễ dàng cho việc đếm khuẩn lạc (mỗi đĩa chỉ nên có 30 - 300 khuẩn lạc). Thời gian thao tác không quá 30 phút.

- Lấy 0,05 ml (hay 1 giọt) mẫu đã pha loãng cho vào đĩa Petri (mỗi độ pha loãng nên làm đồng thời 2 - 3 hộp và nên làm hai cấp pha loãng liên tiếp nhau) đã chứa môi trường thạch dinh dưỡng, trang đều trên mặt thạch.

- Lật ngược đĩa, đặt vào tủ ấm để nhiệt độ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 48 - 72 giờ.

5. Kết quả

Sau khi khuẩn lạc đã mọc, đếm số lượng các khuẩn lạc mọc trên đĩa và tính kết quả theo công thức như trong phần xác định vi sinh vật tổng số.

15.3. COLIFORM VÀ E.COLI

Coliform là một nhóm bao gồm một số các vi khuẩn gram âm, không tạo bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc, có khả năng lên men đường lactoza, sinh hơi trong vòng 48 h ở nhiệt độ nuôi cấy thích hợp. thường là các giống *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* và *Enterobacter*.

Coliform ưa nhiệt (còn gọi là coliform phân): lên men đường lactoza ở nhiệt độ 44°C. *E.Coli* thuộc nhóm coliform ưa nhiệt và là loại coliform rất bền với phenol 0,085% và sinh indol ở nhiệt độ 42 - 44°C.

Xác định lượng Coliform và *E. Coli* cho biết mức độ ô nhiễm và tình trạng vệ sinh trong phân xưởng sản xuất, hay nói chính xác hơn là xác định mức độ nhiễm phân của sản phẩm.

15.3.1. Định lượng Coliform

Để xác định lượng Coliform có thể nuôi cấy trên môi trường lỏng (phương pháp MPN) hoặc trên môi trường thạch rắn chọn lọc.

a) Phương pháp MPN

1. Nguyên tắc

Mẫu được pha loãng ít nhất ở ba độ pha loãng liên tiếp nhau và mỗi độ pha loãng được cấy trong 3 (hoặc 5) ống nghiệm lặp lại có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc (môi trường lỏng Tryptoza Lauryl Sulffat, TLS). Sau thời gian nuôi cấy, quan sát và ghi nhận các ống dương tính và cấy tiếp sang môi trường khẳng định (môi trường lỏng mật lactoza lục sáng – Brilliant Green Bile Lactoza Broth, BGBLB). Từ các ống nghiệm có phản ứng dương tính, tra bảng Mac Grady để từ đó suy ra số lượng coliform có trong mẫu phân tích.

2. Dụng cụ, thiết bị

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu.
- Ống Durham, pipet.

3. Hoá chất, môi trường

- Môi trường TLS (tryptoza lauryl sulfat): tryptoza 20 g; lactoza 5 g; K_2HPO_4 2,75 g; KH_2PO_4 2,75 g; NaCl 5 g; natri lauryl sulfat 0,1 g; H_2O cho đủ 1000 ml.

- Hoà tan các chất và phân phối môi trường vào các ống nghiệm Durham. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, pH cuối = 6,8 ở nhiệt độ 25°C.

- Môi trường BGBLB (Brillant Green Bile Lactose Broth – canh thang mật lactoza lục sáng): Pepton 10 g; lactoza 10 g; mật bò khô 20 g; lục sáng 0,0133 g; H₂O cho đủ 1000 ml.

- Hoà tan các pepton và lactoza vào trong 500 ml, mật bò khô vào 200 ml và lục sáng vào 100 ml nước cất. Trộn đều 3 dung dịch trên và thêm nước cất cho đủ 1000 ml. Phân phối môi trường vào các ống nghiệm Durham. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, pH cuối = 7,2 ở nhiệt độ 25°C.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị và pha loãng mẫu ở 3 nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} và 10^{-3} .
- Tuân tự cấy 1ml dịch mẫu đã pha loãng ở các nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} và 10^{-3} vào các ống nghiệm có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc TLS, mỗi độ pha loãng làm 3 ống lặp lại. Để các ống đã cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 48 h. Quan sát và ghi nhận các ống có sinh khí và đục (có kết quả dương tính).
- Dùng que cấy vòng cấy chuyển mẫu từ các ống nghiệm dương tính sang các ống nghiệm có chứa môi trường BGBLB. Để các ống đã cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 48 h. Với mỗi độ pha loãng, tính tổng số ống có sinh khí và đục (có kết quả dương tính).

5. Kết quả

Dựa vào số ống có kết quả dương tính của mỗi độ pha loãng, xác định số đặc trưng và sau đó là chỉ số MPN và từ đây tính được số Coliform có trong 1 ml hay 1 g mẫu phân tích (Xem cách tính ở phần 14.3.5).

b) Đếm khuẩn lạc

1. Nguyên tắc

Môi trường Endo có chứa natri sulfit và fuchsin, có khả năng ức chế các vi khuẩn gram (+). Trong quá trình phát triển trên môi trường này, coliform lên men đường lactoza tạo thành aldehyt và axit, aldehyt tác động đến phức chất fuchsin-sulfit và giải phóng fuchsin, sau đó fuchsin nhuộm các khuẩn lạc từ màu hồng đến màu đỏ cánh sen, tròn, bờ đều, có thể có ánh kim hoặc không.

2. Dụng cụ, thiết bị

- Hộp Petri, pipet.

3. Hoá chất, môi trường

- Môi trường Endo: Pepton 10 g; lactoza 10 g; K_2HPO_4 2,5 g; natri sulfit 3,3 g; fucshin kiềm 0,3 g; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml; pH = 7,5.
- Hoà tan các chất và môi trường hấp khử trùng ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong thời gian 20 phút.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu và pha loãng mẫu. Cấy 1 giọt mẫu vào đĩa Petri đã có môi trường thạch Endo (nên làm đồng thời 2 - 3 hộp cùng một lúc) và trang đều trên mặt thạch. Nuôi cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $37 \pm 1^\circ C$ trong 48-72 h.
- Trên mỗi hộp Petri đã nuôi, chọn các khuẩn lạc có màu hồng đến màu đỏ cánh sen, tròn, bờ đều, có ánh kim.

5. Kết quả

Đếm các khuẩn lạc có màu từ hồng tới đỏ trong các đĩa có khoảng 15 - 150 khuẩn lạc.

Số lượng Coliform trung bình có trong 1 ml hay 1 g mẫu được tính theo công thức:

$$N \text{ (khuẩn lạc/g hay khuẩn lạc/ml)} = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \times f_1 \times v}$$

trong đó:

$\sum C$ - tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa;

n_1 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1 (độ pha loãng thấp nhất);

n_2 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 2;

f_1 - hệ số pha loãng của đĩa đếm thứ 1;

v - thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa Petri.

Nếu ngay ở đĩa cấy mẫu nguyên chất (lòng) hoặc dung dịch huyền phù gốc mà có số lượng ít hơn 30 khuẩn lạc thì vẫn lấy kết quả đó.

15.3.2. Định lượng *E. Coli*

Cũng giống như Coliform, định lượng *E. Coli* có thể nuôi cấy trên môi trường lòng (phương pháp MPN) hoặc trên môi trường rắn chọn lọc, sau đây

thực hiện thêm một số các phép thử khẳng định.

a) Phương pháp MPN

1. Nguyên tắc

Mẫu được pha loãng ở ba độ pha loãng liên tiếp nhau và mỗi nồng độ pha loãng được cấy trong 3 (hoặc 5) ống nghiệm lập lại có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc (môi trường lỏng tryptone lauryl sulfat, TLS). Sau thời gian nuôi cấy, quan sát và ghi nhận các ống dương tính và cấy tiếp sang môi trường EC. Từ các ống nghiệm có phản ứng dương tính cấy sang các ống nghiệm có chứa nước trypton. Sau khi đã nuôi cấy ở nhiệt độ 44°C thì kiểm tra có sinh indol hay không. Đếm số ống nghiệm nuôi cấy trên môi trường EC dương tính ứng với các ống có sinh indol, tra bảng Mac Grady để từ đó suy ra số lượng *E. coli* có trong mẫu phân tích.

2. Hoá chất, môi trường

- *Môi trường TLS* (tryptone lauryl sulfat): tryptone 20 g; lactose 5 g; K_2HPO_4 4 g; KH_2PO_4 1,5 g; NaCl 5 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất và phân phối môi trường vào các ống nghiệm Durham. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, pH cuối = 6,8 ở nhiệt độ 25°C.

- *Môi trường EC*: tryptone 20 g; lactose 5 g; muối mật (bile salts) số 3 1,5 g; lục sáng 0,0133 g; H_2O cho đủ 1000 ml.

- Hoà tan các chất với nước cất và thêm nước cất cho đủ 1000 ml. Phân phối môi trường vào các ống nghiệm Durham. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, pH cuối = 6,8 ở nhiệt độ 25°C.

- Dung dịch trypton: trypton 10 g; NaCl 5 g; H_2O cho đủ 1000 ml; pH = 7,3 ở nhiệt độ 20°C. Thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15- 20 phút.

- Thuốc thử indol: 4-dimethylaminobenzaldehyt 5 g; 2-metyl butan-1-ol (hoặc pental-1-ol) 75 ml; HCl đậm đặc 25 ml.

- Hoà tan 4-dimethylaminobenzaldehyt trong 2-metyl butan-1-ol (hoặc pental-1-ol), có thể đun nhẹ trong nồi cách thuỷ $t = 50 - 55^\circ C$. Làm nguội và cho axit vào. Bảo quản chỗ tối và ở nhiệt độ thấp. Thuốc thử có màu vàng sáng.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu và pha loãng mẫu ở 3 nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} và 10^{-3} .

- Tuần tự cấy 1 ml dịch mẫu đã pha loãng ở các nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} và 10^{-3}

vào các ống nghiệm có chứa môi trường tăng sinh chọn lọc TLS, mỗi độ pha loãng làm 3 ống lặp lại. Để các ống đã cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 - 48 h. Quan sát và ghi nhận các ống có sinh khí và đục (có kết quả dương tính).

- Dùng que cấy vòng cấy chuyển dịch mẫu từ các ống nghiệm dương tính sang các ống nghiệm có chứa môi trường EC. Để các ống đã cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 - 48 h. Quan sát và ghi nhận các ống có sinh khí và đục (có kết quả dương tính).

Phép thử khẳng định

- Dùng que cấy vòng cấy chuyển dịch mẫu từ các ống nghiệm có chứa môi trường EC dương tính sang các ống nghiệm có chứa nước trypton. Để các ống đã cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 48 h.

- Thêm 0,5 ml thuốc thử indol vào các ống chứa dung dịch trypton đã nuôi cấy, lắc đều và sau 1 phút thì quan sát và ghi nhận số lượng các ống có màu đỏ chứng tỏ có indol (có kết quả dương tính) cho mỗi độ pha loãng.

5. Kết quả

Với mỗi độ pha loãng, đếm số lượng ống có màu đỏ (có kết quả dương tính với indol), xác định được chỉ số MPN và từ đây tính được số *E. Coli* có trong 1 ml hay 1 g mẫu phân tích.

b) Đếm khuẩn lạc

1. Nguyên tắc

Môi trường endo có natri sulfit và fuchsin, có khả năng ức chế các vi khuẩn gram (+). Trong quá trình phát triển trên môi trường này Coliform chịu nhiệt và *E. Coli* lên men đường lactoza ở 44°C tạo thành aldehyt và axit, aldehyt tác động đến phức chất fuchsin-sulfit và giải phóng fuchsin, sau đó fuchsin nhuộm các khuẩn lạc thành màu hồng đến màu đỏ cánh sen, tròn, bờ đều, có thể có ánh kim hoặc không. Nếu khuẩn lạc màu hồng có ánh kim có thể giả định là *E. Coli* thì kiểm tra có sinh indol hay không.

2. Dụng cụ, thiết bị

- Hộp Petri, pipet

3. Hoá chất, môi trường

- *Môi trường Endo*: pepton 10 g; lactoza 10 g; K_2HPO_4 2,5 g; sulfit natri 3,3 g; fucshin kiềm 0,3 g; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml; pH = 7,5.

- Hoà tan các chất và môi trường hấp khử trùng ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong thời gian 20 phút.

- Dung dịch trypton: trypton 10 g; NaCl 5 g; H_2O cho đủ 1000 ml; pH = 7,3 ở nhiệt độ $20^\circ C$. Thanh trùng ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong thời gian 15- 20 phút.

- Thuốc thử indol: 4-dimethylaminobenzaldehyt 5 g; 2-metyl butan-1-ol (hoặc pentan-1-ol) 75 ml; HCl đậm đặc 25 ml.

- Hoà tan 4-dimethylaminobenzaldehyt trong 2-metyl butan-1-ol (hoặc pentan-1-ol), có thể đun nhẹ trong nồi cách thủy $t = 50 - 55^\circ C$. Làm nguội và cho axit HCl đậm đặc vào. Bảo quản chỗ tối và ở nhiệt độ thấp. Thuốc thử có màu vàng sáng.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu và pha loãng mẫu. Cấy 1 giọt mẫu vào đĩa Petri đã có môi trường thạch Endo (nên làm đồng thời 2 - 3 hộp cùng một lúc) và trang đều trên mặt thạch. Nuôi cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $44 \pm 1^\circ C$ trong 48 - 72 h.

- Trên mỗi đĩa Petri đã nuôi, chọn các khuẩn lạc nghi ngờ có các đặc tính như có màu hồng hoặc đỏ cánh sen, tròn, bờ đều và có ánh kim để tiến hành khẳng định đó là *E. Coli*.

Phép thử khẳng định

- Chọn khuẩn lạc nghi ngờ, dùng que cấy vòng cấy chuyển sang các ống nghiệm có chứa dung dịch trypton. Để các ống đã cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $44 \pm 1^\circ C$ trong 48 h.

- Thêm 0,5 ml thuốc thử indol vào các ống chứa nước trypton đã nuôi cấy, lắc đều và sau 1 phút thì quan sát và ghi nhận số lượng các ống có màu đỏ chứng tỏ có indol (có kết quả dương tính) cho mỗi độ pha loãng.

5. Kết quả

Dựa vào số khuẩn lạc nghi ngờ là *E. Coli* đã đếm được trên các đĩa Petri và dựa vào tỷ lệ số ống thử indol có màu đỏ (dương tính) và tổng số ống thử indol, áp dụng công thức dưới đây để tính số lượng *E. Coli* trung bình có trong 1 ml hay 1 g mẫu:

$$N \text{ (khuẩn lạc/g hay khuẩn lạc/ml)} = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot f_1 \cdot v} \cdot R$$

trong đó:

- $\sum C$ - tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa;
- n_1 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1 (độ pha loãng thấp nhất);
- n_2 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 2;
- f_1 - hệ số pha loãng của đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1;
- v - thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa Petri;
- R - số ống thử indol có màu đỏ (dương tính) / tổng số ống thử indol.

15.4. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, hình cầu, Gram dương có khả năng sinh ra nội độc tố gây ngộ độc thực phẩm. Các tế bào thường liên kết thành hình các chùm nho, không tạo bào tử, không di động, có khả năng sinh coagulase làm đông huyết tương. Khi phát triển trong môi trường, tạo sắc tố có màu từ trắng tới vàng đậm.

Staphylococcus aureus còn được gọi là tụ cầu khuẩn gây bệnh do đó cần xác định để biết mẫu sản phẩm thực phẩm phân tích có mang mối nguy hiểm cho người tiêu dùng hay không.

1. Nguyên tắc

Dựa vào tính chất đặc biệt của vi khuẩn *St.aureus* là phát triển được trên môi trường muối mannitol như trên môi trường Chapman tạo khuẩn lạc màu vàng hoặc trên môi trường Baird-Parker cho khuẩn lạc màu đen.

Nếu sau khi nuôi cấy, không có khuẩn lạc mọc trên các môi trường thạch chọn lọc nói trên, thì cũng chưa thể khẳng định được là không có *St.aureus* trong mẫu phân tích vì vi khuẩn này thường ở lượng rất nhỏ. Trong trường hợp này nên làm tăng lượng vi khuẩn này bằng cách nuôi cấy trên môi trường Chapman lỏng (môi trường cực mặn), sau đó mới nuôi cấy trên môi trường thạch Chapman chọn lọc. Như vậy ta có thể xác định được số lượng ít nhất của *St.aureus* trong thể tích sản phẩm ban đầu.

2. Dụng cụ, thiết bị

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo ...).
- Hộp Petri, pipet.

3. Hoá chất - môi trường

- *Môi trường Chapman*: pepton 10 g; cao thịt 1 g; manitol 10; NaCl 75 g; thạch 15 g; pH 6,8; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất và môi trường hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

- *Môi trường Baird-Parker*: pepton 10 g; cao nấm men 1 g; cao thịt 5 g; pyruvat natri 10 g; glycolol 12 g; dịch nhũ lòng đỏ trứng 50 ml; tellurit kali 0,1 g; LiCl 5 g; K₂TeO₃ 0,1 g; Thạch 20 g; pH 7,2; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất và môi trường hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

- *Môi trường Chapman lỏng* (môi trường cực mặn): pepton 20 g; cao thịt 5 g; lactoza 15 g; NaCl 75 g; pH 7,4; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất và môi trường hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu để tạo thành một thể đồng nhất và pha loãng mẫu nếu thấy cần thiết. Trong trường hợp dự đoán là là lượng *St.aureus* ít thì có thể nuôi cấy tăng sinh như sau: lấy 1ml mẫu nguyên hay 1 ml dịch huyền phù (nếu mẫu ở dạng rắn) cho vào ống nghiệm có chứa 9 ml môi trường Chapman lỏng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C, 24 h. Nếu nhìn thấy có sự phát triển của của vi sinh vật (môi trường bị đục) thì tiếp tục các thí nghiệm tiếp theo.

- Cho 0,05 ml hoặc 1 giọt mẫu đã pha loãng hay mẫu đã qua nuôi cấy tăng sinh và cấy lên bề mặt môi trường thạch Chapman, hoặc Baird-Parker và trang đều (nên làm đồng thời ít nhất 2 ống cùng một lúc cho mỗi nồng độ pha loãng).

- Nuôi trong tủ ấm ở 37°C trong 24 - 72 h.

Quan sát khuẩn lạc mọc trên đĩa. Trên môi trường thạch Chapman, đếm các khuẩn lạc màu vàng, nhỏ (1 - 2 mm). Còn trên môi trường thạch Baird-Parker, đếm các khuẩn lạc màu đen bóng, có một mép viền màu trắng xám, xung quanh khuẩn lạc có một vùng sáng trong, rộng (trong khi đó bề mặt môi trường đục). Nếu kiểm tra các khuẩn lạc trên dưới kính hiển vi là vi khuẩn Gram (+), tạo thành từng chùm như các chùm nho thì có thể nghi ngờ đây là *St.aureus* và nên làm phép thử coagulase để khẳng định.

Phép thử khẳng định

- Chọn khuẩn lạc nghi ngờ, dùng que cấy vòng cấy chuyển sang các ống nghiệm có chứa 0,5 ml dịch huyết tương thỏ. Lắc nhẹ để trộn đều môi trường.

Để các ống đã cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 2 h. Theo dõi phản ứng đông huyết tương sau mỗi 2 h. Tiếp tục nuôi cấy đến 24 h thì ngừng nếu không thấy xuất hiện khối kết tụ.

5. Kết quả

Dựa vào số khuẩn lạc nghi ngờ là *St.aureus* đã đếm được trên các đĩa Petri và dựa vào tỷ lệ số ống thử phản ứng coagulase dương tính trên tổng số ống thử phản ứng, áp dụng công thức dưới đây để tính số lượng *St.aureus* trung bình có trong 1 ml hay 1 g mẫu:

$$N \text{ (khuẩn lạc/g hay khuẩn lạc/ml)} = \frac{\sum C}{n \times f \times v} \times R$$

trong đó:

$\sum C$ - tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa;

n - số đĩa Petri đã nuôi cấy;

f - hệ số pha loãng của mẫu;

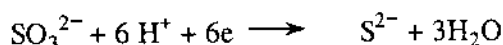
v - thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa Petri;

R - số ống thử phản ứng coagulase dương tính / tổng số ống thử .

15.5. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Clostridium là trực khuẩn, có thể đứng riêng rẽ hoặc thành chuỗi, là vi khuẩn Gram dương, yếm khí bắt buộc, có khả năng khử sulfite thành sulfua, bào tử hình trứng và chịu nhiệt cao tới $75 - 80^{\circ}\text{C}$. *Clostridium perfringens* rất bền với cycloserin.

Clostridium và *Cl.perfringens* có thể khử sulfite thành sulfua như sau:



Kiểm tra vi khuẩn kỵ khí khử sulfite nhằm tìm *Clostridium* hoặc bào tử của chúng, đặc biệt là *Clostridium perfringens* - đó là loài vi khuẩn gây độc trong sản phẩm thực phẩm. Các vi khuẩn *Clostridium* ưa nhiệt được tìm thấy trong các loại đồ hộp thực phẩm, nơi mà chúng có thể sinh sôi dễ dàng, vì chỉ có các bào tử của vi khuẩn này vẫn sống sót sau khi đun nóng.

Sự có mặt vi khuẩn này trong sản phẩm thực phẩm biểu thị sự nhiễm phân khô từ các nguồn đất, nước, và đây là loài vi khuẩn có khả năng gây bệnh.

1. Nguyên tắc

Dựa trên tính chất của các vi khuẩn này là khi nuôi cấy trong môi trường chọn lọc (môi trường thạch trypton sulfit cycloserin hoặc Winson Blair) ở điều kiện kỵ khí, các vi khuẩn này có khả năng phân giải sulfit thành sulfua làm cho khuẩn lạc có màu đen, tròn, to, đường kính 3 - 4 mm.

2. Dụng cụ, thiết bị

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo...).
- Hộp Petri, pipet.

3. Hoá chất, môi trường

- Dung dịch trypton muối : Hoà tan 1 g trypton và 8,5 g muối NaCl với 1000 ml nước cất.

- *Môi trường thạch TSC (trypton sulfit cycloserin):* trypton 15 g; cao nấm men 5 g; soyton 5 g; sắt amoni xitrat 1 g; natri metabisulfat 1 g; thạch 20 g; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, pH cuối = 7,6 ở nhiệt độ 25°C.

- *Dung dịch D-cycloserin:* hoà tan 1 g D-cycloserin với 200 ml nước cất. Lọc và bảo quản 4°C. Trước khi làm thí nghiệm, cho 20 ml dung dịch D-cycloserin vào 250 ml môi trường TSC thạch, đun nóng chảy và đổ đĩa Petri.

- *Môi trường lỏng thioglycollat + resazurin natri:* trypton 15 g; cao nấm men 5 g; L-cystin 0,5 g; dextroza 5 g; NaCl 2,5 g; natri thioglycollat 0,5 g; dung dịch resazurin natri mới pha (1:1000) 1 ml; thạch 0,75 g; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan L-cystin, dextroza, cao nấm men và trypton trong gần 1 l nước cất, đun nóng trong nồi cách thuỷ cho tan. Bổ sung natri thioglycollat và dung dịch resazurin natri. Lắc đều và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, pH cuối = 7,1 ở nhiệt độ 25°C.

- *Môi trường lactoza-gelatin:* trypton 15 g; cao nấm men 10 g; lactoza 10 g; đỏ phenol 0,05 g; gelatin 12 g; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan trypton, cao nấm men, và lactoza với 500 ml nước nóng. Hoà tan gelatin cũng với 500 ml nước nóng 50 - 60°C. Trộn 2 dung dịch với nhau và chỉnh pH = 7,5. Cho thêm chỉ thị đỏ phenol, cho vào các ống nghiệm và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 10 phút.

- *Môi trường Winson Blair*: glucoza 20 g; pepton 5 g; cao nấm men 2,5 g; cao thịt 1 g; NaCl 5 g; thạch 20 g; H₂O cho đủ 1000 ml, Na₂SO₃ 20% và NH₄Fe(SO₄)₂ 5%.

Chuẩn bị môi trường gồm các chất nói trên, phân phối vào các ống nghiệm, hấp khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong 15 phút. Khi nào dùng thì đem các ống thạch đun cho tan chảy và bổ sung vào mỗi ống 2 ml Na₂SO₃ 20% và 5 giọt dung dịch NH₄Fe(SO₄)₂ 5%.

15.5.1. Nuôi cấy trong đĩa thạch

1. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu và dịch pha loãng mẫu:

- Cân 25 g mẫu (hoặc lấy 25 ml) cho vào bình tam giác có chứa sẵn 225 ml dung dịch trypton muối. Lắc đều và thu được mẫu có độ pha loãng 10⁻¹. Hút 1 ml dịch pha loãng 10⁻¹ cho vào ống nghiệm đã có 9 ml dung dịch trypton muối. Lắc đều và thu được mẫu có độ pha loãng 10⁻².

- Cấy trong môi trường thạch:

+ Cho khoảng 6-8 ml môi trường TSC thạch nóng chảy vào đĩa Petri, lắc cho thạch dàn đều trên mặt đĩa (môi trường TSC thạch đã có bổ sung D-cycloserin). Nên làm đồng thời ít nhất 2 đĩa cùng một lúc cho mỗi nồng độ pha loãng.

+ Khi thạch đã đông, lấy 1 ml mẫu đã pha loãng cho lên mặt thạch và cho tiếp 15 ml môi trường TSC thạch vào. Lắc đều cho thạch phủ khắp mặt đĩa.

+ Khi thạch đông chặt, lật ngược đĩa cho vào các túi kỵ khí và cho vào tủ ẩm nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 h.

+ Sau 24 h đếm các khuẩn lạc màu đen, tròn, lồi, bờ đều và nhẵn. Từ kết quả này tính được số khuẩn lạc có trong 1 g hay 1 ml mẫu sản phẩm.

Phép thử khẳng định

Để khẳng định chắc chắn các khuẩn lạc vừa đếm ở trên là *C. perfringens* thì nên làm thêm các bước sau :

- Chọn khuẩn lạc điển hình nói trên (khuẩn lạc màu đen, tròn, lồi, bờ đều và nhẵn) và cấy vào ống nghiệm có chứa môi trường lỏng thioglycollat + resazurin natri. Nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 h trong điều kiện hoàn toàn yếm khí. Sau 24 h thu được canh trường thuần nhất.

- Xác định hình thể và tính chất: Từ canh trường thuần nhất nói trên, lấy mẫu quan sát hình dáng tế bào và nhuộm Gram. *C. perfringens* là trực khuẩn và Gr (+).

- Thử tính chất lên men đường lactoza-gelatin: Từ canh trường thuần nhất nói trên, lấy 1 vòng que cấy cho vào ống nghiệm có chứa môi trường lactoza-gelatin. Nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24 h. Quan sát khả năng lên men đường lactoza, sinh khí trong quá trình lên men và khả năng hoá lỏng gelatin.

2. Kết quả

Tính số *C. perfringens* có trong 1 g hay 1 ml sản phẩm bằng cách lấy trung bình cộng số khuẩn lạc nghi ngờ có trong các đĩa thạch, sau đó nhân với tỷ lệ giữa số ống nghiệm có chứa môi trường lỏng thioglycollat + resazurin natri đã nuôi cấy có kết quả dương tính và tổng số ống nghiệm có chứa môi trường lỏng thioglycollat + resazurin natri đã nuôi cấy và có tính đến cả nồng độ pha loãng.

15.5.2. Nuôi cấy trong ống thạch

1. Tiến hành

- Chuẩn bị mẫu và dịch pha loãng mẫu giống như phần trên

- Lấy các ống thạch có chứa môi trường Winson Blair, đun cho tan chảy, để nguội tới nhiệt độ 50°C và cho 1 ml mẫu nguyên hoặc đã pha loãng cho vào các ống nghiệm nói trên (nên làm đồng thời ít nhất 2 ống cùng một lúc). Bổ sung vào mỗi ống 2 ml dung dịch Na_2SO_3 20% và 5 giọt dung dịch $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 5%.

- Đặt các ống nghiệm đã cấy vào nồi cách thủy ở 75°C trong 10 phút, lấy ra và làm lạnh ngay bằng nước lạnh để làm đông nhanh môi trường thạch.

- Nuôi trong tủ ấm ở 37°C trong 48 - 72 giờ.

Để khẳng định chắc chắn các khuẩn lạc vừa đếm ở trên là *C. perfringens* thì nên làm thêm các phép thử nghiệm giống như trên.

2. Kết quả

Sau thời gian nuôi cấy khoảng 48 - 72 h, đếm các khuẩn lạc tròn, đen, mọc trong khoảng 1/3 chiều cao cột thạch kể từ dưới đáy lên. Tính số khuẩn lạc cho 1 g hoặc 1 ml sản phẩm.

15.6. *SALMONELLA*

Salmonella là loại trực khuẩn, Gram (-), yếm khí tuỳ tiện, tế bào nhỏ, dài 2 - 3 μm , không tạo bào tử. Đây là vi khuẩn có khả năng gây các bệnh rất trầm trọng, hiểm nghèo. Kiểm tra phát hiện chúng cho phép ngăn chặn mối nguy hiểm có thể có trong các sản phẩm thực phẩm như thịt, cá, trứng, sữa...

1. Nguyên tắc

Số lượng *Salmonella* thường rất ít trong thực phẩm. Có thể tăng số lượng có trong mẫu lên bằng cách nuôi cấy trên môi trường tăng sinh, ở nhiệt độ thích hợp (43°C). Sau đó nuôi cấy trong môi trường chọn lọc đặc hiệu để nhận biết các khuẩn lạc nghi ngờ là *Salmonella*. Để có kết luận chắc chắn khuẩn lạc đó có phải là vi khuẩn *Salmonella* hay không thì nên dùng các phép thử kiểm tra đặc tính sinh hoá của các khuẩn lạc nghi ngờ nói trên.

2. Dụng cụ, thiết bị

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo...);
- Ống nghiệm 18 × 180 mm;
- Hộp Petri;
- Pipet 1 và 10 ml.

3. Hoá chất - môi trường nuôi cấy

- Dung dịch đệm pepton: pepton 5 g; NaCl 5 g; Na_2HPO_4 9 g; KH_2HPO_4 1 g; pH = 7; H_2O cho đủ 1000 ml. Phân phối vào các bình thích hợp và thanh trùng bằng nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20'.

- Môi trường RV (Rappaport-Vassiliadis, môi trường magie clorua-lục malachit):

+ Dung dịch A: trypton 4,5 g; NaCl 7,2 g; KH_2HPO_4 1,5g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng đến khoảng 70°C.

+ Dung dịch B: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 36 g; H_2O cho đủ 1000 ml.

+ Dung dịch C: oxalat lục malachit 0,4 g; H_2O cho đủ 100 ml.

+ Cho 100 ml dung dịch B và 10 ml dung dịch C vào 1000 ml dung dịch A. Thanh trùng bằng nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20'. Bảo quản môi trường trong tủ lạnh.

- *Môi trường selenit - xystin:*

+ Dung dịch cơ bản: trypton 5 g; lactoza 4 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10 g; NaHSeO_3 4 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan 3 thành phần đầu tiên trong nước bằng cách đun sôi trong 5 phút. Sau khi làm nguội cho thêm natri hydro selenit, chỉnh pH đến 7 nếu cần.

+ Dung dịch L-xystin: L-xystin 0,1 mg; NaOH 1M 15 ml; H_2O vô trùng cho đủ 100 ml.

+ Làm nguội 1000 ml dung dịch cơ bản và cho thêm một cách vô trùng 10 ml dung dịch L-xystin. Dùng môi trường này trong 1 ngày.

- *Môi trường thạch đỏ phenol - lục sáng:*

+ Dung dịch cơ bản: pepton 9 g; cao nấm men 3 g; cao thịt 4,5 g; Na_2HPO_4 1 g; NaH_2PO_4 0,6 g; NaCl 5 g; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất trong nước, nếu cần có thể đun nóng. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Chỉnh pH đến 7 nếu cần.

+ Dung dịch đỏ phenol-đường: lactoza 10 g; sacaroza 10 g; đỏ phenol 0,09 mg; H_2O cho đủ 100 ml ; pH = 6,9. Hoà tan các chất trên trong nước và định mức 100 ml. Đun trong nồi cách thuỷ ở nhiệt độ 70°C trong 20 phút, sau đấy để nguội tới nhiệt độ 55°C .

+ Dung dịch lục sáng: Lục sáng 0,5g; H_2O cho đủ 100 ml.

+ Cho 1 ml dung dịch lục sáng vào 100 ml dung dịch đỏ phenol có nhiệt độ 55°C . Cho tất cả vào 900 ml dung dịch cơ bản. Cho môi trường vào các đĩa Petri, khử trùng bằng nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20'.

- *Môi trường XLD (xylose lysine desoxycholate):* Cao nấm men 3 g; L-lysine 5 g ; xylose 3,75 g; lactoza 7,5 g; sucroza 7,5 g; desoxycholat natri 2,5 g; ferric amoni citrat 0,8 g; NaCl 5g ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 6,8 g; đỏ phenol 80 mg; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000ml. Đun sôi môi trường, không hấp. để nguội và đổ đĩa Petri. Chỉ dùng trong 1 ngày. Chỉnh pH đến 7 (nếu cần).

- *Môi trường DCLS (desoxycholat citrat lactoza saccaroza):* pepton 10 g; lactoza 10 g; saccaroza 10 g; citrat natri 10,5 g; desoxycholat 2,5 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5 g; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml; đỏ phenol 30 mg.

- Hoà tan các chất trong nước, nếu cần có thể đun nóng. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Chỉnh pH đến 7,3 - 7,4 (nếu cần).

- *Môi trường Hektoen*: pepton 12 g; cao nấm men 3 g; lactoza 12 g; saccaroza 10 g; NaCl 5 g; citrat sắt III 0,3 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,5 g; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml; đỏ phenol 25 mg. Hoà tan các chất trong nước, nếu cần có thể đun nóng. Thanh trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 10 phút. Chỉnh pH đến 7,4 (nếu cần).

- *Môi trường thạch TSI* (triple sugar iron): pepton 20 g; cao nấm men 3 g; cao thịt 3 g; lactoza 10 g; saccaroza 10 g; glucoza 1 g; citrat sắt III 1,5 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,3 g; NaCl 5 g; đỏ phenol 24 mg; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml.

- Hoà tan các chất trong nước, nếu cần có thể đun nóng. Cho môi trường vào các ống nghiệm và khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Chỉnh pH đến 7,5 (nếu cần).

- *Môi trường thạch ure*:

+ Dung dịch cơ bản: pepton 1 g; glucoza 1 g; NaCl 5 g; KH_2PO_4 2 g; thạch 15 g; Đỏ phenol 12 mg; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất trong nước, nếu cần có thể đun nóng. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Chỉnh pH đến 6,8 (nếu cần).

+ Dung dịch ure: ure 400 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan ure trong nước. Thanh trùng bằng phương pháp lọc

+ Làm nóng chảy 950 ml dung dịch cơ bản, để ở nhiệt độ 45°C và cho 50 ml dung dịch ure vào. Phân phối môi trường trên vào các ống nghiệm vô trùng và đặt nằm nghiêng. Khi môi trường đã đông hoàn toàn thì cất tủ lạnh để sử dụng.

- *Môi trường L-lysin decarboxyl*: L-lysin monohydroclorua 5 g; Cao nấm men 3 g; glucoza 1 g; tím bromocresol 15 mg; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất trong nước, nếu cần có thể đun nóng. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 10 phút. Chỉnh pH đến 6,8 nếu cần.

- Dung dịch thử β -galactosidaza:

+ Dung dịch đệm: NaH_2PO_4 6,9 g; NaOH 10 M 3ml; H_2O cho đủ 50 ml. Hoà tan NaH_2PO_4 với 45 ml nước trong bình định mức 50 ml, dùng dung dịch NaOH 10M để chỉnh pH đến 7, thêm nước định mức tới gần bình.

+ Dung dịch ONPG: *o*-nitrophenol β -*o*-galactopyranosidaza (ONPG) 0,08 mg; H_2O cho đủ 15 ml. Hoà tan ONPG trong nước $50 \pm 1^\circ\text{C}$.

- + Để nguội 15 ml dung dịch ONPG và cho 5 ml dung dịch đệm vào.
- Dung dịch thử phản ứng VP (Voges-Proskauer):
 - + *Môi trường VP*: pepton 7 g; glucoza 5 g; KH_2PO_4 5 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, chuyển môi trường vào các ống nghiệm và khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 115°C trong 20 phút. Chỉnh pH đến 6,9 (nếu cần).
 - + Dung dịch creatin (N-amidinnosacodin): hoà tan 0,5 g creatin ngâm 1 phần tử nước vào 100 ml nước cất.
 - + Dung dịch 1-naphtol: hoà tan 6 g 1-naphtol vào 100 ml cồn etylic 96% v/v.
 - + Dung dịch KOH: hoà tan 40 g KOH vào 100 ml nước.
- *Môi trường Tryptophan-trypton*: trypton 10 g; NaCl 5 g; DL-tryptophan 1 g; H_2O cho đủ 1000ml. Hoà tan các thành phần trong nước nóng 100°C , chuyển môi trường vào các ống nghiệm và khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Chỉnh pH đến 7,5 (nếu cần).
- Thuốc thử indol: 4-dimethylaminobenzaldehyt 5 g; 2-metyl butan-1-ol (hoặc pentan-1-ol) 75 ml; HCl đậm đặc 25 ml. Hoà tan 4-dimethylaminobenzaldehyt trong 2-metyl butan-1-ol (hoặc pentan-1-ol), có thể đun nhẹ trong nồi cách thuỷ $t = 50 - 55^\circ\text{C}$. Làm nguội và cho axit vào. Bảo quản chỗ tối và ở nhiệt độ thấp. Thuốc thử có màu vàng sáng.

4. Tiến hành

- a) *Nuôi cấy tăng sinh sơ bộ trên môi trường tăng sinh không chọn lọc*
 - Lấy mẫu sản phẩm (thường 25 g hoặc 25 ml) cho vào bình cầu đã chứa 225 ml dung dịch đệm peptone nuôi trong tủ ấm ở 37°C trong thời gian 24 h.
- b) *Nuôi cấy tăng sinh trên môi trường tăng sinh chọn lọc*
 - Lấy 0,1 ml dịch vừa nuôi cấy cho vào ống nghiệm có chứa 10 ml môi trường RV, đồng thời lấy 10 ml dịch vừa nuôi cấy cho vào bình cầu có chứa 100 ml môi trường selenit - xystin
 - Môi trường RV đã cấy được nuôi trong tủ ấm ở 42°C trong 24 h còn môi trường selenit - xystin đã cấy nuôi trong tủ ấm ở 37°C trong 24 – 48 h.
- c) *Nuôi cấy trên môi trường thạch và nhận dạng*
 - Lấy 1 vòng que cấy dịch vừa nuôi cấy (sau 24 h) trong môi trường tăng

sinh RV và cấy lên bề mặt đĩa Petri đã có chứa môi trường thạch đỏ phenol-lục sáng (hoặc môi trường XLD) và cấy sao cho sẽ thu được những khuẩn lạc tách riêng biệt. Tiến hành tương tự như vậy đối với môi trường rắn chọn lọc DCLS hoặc Hektoen.

- Lấy dịch vừa nuôi cấy trong môi trường tăng sinh selenit – xystin và lặp lại quy trình cấy như vừa nói ở trên với cả 2 môi trường thạch đỏ phenol-lục sáng và môi trường DCLS hoặc Hektoen.

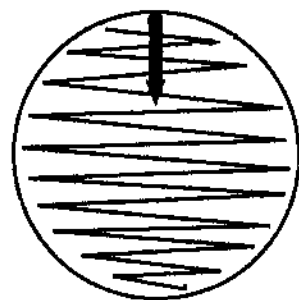
- Lật ngược các đĩa Petri lại, nuôi trong tủ ẩm ở nhiệt độ 37°C trong 24 h. Quan sát sự hình thành các khuẩn lạc *Salmonella* điển hình ở trên các đĩa.

Chú ý:

- Môi trường rắn chọn lọc đỏ phenol-lục sáng là môi trường thứ nhất, không thể thiếu được trong kiểm tra, dùng để nhận biết khuẩn lạc *Salmonella*, còn môi trường rắn chọn lọc thứ 2 có thể dùng môi trường DCLS hoặc Hektoen.

- Nếu dùng hộp Petri lớn (đường kính 140 mm) thì chỉ dùng 1 hộp còn nếu dùng hộp bé (đường kính 90 mm) thì dùng 2 hộp cho mỗi loại môi trường.

- Dùng kỹ thuật cấy trên môi trường thạch như sau: lấy 1 giọt ở ngay trên bề mặt môi trường tăng sinh đã nuôi cấy và đặt ở mép trên bề mặt thạch của đĩa cấy. Rạch một đường dài lên bề mặt đĩa khoảng vài centimet, sau đấy cấy rìa các đường vuông góc cho tới hết đĩa, các đường cấy cách nhau khoảng 5 mm (hình 15.1). Trong trường hợp dùng 2 hộp bé thì sau khi cấy xong đĩa thứ nhất, chuyển sang cấy lên đĩa thứ 2 cũng như vậy mà không lấy thêm dịch.



Hình 15.1: Cấy *Salmonella*.

Phép thử khẳng định sinh hoá

Kiểm tra các đĩa và từ mỗi đĩa chọn ra 5 khuẩn lạc nghi ngờ có các hình dáng như :

- Trên môi trường thạch đỏ phenol-lục sáng thì các khuẩn lạc nghi ngờ có màu đỏ. Còn nếu sử dụng môi trường XLD thì các khuẩn lạc nghi ngờ có màu hồng trong suốt.

- Trên môi trường DCLS thì các khuẩn lạc nghi ngờ thường không có màu hoặc màu vàng nhạt, có hoặc không có phần giữa màu đen. Còn nếu dùng môi trường Hektoen thì các khuẩn lạc nghi ngờ thường có màu xanh lá cây hoặc xanh da trời với tâm màu đen hoặc không.

- Dùng que cấy, cấy từng khuẩn lạc nghi ngờ vào các môi trường thử kháng định hoá sinh như :

+ Thử nghiệm lên men đường glucoza, lactoza, sucroza và sinh H_2S : Dùng ống thạch nghiêng có chứa môi trường TSI, cấy trên bề mặt môi trường và cấy sâu xuống đáy ống thạch nghiêng. Nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ trong 24 h. Trong môi trường này, Salmonella chỉ lên men đường glucoza nhưng không lên men lactoza và sucroza do đó sẽ quan sát phần đáy ống nếu có màu vàng chứng tỏ có lên men đường glucoza (phản ứng dương tính), còn trên bề mặt nghiêng lại có màu đỏ. Nếu có sinh H_2S thì thấy xuất hiện các vết màu đen trong môi trường và có hiện tượng tạo khí làm nứt hoặc vỡ thạch.

+ Thử nghiệm phân giải ure: Cấy rìa trên bề mặt ống thạch nghiêng có chứa môi trường ure. Nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ trong 24 h và kiểm tra thường xuyên. Salmonella không phân giải ure nên không làm thay đổi pH nên môi trường vẫn giữ nguyên màu vàng. Nếu phản ứng dương tính thì ure bị phân giải và giải phóng amoni làm chuyển màu đỏ phenol thành màu hoa hồng sau đó chuyển sang màu đỏ thẫm. Phản ứng xuất hiện sau 2 h nuôi cấy.

+ Thử nghiệm phân giải lysine: Cấy trong môi trường L-lysine decarboxyl lỏng và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ trong 24 h. Xuất hiện màu đỏ tía hay màu tím sau khi nuôi cấy chứng tỏ phản ứng dương tính.

+ Thử nghiệm β -galactosidaza: hoà một vòng que cấy từ khuẩn lạc nghi ngờ vào ống nghiệm có chứa 0,25 ml dung dịch muối 0,85 %. Thêm 1 giọt toluen, lắc đều và đặt ống nghiệm vào nồi cách thuỷ ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ trong vài phút. Sau đó cho 0,25 ml dung dịch thử β -galactosidaza, lắc đều và đặt lại ống nghiệm vào nồi cách thuỷ vẫn ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ trong 24 h. Phản ứng dương tính cho màu vàng, thường xuất hiện sau 20 phút.

+ Thử nghiệm VP (Voges-Proskauer): hoà một vòng que cấy từ khuẩn lạc nghi ngờ vào ống nghiệm có chứa 0,2 ml môi trường VP. Nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ $37^{\circ}C$ trong 24 h. Tiếp theo cho thêm hai giọt dung dịch creatin, ba giọt 1-naphton pha trong cồn và sau đó cho hai giọt dung dịch KOH, lắc đều khi cho

tung loại dung dịch thử. Phản ứng dương tính là khi xuất hiện màu hồng đến màu đỏ tươi trong vòng 15 phút.

+ Môi trường thử phản ứng indol: Cấy từ khuẩn lạc nghi ngờ vào ống nghiệm có chứa 5 ml môi trường trypton-tryptophan. Nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong 24 h. Tiếp theo cho thêm 1 ml thuốc thử Kovacs. Phản ứng dương tính là có một vòng màu đỏ trên bề mặt lớp dịch của ống nghiệm. Phản ứng âm tính là vòng màu nâu vàng.

5. Kết quả

Quan sát các kết quả thử nghiệm của các phép thử khẳng định sinh hoá. Dựa vào phần kết quả để kết luận có hay không *Salmonella* có trong mẫu phân tích. Các đặc tính sinh hóa của *Salmonella* thường có được liệt kê trong bảng 15.1.

Bảng 15.1: Các đặc tính sinh hóa của *Salmonella*

Phép thử sinh hoá	Phản ứng	Tỷ lệ chủng <i>Salmonella</i> có phản ứng (%)
- Trong môi trường TSI :		
▪ Hình thành axit từ glucoza	+	100
▪ Sinh khí từ glucoza	+	91,9
▪ Lên men lactoza	-	99,2
▪ Lên men sucroza	-	99,5
▪ Sinh H ₂ S	+	91,6
- Phân giải ure	-	99
- Phân giải lysin	+	94,6
- Phản ứng β-galactosidaza	-	98,5
- Phản ứng VP	-	100
- Phản ứng indol	-	98,9

15.7. STREPTOCOCCUS FAECALI

Streptococcus faecali (tên ngày nay là vi khuẩn đường ruột *Enterococcus*) là những liên cầu khuẩn, hình cầu hoặc hình oval, Gram (+), không tạo bào tử, sống được cả trong điều kiện hiếu khí tùy ý hay yếm khí. Vi khuẩn này được tìm thấy trong phân người và gia súc, sự có mặt của chúng biểu thị sự nhiễm phân, chứng tỏ tình trạng kém vệ sinh trong sản xuất.

1. Nguyên tắc

Đếm số lượng vi khuẩn này trong các môi trường lỏng chọn lọc.

Vì số lượng liên cầu khuẩn thường có ít trong mẫu do đó trong thời gian đầu nuôi cấy trên dùng môi trường đặc hiệu - môi trường Rothe để tăng sinh. Nếu môi trường bị đục cho phép rút ra kết luận rằng trong những ống nghiệm vừa nuôi cấy có liên cầu khuẩn phân. Để khẳng định giả thiết này, trong giai đoạn hai đã tiếp tục nuôi cấy trong môi trường Litsky có chứa hai tác nhân lựa chọn (azid và ethyl – violet hoặc violet Hexamethyl).

2. Dụng cụ, thiết bị

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo ...).
- Ống nghiệm.
- Hộp Petri.
- Pipet 1 và 10 ml.

3. Hoá chất và môi trường nuôi cấy

- *Môi trường Rothe nồng độ đơn*: pepton 20 g; glucoza 5 g; chất ức chế azid 0,2 g; NaCl 5 g; K_2HPO_4 2,7 g; KH_2PO_4 2,7 g; pH = 6,8; H_2O cho đủ 1000 ml. Thanh trùng bằng nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong thời gian 20'.

- *Môi trường Rothe nồng độ kép*: pepton 40 g; glucoza 10 g; chất ức chế azid 0,4 g; NaCl 10 g; K_2HPO_4 5,4 g; KH_2PO_4 5,4 g; pH = 6,8; H_2O cho đủ 1000 ml. Thanh trùng bằng nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong thời gian 20'.

- *Môi trường Litsky*: là môi trường Rothe nồng độ đơn có bổ sung thêm ethyl violet 0,5 g

- *Môi trường TSA* (Trypton Soy Agar): trypticase pepton 15 g; phypton pepton 5 g; NaCl 5 g; pH = 7,2; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Thanh trùng bằng nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong thời gian 15 phút.

4. Tiến hành

a) *Bước 1*: Nuôi cấy tăng sinh trên môi trường chọn lọc Rothe :

- Lấy 10 ml sản phẩm cho vào ống nghiệm chứa môi trường Rothe nồng độ kép, làm 5 ống đồng thời.

- Lấy 1 ml mỗi dịch pha loãng (từ 10^{-1} đến 10^{-3}) cho vào ống nghiệm chứa môi trường Rothe nồng độ đơn.

- Nuôi cấy ở nhiệt độ $37^\circ C$ từ 24 ÷ 48 h. Quan sát độ đục trong ống nghiệm.

b) *Bước 2*: Nuôi cấy trên môi trường chọn lọc Listky để khẳng định.

- Lắc những ống nghiệm vừa nuôi cấy trên môi trường Rothe bị đục do vi sinh vật.

- Cấy chuyển bằng quai cấy (que cấy hình quai) từ mỗi ống nghiệm nói trên vào các ống nghiệm có chứa môi trường Litsky.

- Nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C từ 24 ÷ 48 h.

- Sau thời gian nuôi cấy, nếu môi trường bị đục đồng đều với hạt có màu tím (không cố định) ở dưới đáy ống chứng tỏ trong ống nghiệm có chứa ít nhất là một tế bào *Streptococcus faecalis*.

5. Kết quả

Dựa trên các kết quả thu được mà kết luận trong mẫu phân tích có hay không liên cầu khuẩn.

15.8. BACILLUS CEREUS

Bacillus cereus là trực khuẩn, Gr (+), hiếu khí và kỵ khí tùy tiện, di động, tạo bào tử, lên men glucoza, tạo khí, phản ứng VP (+), có khả năng sử dụng nitrat và có phản ứng dương tính với lòng đỏ trứng. *Bacillus cereus* thường có trong các sản phẩm ngũ cốc như gạo, thịt, sữa.

1. Nguyên tắc

Bacillus cereus được phát hiện và định lượng bằng cách nuôi cấy mẫu trên môi trường chọn lọc Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin (MYP). Môi trường này có polymyxin là chất đặc hiệu. Chọn khuẩn lạc màu hồng điển hình và tiếp tục khẳng định dựa trên các đặc tính sinh hoá như lên men glucoza, tạo khí, phản ứng VP (+), khử nitrat thành nitrit...

2. Dụng cụ, thiết bị

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo ...).

- Hộp Petri, pipet 1 và 10 ml.

3. Hoá chất - môi trường nuôi cấy

- Dung dịch đệm phosphat: Hoà tan 34 g KH_2PO_4 với 500 ml nước cất. Dung NaOH 1N để chỉnh dung dịch về pH = 7,2 và cho nước cất để đủ 1000 ml. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút. Bảo quản tủ lạnh. Khi cần sử dụng thì lấy 1,5 ml dung dịch đệm phosphat nói trên cho vào bình định

mức 100 ml và dùng nước cất định mức đến gần bình. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

- *Môi trường thạch Manitol-Egg-Yolk- Polymyxin (MYP):*

+ *Môi trường Mossel:* pepton 10 g; cao thịt 1 g; manitol 10 g; NaCl 10 g; đỏ phenol 25 mg; pH = 7,2; thạch 15 g; H₂O cho đủ 900 ml. Hoà tan các chất bằng cách đun nóng. Chính pH đến 7,2 và khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

+ Chuẩn bị dung dịch polymyxin 0,1 % và bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

+ Nhũ hoá lòng đỏ trứng gà 50 % : rửa sạch và vô trùng quả trứng gà bằng cồn. Chỉ lấy lòng đỏ trứng và trộn thật đều với nước muối 0,85 % với khối lượng bằng nhau.

+ Cho 10 ml dung dịch polymyxin 0,1 % và 50 ml nhũ hoá lòng đỏ trứng vào môi trường Mossel nóng chảy. Trộn đều và cho vào các đĩa Petri, để nguội ở nhiệt độ phòng và sau 24 h dùng trong thí nghiệm.

- *Môi trường glucoza-phenol đỏ:* pepton 10 g; glucoza 10 g; NaCl 5 g; cao thịt 1 g; phenol đỏ 18 mg (7 ml của dung dịch phenol đỏ 0,25%) ; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các thành phần trong nước, chuyển môi trường vào các ống nghiệm và khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 115°C trong 15 phút. Chính pH đến 7,4 nếu cần.

- *Dung dịch thử phản ứng Voges-Proskauer, VP:*

+ *Môi trường VP:* pepton 7 g; glucoza 5 g; KH₂PO₄ 5 g; H₂O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, chuyển môi trường vào các ống nghiệm và khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 115°C trong 20 phút. Chính pH đến 6,9 nếu cần.

+ *Dung dịch creatin (N-amidinnosacodin):* hoà tan 0,5 g creatin ngậm một phân tử nước vào 100 ml nước cất.

+ *Dung dịch 1-naphtol:* hoà tan 6 g 1-naphtol vào 100 ml cồn etylic 96 % v/v.

+ *Dung dịch KOH:* hoà tan 40 g KOH vào 100 ml nước.

- *Thuốc thử phát hiện nitrit:*

+ *Thuốc thử A:* Hoà tan 1 g axit sulfanilic với 125 ml axit axetic 5 N.

+ *Thuốc thử B:* Hoà tan 0,25 g N-(1-naphthyl) ethylendiamin với 200 ml axit axetic 5 N.

+ Thuốc thử C : Hoà tan 1 g α -naphthon với 200 ml axit axetic 5 N.

- Môi trường *Trypticase Soy Polymyxin (TSP)*:

+ Trypticase pepton 15 g; phyton pepton 3 g; NaCl 5 g; KH_2PO_4 2,5 g; glucoza 2,5 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất bằng cách đun nóng. Cho vào mỗi ống nghiệm 15 ml và khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

+ Chuẩn bị dung dịch polymyxin 0,1 % và bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

+ Khi cần dùng lấy 0,1 ml dung dịch polymyxin 0,1 % và cho vào các ống nghiệm có chứa 15 ml canh trường nuôi cấy trên, trộn đều.

15.8.1. Đếm khuẩn lạc

1. Tiến hành

a) Nuôi cấy trên môi trường thạch MYP và quan sát khuẩn lạc

- Chuẩn bị và pha loãng mẫu trong dung dịch đệm phosphat.

- Lấy 0,1 ml mẫu nguyên hoặc đã pha loãng và cấy trên đĩa Petri có chứa môi trường thạch MYP. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 - 48 h.

- Quan sát và đếm những khuẩn lạc đỏ hồng, xung quanh có vòng đục, đục, bờ hình răng cưa và đường kính 2-3 mm. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ để thử nghiệm khẳng định nhờ các tính chất sinh hoá.

b) Thử nghiệm khẳng định

- Nhuộm Gram: nếu đúng là *Bacillus cereus* thì đây là trực khuẩn G (+), xếp thành chuỗi

- Khả năng lên men đường glucoza: cấy các khuẩn lạc nghi ngờ vào môi trường glucoza-phenol đỏ. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 h. Quan sát sự đổi màu của ống thử từ đỏ sang vàng.

- Khả năng khử nitrat thành nitrit: cấy các khuẩn lạc nghi ngờ vào môi trường VP và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 h. Cho 0,3 - 0,5 ml thuốc thử A và B vào canh trường nuôi cấy. Nếu có màu đỏ tím thì chứng tỏ nitrit đã được tạo thành.

- Phản ứng VP (+): cấy các khuẩn lạc nghi ngờ vào ống nghiệm có chứa môi trường VP. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 h. Nhỏ 0,6 ml dung dịch 1-naphthol và 0,2 ml KOH 40 % và sau 1 h quan sát màu. Thử nghiệm VP (+) khi có xuất hiện màu hồng đến màu đỏ tươi trong vòng 15 phút trên bề mặt môi trường và VP (-) khi bề mặt môi trường không đổi màu.

2. Kết quả

Dựa vào số khuẩn lạc nghi ngờ là *Bacillus cereus* đã đếm trên các đĩa Petri, nồng độ pha loãng và dựa vào tỷ lệ số khuẩn lạc được khẳng định là *Bacillus cereus* với tổng số khuẩn lạc dùng trong phép thử khẳng định để tính số lượng *Bacillus cereus* trung bình có trong 1ml hay 1g mẫu.

15.8.2. Phương pháp MPN

Phương pháp này sử dụng khi mẫu thực phẩm chứa rất ít lượng *Bacillus cereus* (< 10 tế bào).

1. Tiến hành

a) Nuôi cấy tăng sinh trên môi trường TSP

- Chuẩn bị và pha loãng mẫu trong dung dịch đệm phosphat có 3 độ pha loãng liên tiếp nhau, 10^{-1} , 10^{-2} , và 10^{-3} .

- Lấy 1 ml mẫu nguyên hoặc đã pha loãng và cấy vào các ống nghiệm đã chứa 15 ml môi trường thạch TSP. Mỗi độ pha loãng cấy 3 ống lặp lại. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 48 h. Quan sát độ đục của môi trường.

b) Nuôi cấy trên môi trường thạch MYP và quan sát khuẩn lạc

- *Bacillus cereus* phát triển trên môi trường TSP và làm đục đều môi trường. Cấy canh trường từ các ống có kết quả dương tính sang môi trường thạch MYP, mỗi ống cấy lên một đĩa thạch. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 48 h. Quan sát và đếm những khuẩn lạc đỏ hồng, xung quanh có vòng đục, đục, bờ hình răng cưa và đường kính 2-3 mm. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ để thử nghiệm khẳng định nhờ các tính chất sinh hoá (xem phần 15.8.1.).

2. Kết quả

Đếm số ống nghiệm chứa môi trường TSP đã nuôi cấy và có kết quả dương tính của mỗi nồng độ pha loãng, tra bảng MPN để tính số lượng vi khuẩn *Bacillus cereus* và nhân với R ($R = \text{số khuẩn lạc đã được khẳng định} / \text{tổng số khuẩn lạc nghi ngờ đã chọn để thử nghiệm khẳng định}$).

15.9. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa còn gọi là trực khuẩn mủ xanh, thường có nhiều trong các sản phẩm thực phẩm bị nhiễm độc. Vi khuẩn này thuộc loại hiếu khí, Gram (-), thường ở dạng đơn bào có khả năng di động.

1. Nguyên tắc

Pseudomonas aeruginosa được phát hiện và định lượng bằng cách nuôi cấy mẫu trên môi trường chọn lọc thạch *Pseudomonas* ở nhiệt độ 42°C. Chọn khuẩn lạc màu xanh điển hình và tiếp tục khẳng định dựa trên các đặc tính sinh hoá như lên men glucoza, không lên men lactoza và không sinh khí...

2. Dụng cụ, thiết bị:

- Dụng cụ chuẩn bị mẫu (thìa, cối xay, dao, kéo ...).
- Hộp Petri, pipet 1 và 10 ml.

3. Hoá chất – môi trường nuôi cấy

- Dung dịch muối đậm pepton: pepton 10 g; NaCl 9 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9 g; KH_2PO_4 1,5 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các thành phần trên, nếu cần có thể đun nóng. Cho vào các ống nghiệm và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

- Môi trường thạch *Pseudomonas*: pepton gelatin 16 g; casein thuỷ phân 10 g; cetrimit (bromur tetradonium 0,2 g; axit nalidixic 15 mg; K_2SO_4 10 g; MgCl_2 1,4 g; thạch 15 g; H_2O cho đủ 1000 ml. Hoà tan các chất bằng cách đun nóng. Chỉnh pH cuối đến 7,0 và khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

- Môi trường BHI (*Brain heart Infusion*): Dịch não dê 200 g; dịch tim bò: 250 g; prototypein 10 g; NaCl 5 g; Na_2HPO_4 2,5 g; dextroza 2 g; nước cất định mức đủ 1000 ml. Hòa tan các chất bằng cách gia nhiệt và khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

4. Tiến hành

- Chuẩn bị và pha loãng mẫu trong dung dịch đậm pepton: cân 25 g mẫu hoặc lấy 25 ml cho vào bình tam giác đã có sẵn 225 ml dung dịch muối đậm pepton. Lắc đều và đây là dung dịch có độ pha loãng 10^{-1} . Từ dung dịch này lấy 1 ml và cho vào ống nghiệm đã chứa 9 ml dung dịch muối đậm pepton. Lắc đều và đây là dung dịch có độ pha loãng 10^{-2} . Tương tự như vậy cân pha loãng đến nồng độ cần thiết để số lượng khuẩn lạc mọc trên đĩa Petri không vượt quá 300.

- Lấy 0,1 ml mẫu các dịch đã pha loãng và cấy trên đĩa Petri có chứa môi trường thạch *Pseudomonas*. Nuôi cấy ở nhiệt độ 42°C trong thời gian 24-48 h. Mỗi độ pha loãng phải cấy ít nhất là 2 đĩa Petri và chọn 2 nồng độ pha loãng liên tiếp nhau.

- Quan sát và đếm những khuẩn lạc có sắc tố màu xanh (có thể là xanh nõn chuối, xanh lá mạ hoặc xanh lục), tròn đều, mặt nhẵn.

5. Kết quả

Sau 48 h, dựa vào số khuẩn lạc đã đếm được trên các đĩa Petri, áp dụng công thức dưới đây để tính số lượng khuẩn lạc nghi ngờ là *Pseudomonas* trung bình có trong 1 ml hay 1 g mẫu:

$$N \text{ (khuẩn lạc/g hay khuẩn lạc/ml)} = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \times f \times v}$$

trong đó:

$\sum C$ - tổng số khuẩn lạc màu xanh đếm được trên tất cả các đĩa;

n_1 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 1 (độ pha loãng thấp nhất);

n_2 - số đĩa đếm ở nồng độ pha loãng thứ 2;

f - hệ số pha loãng của đĩa đếm thứ 1;

v - thể tích mẫu cấy vào mỗi đĩa Petri.

Để khẳng định các khuẩn lạc nghi ngờ chắc chắn là *Pseudomonas aeruginosa* thì cần lấy các khuẩn lạc nghi ngờ cho nuôi cấy trong môi trường lỏng BHI (Brain Heart Infusion) ở nhiệt độ 37°C trong 24 h để thu được canh trường thuần nhất. Từ canh trường thuần nhất này xác định hình thể và các tính chất sinh hoá.

Pseudomonas aeruginosa có các tính chất sau:

- Trục khuẩn, G (-).
- Lên men đường glucoza (+).
- Không lên men đường lactoza, không sinh hơi và H₂S.
- Không có khả năng sinh indol.
- Thử nghiệm oxydaza là dương tính.

PHỤ LỤC

**Phụ lục 1: Bảng tra hàm lượng chất khô hoà tan theo tỷ trọng của dịch đường
(Goldiner và Klemann)**

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,00000	0,00	0,99823	0,00	1,00152	39	0,00975	39
004	01	827	01	156	0,40	979	0,40
008	02	831	02	160	41	983	41
012	03	835	03	164	42	987	42
016	04	839	04	167	43	990	43
020	05	843	05	172	44	994	44
024	06	847	06	176	45	998	45
028	07	851	07	180	46	1,00002	46
031	08	854	08	184	47	006	47
035	09	858	09	187	48	009	48
039	0,10	862	0,10	191	49	013	49
043	11	866	11	195	0,50	017	0,50
047	12	870	12	199	51	021	51
051	13	874	13	1,00203	52	025	52
055	14	878	14	207	53	029	53
059	15	882	15	211	54	033	54
063	16	886	16	215	55	037	55
067	17	890	17	219	56	041	56
070	18	893	18	223	57	045	57
074	19	897	19	226	58	048	58
078	0,20	0,99901	0,20	230	59	052	59
082	21	905	21	234	0,60	056	0,60
086	22	909	22	238	0,61	060	0,61
089	23	912	23	242	62	064	62
093	24	916	24	246	63	068	63
097	25	920	25	250	64	072	64
1,00101	26	924	26	254	65	076	65
105	27	928	27	258	66	080	66
109	28	932	28	262	67	084	67
113	29	936	29	265	68	087	68
117	0,30	940	0,30	269	69	091	69
121	31	944	31	273	0,70	095	0,70
125	32	948	32	277	71	099	71
128	33	951	33	281	72	1,00103	72
132	34	955	34	285	73	107	73
136	35	959	35	289	74	111	74
140	36	963	36	293	75	115	75
144	37	967	37	297	76	119	76
148	38	971	38	1,00301	77	123	77

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,00304	78	1,00126	78	1,00476	1,22	1,00298	1,22
308	79	130	79	479	23	1,00301	23
312	0,80	134	0,80	483	24	305	24
316	81	138	81	487	25	309	25
320	82	142	82	491	26	313	26
324	83	146	83	495	27	317	27
328	84	150	84	499	28	321	28
332	85	154	85	1,00503	29	325	29
336	86	158	86	508	1,30	329	1,30
340	87	162	87	512	31	333	31
343	88	165	88	516	32	337	32
347	89	169	89	519	33	340	33
351	0,90	173	0,90	523	34	344	34
355	91	177	91	527	35	348	35
359	92	181	92	531	36	352	36
363	93	185	93	535	37	356	37
367	94	189	94	539	38	360	38
371	95	193	95	543	39	364	1,40
375	96	197	96	547	1,40	368	41
379	97	1,00201	97	551	41	372	42
382	98	204	98	555	42	376	43
386	99	208	99	558	43	379	44
390	1,00	212	1,00	562	44	383	45
394	01	216	01	566	45	387	46
398	02	220	02	570	46	391	47
1,00401	03	223	03	574	47	395	48
405	04	227	04	577	48	398	49
409	05	231	05	581	49	1,00402	1,50
413	06	235	06	585	1,50	406	51
417	07	239	07	589	51	410	52
421	08	243	08	593	52	414	53
425	09	247	09	597	53	418	54
429	1,10	251	1,10	1,00601	54	422	55
433	11	255	11	605	55	426	56
437	12	259	12	609	56	430	57
440	13	262	13	613	57	434	58
444	14	266	14	616	58	437	59
448	15	270	15	620	59	441	1,60
452	16	274	16	624	1,60	445	61
456	17	278	17	628	61	449	62
460	18	282	18	632	62	453	63
464	19	286	19	636	63	457	64
468	1,20	290	1,20	640	64	461	65
472	21	294	21	644	65	465	66

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
648	66	469	67	820	2,10	641	11
652	67	473	68	824	11	645	12
655	68	476	69	828	12	649	13
659	69	480	1,70	831	13	652	14
663	1,70	484	71	835	14	656	15
667	71	488	72	840	15	660	16
671	72	492	73	844	16	664	17
675	73	496	74	848	17	668	18
679	74	1,00500	75	852	18	672	19
683	75	504	76	856	19	676	2,20
687	76	508	77	860	2,20	680	21
691	77	512	78	864	21	684	23
694	78	515	79	868	22	688	24
698	79	519	1,80	871	23	691	25
1,00702	1,80	523	81	875	24	695	26
706	81	527	82	879	25	699	27
710	82	531	83	883	26	1,00703	28
714	83	535	84	887	27	707	29
718	84	539	85	891	28	711	2,30
722	85	543	86	895	29	715	31
726	86	547	87	899	2,30	719	32
730	1,87	551	1,88	1,00903	31	723	33
733	88	554	89	907	32	727	34
737	89	558	1,90	910	33	730	35
741	1,90	562	91	914	34	734	36
745	91	566	92	918	35	738	37
749	92	570	93	922	36	742	38
753	93	574	94	926	37	746	39
757	94	578	95	930	38	750	2,40
761	95	582	96	934	39	754	41
765	96	586	97	938	2,40	758	42
769	97	590	98	942	41	762	43
773	98	594	99	946	42	766	44
777	99	598	2,00	950	43	770	45
781	2,00	1,00602	01	954	44	774	46
785	01	606	02	958	45	778	47
789	02	610	03	962	46	782	48
792	03	613	04	966	47	786	49
796	04	617	05	969	48	789	2,50
1,00800	05	621	06	973	49	793	51
804	06	625	07	977	2,50	797	52
808	07	629	08	981	51	1,00801	53
812	08	633	09	1985	2,52	805	54
816	09	637	2,10	989	53	809	55

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,00993	54	1,00813	56	1,00165	98	1,00985	01
997	55	817	57	169	99	989	02
1,01001	56	821	58	173	3,00	993	03
005	57	825	59	178	01	997	04
008	58	828	2,60	182	02	1,01001	05
012	59	832	61	186	03	005	06
016	2,60	836	62	190	04	009	07
020	61	840	63	194	05	013	08
024	62	844	64	198	06	017	09
028	63	848	65	1,01202	07	021	3,10
032	64	852	66	206	08	025	11
036	65	856	67	210	09	029	12
040	66	860	68	214	3,10	033	13
044	67	864	69	218	11	037	14
048	68	868	2,70	222	12	041	15
052	69	872	71	225	13	044	16
056	2,70	876	72	229	14	048	17
060	71	880	73	233	15	052	18
064	72	884	74	237	16	056	19
067	73	887	75	1,01241	3,17	1,01060	3,20
071	74	891	76	245	18	064	21
075	75	895	77	249	19	068	22
079	76	899	78	253	3,20	072	23
083	77	1,00903	2,80	257	21	076	24
087	78	907	81	261	22	080	25
091	79	911	82	265	23	084	27
095	2,80	915	83	269	24	088	28
099	81	919	84	273	25	092	29
1,01103	82	923	85	277	26	096	3,30
106	83	926	86	281	27	1,01100	31
110	84	930	87	285	28	104	32
114	85	934	88	289	29	108	33
118	86	938	89	293	3,30	112	34
122	87	942	2,90	297	31	116	35
126	88	946	91	1,01301	32	120	36
130	89	950	92	304	33	123	37
134	2,90	954	93	308	34	127	38
138	91	958	94	312	35	131	39
142	92	962	95	316	36	135	3,40
146	93	966	96	320	37	139	41
150	94	970	97	324	38	143	42
154	95	974	98	328	39	147	43
158	96	978	99	332	3,40	151	44
162	97	982	3,00	336	41	155	45

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,01340	42	1,01159	46	1,01515	86	1,01333	91
344	43	163	47	519	87	337	92
348	44	167	48	523	88	341	93
352	45	171	49	527	89	345	94
356	46	175	3,50	531	3,90	349	95
360	47	179	51	535	91	353	96
363	48	182	52	539	92	357	97
367	49	186	53	542	93	360	98
371	3,50	190	54	546	94	364	99
375	51	194	55	550	95	368	4,00
379	52	198	56	554	96	372	01
383	53	1,01202	57	558	97	376	02
387	54	206	58	562	98	380	03
391	55	210	59	566	99	384	05
395	56	214	3,60	570	4,00	388	06
399	57	218	61	574	01	392	07
1,01403	58	222	62	578	02	396	08
407	59	226	63	582	03	1,01400	09
411	3,60	230	64	586	04	404	4,10
415	61	234	65	590	05	408	11
419	62	238	66	594	06	412	12
423	63	242	68	598	07	416	13
427	64	246	69	1,01602	08	420	14
431	65	250	3,70	606	09	424	15
435	66	254	71	610	4,10	428	16
439	67	258	72	614	11	432	17
442	68	261	73	618	12	436	18
446	69	265	74	622	13	440	19
450	3,70	269	75	626	14	444	4,20
454	71	273	76	630	15	448	21
458	72	277	77	634	16	452	22
462	73	281	78	638	17	456	23
466	74	285	79	641	18	459	24
470	75	289	3,80	645	19	463	25
474	76	293	81	649	4,20	467	26
478	77	297	82	653	21	471	27
482	78	1,01301	83	657	22	475	28
486	79	305	84	661	23	479	29
490	3,80	309	85	665	24	483	4,30
494	81	313	86	669	25	487	31
498	3,82	317	3,87	673	26	491	32
1,01502	83	321	88	677	27	495	33
506	84	325	89	681	28	499	34
510	85	329	3,90	685	29	1,01503	35

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,01689	4,30	1,01507	36	1,01865	74	1,01682	82
693	31	511	38	869	75	686	83
697	32	515	39	873	76	690	84
1,01701	33	519	4,40	877	77	694	85
705	34	523	41	881	78	698	86
709	35	527	42	885	79	1,01702	87
713	36	531	43	889	4,80	706	88
717	37	535	44	893	81	710	89
721	38	539	45	897	82	714	4,90
725	39	543	46	1,01901	83	718	91
729	4,40	547	47	905	84	722	92
733	41	551	48	909	85	726	93
737	42	555	49	913	86	730	94
741	43	559	4,50	917	87	734	95
745	44	563	51	921	88	738	96
749	45	567	52	925	89	742	98
753	46	571	53	929	4,90	746	99
757	4,47	575	4,54	933	91	750	5,00
760	48	578	55	937	92	754	01
764	49	582	56	941	93	758	02
768	4,50	586	57	945	94	762	03
772	51	590	58	949	95	766	04
776	52	594	59	953	96	770	05
780	53	598	4,60	957	97	774	06
784	54	1,01602	61	960	98	777	07
788	55	606	62	964	99	781	08
792	56	610	63	968	5,00	785	09
796	57	614	64	972	01	789	5,10
1,01800	58	618	65	976	02	793	11
804	59	622	66	980	03	797	12
808	4,60	626	67	984	04	1,01801	13
812	61	630	69	988	05	805	14
816	62	634	4,70	992	06	809	15
820	63	638	71	996	07	813	16
824	64	642	72	1,02000	08	817	17
828	65	646	73	004	09	821	18
832	66	650	74	008	5,10	825	19
836	67	654	75	012	11	829	5,20
840	68	658	76	016	5,12	833	5,21
844	69	662	77	020	13	837	22
849	4,70	666	78	024	14	841	23
853	71	670	79	028	15	845	24
857	72	674	4,80	032	16	849	25
861	73	678	81	036	17	853	26

Phụ lục I (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,02040	18	1,01857	27	1,02217	62	1,02033	73
044	19	861	29	221	63	037	74
048	5,20	865	5,30	225	64	041	76
052	21	869	31	229	65	045	77
056	22	873	32	233	66	049	78
060	23	877	33	237	67	053	79
064	24	881	34	241	68	057	5,80
068	25	885	35	245	69	061	81
072	26	889	36	249	5,70	065	82
076	27	893	37	253	71	069	83
080	28	897	38	257	72	073	84
084	29	1,01901	39	261	73	077	85
088	5,30	905	5,40	265	74	081	86
092	31	909	41	269	75	085	87
096	32	913	42	273	76	089	88
1,02100	33	917	43	277	5,77	093	5,89
104	34	921	44	281	78	097	5,90
108	35	925	45	285	79	1,02101	91
112	36	929	46	289	5,80	105	92
116	37	933	47	293	81	109	93
120	38	937	48	297	82	113	94
124	39	941	49	1,02301	83	117	95
128	5,40	945	5,51	305	84	121	96
132	41	949	52	309	85	125	97
136	42	953	53	313	86	129	98
140	43	957	54	317	87	133	6,00
144	44	961	55	321	88	137	01
148	45	965	56	325	89	141	02
152	46	969	57	329	5,90	145	03
156	47	973	58	333	91	149	04
160	48	977	59	337	92	153	05
164	49	981	5,60	341	93	157	06
168	5,50	985	61	345	94	161	07
172	51	989	62	349	95	165	08
176	52	993	63	353	96	169	09
180	53	997	64	357	97	173	6,10
185	54	1,02001	65	362	98	178	11
189	55	005	66	366	99	182	12
193	56	009	67	370	6,00	186	13
197	57	013	68	374	01	190	14
1,02201	58	017	69	378	02	194	15
205	59	021	5,70	382	03	198	16
209	5,60	025	71	386	04	1,02202	17
213	61	029	72	390	05	206	18

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,02394	06	1,02210	19	1,02572	6,50	1,02387	66
398	07	214	6,20	576	51	391	67
402	08	218	21	580	52	395	68
406	09	222	23	584	53	399	69
410	6,10	226	24	588	54	1,02403	6,70
414	11	230	25	592	55	407	71
418	12	234	26	596	56	411	72
422	13	238	27	1,02600	57	415	73
426	14	242	28	604	58	419	74
430	15	246	29	608	59	423	75
434	16	250	6,30	612	6,60	427	76
438	17	254	31	616	61	431	77
442	18	258	32	620	62	435	78
446	19	262	33	624	63	439	79
450	6,20	266	34	628	64	443	6,80
454	21	270	35	632	65	447	81
458	22	274	36	636	66	451	82
462	23	278	37	640	67	455	83
466	24	282	38	644	68	459	84
470	25	286	39	648	69	463	85
474	26	290	6,40	652	6,70	467	87
478	27	294	41	656	71	471	88
482	28	298	42	660	72	475	89
486	29	1,02302	43	665	73	480	6,90
490	6,30	306	45	669	74	484	91
494	31	310	46	673	75	488	92
498	32	314	47	677	76	492	93
1,02502	33	318	48	681	77	496	94
506	34	322	49	685	78	1,02500	95
510	35	326	6,50	689	79	504	96
514	36	330	51	693	6,80	508	97
519	37	334	52	697	81	512	98
523	38	338	53	1,02701	82	516	99
527	39	342	54	705	83	520	7,00
531	6,40	346	55	709	84	524	01
535	41	350	56	713	85	528	02
539	6,42	354	6,57	717	86	532	03
544	43	359	58	721	87	536	04
548	44	363	59	725	88	540	05
552	45	367	6,60	729	89	544	07
556	46	371	61	733	6,90	548	08
560	47	375	62	737	91	552	09
564	48	379	63	741	92	556	7,10
568	49	383	64	745	93	560	11

Phụ lục I (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,02749	94	1,02564	12	1,02928	38	1,02742	58
753	95	568	13	932	39	746	59
757	96	572	14	936	7,40	750	7,60
761	97	576	15	940	41	754	61
766	98	581	16	944	42	758	62
770	99	585	17	949	43	763	64
774	7,00	589	18	953	44	767	65
778	01	593	19	957	45	771	66
782	02	597	7,20	961	46	775	67
786	03	1,02601	21	965	47	779	68
790	04	605	22	969	48	783	69
794	05	609	23	973	49	787	7,70
798	06	613	24	977	7,50	791	71
1,02802	7,07	1,02617	7,26	981	51	795	72
806	08	621	27	985	52	799	73
810	09	625	28	989	53	1,02803	74
814	7,10	629	29	993	54	807	75
818	11	633	7,30	997	55	811	76
822	12	637	31	1,03001	56	815	77
826	13	641	32	005	57	819	78
830	14	645	33	010	58	824	79
834	15	649	34	014	59	828	7,80
838	16	653	35	018	7,60	832	82
842	17	657	36	022	61	836	83
846	18	661	37	026	62	840	84
850	19	665	38	030	63	844	85
855	7,20	669	39	034	64	848	86
859	21	673	7,40	038	65	852	87
863	22	677	41	042	66	856	88
868	23	682	42	046	67	860	89
872	24	686	43	050	68	864	7,90
876	25	690	45	054	69	868	91
880	26	694	46	058	7,70	872	92
884	27	698	47	062	71	876	93
888	28	1,02702	48	066	7,72	880	7,94
892	29	706	49	071	73	885	95
896	7,30	710	7,50	075	74	889	96
1,02900	31	714	51	079	75	893	97
904	32	718	52	083	76	897	98
908	33	722	53	087	77	1,02901	8,00
912	34	726	54	091	78	905	01
916	35	730	55	095	79	909	02
920	36	734	56	099	7,80	913	03
924	37	738	57	1,03103	81	917	04

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,03107	82	1,02921	05	287	26	1,03100	52
111	83	925	06	291	27	104	53
115	84	929	07	296	28	109	54
119	85	933	08	1,03300	29	113	55
123	86	937	09	304	8,30	117	56
127	87	941	8,10	308	31	121	57
132	88	946	11	312	32	125	58
136	89	950	12	316	33	129	59
140	7,90	954	13	320	34	133	8,60
144	91	958	14	324	35	137	61
148	92	962	15	328	36	141	62
152	93	966	17	332	8,37	145	8,63
156	94	970	18	336	38	149	64
160	95	974	19	340	39	153	65
1,03164	96	978	8,20	344	8,40	157	67
168	97	982	21	348	41	161	68
172	98	986	22	352	42	165	69
176	99	990	23	357	43	170	8,70
180	8,00	994	24	361	44	174	71
184	01	998	25	365	45	178	72
189	02	1,03002	26	369	46	182	73
194	03	007	27	373	47	186	74
198	04	011	28	377	48	190	75
202	05	015	29	381	49	194	76
206	06	019	8,30	385	8,50	198	77
210	07	023	31	389	51	1,03202	78
214	08	027	32	393	52	206	79
218	09	031	34	398	53	211	8,80
222	8,10	035	35	1,03402	54	215	81
226	11	039	36	406	55	219	83
230	12	043	37	410	56	223	84
234	13	047	38	414	57	227	85
238	14	051	39	418	58	231	86
242	15	055	8,40	422	59	235	87
246	16	059	41	426	8,60	239	88
250	17	063	42	430	61	243	89
255	18	068	43	434	62	247	8,90
259	19	072	44	439	63	252	91
263	8,20	076	45	443	64	256	92
267	21	080	46	447	65	260	93
271	22	084	47	451	66	264	94
275	23	088	48	455	67	268	95
279	24	092	49	459	68	272	96
283	25	096	8,51	463	69	276	97

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,03467	8,70	1,03280	99	1,03648	14	1,03460	46
471	71	284	9,00	652	15	464	47
475	72	288	01	656	16	468	48
479	73	292	02	660	17	472	49
483	74	296	03	665	18	477	9,50
487	75	1,03300	04	669	19	481	51
491	76	304	05	673	9,20	485	52
495	77	308	06	677	21	489	53
1,03500	78	313	07	681	22	493	54
504	79	317	08	686	23	498	55
508	8,80	321	09	690	24	1,03502	56
512	81	325	9,10	694	25	506	57
516	82	329	11	698	26	510	59
520	83	333	12	1,03702	27	514	9,60
525	84	337	13	706	28	518	61
529	85	341	15	710	29	522	62
533	86	345	16	714	9,30	526	63
537	87	349	17	718	31	530	64
542	88	354	18	722	32	534	65
546	89	358	19	727	33	539	66
1,03550	8,90	362	9,20	731	34	543	67
554	91	366	21	735	35	547	68
558	92	370	22	739	36	551	69
562	93	374	23	743	37	555	9,70
566	94	378	24	747	38	559	71
570	95	382	25	751	39	563	72
574	96	386	26	755	9,40	567	74
578	97	390	27	759	41	571	75
583	98	395	28	763	42	575	76
587	99	399	9,30	768	43	580	77
591	9,00	1,03403	31	772	44	584	78
595	01	407	32	776	45	588	79
599	9,02	411	9,33	780	46	592	9,80
1,03603	03	415	34	784	47	596	81
607	04	419	35	788	48	1,03600	82
611	05	423	36	792	49	604	83
615	06	427	37	796	9,50	608	84
619	07	431	38	1,03800	9,51	612	9,85
624	08	436	39	804	52	616	86
628	09	440	9,40	809	53	621	88
632	9,10	444	41	813	54	625	89
636	11	448	42	817	55	629	9,90
640	12	452	43	821	56	633	91
644	13	456	45	825	57	637	92

Phụ lục I (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
829	58	641	93	1,04011	02	1,03822	10,40
833	59	645	94	016	03	827	41
837	9,60	649	95	020	04	831	42
841	61	653	96	024	05	835	44
845	62	657	97	028	06	839	45
850	63	662	98	032	07	843	46
854	64	666	99	037	08	848	47
858	65	670	10,00	041	09	852	48
863	66	674	01	045	10,10	856	49
867	9,67	678	10,03	049	11	860	10,50
872	68	683	04	053	12	864	51
876	69	687	05	057	13	868	52
880	9,70	691	06	061	14	872	53
884	71	695	07	065	15	876	54
888	72	699	08	069	16	880	55
892	73	1,03703	09	073	17	884	57
896	74	707	10,10	078	18	889	58
1,03900	75	711	11	082	19	893	59
904	76	715	12	086	10,20	897	10,60
908	77	719	13	090	21	1,03901	61
913	78	724	14	094	22	905	62
917	79	728	15	099	23	910	63
921	9,80	732	17	1,04103	24	914	64
925	81	736	18	107	25	918	65
929	82	740	19	111	26	922	66
933	83	744	10,20	115	27	926	67
937	84	748	21	119	28	930	68
941	85	752	22	123	29	934	69
945	86	756	23	127	10,30	938	10,71
949	87	760	24	131	31	942	72
954	88	765	25	135	10,32	946	10,73
958	89	769	26	140	33	951	74
962	9,90	773	27	144	34	955	75
966	91	777	28	148	35	959	76
970	92	781	10,30	152	36	963	77
975	93	786	31	156	37	967	78
979	94	790	32	161	38	972	79
983	95	794	33	165	39	976	10,80
987	96	798	34	169	10,40	980	81
991	97	1,03802	35	173	41	984	82
995	98	806	36	177	42	988	84
999	99	810	37	181	43	992	85
1,04003	10,00	814	38	185	44	996	86
007	01	818	39	189	45	1,04000	87

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,03193	46	1,04004	88	1,04377	10,90	1,04187	36
198	47	008	89	381	91	191	37
1,04203	48	013	10,90	385	92	195	38
207	49	017	91	390	93	1,04200	39
211	10,50	021	92	394	94	204	11,40
215	51	025	93	398	95	208	41
219	52	029	94	1,04402	96	212	42
224	53	034	95	406	10,97	216	11,43
228	54	038	97	411	98	221	44
232	55	042	98	415	99	225	45
236	56	046	99	419	11,00	229	47
240	57	050	11,00	423	01	233	48
245	58	055	01	427	02	237	49
249	59	059	02	432	03	242	11,50
253	10,60	063	03	436	04	246	51
257	61	067	04	440	05	250	52
261	62	071	05	444	06	254	53
265	63	075	06	448	07	258	54
269	64	079	07	452	08	262	55
273	65	083	08	456	09	266	56
277	66	087	11,10	460	11,10	270	57
281	67	091	11	464	11	274	58
286	68	096	12	468	12	278	11,60
290	69	1,04100	13	473	13	283	61
294	10,70	104	14	477	14	287	62
298	71	108	15	481	15	291	63
1,04302	72	112	16	485	16	295	64
307	73	117	17	489	17	299	65
311	74	121	18	494	18	1,04304	66
315	75	125	19	498	19	308	67
319	76	129	11,20	1,04502	11,20	312	68
323	77	133	22	506	21	316	69
328	78	138	23	510	22	320	11,70
332	79	142	24	515	23	325	72
336	10,80	146	25	519	24	329	73
340	81	150	26	523	25	333	74
344	82	154	27	527	26	337	75
348	83	158	28	532	27	341	76
352	84	162	29	537	28	346	77
356	85	166	11,30	541	29	350	78
360	86	170	31	545	11,30	354	79
364	87	174	32	549	31	358	11,80
369	88	179	33	553	32	362	81
373	89	183	35	558	33	367	82

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,04562	34	1,04371	84	1,04746	78	1,04555	32
566	35	375	85	750	79	559	33
570	36	379	86	754	11,80	563	34
574	37	383	87	758	81	567	35
578	38	387	88	762	82	571	36
582	39	391	89	766	83	575	37
586	11,40	395	11,90	770	84	579	38
590	41	399	91	774	85	583	39
594	42	1,04403	92	778	86	587	12,40
599	43	408	93	782	87	591	41
1,04603	44	412	94	787	88	596	43
607	45	416	96	791	89	1,04600	44
611	46	420	97	795	11,90	604	45
615	47	424	98	799	91	608	46
620	48	429	99	1,04803	92	612	47
624	49	433	12,00	808	93	617	48
628	11,50	437	01	812	94	621	49
632	51	441	02	816	95	625	12,50
636	52	445	03	820	96	629	51
641	53	450	04	824	97	633	52
645	54	454	05	829	98	638	54
649	55	458	06	833	99	642	55
653	56	462	08	837	12,00	646	56
657	57	466	09	841	01	650	57
662	58	471	12,10	845	02	654	58
666	59	475	11	850	03	659	59
670	11,60	479	12	854	04	663	12,60
674	61	483	13	858	05	667	61
678	11,62	487	12,14	862	06	671	62
683	63	492	15	867	07	675	63
687	64	496	16	872	08	680	65
691	65	1,04500	17	876	09	684	66
695	66	504	19	880	12,10	688	67
699	67	508	12,20	884	11	692	68
1,04704	68	513	21	888	12	696	69
708	69	517	22	893	13	1,04701	12,70
712	11,70	521	23	897	14	705	71
716	71	525	24	1,04901	15	709	72
720	72	529	25	905	16	713	73
725	73	534	26	909	17	717	74
729	74	538	27	914	18	722	76
733	75	542	28	918	19	726	77
737	76	546	29	922	12,20	730	78
741	77	550	12,31	926	21	734	79

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,04930	22	1,04738	12,80	1,05115	66	1,04923	28
935	23	743	81	119	67	927	29
939	24	747	82	124	68	932	13,31
943	25	751	83	128	69	936	32
947	26	755	84	132	12,70	940	33
951	12,27	759	12,85	136	71	944	34
956	28	764	87	140	72	948	35
960	29	768	88	145	73	953	36
964	12,30	772	89	149	74	957	37
968	31	776	12,90	153	75	961	38
972	32	780	91	157	76	965	39
977	33	785	92	161	77	969	13,40
981	34	789	93	166	78	974	42
985	35	793	94	170	79	978	43
989	36	797	95	174	12,80	982	44
993	37	1,04801	96	178	81	986	45
998	38	806	97	182	82	990	46
1,05002	39	810	99	187	83	995	47
006	12,40	814	13,00	191	84	999	48
010	41	818	01	195	85	1,05003	49
014	42	822	02	199	86	007	13,50
019	43	827	03	1,05204	87	011	51
023	44	831	04	209	88	016	53
027	45	835	05	213	89	020	54
031	46	839	06	217	12,90	024	55
035	47	843	07	221	91	028	56
040	48	848	09	225	12,92	032	13,57
044	49	852	13,10	230	93	037	58
048	12,50	856	11	234	94	041	59
052	51	860	12	238	95	045	13,60
056	52	864	13	242	96	049	61
061	53	869	14	247	97	054	63
065	54	873	15	251	98	058	64
069	55	877	16	256	99	063	65
073	56	881	17	260	13,00	067	66
077	57	885	18	264	01	071	67
082	58	890	13,20	268	02	075	68
086	59	894	21	273	03	080	69
090	12,60	898	22	277	04	084	13,70
094	61	1,04902	23	281	05	088	71
098	62	906	24	285	06	092	73
1,05103	63	911	25	289	07	096	74
107	64	915	26	294	08	1,05101	75
111	65	919	27	298	09	105	76

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,05302	13,10	1,04109	77	1,05488	55	1,05295	26
306	11	113	78	492	56	299	27
310	12	117	79	496	57	1,05303	28
315	13	122	13,80	1,05500	13,58	307	14,29
319	14	126	81	505	59	312	14,30
323	15	130	82	509	13,60	316	31
327	16	134	84	513	61	320	32
331	17	138	85	517	62	324	33
336	18	143	86	522	63	328	35
340	19	147	87	526	64	333	36
344	13,20	151	88	530	65	337	37
348	21	155	89	534	66	341	38
352	22	159	13,90	539	67	345	39
357	23	164	91	544	68	350	14,40
361	24	168	92	548	69	354	41
365	25	172	94	553	13,70	359	42
369	26	176	95	557	71	363	43
373	27	180	96	561	72	367	45
378	28	185	97	565	73	371	46
382	29	189	98	570	74	376	47
386	13,30	193	99	574	75	380	48
390	31	197	14,00	578	76	384	49
394	32	1,05201	01	582	77	388	14,50
399	33	206	02	586	78	392	51
1,05403	34	210	04	591	79	397	52
407	35	214	05	595	13,80	1,05401	53
411	36	218	06	599	81	405	55
416	37	223	07	1,05603	82	409	56
420	38	227	08	607	83	413	57
425	39	232	09	612	83	418	58
429	13,40	236	14,10	616	84	422	59
433	42	240	11	620	85	426	14,60
437	43	244	12	624	86	430	61
442	44	249	13	629	87	435	62
446	45	253	15	633	88	439	63
450	46	257	16	638	89	444	65
454	47	261	17	642	13,90	448	66
458	48	265	18	646	91	452	67
463	49	270	19	650	92	456	68
467	13,50	274	14,20	655	93	461	69
471	51	278	21	659	94	465	14,70
475	52	282	22	663	95	469	71
479	53	286	23	667	96	473	72
484	54	291	25	671	97	477	74

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,05676	98	1,05482	75	1,05863	42	1,05669	24
680	99	486	76	867	43	673	25
684	14,00	490	77	872	44	678	26
688	01	494	78	877	45	682	27
692	02	498	79	881	46	686	28
697	03	1,05503	14,80	885	47	690	29
1,05701	04	507	81	890	48	695	15,30
705	05	511	82	894	49	699	32
709	06	515	84	898	14,50	1,05703	33
714	07	520	85	1,05902	51	707	34
718	08	524	86	906	52	711	35
723	09	529	87	911	53	716	36
727	14,10	533	88	915	54	720	37
731	11	537	89	919	55	724	38
735	12	541	14,90	923	56	728	39
740	13	546	91	928	57	733	15,41
744	14	550	92	932	58	737	42
748	15	554	94	937	59	742	43
752	16	558	95	941	13,60	746	44
756	17	562	96	945	61	750	45
761	18	567	97	949	62	754	46
765	19	571	98	954	63	759	47
769	14,20	575	99	958	64	763	48
773	21	579	15,00	962	65	767	49
777	14,22	583	15,01	966	66	771	15,51
782	23	588	03	970	67	775	52
786	24	592	04	975	68	780	53
790	25	296	05	979	69	784	54
794	26	1,05600	06	983	13,70	788	55
799	27	605	07	987	71	792	56
1,05803	28	609	08	992	72	797	57
808	29	614	09	996	73	1,05801	58
812	14,30	618	15,10	1,06001	74	806	15,60
816	31	622	11	005	75	810	61
820	32	626	13	009	76	814	62
825	33	631	14	013	77	818	63
829	34	635	15	018	78	823	64
833	35	639	16	022	79	827	65
837	36	643	17	026	14,80	831	66
841	37	647	18	030	81	835	67
846	38	652	19	034	82	839	69
850	39	656	15,20	039	83	844	15,70
854	14,40	660	22	043	84	848	71
858	41	664	23	047	85	852	72

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,05051	86	1,05856	73	1,06241	15,30	1,06045	22
1,06056	14,87	1,05861	15,74	245	31	049	24
060	88	865	75	250	32	054	25
065	89	870	76	254	33	058	26
069	14,90	874	78	259	34	063	27
073	91	878	79	263	35	067	28
077	92	882	15,80	267	36	071	29
082	93	887	81	271	37	075	16,30
086	94	891	82	276	38	080	32
090	95	895	83	280	39	084	33
094	96	899	84	284	15,40	088	34
099	97	1,05904	85	288	41	092	35
1,06103	98	908	87	292	42	096	36
108	99	913	88	297	43	1,06101	37
112	15,00	917	89	1,06301	44	105	38
116	01	921	15,90	305	45	109	39
120	02	925	91	309	46	113	16,41
125	03	930	92	314	47	118	42
129	04	934	93	318	48	122	43
133	05	938	94	323	49	127	44
137	06	942	95	327	15,50	131	45
141	07	946	97	331	51	135	46
146	08	951	98	335	15,52	139	16,47
150	09	955	99	340	53	144	48
154	15,10	959	16,00	344	54	148	16,50
158	11	963	01	348	55	152	51
163	12	968	02	352	56	156	52
167	13	972	03	357	57	161	53
172	14	977	04	361	58	165	54
176	15	981	06	366	59	170	55
180	16	985	07	370	15,60	174	56
184	17	989	08	374	61	178	57
189	18	994	09	378	62	182	59
193	19	998	16,10	383	63	187	16,60
197	15,20	1,06002	11	387	64	191	61
1,06201	21	006	12	391	65	195	62
206	22	011	13	395	66	199	63
211	23	015	15	1,06400	67	1,06204	64
216	24	020	16	404	68	208	65
220	25	024	17	409	69	213	66
224	26	028	18	413	15,70	217	68
228	27	032	19	417	71	221	69
233	28	037	16,20	421	15,72	225	16,70
237	29	041	21	426	73	230	71

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,06430	15,74	1,06234	16,72	1,06621	18	1,06424	22
434	75	238	73	1,06625	19	428	23
438	76	242	74	629	16,20	432	24
443	77	247	76	633	21	436	25
447	78	251	77	638	22	441	26
452	79	256	78	642	16,23	1,06445	17,28
456	15,80	260	79	647	24	450	29
460	81	264	16,80	651	25	454	17,30
464	82	268	81	655	26	458	31
469	83	273	82	660	27	463	32
473	84	277	83	664	28	467	33
477	85	281	85	669	29	472	34
481	86	285	86	673	16,30	476	36
486	87	290	87	677	31	480	37
490	88	294	88	681	32	484	38
495	89	299	89	686	33	489	39
499	15,90	1,06303	16,90	690	34	493	17,40
1,06503	91	307	91	694	35	497	41
507	92	311	92	698	36	1,06501	42
512	93	316	94	1,06703	37	506	44
516	94	320	95	707	38	510	45
520	95	324	96	712	39	515	46
524	96	328	97	716	16,40	519	47
529	97	333	98	720	41	523	48
533	98	337	99	724	42	527	49
538	99	342	17,00	729	43	532	17,50
542	16,00	346	02	733	44	536	51
547	01	350	03	737	45	540	53
552	02	355	04	741	46	544	54
556	03	359	05	746	47	549	55
561	04	364	06	750	48	553	56
565	05	368	07	755	49	558	57
569	06	372	08	759	16,50	562	58
573	07	376	09	763	51	566	59
578	08	381	17,11	768	52	571	17,61
582	09	385	12	772	53	575	62
586	16,10	389	13	777	54	580	63
590	11	393	14	781	55	584	64
595	12	398	15	785	56	588	65
599	13	1,06402	16	789	57	592	66
1,06604	14	407	17	794	58	597	67
608	15	411	19	798	59	1,06601	69
612	16	415	17,20	1,06802	16,60	605	17,70
1,06616	16,17	1,06419	17,21	806	61	609	71

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,06811	62	1,06614	72	1,07003	06	1,06805	22
815	63	618	73	007	07	809	23
820	64	623	74	012	08	814	24
824	65	627	75	016	09	818	26
828	66	631	76	020	17,10	822	27
833	67	636	78	024	11	826	28
837	68	640	79	029	12	831	29
842	69	645	17,80	033	17,13	1,06835	18,30
846	16,70	649	81	038	14	840	31
850	71	653	82	042	15	844	32
854	72	657	83	046	16	848	34
859	73	662	84	051	17	853	35
863	74	666	86	055	18	857	36
867	75	670	87	060	19	862	37
871	76	674	88	064	17,20	866	38
876	77	679	89	068	21	870	39
881	78	683	17,90	073	22	875	18,40
886	79	688	91	077	23	879	42
890	16,80	692	92	082	24	884	43
894	81	696	94	086	25	888	44
899	16,82	1,06701	17,95	090	26	892	45
1,06903	83	705	96	094	27	896	46
908	84	710	97	099	28	1,06901	47
912	85	714	98	1,07103	29	905	48
916	86	718	99	107	17,30	909	18,50
921	87	723	18,00	111	31	913	51
925	88	727	02	116	32	918	52
930	89	732	03	120	33	922	53
934	16,90	736	04	125	34	927	54
938	91	740	05	129	35	931	55
942	92	744	06	133	36	935	56
947	93	749	07	138	37	940	58
951	94	753	08	142	38	944	59
955	95	757	18,10	147	39	949	18,60
959	96	761	11	151	17,40	953	61
964	97	766	12	155	41	957	62
968	98	770	13	160	42	962	63
973	99	775	14	164	43	966	64
977	17,00	779	15	169	44	971	66
981	01	783	16	173	45	975	67
986	02	788	18	177	46	979	68
990	03	792	19	181	17,47	983	18,69
995	04	797	18,20	186	48	988	18,70
999	05	1,06801	21	190	49	992	71

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,07194	17,50	996	72	1,07388	94	1,07189	23
198	51	1,07000	74	392	95	193	24
1,07203	52	005	75	396	96	197	25
207	53	009	76	1,07401	97	1,07202	26
212	54	014	77	405	98	206	28
217	55	018	78	410	99	211	29
221	56	022	79	414	18,00	215	19,30
226	57	027	18,80	418	01	219	31
230	58	031	82	423	02	224	32
235	59	036	83	427	03	228	33
239	17,60	1,06040	18,84	432	04	233	34
243	61	044	85	436	05	237	36
248	62	049	86	440	06	241	37
252	63	053	87	445	07	46	38
257	64	058	89	449	08	250	39
261	65	062	18,90	454	09	255	19,40
265	66	066	91	458	18,10	259	41
270	67	071	92	462	11	263	43
274	68	075	93	466	18,12	267	19,44
279	69	080	94	471	13	272	45
283	17,70	084	95	475	14	276	46
287	71	088	97	479	15	280	47
291	72	092	98	783	16	284	48
296	73	097	99	488	17	289	49
1,07300	74	1,07101	19,00	492	18	293	19,51
304	75	105	01	497	19	298	52
308	76	109	02	1,07501	18,20	1,07302	23
313	77	114	03	505	21	306	54
317	78	118	05	510	22	311	55
322	79	123	06	514	23	315	56
326	17,80	127	07	519	24	320	58
330	81	131	08	523	25	324	59
335	82	136	09	527	26	328	19,60
339	83	140	19,10	532	27	333	61
344	84	145	11	536	28	337	62
348	85	149	13	541	29	342	63
352	86	153	14	545	18,30	346	64
357	87	158	15	549	31	350	66
361	88	162	16	555	32	355	67
366	89	167	17	559	33	359	68
370	17,90	171	18	564	34	364	69
374	91	175	19,20	568	35	368	19,70
379	92	180	21	572	36	372	71
383	93	184	22	577	37	377	73

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,07581	38	1,07381	74	1,07775	82	1,07575	25
586	39	386	75	779	83	579	26
590	18,40	390	76	784	84	584	27
594	41	394	77	788	85	588	28
599	42	399	78	792	86	592	29
1,07603	43	1,07403	79	797	87	597	20,30
608	44	408	19,81	1,07801	88	1,07601	32
612	45	412	82	806	89	606	33
616	46	416	83	810	18,90	610	34
621	47	421	84	814	91	614	35
625	48	425	85	819	92	619	36
630	49	430	86	823	93	623	37
634	18,50	434	88	828	94	628	38
638	51	438	89	832	95	632	20,40
643	52	443	19,90	836	96	636	41
647	53	447	91	841	97	641	42
652	54	452	92	845	98	645	43
656	55	456	93	850	99	650	44
660	56	460	94	854	19,00	654	45
665	57	465	95	858	01	658	47
669	58	469	97	863	02	663	48
674	59	474	98	867	03	667	49
678	18,60	478	99	872	04	672	20,50
682	61	482	20,00	876	05	676	51
687	62	487	01	880	06	680	52
691	63	491	03	886	07	685	54
696	64	496	04	890	08	689	55
1,07700	65	1,07500	05	895	09	694	56
704	66	504	06	899	19,10	698	57
709	67	509	07	1,07903	11	1,07702	58
713	68	513	08	908	12	707	59
718	69	518	20,10	912	13	711	20,61
722	18,70	522	11	917	14	716	62
726	71	526	12	921	15	720	63
731	72	531	13	925	16	724	64
735	73	535	14	930	17	729	65
740	74	540	15	934	18	733	66
744	75	544	16	939	19	738	67
748	76	548	18	943	19,20	742	69
753	18,77	553	20,19	947	21	746	20,70
757	78	557	20,20	952	22	751	71
762	79	562	21	956	23	755	72
766	18,80	566	22	961	24	760	73
770	81	570	23	965	25	764	74

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,07969	26	1,07768	76	164	19,70	963	27
974	27	773	77	168	71	967	28
978	28	777	78	173	72	972	29
983	29	782	79	177	73	976	21,30
987	19,30	786	20,80	182	74	981	32
991	31	790	81	186	75	985	33
996	32	795	83	190	76	989	34
1,08000	33	799	84	195	77	994	35
005	34	1,07804	85	199	78	998	36
009	35	808	86	1,08204	79	1,08003	37
013	36	812	87	208	19,80	007	39
018	37	817	88	212	81	011	21,40
022	38	821	20,90	217	82	016	41
027	39	826	91	222	83	020	42
031	19,40	830	92	227	84	025	43
035	41	834	93	231	85	029	44
040	19,42	839	21,94	236	86	034	46
044	43	843	95	240	87	038	47
049	44	848	97	245	88	043	48
053	45	852	98	249	89	047	49
057	46	856	99	254	19,90	052	21,50
062	47	861	21,00	258	91	056	51
066	48	865	01	263	92	061	53
071	49	870	02	267	93	065	54
075	19,50	874	04	272	94	070	55
080	51	879	05	276	95	074	56
084	52	883	06	280	96	078	57
089	53	888	07	285	97	083	58
093	54	892	08	289	98	087	21,60
098	55	897	09	294	99	092	61
1,08102	56	1,07901	21,11	298	20,00	096	62
107	57	906	12	1,08302	01	1,08100	63
111	58	910	13	307	02	105	64
116	59	915	14	311	03	109	65
120	19,60	919	15	316	04	114	67
124	61	923	16	320	05	118	68
129	62	928	18	324	06	122	69
133	63	932	19	329	20,07	127	21,70
138	64	937	21,20	333	08	131	1
142	65	941	21	338	09	136	72
146	19,66	945	21,22	342	20,10	140	74
151	67	950	23	347	11	145	75
155	68	954	25	351	12	149	76
160	69	959	26	356	13	154	77

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,08360	14	1,08158	78	556	58	354	20,30
365	15	163	79	562	59	359	31
369	16	167	21,81	566	20,60	363	32
374	17	172	82	570	61	367	33
378	18	176	83	575	62	372	35
383	19	181	84	579	63	376	36
387	20,20	185	85	584	64	381	37
391	21	189	86	588	65	385	38
396	22	194	88	592	66	389	39
1,08400	23	198	89	597	67	394	22,41
405	24	1,08203	21,90	1,08601	68	398	42
409	25	207	91	606	69	1,08403	43
413	26	211	92	610	20,70	407	44
418	27	216	94	615	71	412	45
422	28	220	95	619	20,72	416	22,46
427	29	225	96	624	73	421	48
431	20,30	229	97	628	74	425	49
435	31	233	98	633	75	430	22,50
440	32	238	99	638	76	435	51
444	33	242	22,01	642	77	439	52
449	34	247	02	646	78	444	53
453	35	251	03	651	79	448	55
458	36	256	04	655	20,80	452	56
462	37	260	05	659	81	456	57
467	38	265	06	664	82	461	58
472	39	269	08	668	83	465	59
476	20,40	274	09	673	84	470	22,61
480	41	278	22,10	677	85	474	62
485	42	283	11	682	86	479	63
489	43	287	12	686	87	483	64
494	44	292	13	691	88	488	65
498	45	296	15	695	89	492	66
1,08502	46	1,08300	16	1,08700	20,90	497	68
507	47	305	17	704	91	1,08501	69
511	48	309	18	709	92	506	22,70
516	49	314	19	713	93	510	71
520	20,50	318	22,21	718	94	515	72
525	51	323	22	722	95	519	73
529	52	327	23	726	96	523	75
534	53	332	24	731	97	528	76
538	54	336	25	735	98	532	77
543	55	341	26	740	99	537	78
547	56	345	28	744	21,00	541	79
552	57	350	29	749	01	546	22,81

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,08753	02	1,08550	82	1,08951	46	1,08747	34
758	03	555	83	956	47	752	35
762	04	559	84	960	48	756	36
767	05	564	85	965	49	761	37
771	06	568	86	969	21,50	765	38
776	07	573	88	974	51	770	23,40
780	08	577	89	978	52	774	41
785	09	582	22,90	983	53	779	42
789	21,10	586	91	987	54	783	43
794	11	591	92	992	55	788	44
798	12	595	94	996	56	792	46
1,08803	13	1,08600	95	1,09001	57	797	47
807	14	604	96	005	58	1,08801	48
812	15	609	97	010	59	806	49
816	16	613	98	014	21,60	810	23,50
821	17	618	99	019	61	815	51
825	18	622	23,01	023	62	819	53
830	19	627	02	028	63	824	54
834	21,20	631	03	032	64	828	55
838	21	635	04	037	65	833	56
843	22	640	05	041	66	837	57
847	23	644	07	046	67	842	59
852	24	649	08	050	68	846	23,60
856	25	653	09	055	69	851	61
861	26	658	23,10	059	21,70	855	62
865	27	662	11	064	71	860	63
870	28	667	12	068	72	864	65
874	29	671	14	073	73	869	66
879	21,30	676	15	077	74	873	67
883	31	680	16	082	75	878	68
888	32	685	17	086	76	882	69
893	33	689	18	091	77	887	23,70
898	34	694	23,20	095	78	891	72
1,08902	35	698	21	1,09100	79	896	73
907	36	1,08703	22	104	21,80	1,08900	74
911	21,37	707	23,23	109	81	905	75
916	38	712	24	113	82	909	76
920	39	716	25	118	83	914	78
925	21,40	721	27	122	84	918	79
929	41	725	28	127	85	923	23,80
934	42	730	29	131	86	927	81
938	43	734	23,30	136	87	932	82
943	44	739	31	140	88	936	84
947	45	743	33	145	89	941	85

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,09149	21,90	1,09945	86	1,09348	34	1,09143	38
154	91	950	87	353	35	148	39
158	92	954	88	357	36	152	24,41
163	93	959	89	362	37	157	42
167	94	963	23,91	366	38	161	43
172	95	968	92	371	39	166	44
176	96	972	93	375	22,40	170	45
181	97	977	94	380	41	175	47
185	98	981	95	384	42	179	48
190	99	986	97	389	43	184	49
194	22,00	990	98	393	44	188	24,50
199	01	995	99	398	45	193	51
1,09203	22,02	1,09999	24,00	1,09403	46	198	53
208	03	1,09004	01	407	47	1,09202	54
212	04	008	03	412	48	207	55
217	05	013	04	416	49	211	56
221	06	017	05	421	22,50	216	57
226	07	022	06	425	51	220	59
231	08	026	07	430	52	225	24,60
236	09	031	08	434	53	229	61
240	22,10	035	24,10	439	54	234	62
245	11	040	11	443	55	238	63
249	12	044	12	448	56	243	65
254	13	049	13	452	57	247	66
258	14	053	14	457	58	252	67
263	15	058	16	461	59	256	68
267	16	062	17	466	22,60	261	69
272	17	067	18	471	61	266	24,71
276	18	071	19	475	62	270	72
281	19	076	24,20	480	63	275	73
285	22,20	080	22	484	64	279	74
290	21	085	23	488	65	283	75
294	22	089	24	493	66	288	76
299	23	094	25	498	22,67	293	24,78
1,09303	24	098	26	502	68	297	79
308	25	1,09103	28	507	69	302	24,80
312	26	107	29	511	22,70	306	81
317	27	112	24,30	516	71	311	82
321	28	116	31	520	72	315	84
326	29	121	32	525	73	320	85
330	22,30	125	33	529	74	324	86
335	31	130	35	534	75	329	87
339	32	134	36	538	76	333	88
344	33	139	37	543	77	338	24,90

Phụ lục I (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,09547	78	1,09342	91	1,09748	22	1,09542	44
552	79	347	92	753	23	547	45
556	22,80	351	93	757	24	551	46
561	81	356	94	762	25	556	47
566	82	360	96	766	26	560	48
571	83	365	97	771	27	565	25,50
575	84	369	98	775	28	569	51
580	85	374	99	780	29	574	52
585	86	379	25,00	784	23,30	578	53
589	87	383	02	789	31	583	54
594	88	388	03	1,09793	23,32	1,09587	25,56
598	89	392	04	798	33	592	57
1,09603	22,90	397	05	802	34	596	58
607	91	1,09401	06	807	35	1,09601	59
612	92	406	08	812	36	606	25,60
616	93	410	09	816	37	610	62
621	94	415	25,10	821	38	615	63
625	95	419	11	825	39	619	64
630	96	424	12	830	23,40	624	65
634	97	428	14	834	41	628	66
639	98	433	15	839	42	633	68
643	99	437	16	843	43	637	69
648	23,00	442	17	848	44	642	25,70
653	01	447	18	852	45	646	71
657	02	451	25,20	857	46	651	72
662	03	456	21	861	47	655	74
666	04	460	22	866	48	660	75
671	05	465	23	870	49	664	76
675	06	469	24	875	23,50	669	77
680	07	474	26	880	51	674	78
684	08	478	27	884	52	678	25,80
689	09	483	28	889	53	683	81
693	23,10	487	29	893	54	687	82
698	11	492	25,30	898	55	692	83
1,09702	12	496	32	1,09904	56	697	84
707	13	1,09501	33	908	57	1,09701	86
711	14	505	34	913	58	706	87
716	15	510	35	917	59	710	88
721	16	515	36	922	23,60	715	89
725	17	519	38	927	61	720	25,90
730	18	524	39	931	62	724	92
734	19	528	25,40	936	63	729	93
739	23,20	533	41	940	64	733	94
744	21	538	42	945	65	738	95

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,09949	66	1,09742	96	1,10150	24,10	1,09943	26,50
954	67	747	98	155	11	948	51
958	68	751	99	159	12	952	52
963	69	756	26,00	164	13	957	53
967	23,70	760	01	168	14	961	54
972	71	765	03	173	15	966	56
976	72	769	04	178	16	971	57
981	73	774	05	182	17	975	58
985	74	778	06	187	18	980	59
990	75	783	07	191	19	984	26,61
995	76	788	09	196	24,20	989	62
999	77	792	26,10	1,10201	21	994	63
1,10004	78	797	11	205	22	998	64
008	79	1,09801	12	210	23	1,10003	65
013	23,80	806	13	214	24	7	67
018	81	811	15	219	25	12	68
022	82	815	16	223	26	16	69
027	83	820	17	228	27	21	26,70
031	84	824	18	232	28	25	71
036	85	829	19	238	29	30	73
040	86	833	26,21	242	24,30	34	74
045	87	838	22	247	31	39	75
049	88	842	23	251	32	43	76
054	89	847	24	256	33	48	77
058	23,90	851	25	260	34	52	79
063	91	856	27	265	35	57	26,80
067	92	860	28	270	36	62	81
072	93	865	29	274	37	66	82
076	94	869	26,30	279	38	71	84
081	95	874	31	283	39	75	85
086	96	879	33	288	24,40	80	86
090	23,97	883	26,34	293	41	85	87
095	98	888	35	297	42	89	88
099	99	892	36	1,10302	43	94	26,90
1,10104	24,00	897	38	306	44	98	91
109	01	1,09902	39	311	45	1,10103	92
113	02	906	26,40	316	46	108	93
118	03	911	41	320	47	112	94
122	04	915	42	325	48	117	96
127	05	920	44	329	49	121	97
132	06	925	45	334	24,50	126	98
136	07	929	46	339	51	131	99
141	08	934	47	343	52	135	27,01
145	09	938	48	348	53	140	02

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,10352	54	1,10144	03	555	98	347	56
357	55	149	04	559	99	351	58
362	56	154	05	564	25,00	356	59
366	57	158	07	569	01	361	27,60
371	58	163	08	574	02	365	61
375	59	167	09	579	03	370	63
380	24,60	172	27,10	583	04	374	64
385	61	177	11	588	25,05	1,10379	27,65
389	24,62	181	27,13	593	06	384	66
394	63	186	14	597	07	388	67
398	64	190	15	1,10602	08	393	69
1,10403	65	195	16	606	09	397	27,70
408	66	1,10200	18	611	25,10	1,10402	71
412	67	204	19	616	11	407	72
417	68	209	27,20	620	12	411	74
421	69	213	21	625	13	416	75
426	24,70	218	22	629	14	420	76
431	71	223	24	634	15	425	77
435	72	227	25	639	16	430	78
440	73	232	26	643	17	434	27,80
444	74	236	27	648	18	439	81
449	75	241	28	652	19	443	82
454	76	246	27,30	657	25,20	448	83
458	77	250	31	662	21	453	85
463	78	255	32	666	22	457	86
467	79	259	33	671	23	462	87
472	24,80	264	35	675	24	466	88
477	81	269	36	680	25	471	89
481	82	273	37	685	26	476	27,91
486	83	278	38	689	25,27	480	27,92
490	84	282	39	694	28	485	93
495	85	287	27,41	698	29	489	94
1,10500	86	292	42	1,10703	25,30	494	95
504	87	296	43	708	31	499	97
509	88	1,10301	44	712	32	1,10503	98
513	89	305	45	717	33	508	99
518	24,90	310	47	721	34	512	28,00
523	91	315	48	726	35	517	02
527	92	319	49	731	36	522	03
532	93	324	27,50	735	37	526	04
536	94	328	52	740	38	531	05
541	95	333	53	744	39	535	06
546	96	338	54	749	25,40	540	08
550	97	342	55	754	41	545	09

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,10758	42	1,10549	28,10	1,10963	86	1,10753	64
763	43	554	11	967	87	757	65
767	44	558	13	972	88	762	67
772	45	563	14	976	89	766	68
777	46	568	15	981	25,90	771	69
781	47	572	16	986	91	776	28,70
786	48	577	18	1,10990	25,92	1,10780	28,71
790	49	581	19	995	93	785	73
795	25,50	586	28,20	999	94	789	74
1,10800	51	591	21	1,11004	95	794	75
804	52	595	22	009	96	799	76
809	53	1,10600	24	014	97	1,10804	78
813	54	604	25	018	98	808	79
818	55	609	26	023	99	813	28,80
823	56	614	27	028	26,00	818	81
827	57	618	29	033	01	823	83
832	58	623	28,30	037	02	827	84
836	59	627	31	1,10042	26,03	1,10832	28,85
841	25,60	632	32	046	04	836	86
846	61	637	33	051	05	841	87
851	62	642	35	056	06	846	89
855	63	646	36	060	07	850	28,90
860	64	651	37	065	08	855	91
865	65	656	38	069	09	859	92
870	66	661	28,40	074	26,10	864	94
874	67	665	41	079	11	869	95
879	68	670	42	083	12	873	96
883	69	674	43	088	13	878	97
888	25,70	679	44	092	14	882	98
893	71	684	46	097	15	887	29,00
897	72	688	47	1,11102	16	892	01
1,10902	73	693	48	106	17	896	02
907	74	697	49	111	18	1,10901	03
912	75	1,10702	28,51	115	19	905	05
917	76	707	52	120	26,20	910	06
921	77	711	53	125	21	915	07
926	78	716	54	130	22	920	08
930	79	720	55	134	23	924	29,10
935	25,80	725	57	139	24	929	11
940	81	730	58	144	25	934	12
944	82	734	59	149	26	939	13
949	83	739	28,60	153	27	943	14
953	84	743	62	158	28	948	16
958	85	748	63	162	29	952	17

Phụ lục I (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,11167	26,30	1,10957	18	1,11372	74	1,11161	72
172	31	962	19	377	75	166	74
176	32	966	29,21	382	76	171	75
181	33	971	22	387	77	176	76
185	34	975	23	391	78	180	77
190	35	980	24	396	79	185	79
195	36	985	26	1,11401	26,80	190	29,80
199	37	989	27	406	81	195	81
1,11204	38	994	28	410	82	199	82
208	39	998	29	415	83	1,11204	84
213	26,40	1,11003	29,30	419	84	208	85
218	41	008	32	424	85	213	86
223	42	013	33	429	86	218	87
227	43	017	34	433	87	222	89
232	44	022	35	438	88	227	29,90
237	45	027	37	442	89	231	91
243	46	032	38	447	26,90	236	92
247	47	036	39	452	91	241	93
252	48	041	29,40	456	92	245	95
256	49	045	42	461	93	250	96
261	26,50	050	43	465	94	254	97
266	51	055	44	470	95	259	98
270	52	059	29,45	475	96	264	30,00
275	53	064	47	480	97	269	01
279	54	058	48	484	98	273	02
284	55	073	49	489	99	278	03
289	56	078	29,50	494	27,00	283	05
293	26,57	082	29,51	499	01	288	06
298	58	087	53	1,11503	02	292	07
302	59	091	54	508	03	297	08
307	26,60	096	55	512	04	1,11301	30,10
312	61	1,11101	56	517	05	306	11
317	62	106	58	522	06	311	12
321	63	110	59	527	07	316	13
326	64	115	29,60	531	08	320	15
331	65	120	61	536	09	325	16
336	66	125	63	541	27,10	330	17
340	67	129	64	546	11	335	18
345	68	134	65	550	12	339	30,20
349	69	138	66	555	13	344	21
354	26,70	143	68	559	14	348	22
359	71	148	69	564	15	353	23
363	72	152	29,70	569	16	358	24
368	73	157	71	573	17	362	26

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,11579	18	1,11367	27	785	62	573	82
583	19	371	28	790	63	578	83
588	27,20	376	29	794	64	582	84
593	21	381	30,31	799	65	587	85
598	27,22	386	30,32	1,11804	66	592	87
602	23	390	33	808	67	596	88
607	24	395	34	813	68	1,11601	89
612	25	1,11400	36	817	69	605	30,90
617	26	405	37	822	27,70	610	92
621	27	409	38	827	71	615	93
626	28	414	39	832	72	620	94
630	29	418	30,41	836	73	624	95
635	27,30	423	42	841	74	629	97
640	31	428	43	846	75	634	98
644	32	432	44	851	76	639	99
649	33	437	46	855	77	643	31,00
653	34	441	47	860	78	648	02
658	35	446	48	864	79	652	03
663	36	451	49	869	26,80	657	04
668	37	456	30,51	874	81	662	05
672	38	460	52	879	82	667	07
677	39	465	53	883	83	671	08
682	27,40	470	54	888	84	676	09
687	41	475	56	893	85	681	31,10
691	42	479	57	898	86	686	12
696	43	484	58	1,11902	27,87	690	31,13
1,11700	44	488	59	907	88	695	14
705	45	493	30,60	11	89	699	15
710	46	498	62	917	27,90	1,11704	17
715	47	1,11503	63	922	91	709	18
719	48	507	64	927	92	714	19
724	49	512	65	931	93	718	31,20
729	27,50	517	67	936	94	723	22
734	51	522	68	941	95	728	23
738	52	526	69	946	96	733	24
743	53	531	30,70	950	97	737	25
747	54	535	72	955	98	742	27
752	55	540	73	959	99	746	28
757	56	545	74	964	28,00	751	29
762	57	550	75	969	01	756	31,30
766	58	554	77	974	02	761	32
771	59	559	78	978	03	765	33
776	27,60	564	79	983	04	770	34
781	61	569	30,80	988	05	775	35

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,11993	06	1,11780	37	1,12200	28,50	987	92
997	07	784	38	205	51	992	93
1,12002	08	789	39	209	27,52	996	31,94
006	09	793	31,40	214	53	1,12001	95
011	28,10	798	42	218	54	005	97
016	11	1,11803	43	223	55	010	98
021	12	808	44	228	56	015	99
025	13	812	45	233	57	020	32,00
030	14	817	47	237	58	024	02
035	15	822	48	242	59	029	03
040	16	827	49	247	28,60	034	04
044	17	831	31,50	253	61	039	05
049	18	836	52	258	62	044	07
053	19	840	53	262	63	048	08
058	28,20	845	54	267	64	053	09
063	21	850	55	272	65	058	32,10
068	22	855	57	277	66	063	12
072	23	859	58	281	67	067	13
077	24	864	59	286	68	072	14
082	25	869	31,60	290	69	076	15
087	26	874	62	295	28,70	081	17
091	27	878	63	1,12300	71	086	18
096	28	883	64	305	72	091	19
1,12100	29	887	65	309	73	095	32,20
105	28,30	892	67	314	74	1,12100	22
110	31	897	68	319	75	105	23
115	32	1,11902	69	324	76	110	24
119	33	906	31,70	328	77	114	26
124	34	911	72	333	78	119	27
129	35	916	73	337	79	123	28
134	36	921	74	342	28,80	128	29
139	37	926	75	347	81	133	32,31
143	38	930	77	352	82	138	32
148	39	935	78	356	83	142	33
153	28,40	940	79	361	84	147	34
158	41	945	31,80	366	85	152	36
162	42	949	82	371	86	157	37
167	43	954	83	1,12376	28,87	1,12162	32,38
171	44	958	84	380	88	166	39
176	45	963	85	385	89	171	32,41
181	46	968	87	390	28,90	176	42
186	47	973	88	395	91	181	43
190	48	977	89	399	92	185	44
195	49	982	31,90	1,12404	93	190	46

Phụ lục 1 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml	d_{20}^{20}	% chất khô g/100 g	d_4^{20}	% chất khô g/100 ml
1,12408	94	194	47	1,12475	08	1,12261	65
413	95	199	48	480	09	266	66
418	96	1,12204	49	485	29,10	271	67
423	28,97	209	32,51	490	11	276	68
427	98	213	52	494	12	280	32,70
432	99	218	53	499	13	285	71
437	29,00	223	54	1,12503	14	289	72
442	01	228	56	508	15	294	73
447	02	233	57	513	16	299	75
451	03	237	58	518	17	1,12304	76
456	04	242	32,60	522	18	308	77
461	05	247	61	527	19	313	78
466	06	252	62	532	29,20	318	32,80
471	07	257	63				

Chú thích:

d_{20}^{20} - Tỷ trọng của dịch quả ở 20°C so với nước ở 20°C.

d_4^{20} - Tỷ trọng của dịch quả ở 20°C so với nước ở 4°C.

Phụ lục 2: Bảng hiệu chỉnh °Bx về nhiệt độ 20°C
(đo bằng đường kẻ)

t°C	Giá trị đo được (°Bx)								
	0	5	10	15	20	25	30	35	40
0	0,30	0,49	0,65	0,77	0,89	0,99	1,08	1,16	1,24
5	0,36	0,47	0,56	0,65	0,73	0,80	0,86	0,91	0,97
10	0,32	0,38	0,43	0,48	0,52	0,57	0,60	0,64	0,67
11	0,31	0,35	0,40	0,44	0,48	0,51	0,55	0,58	0,60
12	0,29	0,32	0,36	0,40	0,43	0,46	0,50	0,52	0,54
13	0,26	0,29	0,32	0,35	0,38	0,41	0,44	0,46	0,48
14	0,24	0,26	0,29	0,31	0,34	0,36	0,38	0,40	0,41
15	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30	0,32	0,33	0,34
16	0,17	0,18	0,20	0,22	0,23	0,25	0,26	0,27	0,28
17	0,13	0,14	0,15	0,16	0,18	0,19	0,20	0,20	0,21
18	0,09	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,13	0,14	0,14
19	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
20									
21	0,04	0,05	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
22	0,10	0,10	0,11	0,12	0,12	0,13	0,14	0,14	0,15
23	0,16	0,16	0,17	0,17	0,19	0,2	0,21	0,21	0,22
24	0,21	0,22	0,23	0,24	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30
25	0,27	0,28	0,30	0,31	0,32	0,34	0,35	0,36	0,38
26	0,33	0,34	0,36	0,37	0,40	0,40	0,42	0,44	0,46
27	0,40	0,41	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54
28	0,46	0,47	0,49	0,51	0,54	0,56	0,58	0,60	0,61
29	0,54	0,55	0,56	0,59	0,61	0,63	0,66	0,68	0,70
30	0,61	0,62	0,63	0,66	0,68	0,71	0,73	0,76	0,78
35	0,99	1,01	1,02	1,06	1,10	1,13	1,16	1,18	1,20

**Phụ lục 3: Bảng hiệu chỉnh nồng độ chất khô (%) đo được về nhiệt độ 20°C
(đo bằng chiết quang kế)**

t°C		Nồng độ chất khô đo được (%)				
		10	15	20	25	30
8	Trừ	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7
9		0,5	0,6	0,6	0,7	0,7
10		0,5	0,5	0,6	0,6	0,7
11		0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
12		0,5	0,4	0,5	0,5	0,5
13		0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
14		0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
15		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
16		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
17		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
18		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
19		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20						
21	Cộng	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22		0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
23		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
24		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
25		0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
26		0,4	0,4	0,5	0,5	0,5
27		0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
28		0,6	0,6	0,6	0,7	0,7
29		0,6	0,7	0,7	0,8	0,8
30		0,8	0,8	0,8	0,9	0,9
31		0,8	0,9	0,9	1,0	1,0
32		0,9	1,0	1,0	1,1	1,1
33		1,0	1,1	1,1	1,1	1,2
34		1,1	1,2	1,2	1,2	1,3

Phụ lục 4: Bảng hiệu chỉnh tỷ trọng đo được ($d > 1$) về 20°C

t°C		Tỷ trọng đo được										1,13	1,14
		1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14		
10	Tỷ	2,17	2,34	2,52	2,68	2,85	2,99	3,16	3,29	3,44	3,58		
11		2,00	2,16	2,29	2,44	2,59	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24		
12		1,81	1,95	2,08	2,21	2,34	2,47	2,58	2,70	2,82	2,92		
13		1,62	1,74	1,85	1,96	2,07	2,17	2,28	2,38	2,48	2,59		
14		1,44	1,54	1,64	1,73	1,82	1,92	2,00	2,08	2,17	2,25		
15		1,21	1,29	1,37	1,45	1,53	1,60	1,68	1,75	1,82	1,89		
16		1,00	1,06	1,12	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,54		
17		0,76	0,82	0,86	0,91	0,96	1,00	1,05	1,09	1,14	1,18		
18		0,53	0,56	0,59	0,63	0,65	0,69	0,72	0,74	0,77	0,80		
19		0,28	0,30	0,31	0,33	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,42		
20													
21	Cộng	0,28	0,29	0,31	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,41		
22		0,55	0,58	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,78	0,81		
23		0,85	0,90	0,95	0,99	1,04	1,08	1,12	1,16	1,21	1,25		
24		1,15	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,48	1,54	1,60	1,65		
25		1,44	1,52	1,59	1,67	1,74	1,81	1,88	1,95	2,02	2,09		
26		1,76	1,84	1,93	2,02	2,10	2,18	2,25	2,33	2,41	2,49		
27		2,07	2,16	2,26	2,36	2,46	2,56	2,65	2,74	2,83	2,91		
28		2,39	2,51	2,63	2,74	2,85	2,96	3,06	3,16	3,28	3,38		
29		2,74	2,86	2,97	3,09	3,22	3,34	3,46	3,57	3,69	3,80		
30		3,06	3,21	3,35	3,50	3,63	3,77	3,91	4,02	4,15	4,28		

Phụ lục 4 (tiếp theo)

t°C	Tỷ trọng đo được											
	1,15	1,16	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26	1,28	1,30	1,32	1,34	
10	3,73	3,86	4,13	4,36	4,60	4,82	5,02	5,25	5,39	5,56	5,73	
11	3,37	3,48	3,71	3,94	4,15	4,33	4,52	4,69	4,85	5,01	5,15	
12	3,03	3,14	3,35	3,55	3,72	3,90	4,07	4,23	4,37	4,52	4,64	
13	2,68	2,77	2,94	3,11	3,28	3,44	3,54	3,72	3,86	3,99	4,12	
14	2,34	2,42	2,57	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24	3,35	3,46	3,57	
15	1,97	2,03	2,16	2,28	2,40	2,51	2,61	2,71	2,80	2,89	2,94	
16	1,60	1,65	1,75	1,84	1,94	2,02	2,09	2,17	2,23	2,30	2,36	
17	1,22	1,25	1,32	1,39	1,46	1,52	1,57	1,63	1,67	1,71	1,75	
18	0,82	0,85	0,90	0,95	0,99	1,02	1,06	1,09	1,13	1,16	1,18	
19	0,43	0,43	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54	0,55	0,57	0,58	0,59	
20												
21	0,43	0,44	0,46	0,48	0,51	0,54	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60	
22	0,84	0,87	0,93	0,97	1,02	1,06	1,09	1,12	1,15	1,17	1,19	
23	1,29	1,32	1,39	1,46	1,52	1,58	1,62	1,68	1,72	1,75	1,77	
24	1,71	1,76	1,86	1,95	2,04	2,11	2,17	2,23	2,29	2,33	2,35	
25	2,16	2,22	2,34	2,45	2,55	2,64	2,74	2,81	2,87	2,90	2,92	
26	2,56	2,64	2,78	2,91	3,03	3,15	3,26	3,37	3,47	3,55	3,62	
27	3,00	3,07	3,24	3,39	3,55	3,69	3,82	3,94	4,04	4,14	4,23	
28	3,48	3,57	3,75	3,92	4,08	4,23	4,37	4,51	4,62	4,73	4,80	
29	3,90	4,00	4,20	4,39	4,58	4,74	4,90	5,05	5,19	5,31	5,40	
30	4,40	4,52	4,75	4,96	5,16	5,35	5,52	5,67	5,79	5,91	5,99	

$$d_{20}^{20} = d_{20}^t \pm c/1000 \quad (c \text{ tra được từ bảng}) \quad \begin{cases} - \text{ nếu } t^\circ\text{C} < 20^\circ\text{C} \\ + \text{ nếu } t^\circ\text{C} > 20^\circ\text{C} \end{cases}$$

**Phụ lục 5: Bảng tra hàm lượng đường (g/l) trong dịch quả nho
theo tỷ trọng của dịch quả**

d_{20}^{20}	Đg (g/l)	d_{20}^{20}	Đg(g/l)	d_{20}^{20}	Đg(g/l)	d_{20}^{20}	Đg(g/l)	d_{20}^{20}	Đg(g/l)
1,041	87,5	1,067	154,2	1,093	220,8	1,082	192,6	1,108	257,4
1,042	90,1	1,068	156,7	1,094	222,8	1,083	195,2	1,109	259,9
1,043	92,7	1,069	159,3	1,095	225,3	1,084	197,8	1,110	262,4
1,044	95,2	1,070	161,9	1,096	227,8	1,085	200,3	1,111	264,8
1,045	97,8	1,071	164,4	1,097	230,2	1,086	202,9	1,112	267,3
1,046	100,3	1,072	167,0	1,098	232,7	1,087	205,5	1,113	269,8
1,047	102,9	1,073	169,5	1,099	235,2	1,088	208,0	1,114	272,3
1,048	105,5	1,074	172,1	1,100	237,6	1,089	210,6	1,115	274,7
1,049	108,0	1,075	174,7	1,101	240,1	1,090	213,2	1,116	277,2
1,050	110,6	1,076	177,3	1,102	242,6	1,091	215,7	1,117	279,7
1,051	113,2	1,077	179,8	1,103	245,1	1,092	218,2	1,118	282,1
1,052	115,7	1,078	182,4	1,104	247,5	1,093	220,8	1,119	284,6
1,053	118,3	1,079	185,0	1,105	250,0	1,094	222,8	1,120	287,1
1,054	120,9	1,080	187,5	1,106	252,5	1,095	225,3	1,121	289,6
1,055	123,4	1,081	190,1	1,107	255,0	1,096	227,8	1,122	292,0
1,056	126,0	1,082	192,6	1,071	164,4	1,097	230,2	1,123	294,5
1,057	128,5	1,083	195,2	1,072	167,0	1,098	232,7	1,124	297,0
1,058	131,1	1,084	197,8	1,073	169,5	1,099	235,2	1,125	299,4
1,059	133,7	1,085	200,3	1,074	172,1	1,100	237,6	1,126	301,9
1,060	136,8	1,086	202,9	1,075	174,7	1,101	240,1	1,127	304,4
1,061	138,8	1,087	205,5	1,076	177,3	1,102	242,6	1,128	306,9
1,062	141,4	1,088	208,0	1,077	179,8	1,103	245,1	1,129	309,3
1,063	143,9	1,089	210,6	1,078	182,4	1,104	247,5	1,130	311,8
1,064	146,5	1,090	213,2	1,079	185,0	1,105	250,0		
1,065	149,1	1,091	215,7	1,080	187,5	1,106	252,5		
1,066	151,6	1,092	218,2	1,081	190,1	1,107	255,0		

Chú thích:

d_{20}^{20} : Tỷ trọng của dịch quả ở 20°C so với nước cất 20°C.

Đg (g/l): Hàm lượng đường có trong dịch quả (g/l).

**Phụ lục 6: Bảng chuyển đổi giữa nồng độ chất khô (%)
và nồng độ đường (g/l) trong dịch nho ép**

Chất khô (%)	Đường (g/l)	Chất khô (%)	Đường (g/l)	Chất khô (%)	Đường (g/l)	Chất khô (%)	Đường (g/l)
10,0	85,4	13,0	116,8	16,0	148,9	19,0	181,8
10,2	87,5	13,2	118,9	16,2	151,0	19,2	184,0
10,4	89,6	13,4	121,0	16,4	153,2	19,4	186,2
10,6	91,6	13,6	123,1	16,6	155,4	19,6	188,4
10,8	93,7	13,8	125,3	16,8	157,6	19,8	190,7
11,0	95,8	14,0	127,4	17,0	159,7	20,0	192,9
11,2	97,9	14,2	129,5	17,2	161,9	20,2	195,1
11,4	100,0	14,4	131,7	17,4	164,1	20,4	197,4
11,6	102,0	14,6	133,8	17,6	166,3	20,6	199,6
11,8	104,1	14,8	135,9	17,8	168,5	20,8	201,9
12,0	106,2	15,0	138,0	18,0	170,7	21,0	204,1
12,2	108,4	15,2	140,2	18,2	172,9	21,2	206,4
12,4	110,5	15,4	142,4	18,4	175,1	21,4	208,6
12,6	112,6	15,6	144,5	18,6	177,3	21,6	210,9
12,8	114,7	15,8	146,7	18,8	179,5	21,8	213,1

Phụ lục 7: Bảng tra tỷ trọng d_{20}^{20} của dịch đường theo nồng độ chất khô (%)

Nồng độ (%)	d_{20}^{20}	Nồng độ (%)	d_{20}^{20}	Nồng độ (%)	d_{20}^{20}	Nồng độ (%)	d_{20}^{20}	Nồng độ (%)	d_{20}^{20}
1	1,0039	15	1,0611	29	1,1244	43	1,1943	57	1,2715
2	1,0078	16	1,0654	30	1,1291	44	1,1996	58	1,2773
3	1,0117	17	1,0698	31	1,1339	45	1,2049	59	1,2832
4	1,0157	18	1,0741	32	1,1388	46	1,2103	60	1,2891
5	1,0196	19	1,0785	33	1,1436	47	1,2156	61	1,2950
6	1,0237	20	1,0830	34	1,1485	48	1,2211	62	1,3010
7	1,0277	21	1,0874	35	1,1535	49	1,2265	63	1,3070
8	1,0318	22	1,0919	36	1,1585	50	1,2320	64	1,3130
9	1,0359	23	1,0965	37	1,1635	51	1,2376	65	1,3191
10	1,0400	24	1,1010	38	1,1685	52	1,2431	66	1,3252
11	1,0442	25	1,1056	39	1,1736	53	1,2487	67	1,3313
12	1,0484	26	1,1103	40	1,1788	54	1,2544	68	1,3375
13	1,0526	27	1,1149	41	1,1839	55	1,2601	69	1,3437
14	1,0568	28	1,1196	42	1,1891	56	1,2658	70	1,3500

**Phụ lục 8: Quan hệ giữa độ Brix, độ Bomê, nồng độ % khối lượng
và tỷ trọng của dịch đường**

°Bx	°Bé	%	d_{20}^{20}	d_4^{20}	d_4^{15}	°Bx	°Bé	%	d_{20}^{20}	d_4^{20}	d_4^{15}
0,0	0,0	0,0	1,0000	0,9982	1,0009	14,4	8,0	15,2	1,0585	1,0566	1,0595
0,4	0,2	0,4	1,0016	0,9998	1,0025	14,8	8,2	15,7	1,0602	1,0683	1,0612
0,8	0,4	0,8	1,0031	1,0013	1,0040	15,2	8,4	16,1	1,0619	1,0600	1,0629
1,2	0,7	1,2	1,0047	1,0029	1,0056	15,6	8,7	16,6	1,0636	1,0617	1,0646
1,6	0,9	1,6	1,0062	1,0045	1,0071	16,0	8,9	17,0	1,0653	1,0634	1,0663
2,0	1,1	2,0	1,0078	1,0060	1,0087	16,4	9,1	17,5	1,0671	1,0652	1,0681
2,4	1,3	2,4	1,0094	1,0076	1,0103	16,8	9,3	17,9	1,0688	1,0669	1,0698
2,8	1,6	2,8	1,0109	1,0091	1,0118	17,2	9,6	18,4	1,0706	1,0687	1,0716
3,2	1,8	3,2	1,0125	1,0107	1,0134	17,6	9,8	18,8	1,0723	1,0704	1,0733
3,6	2,0	3,6	1,0141	1,0123	1,0150	18,0	10,0	19,3	1,0740	1,0721	1,0750
4,0	2,2	4,1	1,0157	1,0139	1,0166	18,4	10,2	19,8	1,0758	1,0739	1,0768
4,4	2,4	4,5	1,0173	1,0155	1,0182	18,8	10,4	20,2	1,0776	1,0757	1,0786
4,8	2,7	4,9	1,0189	1,0171	1,0198	19,2	10,7	20,7	1,0793	1,0774	1,0803
5,2	2,9	5,3	1,0204	1,0186	1,0213	19,6	10,9	21,2	1,0811	1,0792	1,0821
5,6	3,1	6,6	1,0021	1,0203	1,0262	20,0	11,1	21,6	1,0829	1,0810	1,0839
6,0	3,3	6,1	1,0237	1,0219	1,0246	20,4	11,3	22,1	1,0846	1,0827	1,0856
6,4	3,6	6,6	1,0253	1,0235	1,0262	20,8	11,6	22,6	1,0864	1,0845	1,0874
6,8	3,8	7,0	1,0269	1,0251	1,0278	21,2	11,8	23,0	1,0882	1,0863	1,0892
7,2	4,0	7,4	1,0285	1,0267	1,0294	21,6	12,0	23,5	1,0900	1,0881	1,0910
7,6	4,2	7,8	1,0301	1,0283	1,0310	22,0	12,2	24,0	1,0918	1,0899	1,0928
8,0	4,4	8,2	1,0318	1,0300	1,0327	22,4	12,4	24,4	1,0927	1,0908	1,0937
8,4	4,7	8,7	1,0334	1,0316	1,0343	22,8	12,7	24,9	1,0945	1,0926	1,0955
8,8	4,9	9,1	1,0350	1,0332	1,0359	23,2	12,9	25,4	1,0964	1,0945	1,0974
9,2	5,1	9,5	1,0367	1,0349	1,0376	23,6	13,1	25,9	1,0982	1,0963	1,0992
9,6	5,3	10,0	1,0383	1,0365	1,0392	24,0	13,3	26,4	1,1009	1,0990	1,1019
10,0	5,6	10,4	1,0400	1,0382	1,0409	24,4	13,6	26,9	1,1028	1,1009	1,1038
10,4	5,8	10,8	1,0416	1,0398	1,0425	24,8	13,8	27,3	1,1046	1,1026	1,1056
13,2	7,3	13,9	1,0534	1,0515	1,0543	25,2	14,0	27,8	1,1064	1,1044	1,1074
13,6	7,6	14,3	1,0551	1,0532	1,0561	25,6	14,2	28,3	1,1083	1,1063	1,1093
14,0	7,8	14,8	1,0568	1,0549	1,0578	26,0	14,4	28,8	1,1101	1,1081	1,1111

Phụ lục 9: Bảng tra độ rượu (% v/v) theo tỷ trọng của dung dịch ethanol ở 20°C

$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V	$\frac{20}{d_{20}}$	%V
0,9999	0,07	0,9974	1,76	0,9949	3,50	0,9924	5,32	0,9899	7,24	0,9874	9,18	0,9849	11,34	0,9824	13,49	0,9799	15,64
0,9998	0,13	0,9973	1,83	0,9948	3,57	0,9923	5,39	0,9898	7,31	0,9873	9,26	0,9848	11,43	0,9823	13,58	0,9798	15,71
0,9997	0,20	0,9972	1,90	0,9947	3,64	0,9922	5,47	0,9897	7,39	0,9872	9,34	0,9847	11,51	0,9822	13,65	0,9797	15,78
0,9996	0,27	0,9971	1,97	0,9946	3,76	0,9921	5,54	0,9896	7,47	0,9871	9,43	0,9846	11,60	0,9821	13,72	0,9796	15,85
0,9995	0,34	0,9970	2,03	0,9945	3,78	0,9920	5,62	0,9895	7,55	0,9870	9,51	0,9845	11,68	0,9820	13,79	0,9795	15,92
0,9994	0,40	0,9969	2,10	0,9944	3,85	0,9919	5,69	0,9894	7,63	0,9869	9,58	0,9844	11,77	0,9819	13,86	0,9794	16,00
0,9993	0,47	0,9968	2,17	0,9943	3,92	0,9918	5,77	0,9893	7,71	0,9868	9,66	0,9843	11,85	0,9818	13,93	0,9793	16,07
0,9992	0,54	0,9967	2,24	0,9942	4,00	0,9917	5,84	0,9892	7,79	0,9867	9,74	0,9842	11,94	0,9817	14,00	0,9792	16,14
0,9991	0,61	0,9966	2,31	0,9941	4,07	0,9916	5,92	0,9891	7,87	0,9866	9,82	0,9841	12,02	0,9816	14,07	0,9791	16,21
0,9990	0,67	0,9965	2,38	0,9940	4,14	0,9915	6,00	0,9890	7,95	0,9865	9,90	0,9840	12,11	0,9815	14,14	0,9790	16,28
0,9989	0,74	0,9964	2,44	0,9939	4,22	0,9914	6,07	0,9889	8,03	0,9864	10,09	0,9839	12,19	0,9814	14,21	0,9789	16,35
0,9988	0,81	0,9963	2,51	0,9938	4,29	0,9913	6,15	0,9888	8,12	0,9863	10,17	0,9838	12,28	0,9813	14,28	0,9788	16,42
0,9987	0,88	0,9962	2,58	0,9937	4,36	0,9912	6,22	0,9887	8,20	0,9862	10,26	0,9837	12,36	0,9812	14,35	0,9787	16,49
0,9986	0,94	0,9961	2,65	0,9936	4,43	0,9911	6,30	0,9886	8,28	0,9861	10,34	0,9836	12,45	0,9811	14,42	0,9786	16,56
0,9985	1,01	0,9960	2,72	0,9935	4,51	0,9910	6,38	0,9885	8,36	0,9860	10,42	0,9835	12,54	0,9810	14,49	0,9785	16,63
0,9984	1,08	0,9959	2,79	0,9934	4,58	0,9909	6,46	0,9884	8,44	0,9859	10,51	0,9834	12,62	0,9809	14,56	0,9784	16,70
0,9983	1,15	0,9958	2,86	0,9933	4,65	0,9908	6,53	0,9883	8,52	0,9858	10,59	0,9833	12,71	0,9808	14,63	0,9783	16,77
0,9982	1,21	0,9957	2,93	0,9932	4,72	0,9907	6,61	0,9882	8,60	0,9857	10,67	0,9832	12,80	0,9807	14,70	0,9782	16,84
0,9981	1,28	0,9956	3,00	0,9931	4,80	0,9906	6,69	0,9881	8,68	0,9856	10,76	0,9831	12,89	0,9806	14,77	0,9781	16,91
0,9980	1,35	0,9955	3,08	0,9930	4,87	0,9905	6,77	0,9880	8,76	0,9855	10,84	0,9830	12,97	0,9805	14,84	0,9780	16,98
0,9979	1,42	0,9954	3,15	0,9929	4,94	0,9904	6,84	0,9879	8,85	0,9854	10,92	0,9829	13,06	0,9804	14,91	0,9779	17,05
0,9978	1,49	0,9953	3,22	0,9928	5,01	0,9903	6,92	0,9878	8,93	0,9853	11,00	0,9828	13,15	0,9803	14,98	0,9778	17,12
0,9977	1,56	0,9952	3,29	0,9927	5,09	0,9902	7,00	0,9877	9,03	0,9852	11,09	0,9827	13,24	0,9802	15,05	0,9777	17,19
0,9976	1,62	0,9951	3,36	0,9926	5,16	0,9901	7,08	0,9876	9,10	0,9851	11,17	0,9826	13,32	0,9801	15,12	0,9776	17,26
0,9975	1,69	0,9950	3,43	0,9925	5,24	0,9900	7,16	0,9875	9,19	0,9850	11,26	0,9825	13,41	0,9800	15,19	0,9775	17,33

Phụ lục 9 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V
0,9824	13,50	0,9799	15,73	0,9774	18,03	0,9749	20,40	0,9724	22,70	0,9699	24,95	0,9674	27,12				
0,9823	13,55	0,9798	15,82	0,9773	18,13	0,9748	20,50	0,9723	22,80	0,9698	25,04	0,9673	27,20				
0,9822	13,60	0,9797	15,91	0,9772	18,22	0,9747	20,59	0,9722	22,89	0,9697	25,13	0,9672	27,29				
0,9821	13,70	0,9796	16,00	0,9771	18,32	0,9746	20,68	0,9721	22,98	0,9696	25,22	0,9671	27,38				
0,9820	13,80	0,9795	16,09	0,9770	18,41	0,9745	20,78	0,9720	23,07	0,9695	25,30	0,9670	27,46				
0,9819	13,90	0,9794	16,18	0,9769	18,50	0,9744	20,87	0,9719	23,16	0,9694	25,39	0,9669	27,54				
0,9818	14,03	0,9793	16,27	0,9768	18,60	0,9743	20,97	0,9718	23,25	0,9693	25,48	0,9668	27,63				
0,9817	14,12	0,9792	16,36	0,9767	18,69	0,9742	21,06	0,9717	23,34	0,9692	25,57	0,9667	27,72				
0,9816	14,21	0,9791	16,45	0,9766	18,79	0,9741	21,15	0,9716	23,43	0,9691	25,66	0,9666	27,80				
0,9815	14,30	0,9790	16,55	0,9765	18,88	0,9740	21,24	0,9715	23,52	0,9690	25,74	0,9665	27,88				
0,9814	14,39	0,9789	16,64	0,9764	18,93	0,9739	21,33	0,9714	23,61	0,9689	25,83	0,9664	27,97				
0,9813	14,48	0,9788	16,73	0,9763	19,08	0,9738	21,42	0,9713	23,70	0,9688	25,92	0,9663	28,06				
0,9812	14,56	0,9787	16,82	0,9762	19,17	0,9737	21,52	0,9712	23,79	0,9687	26,00	0,9662	28,14				
0,9811	14,65	0,9786	16,91	0,9761	19,25	0,9736	21,61	0,9711	23,88	0,9686	26,09	0,9661	28,22				
0,9810	14,74	0,9785	17,01	0,9760	19,36	0,9735	21,70	0,9710	23,97	0,9685	26,18	0,9660	28,31				
0,9809	14,83	0,9784	17,10	0,9759	19,46	0,9734	21,79	0,9709	24,06	0,9684	26,26	0,9659	28,39				
0,9808	14,92	0,9783	17,18	0,9758	19,55	0,9733	21,88	0,9708	24,15	0,9683	26,35	0,9658	28,47				
0,9807	15,01	0,9782	17,28	0,9757	19,65	0,9732	21,98	0,9707	24,24	0,9682	26,43	0,9657	28,56				
0,9806	15,10	0,9781	17,38	0,9756	19,74	0,9731	22,07	0,9706	24,33	0,9681	26,52	0,9656	28,64				
0,9805	15,19	0,9780	17,47	0,9755	19,84	0,9730	22,16	0,9705	24,42	0,9680	26,60	0,9655	28,72				
0,9804	15,28	0,9779	17,56	0,9754	19,93	0,9729	22,25	0,9704	24,51	0,9679	26,69	0,9654	28,81				
0,9803	15,37	0,9778	17,66	0,9753	20,02	0,9728	22,34	0,9703	24,60	0,9678	26,78	0,9653	28,89				
0,9802	15,46	0,9777	17,75	0,9752	20,12	0,9727	22,43	0,9702	24,69	0,9677	26,86	0,9652	28,98				
0,9801	15,55	0,9776	17,85	0,9751	20,21	0,9726	22,52	0,9701	24,77	0,9676	26,95	0,9651	29,06				
0,9800	15,64	0,9775	17,94	0,9750	20,31	0,9725	22,61	0,9700	24,86	0,9675	27,03	0,9650	29,14				

Phụ lục 9 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V
0,9649	23	0,9623	32	0,9597	29	0,9571	16	0,9545	93	0,9519	64	0,9493	27		
0,9648	31	0,9622	40	0,9596	36	0,9570	23	0,9544	37,00	0,9518	70	0,9492	33		
0,9647	39	0,9621	47	0,9595	44	0,9569	30	0,9543	37,07	0,9517	76	0,9491	39		
0,9646	47	0,9620	55	0,9594	51	0,9568	37	0,9542	13	0,9516	83	0,9490	46		
0,9645	56	0,9619	63	0,9593	58	0,9567	44	0,9541	20	0,9515	89	0,9489	52		
0,9644	64	0,9618	71	0,9592	66	0,9566	50	0,9540	27	0,9514	95	0,9488	58		
0,9643	72	0,9617	78	0,9591	73	0,9565	57	0,9539	34	0,9513	39,02	0,9487	64		
0,9642	80	0,9616	86	0,9590	81	0,9564	64	0,9538	40	0,9512	39,08	0,9486	70		
0,9641	88	0,9615	94	0,9589	33,88	0,9563	71	0,9537	47	0,9511	14	0,9485	77		
0,9640	96	0,9614	32,01	0,9588	95	0,9562	78	0,9536	53	0,9510	21	0,9484	83		
0,9639	30,04	0,9613	32,09	0,9587	34,02	0,9561	85	0,9535	60	0,9509	27	0,9483	89		
0,9638	13	0,9612	16	0,9586	10	0,9560	92	0,9534	66	0,9508	33	0,9482	95		
0,9637	21	0,9611	24	0,9585	17	0,9559	99	0,9533	73	0,9507	40	0,9481	41,01		
0,9636	29	0,9610	32	0,9584	24	0,9558	36,05	0,9532	79	0,9506	46	0,9480	41,07		
0,9635	37	0,9609	39	0,9583	31	0,9557	12	0,9531	86	0,9505	52	0,9479	13		
0,9634	45	0,9608	47	0,9582	38	0,9556	19	0,9530	92	0,9504	59	0,9478	19		
0,9633	53	0,9607	54	0,9581	45	0,9555	26	0,9529	99	0,9503	65	0,9477	25		
0,9632	61	0,9606	62	0,9580	52	0,9554	36,32	0,9528	38,06	0,9502	71	0,9476	31		
0,9631	69	0,9605	70	0,9579	59	0,9553	40	0,9527	12	0,9501	77	0,9475	38		
0,9630	77	0,9604	77	0,9578	66	0,9552	46	0,9526	19	0,9500	39,84	0,9474	44		
0,9629	84	0,9603	85	0,9577	74	0,9551	53	0,9525	25	0,9499	90	0,9473	50		
0,9628	92	0,9602	92	0,9576	81	0,9550	60	0,9524	32	0,9498	96	0,9472	56		
0,9627	31,00	0,9601	99	0,9575	88	0,9549	66	0,9523	38	0,9497	40,02	0,9471	62		
0,9626	31,08	0,9600	33,07	0,9574	95	0,9548	73	0,9522	45	0,9496	40,08	0,9470	68		
0,9625	16	0,9599	14	0,9573	35,02	0,9547	80	0,9521	51	0,9495	15	0,9469	74		
0,9624	31,24	0,9598	22	0,9572	35,09	0,9546	86	0,9520	58	0,9494	21	0,9468	80		

Phụ lục 9 (tiếp theo)

d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V	d_{20}^{20}	%V
0,9467	86	0,9443	26	0,9419	62	0,9395	95	0,9371	25	0,9347	52	0,9323	76				
0,9466	92	0,9442	32	0,9418	68	0,9394	46,01	0,9370	31	0,9346	58	0,9322	82				
0,9465	98	0,9441	38	0,9417	74	0,9393	46,06	0,9369	36	0,9345	63	0,9321	87				
0,9464	42,04	0,9440	43	0,9416	79	0,9392	12	0,9368	42	0,9344	38	0,9320	92				
0,9463	10	0,9439	49	0,9415	85	0,9391	17	0,9367	47	0,9343	73	0,9319	97				
0,9462	16	0,9438	55	0,9414	90	0,9390	23	0,9366	52	0,9342	78	0,9318	50,02				
0,9461	21	0,9437	60	0,9413	96	0,9389	28	0,9365	57	0,9341	84	0,9317	50,07				
0,9460	27	0,9436	66	0,9412	45,02	0,9388	34	0,9364	63	0,9340	89	0,9316	12				
0,9459	33	0,9435	72	0,9411	45,07	0,9387	39	0,9363	68	0,9339	94	0,9315	17				
0,9458	39	0,9434	78	0,9410	13	0,9386	44	0,9362	73	0,9338	99	0,9314	22				
0,9457	45	0,9433	83	0,9409	18	0,9385	50	0,9361	79	0,9337	49,04	0,9313	28				
0,9456	51	0,9432	89	0,9408	24	0,9384	55	0,9360	84	0,9336	10	0,9312	33				
0,9455	56	0,9431	95	0,9407	29	0,9383	61	0,9359	89	0,9335	15	0,9311	38				
0,9454	62	0,9430	44,00	0,9406	35	0,9382	66	0,9358	94	0,9334	20	0,9310	43				
0,9453	68	0,9429	44,06	0,9405	40	0,9381	71	0,9357	48,00	0,9333	25						
0,9452	74	0,9428	12	0,9404	46	0,9380	77	0,9356	48,05	0,9332	30						
0,9451	80	0,9427	18	0,9403	51	0,9379	82	0,9355	10	0,9331	35						
0,9450	86	0,9426	23	0,9402	57	0,9378	88	0,9354	16	0,9330	41						
0,9449	42,92	0,9425	29	0,9401	62	0,9377	93	0,9353	21	0,9329	46						
0,9448	97	0,9424	34	0,9400	68	0,9376	98	0,9352	26	0,9328	51						
0,9447	43,03	0,9423	40	0,9399	73	0,9375	47,04	0,9351	32	0,9327	56						
0,9446	43,09	0,9422	46	0,9398	79	0,9374	47,09	0,9350	37	0,9326	61						
0,9445	43,15	0,9421	51	0,9397	84	0,9373	15	0,9349	42	0,9325	66						
0,9444	43,2	0,9420	57	0,9396	90	0,9372	20	0,9348	47	0,9324	71						

%V: nồng độ phần trăm thể tích của dịch.

 d_{20}^{20} : Tỷ trọng của dịch ở 20°C với nước cất 20°C.

Phụ lục 10: Bảng hệ số hiệu chỉnh tỷ trọng ($d < 1$) đo được về 20°C

T°C	Tỷ trọng biểu kiến đo được						
	0,9980 - 0,9940	0,9939 - 0,9890	0,9889 - 0,9850	0,9849 - 0,9810	0,9809 - 0,9770	0,9769 - 0,9730	0,9729 - 0,9690
10	1,5	1,6	1,8	2,1	2,4	2,8	3,1
11	1,4	1,5	1,7	1,9	2,2	2,6	2,8
12	1,3	1,4	1,5	1,7	2,0	2,4	2,6
13	1,2	1,3	1,4	1,6	1,8	2,0	2,3
14	1,0	1,1	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
15	0,9	1,0	1,1	1,2	1,4	1,6	1,7
16	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,3	1,4
17	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1
18	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,7
19	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
21	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4
22	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7
23	0,6	0,7	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1
24	0,9	1,0	1,0	1,1	1,2	1,4	1,5
25	1,1	1,2	1,3	1,4	1,6	1,8	1,9
26	1,4	1,5	1,6	1,7	1,9	2,1	2,3
27	1,7	1,8	1,9	2,0	2,2	2,5	2,8
28	2,0	2,1	2,2	2,3	2,6	2,9	3,2
29	2,3	2,4	2,5	2,6	3,0	3,3	3,6
30	2,6	2,7	2,8	3,0	3,4	3,7	4,0

Ghi chú: T°C: Nhiệt độ của dịch khí đem đi xác định tỷ trọng.

Phụ lục 11: Hiệu chỉnh độ côn theo nhiệt độ 20°C

T°		Độ côn biểu kiến tại các nhiệt độ										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	Cộng	0,76	0,77	0,82	0,87	0,95	1,04	1,16	1,31	1,49	1,70	1,95
1		0,81	0,83	0,87	0,92	1,00	1,09	1,20	1,36	1,52	1,73	1,97
2		0,85	0,87	0,92	0,97	1,04	1,13	1,24	1,38	1,54	1,74	1,97
3		0,88	0,91	0,95	1,00	1,07	1,15	1,26	1,39	1,55	1,73	1,95
4		0,90	0,92	0,97	1,02	1,09	1,17	1,27	1,40	1,55	1,72	1,92
5		0,91	0,93	0,98	1,03	1,10	1,17	1,27	1,39	1,53	1,69	1,87
6		0,92	0,94	0,98	1,02	1,09	1,16	1,25	1,37	1,50	1,65	1,82
7		0,91	0,93	0,97	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,45	1,59	1,75
8		0,89	0,91	0,94	0,98	1,04	1,11	1,19	1,28	1,39	1,52	1,66
9		0,86	0,88	0,91	0,95	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,44	1,57
10		0,82	0,84	0,87	0,91	0,96	1,01	1,08	1,16	1,25	1,35	1,47
11		0,78	0,79	0,82	0,86	0,9	0,95	1,01	1,08	1,16	1,25	1,36
12		0,72	0,74	0,76	0,79	0,83	0,88	0,93	0,99	1,07	1,15	1,24
13		0,66	0,67	0,69	0,72	0,76	0,80	0,84	0,90	0,96	1,03	1,11
14		0,59	0,60	0,62	0,64	0,67	0,71	0,74	0,79	0,85	0,91	0,97
15		0,51	0,52	0,53	0,55	0,58	0,61	0,64	0,68	0,73	0,77	0,83
16		0,42	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0,56	0,60	0,63	0,67
17		0,33	0,33	0,34	0,35	0,37	0,39	0,41	0,43	0,46	0,48	0,51
18		0,23	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,29	0,31	0,33	0,35
19		0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18
21	Trừ		0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19
22			0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37
23			0,40	0,41	0,42	0,44	0,45	0,47	0,49	0,51	0,54	0,57
24			0,55	0,56	0,58	0,60	0,62	0,64	0,67	0,70	0,73	0,77
25			0,69	0,71	0,73	0,76	0,79	0,82	0,85	0,89	0,93	0,97
26			0,85	0,87	0,90	0,93	0,96	1,00	1,04	1,08	1,13	1,18
27				1,03	1,07	1,11	1,15	1,19	1,23	1,28	1,34	1,40
28				1,21	1,25	1,29	1,33	1,38	1,43	1,49	1,55	1,62
29				1,39	1,43	1,47	1,52	1,58	1,63	1,70	1,76	1,84
30				1,57	1,61	1,66	1,72	1,78	1,84	1,91	1,98	2,07
31				1,75	1,80	1,86	1,92	1,98	2,05	2,13	2,21	2,30
32				1,94	2,00	2,06	2,13	2,20	2,27	2,35	2,44	2,53
33					2,20	2,27	2,34	2,42	2,50	2,58	2,67	2,77
34					2,41	2,48	2,56	2,64	2,72	2,81	2,91	3,02
35					2,62	2,70	2,78	2,86	2,95	3,05	3,16	3,27
36					2,83	2,91	3,00	3,09	3,19	3,29	3,41	3,53
37						3,13	3,23	3,33	3,43	3,54	3,65	3,78
38						3,36	3,47	3,57	3,68	3,79	3,91	4,03
39						3,59	3,70	3,81	3,93	4,05	4,17	4,30
40						3,82	3,94	4,06	4,18	4,31	4,44	4,57

Phụ lục 11 (tiếp theo)

T°		Độ cồn biểu kiến tại các nhiệt độ									
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0	Cộng	2,26	2,62	3,03	3,49	4,02	4,56	5,11	5,65	6,16	6,63
1		2,26	2,59	2,97	3,40	3,87	4,36	4,86	5,35	5,82	6,26
2		2,24	2,54	2,89	3,29	3,72	4,17	4,61	5,05	5,49	5,89
3		2,20	2,48	2,80	3,16	3,55	3,95	4,36	4,77	5,17	5,53
4		2,15	2,41	2,71	3,03	3,38	3,75	4,11	4,48	4,84	5,17
5		2,08	2,33	2,60	2,89	3,21	3,54	3,86	4,2	4,52	4,83
6		2,01	2,23	2,47	2,74	3,02	3,32	3,61	3,91	4,21	4,49
7		1,92	2,12	2,34	2,58	2,83	3,10	3,36	3,63	3,90	4,15
8		1,82	2,00	2,20	2,42	2,65	2,88	3,11	3,35	3,59	3,81
9		1,71	1,87	2,05	2,24	2,44	2,65	2,86	3,07	3,28	3,48
10		1,60	1,74	1,89	2,06	2,24	2,43	2,61	2,80	2,98	3,16
11		1,47	1,60	1,73	1,88	2,03	2,20	2,36	2,52	2,68	2,83
12		1,34	1,44	1,56	1,69	1,82	1,96	2,10	2,24	2,38	2,51
13		1,19	1,28	1,38	1,49	1,61	1,73	1,84	1,96	2,08	2,20
14		1,04	1,12	1,20	1,29	1,39	1,49	1,58	1,68	1,78	1,88
15		0,89	0,95	1,02	1,09	1,16	1,24	1,32	1,40	1,48	1,56
16		0,72	0,77	0,82	0,88	0,94	1,00	1,06	1,12	1,19	1,25
17		0,55	0,59	0,62	0,67	0,71	0,75	0,80	0,84	0,89	0,94
18		0,37	0,40	0,42	0,45	0,48	0,51	0,53	0,56	0,59	0,62
19		0,19	0,20	0,21	0,23	0,24	0,25	0,27	0,28	0,30	0,31
21	Trừ	0,19	0,20	0,22	0,23	0,25	0,26	0,28	0,29	0,30	0,31
22		0,39	0,41	0,44	0,47	0,49	0,52	0,55	0,57	0,60	0,62
23		0,60	0,63	0,66	0,70	0,74	0,78	0,82	0,86	0,90	0,93
24		0,81	0,85	0,89	0,94	0,99	1,04	1,10	1,15	1,20	1,25
25		1,02	1,07	1,13	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,56
26		1,24	1,30	1,36	1,43	1,50	1,57	1,65	1,73	1,80	1,87
27		1,46	1,53	1,60	1,68	1,76	1,84	1,93	2,01	2,10	2,18
28		1,69	1,77	1,85	1,93	2,02	2,11	2,21	2,31	2,40	2,49
29		1,92	2,01	2,10	2,19	2,29	2,39	2,50	2,60	2,70	2,81
30		2,15	2,25	2,35	2,45	2,56	2,67	2,78	2,90	3,01	3,12
31		2,39	2,49	2,60	2,71	2,83	2,94	3,07	3,19	3,31	3,43
32		2,63	2,74	2,86	2,97	3,09	3,22	3,36	3,49	3,62	3,74
33		2,88	2,99	3,12	3,24	3,37	3,51	3,65	3,79	3,92	4,06
34		3,13	3,25	3,38	3,51	3,65	3,79	3,94	4,09	4,23	4,37
35		3,39	3,51	3,64	3,78	3,93	4,08	4,23	4,38	4,53	4,69
36		3,65	3,78	3,91	4,05	4,21	4,37	4,52	4,68	4,84	5,00
37		3,91	4,04	4,18	4,33	4,49	4,65	4,82	4,98	5,15	5,31
38		4,17	4,31	4,46	4,61	4,77	4,94	5,12	5,29	5,46	5,63
39		4,44	4,58	4,74	4,90	5,06	5,23	5,41	5,59	5,77	5,94
40		4,71	4,86	5,02	5,19	5,36	5,53	5,71	5,90	6,08	6,26

Phụ lục 11 (tiếp theo)

T°		Độ cồn biểu kiến tại các nhiệt độ									
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0	Cộng	7,05	7,39	7,67	7,91	8,07	8,20	8,30	8,36	8,39	8,4
1		6,64	6,96	7,23	7,45	7,62	7,75	7,85	7,91	7,95	7,96
2		6,25	6,55	6,81	7,02	7,18	7,31	7,40	7,47	7,51	7,53
3		5,85	6,14	6,39	6,59	6,74	6,86	6,97	7,03	7,07	7,09
4		5,48	5,74	5,97	6,16	6,31	6,43	6,53	6,59	6,63	6,66
5		5,11	5,35	5,56	5,74	5,89	6,00	6,10	6,16	6,20	6,23
6		4,74	4,96	5,16	5,33	5,47	5,58	5,67	5,73	5,77	5,80
7		4,38	4,58	4,77	4,92	5,05	5,15	5,24	5,30	5,34	5,37
8		4,02	4,21	4,38	4,52	4,64	4,74	4,81	4,87	4,92	4,95
9		3,67	3,84	3,99	4,12	4,23	4,32	4,39	4,45	4,50	4,53
10		3,33	3,48	3,61	3,73	3,83	3,91	3,98	4,03	4,08	4,11
11		2,98	3,12	3,24	3,34	3,43	3,50	3,57	3,62	3,66	3,69
12		2,64	2,76	2,87	2,96	3,04	3,10	3,16	3,21	3,25	3,27
13		2,31	2,41	2,50	2,58	2,65	2,71	2,76	2,80	2,83	2,85
14		1,97	2,06	2,13	2,20	2,26	2,31	2,36	2,39	2,42	2,44
15		1,64	1,71	1,77	1,83	1,88	1,92	1,96	1,98	2,01	2,03
16		1,31	1,36	1,41	1,46	1,50	1,53	1,56	1,58	1,60	1,62
17		0,98	1,02	1,05	1,09	1,12	1,14	1,17	1,18	1,20	1,21
18		0,65	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,78	0,79	0,80	0,81
19		0,33	0,34	0,35	0,36	0,37	0,38	0,39	0,40	0,40	0,41
21	Trừ	0,33	0,34	0,35	0,35	0,37	0,38	0,38	0,39	0,39	0,40
22		0,65	0,67	0,70	0,72	0,74	0,75	0,76	0,78	0,79	0,80
23		0,97	1,01	1,04	1,07	1,10	1,12	1,15	1,17	1,18	1,19
24		1,29	1,34	1,39	1,43	1,46	1,50	1,53	1,55	1,57	1,59
25		1,62	1,68	1,73	1,78	1,83	1,87	1,90	1,94	1,97	1,99
26		1,94	2,01	2,07	2,13	2,19	2,24	2,28	2,32	2,35	2,38
27		2,26	2,34	2,41	2,48	2,55	2,61	2,66	2,70	2,74	2,77
28		2,58	2,67	2,76	2,83	2,90	2,98	3,03	3,08	3,13	3,17
29		2,91	3,00	3,09	3,18	3,26	3,34	3,40	3,46	3,51	3,55
30		3,23	3,34	3,44	3,53	3,62	3,70	3,77	3,84	3,90	3,95
31		3,55	3,67	3,78	3,88	3,98	4,07	4,15	4,22	4,28	4,33
32		3,87	4,00	4,11	4,22	4,33	4,43	4,51	4,59	4,66	4,72
33		4,2	4,33	4,45	4,57	4,68	4,79	4,88	4,97	5,04	5,10
34		4,52	4,66	4,79	4,91	5,03	5,15	5,25	5,34	5,42	5,49
35		4,84	4,98	5,12	5,26	5,38	5,50	5,61	5,71	5,80	5,87
36		5,16	5,31	5,46	5,60	5,73	5,86	5,97	6,08	6,17	6,25
37		5,48	5,64	5,80	5,95	6,06	6,22	6,33	6,44	6,54	6,63
38		5,80	5,97	6,13	6,29	6,43	6,57	6,69	6,81	6,92	7,01
39		6,12	6,30	6,47	6,63	6,78	6,93	7,06	7,18	7,29	7,39
40		6,44	6,62	6,80	6,97	7,13	7,28	7,41	7,54	7,66	7,76

**Phụ lục 12: Quan hệ giữa lượng đồng Cu (mg) và lượng glucoza (mg)
khi xác định đường khử theo phương pháp Bertran**

Cu	Glucoza	Cu	Glucoza	Cu	Glucoza	Cu	Glucoza
2	0,98	46	23,10	90	47,00	134	72,56
3	1,37	47	23,65	91	47,55	135	73,19
4	1,82	48	24,16	92	48,11	136	73,81
5	2,27	49	24,70	93	48,67	137	74,44
6	2,94	50	25,21	94	49,22	138	75,06
7	3,43	51	25,74	95	49,78	139	75,65
8	3,92	52	26,26	96	50,35	140	76,25
9	4,41	53	26,69	97	50,94	141	76,87
10	5,90	54	27,30	98	51,50	142	77,50
11	5,40	55	27,84	99	52,07	143	78,71
12	5,92	56	28,37	100	52,65	144	79,31
13	6,37	57	28,90	101	53,23	145	79,94
14	6,86	58	29,42	102	53,82	146	80,56
15	7,35	59	29,95	103	54,39	147	81,19
16	7,84	60	30,50	104	54,94	148	81,00
17	8,33	61	31,05	105	55,53	149	81,00
18	8,92	62	31,58	106	56,11	150	82,44
19	9,31	63	32,11	107	56,67	151	83,06
20	9,80	64	32,67	108	57,23	152	83,68
21	10,30	65	33,21	109	57,82	153	84,33
22	10,80	66	33,74	110	58,39	154	85,00
23	11,31	67	34,25	111	58,94	155	85,62
24	11,84	68	34,83	112	59,53	156	86,25
25	12,36	69	35,39	113	60,12	157	86,87
26	19,85	70	35,94	114	60,71	158	87,50
27	13,35	71	36,47	115	61,29	159	88,12
28	13,85	72	37,00	116	61,88	160	88,75
29	14,38	73	37,55	117	62,47	161	89,37
30	14,90	74	38,10	118	63,06	162	90,00
31	15,40	75	38,63	119	63,65	163	90,62
32	15,90	76	39,17	120	64,23	164	91,25
33	16,40	77	39,72	121	64,82	165	91,91
34	16,90	78	40,28	122	65,41	166	92,53
35	17,40	79	40,83	123	66,00	167	93,19
36	17,90	80	41,39	124	66,59	168	93,81
37	18,42	81	41,44	125	67,18	169	94,44
38	18,95	82	42,58	126	67,76	170	95,06
39	19,45	83	43,05	127	68,35	171	95,69
40	19,95	84	43,51	128	68,94	172	96,31
41	20,47	85	44,18	129	69,53	173	96,94
42	21,00	86	44,80	130	70,12	174	97,60
43	21,33	87	45,33	131	70,75	175	98,25
44	22,05	88	45,89	132	71,35		
45	22,58	89	46,44	133	71,94		

**Phụ lục 13: Quan hệ giữa lượng đồng Cu (mg) và lượng maltoza (mg)
khi xác định đường khử theo phương pháp Bertran**

Cu	Maltoza	Cu	Maltoza	Cu	Maltoza	Cu	Maltoza
1	0,89	26	23,46	51	46,36	76	69,55
2	1,78	27	24,36	52	47,26	77	70,44
3	2,68	28	25,25	53	48,18	78	71,40
4	3,57	29	26,09	54	49,09	79	72,36
5	4,51	30	27,00	55	50,00	80	73,27
6	5,36	31	27,91	56	50,91	81	74,20
7	6,25	32	28,00	57	51,90	82	75,18
8	7,17	33	29,73	58	52,82	83	76,09
9	8,04	34	30,64	59	53,71	84	77,00
10	8,93	35	31,35	60	54,70	85	77,91
11	9,82	36	32,50	61	55,64	86	78,80
12	10,72	37	33,54	62	56,54	87	79,82
13	11,64	38	34,36	63	57,50	88	80,78
14	12,54	39	35,27	64	58,45	89	81,64
15	13,45	40	36,18	65	59,36	90	82,60
16	14,36	41	37,10	66	60,19	91	83,52
17	15,27	42	38,09	67	61,18	92	84,46
18	16,18	43	39,00	68	62,10	93	85,36
19	17,00	44	39,91	69	63,09	94	86,37
20	18,00	45	40,81	70	64,00	95	87,20
21	18,90	46	41,73	71	64,81	96	88,18
22	19,31	47	42,64	72	65,58	97	89,00
23	20,72	48	43,54	73	66,73	98	90,00
24	21,64	49	44,50	74	67,69	99	91,00
25	22,55	50	45,45	75	68,64	100	91,91

Phụ lục 14: Bảng Mac Grady 1: Xác định giá trị MPN theo số đặc trưng

Số ống cho một độ pha loãng													
2				3				5					
Sdt	MPN	Sdt	MPN	Sdt	MPN	Sdt	MPN	Sdt	MPN	Sdt	MPN	Sdt	MPN
000	0,0	000	0	222	3,5	000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,5	001	0,3	223	4	001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5
010	0,5	010	0,3	230	3	002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7
011	0,9	011	0,6	231	3,5	010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
020	0,9	020	0,6	232	4	011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12
100	0,6	100	0,4	300	2,5	012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15
101	1,2	101	0,7	301	4,0	020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
110	1,3	102	1,1	302	6,5	021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8
111	2,0	110	0,7	310	4,5	030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11
120	2,0	111	1,1	311	7,5	100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14
121	3,0	120	1,1	312	11,5	101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
200	2,5	121	1,5	313	16	102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20
201	5	130	1,6	320	9,5	103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25
210	6	200	0,9	321	15	110	0,4	310	1,1	440	3,5	540	13
211	13	201	1,4	322	20	111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17
212	20	202	2,0	323	30	112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25
220	25	210	1,5	330	25	120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30
221	70	211	2	331	45	121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35
222	110	212	3	332	110	122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45
		220	2	333	140	130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25
		221	3			131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35
						140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60
						200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90
						201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160
						202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180

Phụ lục 15: Bảng Mac Grady 2

Số ống dương tính cho 3 độ pha loãng liên tiếp			MPN	Độ tin cậy			
10^0	10^{-1}	10^{-2}		95%		99%	
0	0	0	<0,3	—	—	—	—
0	0	1	0,3	<0,1	1,7	<0,1	2,3
0	1	0	0,3	<0,1	1,7	<0,1	2,3
0	2	0	0,6	0,2	2,3	0,1	2,9
1	0	0	0,4	0,1	2,1	<0,1	2,8
1	0	1	0,7	0,2	2,7	0,1	3,5
1	1	0	0,7	0,2	2,8	0,1	3,6
1	1	1	1,1	0,4	3,4	0,2	4,3
1	2	0	1,1	0,4	3,5	0,2	4,4
1	2	1	1,5	0,6	4,1	0,4	5,1
1	3	0	1,6	0,6	4,2	0,4	5,2
2	0	0	0,9	0,2	3,8	0,1	5,0
2	0	1	1,4	0,5	4,8	0,3	6,2
2	1	0	1,5	0,5	5,0	0,3	6,5
2	1	1	2,0	0,8	6,1	0,5	7,7
2	2	0	2,1	0,8	6,3	0,5	8,0
2	2	1	2,8	1,1	7,5	0,7	9,3
2	3	0	2,9	1,2	7,8	0,8	9,7
3	0	0	2,3	0,7	12,9	0,4	17,7
3	0	1	4	1	18	1	23
3	0	2	6	2	23	1	29
3	1	0	4	2	21	1	29
3	1	1	7	2	28	2	37
3	1	2	12	4	35	2	45
3	2	0	9	3	39	2	52
3	2	1	15	5	51	3	65
3	2	2	21	8	64	5	82
3	2	3	29	12	80	8	99
3	3	0	20	10	140	<10	190
3	3	1	50	20	240	10	320
3	3	2	110	30	480	20	640
3	3	3	>110				

**Phụ lục 16: Bảng chỉ tiêu vi sinh vật trong các sản phẩm thực phẩm
(theo quyết định của Bộ trưởng Bộ Y tế, số 667/1998/QĐ-BYT)**

STT	Nhóm thực phẩm	Chỉ tiêu vi sinh											
		1	2	3	4	5	6	7	8*	9	10	11	12
1	Thịt												
	Thịt tươi	10 ⁶	-	10 ²	10 ²	-	10 ²	-	0	-	-	-	-
	Sản phẩm thịt (sử dụng trực tiếp)	3.10 ⁵	50	3	10	10	10	10	0	-	-	-	-
2	Cá và thủy sản												
	Cá và thủy sản tươi, quá xử lý nhiệt trước khi sử dụng	10 ⁶	-	10 ²	10 ²	10 ²	-	-	0	-	-	10 ²	-
	Sản phẩm chế biến từ cá và thủy sản (không cần xử lý nhiệt khi sử dụng)	10 ⁵	10	3	10	10	-	10	0	-	-	10	-
	Thủy sản khô sơ chế (qua xử lý nhiệt khi sử dụng)	10 ⁶	10 ²	10	10 ²	10 ²	-	-	0	-	-	10 ²	-
3	Trứng												
	Trứng tươi, dịch trứng tươi hoặc đông lạnh	10 ⁵	10 ²	3	10	-	-	-	0	-	-	-	-
	Sản phẩm chế biến từ trứng đã tiệt trùng Pasteur	10 ³	10	0	3	-	-	-	0	-	-	-	-
4	Sữa												
	Sữa khô, bột	5.10 ⁴	10	0	0	-	-	-	0	-	-	-	-
	Sữa tiệt trùng theo phương pháp Pasteur	5.10 ⁴	10	3	-	-	-	-	0	-	-	-	-
	Sữa tiệt trùng theo phương pháp UHT	10	0	0	0	-	-	-	0	-	-	-	-
	Sản phẩm chế biến từ sữa không qua xử lý nhiệt khi dùng	10 ⁴	10	0	0	-	-	-	0	-	-	-	-
5	Nhóm ngũ cốc, khoai củ, đậu đỗ												
	Các sản phẩm có xử lý nhiệt khi sử dụng	10 ⁶	10 ³	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	-	-	-	-	-
	Các sản phẩm không xử lý nhiệt khi sử dụng	10 ⁴	10	3	10	10	10	10	10 ²	-	-	-	-

Phụ lục 16 (tiếp theo)

STT	Nhóm thực phẩm	Chỉ tiêu vi sinh											
		1	2	3	4	5	6	7	8*	9	10	11	12
6	Nhóm rau quả												
	Rau quả tươi, đông lạnh	GAP	10	GAP	GAP	GAP	-	-	0	-	-	-	-
	Rau quả muối, rau quả khô	10 ⁴	10	0	-	10	10 ²	10 ²	-	-	-	-	-
7	Nước khoáng, nước giải khát đóng chai												
	Có cồn	10	-	0	0	0	-	-	-	0	0	-	-
	Không cồn	10 ²	10	3	0	0	-	10	-	0	0	-	-
	Nước khoáng đóng chai**	GMP	0	-	-	0	-	-	-	0	0	-	-
8	Gia vị	10 ⁴	10 ²	3	10 ²	-	-	10 ²	0	-	-	-	-
9	Nước chấm												
	Nước chấm nguồn gốc động vật	10 ⁴	10 ²	0	3	10	-	-	0	-	-	10	-
	Nước chấm nguồn gốc thực vật	10 ⁴	10 ²	0	3	10	-	10	0	-	-	-	-
10	Thức ăn đặc biệt												
	Thức ăn khô, dinh dưỡng cho trẻ em, phải xử lý nhiệt khi sử dụng	10 ⁵	10 ²	10	10 ²	10	10 ²	-	0	-	-	-	-
	Thức ăn khô, dinh dưỡng cho trẻ em, không xử lý nhiệt khi sử dụng	10 ⁴	10	0	3	10	10	-	0	-	-	-	-
11	Kem, nước đá	5.10 ⁴	10 ²	0	10	10	-	-	0	-	-	-	-
12	Đồ hộp (thịt cá, rau quả)	-	-	0	0	0	-	0	-	-	-	-	0
13	Dầu mỡ	10 ³	10	3	0	-	-	0	0	-	-	-	-

Chú thích: 1. Tổng số vi khuẩn hiếu khí. 2. *Coliform*. 3. *Escherichia coli*. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. *Clostridium perfringens*.

6. *Bacillus cereus*. 7. Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc. 8. *Salmonella*. 9. *Streptococcus faecal*. 10. *Peisedomonas aeruginosa*. 11. *Vibrio parahaemolyticus*. 12. *Clostridium botulinum*.

GAP: Giới hạn bởi GAP -Thực hành nông nghiệp tốt.

GMP: Giới hạn bởi GMP -Thực hành sản xuất tốt.

*: Không được có trong 25 g thực phẩm.

**: Không được có trong 250 ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Đình Thường, Nguyễn Thanh Hằng.**
Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic.
Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2000.
2. **Nguyễn Đình Thường.**
Thí nghiệm chuyên ngành lên men.
Trường Đại học Công nghiệp nhẹ, 1976.
3. **Tiêu chuẩn Việt Nam về vi sinh vật học ban hành năm 2001.**
TCVN 4882, TCVN 4884, TCVN 6847, TCVN 4829, TCVN 6846,
TCVN 6848
4. **Е. А. Плевако, О. А. Бакушинская.**
Микробиологический и химико-технологический контроль дрожжевого
производства.
Издательство пищевая промышленность Москва 1964.
5. **Е. И. Великая, В. Ф. Суходол, В. К. Томащевил.**
Общие метода контроля бродульных проидводствъ.
Издательство пищевая промышленность Москва 1964.
6. **Verlag Hins Carl, Getrsnke-Fachverlag.**
European Brewery Convention, Analytica-EBC.
Issue by the EBC Analysis Committee, 1998.
7. **John Wiley a. Sons.**
Control of enzyme activity.
Lond N. Y: Chapman & Hall, 1976.
8. **Enzymic hydrolysis of food proteins.**
Elsevier Applied Science, 1987.
9. **S. Suzane Nielsen.**
Introduction to the chemical Analysis of food.
Jones and Barlett Publishers, 1994.

10. **C. S. ough and M.A. Amerine.**
Methods for analysis of musts and wines.
A wiley-Interscience Publication, 1988.
11. **Analytica Microbiologica.**
EBC, Bios, Vol 8, N°4, 1977.
12. **Genie enzymatique.**
Doin editeur, 1992.
13. **Guide pratique d'analyser dans les industries des céréales.**
Technique & Documentation, 1997.
14. **Méthodes d'analyse & contrôle de la fabrication de la bière.**
De Clerck, Brasseur volume II, 2^e edition, 1982.
15. **Christiance & Jean-Noel Joffin.**
Microbiology Alimentary.
Centre Regional de documentation Dedagogique de Bordeaux, 1992.
16. **Joseph - Pierre GUIRAUD, Dunod.**
Microbiologie Alimentaire, 1998.
17. **D. Delanoc, C. Maillard, D. Maisondieu.**
Le vin de l'analyse à élaboration.
Technique et Documentation, 1984.
18. **Contrôle de la qualité des produits alimentaire - Méthodes d'analyse officielles.**
Afnor -dgccrf, 1989.
19. **Manuel de travaux pratiques.**
Université de Bourgogne.
Institut Universitaire de la vigne et du vin – Laboratoire d'oenologie.

MỤC LỤC

LỜI MỞ ĐẦU	3
 PHẦN I: PHÂN TÍCH NGUYÊN LIỆU.....	5
 CHƯƠNG I: PHÂN TÍCH HẠT ĐẠI MẠCH.....	5
1.1. Độ ẩm	5
1.2. Khối lượng 1000 hạt.....	6
1.3. Nitơ tổng số	7
1.4. Khả năng nảy mầm của hạt (GC = Germinative capacity)	11
1.4.1. Phương pháp nhuộm màu nhanh	11
1.4.2. Phương pháp dùng hydroperoxyt và tách vỏ	12
1.5. Năng lực nảy mầm (GE = Germinative energy).....	14
1.5.1. Phương pháp Aubry.....	14
1.5.2. Phương pháp BRF	15
1.5.3. Phương pháp Schönfeld	16
1.6. Tỷ lệ nảy mầm và chỉ số nảy mầm.....	17
 CHƯƠNG 2: PHÂN TÍCH MALT ĐẠI MẠCH	19
2.1. Độ ẩm	19
2.2. Khối lượng 1000 hạt.....	20
2.3. Nitơ tổng số	20
2.4. Độ hoà tan	20
2.5. Độ màu	23
2.5.1. Phương pháp quang phổ.....	23
2.5.2. Phương pháp so màu bằng mắt thường	24
2.6. Nitơ hòa tan	26
2.7. Năng lực đường hóa	27
2.8. Hoạt lực enzym α -amilaza.....	30

CHƯƠNG 3. PHÂN TÍCH NGUYÊN LIỆU CHỨA TINH BỘT	33
3.1. Độ ẩm	33
3.2. Dung trọng	34
3.3. Trọng lượng riêng	35
3.4. Tinh bột	36
3.4.1. Phương pháp hoá học	37
3.4.2. Phương pháp quang học Evec	38
3.5. Pentozan và đường 5 carbon	40
3.6. Độ hoà tan	43
3.6.1. Phương pháp ASBC	43
3.6.2. Phương pháp De Clerk	45
3.6.3. Phương pháp sử dụng Enzym Termamyl để dịch hoá	47
CHƯƠNG 4: PHÂN TÍCH RỈ ĐƯỜNG	49
4.1. Nồng độ chất khô	49
4.1.1. Bx kế và Bomê kế	49
4.1.2. Chiết quang kế	50
4.2. Hàm lượng đường	50
4.2.1. Xử lý và pha loãng rỉ đường	50
4.2.2. Phương pháp Bectran	52
4.2.3. Phương pháp Opnhe	54
4.2.4. Phương pháp Graxianop	56
4.2.5. Xác định đường theo phương pháp DNS	57
4.3. Độ thuần khiết của rỉ đường	58
4.4. Nitơ tổng số	59
4.5. Nitơ hoà tan	59
4.6. Nitơ amin	59
4.7. Axit bay hơi	61
4.8. Hàm lượng SO_2	62
4.9. Chất keo	63
4.10. Chất tro	65
4.11. Hàm lượng canxi	66

CHƯƠNG 5: PHÂN TÍCH HOA HOUBLON	69
5.1. Độ ẩm	69
5.1.1. Phương pháp sấy	69
5.1.2. Phương pháp trích ly	70
5.2. Chất đắng trong hoa và các sản phẩm của hoa houblon	71
5.2.1. Phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ	71
5.2.2. Phương pháp Ganzlin cải tiến từ phương pháp Wollmer	72
5.3. Chất đắng trong cao hoa	76
5.4. α và β -axit đắng	78
 CHƯƠNG 6: PHÂN TÍCH QUẢ	81
6.1. Hàm ẩm	81
6.2. Khối lượng trung bình 1 quả	82
6.3. Chiết dịch quả	82
6.3.1. Dùng thiết bị	82
6.3.2. Dùng nhiệt	83
6.4. Hàm lượng chất hòa tan	83
6.4.1. Phương pháp lý học	83
6.4.2. Phương pháp hóa học	85
6.5. Axit tổng số	87
6.6. Nitơ amin	89
6.7. Polyphenol	91
6.8. Hàm lượng tanin	94
6.9. Pectin	95
6.9.1. Định tính	95
6.9.2. Định lượng theo phương pháp pectat canxi	96
6.10. Axit ascorbic (vitamin C)	97
 CHƯƠNG 7: PHÂN TÍCH NƯỚC	98
7.1. Chuẩn bị mẫu	98
7.2. Đánh giá sơ bộ	98
7.2.1. Mùi	98
7.2.2. Màu	98
7.2.3. Độ trong	98

7.3. Hàm lượng cặn	98
7.4. Độ kiềm	99
7.5. Độ cứng của nước	100
7.5.1. Phương pháp Wartha - Preiffer	101
7.5.2. Phương pháp Schwarzenback	102
7.6. Canxi	104
7.6.1. Định tính	104
7.6.2. Định lượng theo phương pháp chuẩn độ complexon III	105
7.7. Magie	105
7.7.1. Định tính	105
7.7.2. Định lượng	106

PHẦN 2: PHÂN TÍCH SẢN PHẨM LÊN MEN..... 107

CHƯƠNG 8: KIỂM TRA DỊCH LÊN MEN BIA VÀ BIA THÀNH PHẨM..... 107

8.1. Kiểm tra dịch đường và dịch lên men bia	107
8.1.1. Xác định tỷ trọng dịch đường	107
8.1.2. Chất hoà tan	107
8.1.3. Nitơ tổng số	107
8.1.4. Màu của dịch đường bằng phương pháp quang phổ	108
8.1.5. Độ nhớt	109
8.1.6. Độ đặc của dịch đường	110
8.1.7. Polyphenol	110
8.1.8. Độ lên men	110
8.2. Kiểm tra bia thành phẩm	112
8.2.1. Nồng độ rượu và chất hoà tan ban đầu	112
8.2.2. Nồng độ rượu trong bia không cồn hoặc độ cồn thấp	114
8.2.3. Nitơ tổng	117
8.2.4. Độ nhớt	117
8.2.5. Độ màu	117
8.2.6. Độ đặc	118
8.2.7. Polyphenol tổng số	119
8.2.8. Flavanoit	121
8.2.9. Diacetyl ($\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$)	122

8.2.10. Độ chua	124
8.2.11. CO ₂	125
8.2.11. Dự đoán độ bền keo.....	128
CHƯƠNG 9: KIỂM TRA DỊCH ĐƯỜNG, DỊCH LÊN MEN	
VÀ CỐN THÀNH PHẨM	129
9.1. Dịch đường và dịch lên men rượu	129
9.1.1. Nồng độ chất hoà tan của dịch đường và giấm chín.....	129
9.1.2. Đường và tinh bột sót trong giấm chín	129
9.1.3. Đường sót trong giấm chín từ rỉ đường	133
9.1.4. Độ chua của giấm chín	135
9.1.5. Nồng độ rượu	136
9.2. Cồn sản phẩm.....	138
9.2.1. Nồng độ rượu	138
9.2.2. Axit và este	141
9.2.3. Aldehyt.....	142
9.2.4. Dầu fusel.....	144
9.2.5. Rượu methylic.....	145
9.2.6. Thời gian oxy hóa	147
9.2.7. Furfurol (C ₅ H ₄ O ₂).....	148
CHƯƠNG 10: PHÂN TÍCH RƯỢU VANG.....	
10.1. Nồng độ rượu	149
10.1.1. Phương pháp chưng cất.....	149
10.1.2. Phương pháp đo nhiệt độ sôi.....	149
10.2. Chất hoà tan	151
Xác định tỷ trọng	151
10.3. Hàm lượng đường khử	152
10.4. Axit tổng số	153
10.5. Axit bay hơi	154
10.6. SO ₂ tự do và tổng số	155
10.7. Polyphenol	157
10.7.1. Phương pháp so màu.....	157
10.7.2. Phương pháp Folin-Ciocalteu	157

10.7.3. Chỉ số permanganat (Permaganate Index, PI)	158
10.7.4. Phép thử pH với sulfatamonium sắt II	159
10.8. Tanin tổng số	160
10.9. Màu	161
10.10. Axetaldehyt.....	162
10.11. Các chất huyền phù rắn	163
10.12. Kiểm tra độ bền vững bitartrat kali	164
10.13. Kiểm tra sự ổn định protein	165
10.13.1. Thuốc thử Bentotest.....	165
10.13.2. Kết tủa trong cồn.....	166
10.13.3. Phương pháp axit trichloaxetic (TCA).....	167
10.14. Axit sorbic	167
CHƯƠNG II: PHÂN TÍCH MÌ CHÍNH - NƯỚC CHẤM.....	170
11.1. Mì chính	170
11.1.1. Độ ẩm.....	170
11.1.2. Độ pH	171
11.1.3. Glutamat natri	171
11.2. Nước chấm.....	172
11.2.1. Nitơ tổng số.....	172
11.2.2. Nitơ amoniac	173
11.2.3. Nitơ amin	174
11.3. Muối NaCl	175
11.4. Độ axit.....	176
C HƯƠNG 12: XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ CÁC CHẾ PHẨM ENZYM	177
12.1. Khái quát về xác định hoạt độ enzym	177
12.1.1. Các khái niệm về hoạt độ enzym.....	177
12.1.2. Các phương pháp xác định hoạt độ enzym.....	178
12.1.3. Những điều lưu ý khi xác định hoạt độ enzym	178
12.2. Hoạt độ enzym thuộc hệ amilaza	179
12.2.1. Hoạt độ enzym α -amilaza theo Rukhliadeva	179
12.2.2. Hoạt độ enzym glucoamilaza (γ -amilaza).....	183
12.3. Hoạt độ enzym proteinaza	186

12.3.1. Phương pháp Anson cải tiến	186
12.3.2. Phương pháp Babakina	190
12.4. Hoạt độ của chế phẩm trypsin	191
12.5. Hoạt độ enzym pectinaza	192
Hoạt độ polygalacturonaza (HdPg)	192
12.6. Hoạt độ pectinesteraza (HĐPE)	196
12.7. Hoạt độ enzym peroxidaza	198
12.7.1. Phương pháp chuẩn độ KMNO_4	198
12.7.2. Phương pháp so màu với purpurogalin	200
12.7.3. Phương pháp đo cường độ hấp thụ ánh sáng	201
12.8. Hoạt độ enzym invertaza (β -fructozidaza)	202
12.9. Hoạt độ enzym phytaza	203
12.10. Hoạt độ enzym β -glucosidaza	205

PHẦN 3: PHÂN TÍCH VI SINH VẬT

CHƯƠNG 13: KIỂM TRA MỨC ĐỘ KHỬ TRÙNG	207
13.1. Kiểm tra phương pháp khử trùng khô	207
13.2. Kiểm tra phương pháp khử trùng ẩm	208
13.3. Kiểm tra phương pháp khử trùng bằng nhiệt gián đoạn	209
13.4. Kiểm tra phương pháp lọc khử trùng	210

CHƯƠNG 14: ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT	212
14.1. Chuẩn bị mẫu phân tích	212
14.2. Các phương pháp định tính vi sinh vật	213
14.2.1. Quan sát trên kính hiển vi	213
14.2.2. Lọc màng	215
14.2.3. Nuôi cấy trong môi trường lỏng	218
14.3. Các phương pháp định lượng vi sinh vật	219
14.3.1. Xác định khối lượng khô	219
14.3.2. Đo độ đục	220
14.3.3. Đếm trực tiếp số lượng tế bào	221
14.3.4. Đếm khuẩn lạc	224
14.3.5. Phương pháp đếm số có xác suất lớn nhất (MPN)	227

14.4. Phân tích đặc tính công nghệ của nấm men.....	230
14.4.1. Năng lực lên men của nấm men	230
14.4.2. Kiểm tra độ kết lắng của nấm men bia.....	231
14.4.3. Hoạt lực zimaza và maltaza của nấm men bánh mì.....	232
14.4.4. Lực nở của nấm men bánh mì	233
CHƯƠNG 15: PHÂN TÍCH CÁC CHỈ TIÊU VI SINH VẬT THỰC PHẨM	235
15.1. Vi sinh vật tổng số	235
15.2. Nấm men và nấm mốc	237
15.3. Coliform và <i>E. coli</i>	239
15.3.1. Định lượng Coliform	239
15.3.2. Định lượng <i>E. coli</i>	241
15.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	245
15.5. <i>Clostridium perfringens</i>	247
15.5.1. Nuôi cấy trong đĩa thạch.....	249
15.5.2. Nuôi cấy trong ống thạch.....	250
15.6. <i>Salmonella</i>	251
15.7. <i>Streptococcus faecali</i>	257
15.8. <i>Bacillus cereus</i>	259
15.8.1. Đếm khuẩn lạc	261
15.8.2. Phương pháp MPN	262
15.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	262

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Bảng tra hàm lượng chất khô hoà tan theo tỷ trọng của dịch đường (Goldiner và Klemann).....	265
Phụ lục 2: Bảng hiệu chỉnh °Bx về nhiệt độ 20°C (đo bằng đường kế).....	299
Phụ lục 3: Bảng hiệu chỉnh nồng độ chất khô (%) đo được về nhiệt độ 20°C (đo bằng chiết quang kế).....	300
Phụ lục 4: Bảng hiệu chỉnh tỷ trọng đo được ($d > 1$) về 20°C.....	301
Phụ lục 5: Bảng tra hàm lượng đường (g/l) trong dịch quả nho theo tỷ trọng của dịch quả.....	303

Phụ lục 6: Bảng chuyển đổi giữa nồng độ chất khô (%) và nồng độ đường (g/l) trong dịch nho ép	304
Phụ lục 7: Bảng tra tỷ trọng d_{20}^{20} của dịch đường theo nồng độ chất khô (%).....	305
Phụ lục 8: Quan hệ giữa độ Brix, độ Bomê, nồng độ % khối lượng và tỷ trọng của dịch đường.....	306
Phụ lục 9: Bảng tra độ rượu (% v/v) theo tỷ trọng của dung dịch ethanol ở 20°C.....	307
Phụ lục 10: Bảng hệ số hiệu chỉnh tỷ trọng ($d < 1$) đo được về 20°C.....	311
Phụ lục 11: Hiệu chỉnh độ cồn theo nhiệt độ 20°C.....	312
Phụ lục 12: Quan hệ giữa lượng đồng Cu (mg) và lượng glucoza (mg) khi xác định đường khử theo phương pháp Bertran	315
Phụ lục 13: Quan hệ giữa lượng đồng Cu (mg) và lượng maltoza (mg) khi xác định đường khử theo phương pháp Bertran	316
Phụ lục 14: Bảng Mac Grady 1: Xác định giá trị MPN theo số đặc trưng	317
Phụ lục 15: Bảng Mac Grady 2.....	318
Phụ lục 16: Bảng chỉ tiêu vi sinh vật trong các sản phẩm thực phẩm (theo quyết định của Bộ trưởng Bộ Y tế, số 667/1998/QĐ-BYT).....	319
TÀI LIỆU THAM KHẢO	321

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

**CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH
NGÀNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN**

Tác giả: PGS. TS. LÊ THANH MAI (CHỦ BIÊN)
GS. TS. NGUYỄN THỊ HIỀN
PGS. TS. PHẠM THU THỦY
TS. NGUYỄN THANH HẰNG
THS. LÊ THỊ LAN CHI

Chịu trách nhiệm xuất bản: TS. PHẠM VĂN DIỄN

Biên tập và sửa bài: ThS. NGUYỄN HUY TIẾN

NGỌC LINH

Trình bày bìa:

HƯỜNG LAN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

In 700 cuốn khổ 16 x 24cm, tại Xưởng in NXB Văn hóa Dân tộc.

Số đăng ký kế hoạch XB: 209 – 2009/CXB/211 – 10/KHKT, ngày 18/3/2009.

Quyết định XB số: 174/QĐXB – NXBKHK, ký ngày 10/6/2009.

In xong và nộp lưu chiểu Quý III năm 2009.

209161 M03

Các pp phân tích công nghệ lên



1409090000025

69,000

Giá: 69.000đ