

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM  
301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà nội

**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**

**Đề tài:**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM  
TRONG CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM  
MÃ SỐ: KC 04-07**

*Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước: PGS.TS. Ngô Tiến Hiến*

**Đề tài nhánh:**

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT RƯỢU VANG CHẤT LƯỢNG CAO**

*Chủ nhiệm đề mục đề tài cấp nhà nước: Ths. Đặng Hồng Ánh*

Hà nội, 10-2004

**BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM  
301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà nội**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**

**Đề tài cấp Nhà nước:**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM  
TRONG CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM  
MÃ SỐ: KC 04-07**

*Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước: PGS.TS. Ngô Tiến Hiến*

**Đề tài nhánh cấp Nhà nước:**

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT RƯỢU VANG CHẤT LƯỢNG CAO**

*Chủ nhiệm đề mục đề tài cấp nhà nước: Ths. Đặng Hồng Ánh*

**HÀ NỘI, 10-2004**  
Bản thảo viết xong tháng 9 - 2004

*Tài liệu này được chuẩn bị dựa trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài cấp Nhà nước, Mã số: KC 04-07*

## **DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN**

1. Ths. Đặng Hồng Ánh
2. Ths. Phạm Thị Thu
3. Ths. Giang Thế Việt
4. KS. Phạm Minh Kim
5. CN. Nguyễn Minh Châu
6. KS. Đặng Kim Tuyến
7. TS. Giang Thế Bính

## BÀI TÓM TẮT

Lên men malolactic là quá trình chuyển hoá axit malic thành axit lactic và qua đó tạo cho vang một tính chất cảm quan đặc trưng và sự ổn định sinh học nhờ chủng vi khuẩn *Leuconostoc oenos*. Quá trình lên men malolactic có thể được thực hiện nhờ các tế bào vi khuẩn tự do hoặc tế bào được cố định trong các chất mang mà thông dụng nhất là Ca-alginat.

Độ trong của rượu vang là một yêu cầu chất lượng thiết yếu. Công nghệ mới hiện nay đưa ra khái niệm làm trong rượu vang dùng để chỉ việc thêm chủ động một số chất hấp phụ nào đó để kết lắng hoặc kết tủa các cấu tử có trong rượu vang với nồng độ cao vượt quá giới hạn để đảm bảo độ trong cho rượu vang và giữ cho rượu vang ổn định về mặt hóa lý.

Việc nghiên cứu để đưa vào ứng dụng trong sản xuất hai quá trình công nghệ trên đóng vai trò rất quan trọng trong việc nâng cao chất lượng của rượu vang Việt nam.

Thực hiện nghiên cứu này chúng tôi đã đạt được các kết quả sau đây:

1. Đã tuyển chọn được 1 chủng vi khuẩn *Leuconostoc oenos* có hoạt độ malolactic cao và xác định được các điều kiện nuôi cấy và môi trường thích hợp nhất với chủng vi khuẩn này.
2. Cố định vi khuẩn trong gel Ca-alginat và xác định được các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ malolactic của các hạt cố định. Tiến hành lên men malolactic nhờ các tế bào cố định tại quy mô phòng thí nghiệm.
3. Xây dựng quy trình công nghệ lên men malolactic nhờ tế bào vi khuẩn tự do và tiến hành thực nghiệm trên thiết bị lên men 3000 lít. Chất lượng rượu vang được cải thiện đáng kể: vị chua dịu, hài hoà, được nhiều người ưa thích.
4. Nghiên cứu sử dụng các chất làm trong rượu vang: PPVP, gelatin, bentonit và lựa chọn được bentonit là thích hợp nhất.
5. Đã chuyển giao công nghệ sản xuất rượu vang cho 2 cơ sở sản xuất là: Công ty cổ phần Đường Biên Hoà và Công ty Bia và nước giải khát Quảng Ninh.

## MỤC LỤC

|                                                                                         | trang |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Phần I. Mở đầu                                                                          | 1     |
| Phần II. Tổng quan                                                                      | 3     |
| 2.1. Quá trình lên men malolactic                                                       | 3     |
| 2.1.1. Vai trò của quá trình lên men malolactic                                         | 3     |
| 2.1.2. Các kiểu lên men malolactic                                                      | 4     |
| 2.1.2.1. Lên men tự nhiên                                                               | 4     |
| 2.1.2.2. Lên men một giai đoạn                                                          | 5     |
| 2.1.2.3. Lên men hai giai đoạn tách riêng                                               | 6     |
| 2.1.3. Các kỹ thuật thúc đẩy quá trình lên men malolactic                               | 7     |
| 2.1.3.1. Sử dụng chế phẩm malolactic                                                    | 7     |
| 2.1.3.2. Sử dụng tế bào cố định                                                         | 8     |
| 2.1.4. Vi khuẩn <i>Leuconostoc oenos</i> tác nhân của quá trình lên men malolactic      | 9     |
| 2.1.4.1. Đặc tính sinh học                                                              | 9     |
| 2.1.4.2. Enzim trong <i>Leuconostoc oenos</i>                                           | 9     |
| 2.1.5. Ảnh hưởng của điều kiện công nghệ và môi trường đến quá trình lên men malolactic | 11    |
| 2.1.5.1. Ảnh hưởng của pH                                                               | 11    |
| 2.1.5.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ                                                         | 12    |
| 2.1.5.3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn                                                      | 12    |
| 2.1.5.4. Ảnh hưởng của SO <sub>2</sub>                                                  | 12    |
| 2.1.5.5. Ảnh hưởng của các loại đường                                                   | 13    |
| 2.1.5.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ                                                       | 13    |
| 2.1.5.7. Ảnh hưởng của axit malic và các axit hữu cơ khác                               | 14    |
| 2.1.5.8. Ảnh hưởng qua lại của nấm men và <i>Leuconostoc oenos</i>                      | 15    |
| 2.2. Quá trình làm trong rượu vang                                                      | 16    |
| 2.2.1. Mục đích của quá trình làm trong rượu vang                                       | 16    |
| 2.2.2. Một số tác nhân làm trong                                                        | 18    |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2.1. Các chất trợ lắng có bản chất protein                                                              | 18 |
| 2.2.2.2. Đất hoạt tính                                                                                      | 19 |
| 2.2.2.3. Các chất cao phân tử tổng hợp                                                                      | 20 |
| 2.2.3. Các phản ứng giữa protein và tanin                                                                   | 21 |
| 2.2.4. Ảnh hưởng của môi trường đến sự tương tác giữa tanin và protein                                      | 22 |
| 2.2.5. Ảnh hưởng của quá trình làm trong lên các hợp chất phenol và các chất hương trong rượu vang          | 23 |
| Phần III. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu                                                             | 24 |
| 3.1. Giống vi sinh vật và điều kiện nuôi dưỡng                                                              | 24 |
| 3.2. Môi trường                                                                                             | 24 |
| 3.3. Cố định tế bào                                                                                         | 24 |
| 3.4. Lên men malolactic rượu vang nhờ các tế bào vi khuẩn tự do hoặc cố định                                | 25 |
| 3.5. Phân tích                                                                                              | 25 |
| 3.6. Phương pháp cảm quan                                                                                   | 28 |
| 3.7. Chuẩn bị các chất trợ lắng                                                                             | 28 |
| Phần IV. Kết quả nghiên cứu và bàn luận                                                                     | 29 |
| 4.1. Lựa chọn giống vi khuẩn có hoạt độ malolactic cao                                                      | 29 |
| 4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn LF01 | 30 |
| 4.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ cồn                                                                            | 30 |
| 4.2.2. Ảnh hưởng của chủng loại và nồng độ đường                                                            | 31 |
| 4.2.3. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ                                                                  | 33 |
| 4.2.4. Ảnh hưởng của axit D-L malic                                                                         | 34 |
| 4.2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy                                                                      | 35 |
| 4.2.6. Ảnh hưởng của pH môi trường                                                                          | 36 |
| 4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến hoạt độ malolactic của các tế bào cố định                      | 37 |
| 4.3.1. Ảnh hưởng của pH môi trường đến H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> của các hạt cố định                    | 38 |
| 4.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn tới H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> của các hạt cố định                      | 39 |

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.4. Ảnh hưởng của nồng độ tế bào trong hạt cố định                                                                  | 40 |
| 4.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến HĐML của các hạt cố định                                                     | 41 |
| 4.3.6. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến HĐML của các hạt cố định                                                        | 43 |
| 4.3.7. Lên men malolactic nhờ các tế bào <i>Lcn. oenos</i> cố định                                                     | 44 |
| 4.3.8. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian sử dụng đến HĐML của các hạt cố định                                         | 46 |
| 4.3.9. Quy trình lên men malolactic nhờ tế bào cố định                                                                 | 49 |
| 4.4. Lên men malolactic nhờ tế bào tự do                                                                               | 49 |
| 4.4.1. Nghiên cứu thời điểm thích hợp để bổ sung vi khuẩn                                                              | 50 |
| 4.4.2. Nghiên cứu lựa chọn nồng độ vi khuẩn thích hợp cho lên men malolactic                                           | 53 |
| 4.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ $SO_2$ trong quá trình xử lý dịch quả ban đầu đến quá trình lên men malolactic | 55 |
| 4.5. Lên men malolactic để nâng cao chất lượng vang quy mô pilot                                                       | 60 |
| 4.6. Nghiên cứu sử dụng một số chất trợ lắng để làm trong rượu vang                                                    | 63 |
| 4.6.1. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng Polyclar 10 để làm trong                                                       | 63 |
| 4.6.2. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng gelatin để làm trong                                                           | 65 |
| 4.6.3. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng bentonit để làm trong                                                          | 66 |
| 4.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu quả và tốc độ lắng trong                                               | 68 |
| Phần V. Kết luận                                                                                                       | 70 |

## MỤC LỤC

|                                                                                                              | trang |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Phần I. Mở đầu                                                                                               | 1     |
| Phần II. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu                                                               | 3     |
| 2.1. Giống vi sinh vật và điều kiện nuôi dưỡng                                                               | 3     |
| 2.2. Môi trường                                                                                              | 3     |
| 2.3. Cố định tế bào                                                                                          | 3     |
| 2.4. Lên men malolactic rượu vang nhờ các tế bào vi khuẩn tự do hoặc cố định                                 | 4     |
| 2.5. Phân tích                                                                                               | 4     |
| Phần IV. Kết quả nghiên cứu và bàn luận                                                                      |       |
| 3.1. Lựa chọn giống vi khuẩn có hoạt độ malolactic cao                                                       | 7     |
| 3..2. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường tới sự sinh trưởng và phát triển của chủng vi khuẩn LF01 | 7     |
| 3..2.1. Ảnh hưởng của nồng độ cồn                                                                            | 7     |
| 3..2.2. Ảnh hưởng của chủng loại và nồng độ đường                                                            | 7     |
| 3..2.3. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ                                                                  | 8     |
| 3..2.4. Ảnh hưởng của axit D-L malic                                                                         | 8     |
| 3..2.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy                                                                      | 8     |
| 3.2.6. Ảnh hưởng của pH môi trường                                                                           | 8     |
| 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến hoạt độ malolactic của các tế bào cố định                       | 9     |
| 3.3.1. Ảnh hưởng của pH môi trường đến HĐML của các hạt cố định                                              | 9     |
| 3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ cồn tới HĐML của các hạt cố định                                                | 10    |
| 3.3.3. Ảnh hưởng của nồng độ tế bào trong hạt cố định                                                        | 11    |
| 3.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến HĐML của các hạt cố định                                           | 11    |
| 3.3.6. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến HĐML của các hạt cố định                                              | 12    |
| 3.3.7. Lên men malolactic nhờ các tế bào <i>Lcn. oenos</i> cố định                                           | 13    |
| 3.3.8. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian sử dụng đến HĐML của các hạt cố định                               | 14    |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4. Lên men malolactic nhờ tế bào tự do                                                                                      | 16 |
| 3.4.1. Nghiên cứu thời điểm thích hợp để bổ sung vi khuẩn                                                                     | 16 |
| 3.4.2. Nghiên cứu lựa chọn nồng độ vi khuẩn thích hợp cho lên men malolactic                                                  | 18 |
| 3.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ $\text{SO}_2$ trong quá trình xử lý dịch quả ban đầu đến quá trình lên men malolactic | 19 |
| 3.5. Lên men malolactic để nâng cao chất lượng vang quy mô pilot                                                              | 21 |
| 3.6. Nghiên cứu sử dụng một số chất trợ lắng để làm trong rượu vang                                                           | 22 |
| 3.6.1. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng Polyclar 10 để làm trong                                                              | 22 |
| 3.6.2. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng gelatin để làm trong                                                                  | 23 |
| 3.6.3. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng bentonit để làm trong                                                                 | 23 |
| 3.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu quả và tốc độ lắng trong                                                      | 24 |
| Phần V. Kết luận                                                                                                              | 25 |

## PHẦN I. MỞ ĐẦU

Rượu vang là sản phẩm lên men không chưng cất từ dịch quả nói chung mà chủ yếu nhất là nho. Đây là một loại đồ uống có giá trị dinh dưỡng cao do hầu hết các chất dinh dưỡng từ quả được chuyển vào trong rượu mà không bị mất đi do không qua giai đoạn chưng cất. Ngoài thành phần chính là cồn với nồng độ vừa phải 10 -14%V trong vang còn có hầu hết các axit amin không thay thế như lisin, treonin, leusin, isoleusin, valin, arginin, histidin, phenylalanin... các vitamin B<sub>2</sub>, PP, P, các chất vi lượng Na, Ca, Mg, Fe, Mn, các chất tạo cảm vị chua chát như: axit lactic, malic, citric, tartaric, các polyphenol, các chất màu tự nhiên và hình thơm tinh tế hài hòa chất lọc từ quả.

Nước ta có tiềm năng rất lớn trong ngành sản xuất vang trên cả hai phương diện: nguồn nguyên liệu và nhu cầu tiêu thụ của thị trường. Việt nam là nước có khí hậu nhiệt đới, có nhiều chủng loại quả phong phú quanh năm với sản lượng lớn, giá thành rẻ. Xu hướng gần đây, vang đã trở thành một loại đồ uống khá thông dụng.

Công nghệ sản xuất rượu vang thường trải qua hai giai đoạn lên men:

- Giai đoạn lên men rượu: chủ yếu để lên men tạo độ cồn thích hợp nhờ hoạt động của nấm men.
- Giai đoạn lên men malolactic: tạo cho vang một tính chất cảm quan đặc trưng và khả năng bảo quản lâu hơn nhờ chủng vi khuẩn *Leuconostoc oenos*.

Có thể nói chất lượng của rượu được cải thiện rất nhiều nhờ giai đoạn thứ hai này. Ở Việt nam hầu hết các cơ sở sản xuất vang chưa thực hiện giai đoạn thứ hai, quá trình lên men phụ chủ yếu là để kết lắng nấm men làm trong rượu mà không có giai đoạn lên men malolactic, do vậy chất lượng rượu bị hạn chế đáng kể nhất là với các loại quả có chứa hàm lượng axit malic cao. Vì vậy việc nghiên cứu quá trình lên men malolactic là một giải pháp bước đầu để nâng cao chất lượng vang Việt nam.

Độ trong của rượu vang là một yêu cầu chất lượng thiết yếu. Rượu vang không chỉ phải trong ở thời điểm đóng chai mà còn phải duy trì độ trong đó trong suốt quá trình tàng trữ và lưu thông trong một thời gian nhất định bất cứ ở điều kiện nhiệt độ nào. Rượu vang non có thành phần các hạt lơ lửng rất lớn gồm có bã nấm men và các mảnh thịt quả. Các hạt lơ lửng hoặc tạo thành sương mù hoặc phân tán trong dịch lỏng

không chỉ gây nên sự hư hỏng về hình thức mà còn ảnh hưởng đến hương vị của rượu vang. Độ trong thu nhận được bằng cách lắng cặn dần dần và sau đó được gạn lắng dần để loại bỏ các chất cặn. Ngoài ra quá trình nhanh hơn như lọc và ly tâm cũng được sử dụng, tuy nhiên phương pháp này chỉ mang lại độ trong cho vang tại thời điểm lọc nhưng không duy trì được sự ổn định của nó. Theo truyền thống, độ trong ổn định thu được sau một thời gian tàng trữ dài. Công nghệ mới hiện nay đưa ra khái niệm làm trong rượu vang dùng để chỉ việc thêm chủ động một chất hấp phụ nào đó để kết lắng hoặc kết tủa các cấu tử có khả năng hòa tan một phần có trong rượu vang. Các chất dùng cho mục đích này được gọi chung là chất làm trong mặc dù các chất hòa tan trong rượu vang mà chúng hấp phụ và cơ chế loại bỏ các chất này rất đa dạng. Mục đích của quá trình làm trong trong công nghệ sản xuất rượu vang là để loại bỏ các cấu tử có trong thành phần của rượu vang với nồng độ cao vượt quá giới hạn để đảm bảo độ trong cho rượu vang và giữ cho rượu vang ổn định về mặt hóa lý.

Để đạt được các mục tiêu trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu một số vấn đề sau:

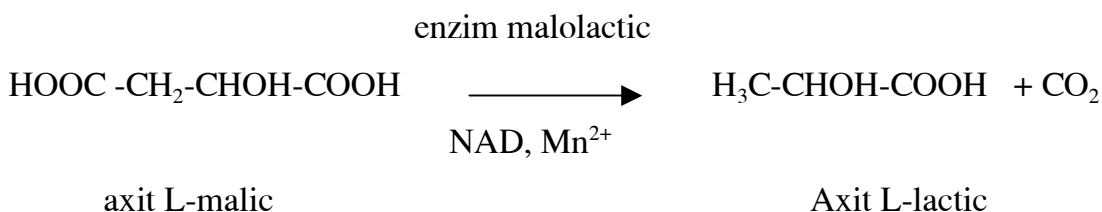
1. Các ảnh hưởng của công nghệ và môi trường đến khả năng sinh trưởng và phát triển cũng như phân giải axit malic của các chủng vi khuẩn và qua đó tìm được một chủng có các đặc tính phù hợp với quá trình lên men malolactic.
2. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật cố định tế bào trong lên men malolactic.
3. Xây dựng quy trình lên men malolactic nhờ tế bào vi khuẩn tự do
4. Tiến hành thực nghiệm lên men vang có trải qua giai đoạn lên men malolactic trên thiết bị 3000 lít.
5. Sử dụng một số tác nhân làm trong trong quá trình tàng trữ vang.
6. Xác định được điều kiện nhiệt độ tàng trữ vang

## PHẦN II: PHẦN TỔNG QUAN

### 2.1. Quá trình lên men malolactic:

Trong lên men rượu vang người ta gọi quá trình phân giải axit malic và xitric dưới tác dụng của enzym malolactic của *Leuconostoc oenos* là quá trình lên men malolactic, một quá trình quan trọng bậc nhất trong giai đoạn lên men phụ của rượu vang và sâm panh [4,7,8,12]. Đặc trưng cơ bản nhất của quá trình này là sự biến đổi sâu sắc các axit hữu cơ trong đó quan trọng nhất là axit malic. Axit malic và xitric chủ yếu vào dịch lên men từ quả và chỉ một lượng nhỏ được tạo ra từ quá trình lên men rượu. Khi axit malic và xitric bị phân giải sẽ làm vang chua dịu hơn và vị hài hoà hơn tức làm vang bớt cảm “giác cứng” và ngon hơn. Một khi rượu vang không còn axit malic và xitric thì ít có nguy cơ biến đổi độ chua và kết quả là chất lượng vang ổn định hơn. Sản phẩm của quá trình lên men malolactic từ axit malic là axit lactic, CO<sub>2</sub>, còn từ axit xitric là diacetyl, axetoin, 2,3-butylen-glycol đây là những chất tiền thân tạo nên hình thơm đặc trưng cho vang, ngoài ra còn tạo thành axit axetic.

Phản ứng hình thành axit lactic từ axit malic theo phương trình tổng quát như sau:



Bản chất enzym malolactic của *Leuconostoc oenos* là một protein có tác dụng xúc tác phân giải axit L-malic thành axit L-lactic và CO<sub>2</sub>. Hiện nay vẫn chưa thể chứng minh được axit pyruvic và NADH là các chất trung gian của phản ứng chỉ biết rằng NAD<sup>+</sup> cần thiết cho hoạt tính của enzym malolactic và NADH, axit pyruvic có được tạo thành nhưng chỉ với lượng rất nhỏ [9].

#### 2.1.1. Vai trò của quá trình lên men malolactic:

Những nghiên cứu gần đây cho thấy rượu vang được cấy chủng giống lên men malolactic cho chất lượng cao hơn hẳn khi không cấy chủng vi khuẩn này đặc biệt đối

với các loại vang có thành phần axit cao được sản xuất ở xứ lạnh như Đức, Pháp và miền đông nước Mỹ [7,11,13]. Sự biến đổi chất lượng của vang sau quá trình lên men malolactic đã được chỉ ra là vì ba lý do chủ yếu sau:

- Để giảm độ chua của vang do diacid (axit malic) được chuyển thành monoacid (axit lactic) điều này làm giảm độ axit và tăng độ pH nhờ đó mà vang thay vì vị chua gắt của axit malic sẽ trở nên dịu hơn và vị hài hòa hơn [16,17,18].
- Làm tăng tính ổn định sinh học của rượu vang bởi vì sự phát triển của vi khuẩn sẽ làm nghèo nguồn dinh dưỡng của môi trường và loại khỏi môi trường hai axit hữu cơ quan trọng là axit malic và axit citric để có thể đảm bảo giảm tối thiểu quá trình lên men chậm của vi khuẩn lactic khi bảo quản vang trong chai và sự phát triển một cách tự phát của các vi sinh vật không mong muốn gây nên các bệnh cho vang [18,19,20,21].
- Làm tăng tổ hợp thơm của vang vì các hợp chất diacid, acetoin và 2,3-butanediol tạo ra từ quá trình chuyển hoá axit citric bởi vi khuẩn là các hợp phần tạo nên hình thơm cho vang. Những thành phần khác của hương vị cũng tăng khá như axit bay hơi, diethyl succinat, một số este bay hơi, ethyl acetat, n-propanol, 2-butanol, n-hexanol, ethyl lactat, và 2,3 butanediol. Một số thành phần khác cũng tăng nhẹ như 3-methyl-n-butyl acetat, n-hexyl acetat, 2-phenylethyl-acetat và 2-ethyl-n-hexanoat [7,16,17].

Ngoài ra quá trình lên men malolactic được thực hiện bằng cách chủ động đưa vi khuẩn *Leuconostoc oenos* vào vang non sẽ giúp rút ngắn thời gian tàng trữ đáng kể. Vì vậy đưa quá trình này vào công nghệ sản xuất vang sẽ là một giải pháp rất tốt để nâng cao chất lượng vang và giảm giá thành sản phẩm.

### **2.1.2. Các kiểu lên men malolactic:**

#### **2.1.2.1. Lên men tự nhiên:**

Sản xuất vang theo truyền thống thì lên men malolactic diễn ra tự phát trong suốt quá trình bảo quản vang non trong thời gian vài tháng hoặc nhiều năm. Vi khuẩn có nguồn gốc trên vỏ quả nho hoặc ở thùng gỗ. Tuy nhiên trong công nghệ sản xuất vang hiện đại với quá trình chế biến sạch hơn và thời gian bảo quản cần giảm tối thiểu

thì quá trình lên men như vậy quá chậm và không đủ độ tin cậy. *Leuconostoc oenos* sinh trưởng cực kỳ chậm chạp và đôi khi không phát triển ở vang có pH 3,0-3,8; cồn 10-14% V; 10-100 ppm SO<sub>2</sub> và hàm lượng đường sót thấp. Ngoài ra trong lên men malolactic tự phát ngoài tác nhân là vi khuẩn *Lcn.oenos* còn rất nhiều vi khuẩn lactic khác vì thế luôn luôn có những rủi ro do việc trao đổi chất không hoàn toàn của axit malic hay sản phẩm có mùi lạ hoặc sự hình thành các amine do vi khuẩn lactic decarboxyl hoá các amino axit. Đặc biệt *Pediococcus* được coi là yếu tố quan trọng nhất sản ra histamine. Do đó vang có độ pH cao thúc đẩy sự sinh trưởng của các giống này trong quá trình lên men malolactic thì chắc chắn chứa lượng histamine không mong muốn.

Biện pháp lên men tự nhiên cũng có những ưu điểm là thuận lợi và không đắt tiền, nó được áp dụng khá rộng rãi ở Pháp. Nhiều năm kinh nghiệm đã chỉ ra rằng thành phần vang và điều kiện môi trường đã thúc đẩy sự sinh trưởng của *Lcn.oenos* có mặt tự nhiên trong vang vùng Bordeaux của Pháp và thông thường lên men malolactic bắt đầu trong vòng 1-4 tuần sau khi lên men rượu kết thúc. Thành phần và điều kiện đó bao gồm: SO<sub>2</sub> tổng thấp (< 40-50mg/l); duy trì pH của vang lớn hơn 3,2-3,3; duy trì nhiệt độ của vang khoảng 16-25°C. Tuy nhiên những biện pháp để thúc đẩy sự sinh trưởng của vi khuẩn tự nhiên để lên men malolactic thành công hoàn toàn không phải luôn luôn xảy ra và các phương pháp khác để thúc đẩy lên men malolactic trở nên cần thiết [5].

Như vậy lên men malolactic tự nhiên tuy có những ưu điểm là thuận lợi và rẻ tiền nhưng nhược điểm cũng rất nhiều đó là khó khởi động, diễn ra rất chậm chạp và khó kiểm soát được các chủng vi khuẩn tham gia vào quá trình dẫn đến việc tạo các sản phẩm phụ không mong đợi. Để khắc phục hiện nay người ta thường áp dụng phương pháp chủ động đưa vi khuẩn *Lcn. oenos* thuần chủng vào môi trường để thực hiện lên men malolactic. Việc cấy vi khuẩn có thể diễn ra trong quá trình lên men rượu (có nghĩa là đồng thời với nấm men) hoặc sau khi hoàn thành quá trình lên men rượu.

#### 2.1.2.2. Lên men một giai đoạn (hay lên men hỗn hợp):

Lên men một giai đoạn có nghĩa là người ta cấy nấm men và vi khuẩn đồng thời trong quá trình lên men rượu. Phương pháp này có những ưu điểm là vi khuẩn sẽ có

điều kiện sinh trưởng tốt hơn trong môi trường có nồng độ cồn thấp và khi hàm lượng cồn tăng dần trong quá trình lên men rượu thì vi khuẩn sẽ được thích nghi dần với môi trường chứa rượu chứ không bị sốc như khi đột ngột gặp môi trường có nồng độ cồn cao. Hơn nữa khi môi trường đang còn rất giàu chất dinh dưỡng nên thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Nuôi cấy hỗn hợp còn tạo điều kiện cho sự lên men malolactic xảy ra đồng thời với lên men rượu, nếu lên men malolactic không xảy ra tức thời thì có thể do tỷ lệ vi khuẩn trong dịch lên men quá ít hoặc do hàm lượng  $\text{SO}_2$  quá cao đã ức chế vi khuẩn.

Tuy nhiên phương pháp này còn có các hạn chế đó là sự cạnh tranh nguồn dinh dưỡng và quan hệ đối kháng giữa các chủng vi sinh vật. Sự chuyển hoá đường của vi khuẩn lactic để sinh ra axit lactic và axetic gây ảnh hưởng đến hiệu suất quá trình lên men cồn và chất lượng vang. Phương pháp này chỉ nên thực hiện khi các chủng vi sinh vật đã được lựa chọn kỹ, không có tính chất đối kháng và lượng tế bào cần có của mỗi chủng đã được xác định.

#### *2.1.2.3. Lên men hai giai đoạn tách riêng:*

Lên men hai giai đoạn tách riêng là tiến hành quá trình lên men rượu và lên men malolactic riêng biệt. Sau khi lên men rượu bởi nấm men kết thúc đưa vi khuẩn vào thực hiện giai đoạn lên men phụ (lên men malolactic).

Phương pháp này có những ưu điểm sau:

- Cho phép điều chỉnh một cách dễ dàng các yếu tố môi trường thích hợp cho từng loài. Điều này giúp thời gian lên men của mỗi giai đoạn có thể rút ngắn.
- Không ảnh hưởng đến hiệu suất lên men cồn vì nuôi cấy hai chủng riêng
- Cuối quá trình lên men do nồng độ đường còn rất thấp nên lúc này vi khuẩn lactic buộc phải sử dụng các axit hữu cơ làm nguồn cơ chất chính để sinh tồn. pH dịch lên men lúc này đã giảm còn khoảng 3,5-4, đây là khoảng pH thích hợp cho việc chuyển hoá axit malic, hoạt lực enzym malolactic lớn nhất trong khoảng pH này
- Nguy cơ đường bị chuyển hoá thành các sản phẩm khác như axit lactic, axit axetic giảm.

Nhược điểm lớn nhất của phương pháp này là khi kết thúc lên men rượu nồng độ cồn trong môi trường cao khoảng 12-15%V, do đó khi cấy vi khuẩn vào môi trường

do gặp nồng độ cồn cao đột ngột nên vi khuẩn bị sốc, số lượng giảm đáng kể do đó sẽ làm chậm quá trình lên men malolactic. Do vậy mà phải chọn được các chủng vi khuẩn có khả năng chịu được độ cồn cao và dùng phương pháp nuôi cấy trước tức là nuôi vi khuẩn trong các môi trường giàu dinh dưỡng có bổ sung cồn ở khoảng pH 4,5 trong 5-7 ngày để vi khuẩn thích ứng dần sau đó mới đưa vào vang non, qua đó có thể khắc phục tình trạng chết của vi khuẩn một cách đáng kể.

Trong thực tế không có một phương pháp nào chung cho việc khởi động quá trình lên men malolactic, vì vậy khi đưa một chủng vi khuẩn nào vào thực hiện quá trình này cần thiết phải xác định thời điểm bổ sung thích hợp với chủng giống này.

### ***2.1.3.Các kỹ thuật thúc đẩy quá trình lên men malolactic:***

#### ***2.1.3.1. Sử dụng chế phẩm malolactic:***

Khi cấy trực tiếp vi khuẩn vào vang non thì sẽ gây hiện tượng số lượng tế bào vi khuẩn tử vong cao do nồng độ cồn trong môi trường cao. Để khắc phục tình trạng này có thể sử dụng các chế phẩm malolactic. Ở đây người ta tiến hành nuôi *Leuconostoc oenos* trên các môi trường có thành phần rất gần với thành phần của rượu vang như các môi trường cơ bản có thêm nước ép nho hoặc vang có bổ sung dinh dưỡng bằng nước chiết nấm men nhằm tạo điều kiện thuận lợi nhất cho vi khuẩn phát triển tối đa nhằm thu lấy sinh khối tế bào, bảo quản chúng bằng các biện pháp hữu hiệu ở nhiệt độ lạnh hoặc đông khô. Trước khi các chế phẩm được tiếp vào vang đang ở giai đoạn lên men phụ cần qua một giai đoạn tái hoạt hoá. Giai đoạn tái hoạt hoá không những cho lượng sinh khối vi khuẩn đủ để tiến hành nhanh quá trình lên men malolactic (với nồng độ tế bào không thấp hơn  $10^6$  tế bào/ml) mà còn đưa các tế bào vi khuẩn đến giai đoạn sinh lý biểu hiện đặc trưng của enzym malolactic [6,10].

Trên thị trường có rất nhiều loại chế phẩm malolactic có thể lấy ví dụ như *Leuconostoc oenos* GM là loại đông lạnh, 80% lượng vi khuẩn sẽ mất sự sống nếu cấy trực tiếp vào vang nhưng nếu cho cấy trước trong nước nho chứa 0,5% nước chiết nấm men ở pH 4,5 thì khả năng sống tốt hơn nhiều. Trong môi trường này mật độ tế bào ban đầu là  $10^6$  tế bào/ml thì lên tới  $10^9$  tế bào/ml sau 6 ngày nuôi cấy.

Nhiều tác giả cho rằng nên kích thích quá trình lên men malolactic trong hoặc sau quá trình lên men rượu là lúc môi trường thuận lợi cho sinh sản và hoạt động của vi khuẩn. Tuy nhiên các tác giả khác lại cho rằng nếu nuôi cấy đồng thời *Sacharomyces cerevisiae* và *Leuconostoc oenos* thì quá trình lên men malolactic sẽ xảy ra thuận lợi sau 15-20 ngày.

#### 2.1.3.2. Sử dụng tế bào cố định:

Theo [4] ngay từ năm 1976 Divies và Siess đã thực hiện quá trình chuyển hoá liên tục axit malic nhờ các tế bào *Lactobacillus casei* cố định trong gel polyacrylamid. Spettoli và cộng sự [14,15] đã cố định *Lcn. oenos* trên gel alginate (1,67%) và thử khả năng chuyển hoá axit L-malic trong vang đỏ có nồng độ cồn 10,2%V, 7,98 g/l axit có thể chuẩn độ, pH 3,15, 21mg/l SO<sub>2</sub> tổng và 1,5g/l axit malic. Lên men gián đoạn trong 16 giờ đã có 56% axit L-malic chuyển hoá thành axit L-lactic. Gestrelus đã cố định *Lcn. oenos* trong alginat và tiến hành lên men malolactic ở quy mô thực nghiệm một cách liên tục trong 2000 giờ và thấy rằng hoạt độ malolactic (HĐML) giảm dần từ 100% xuống 35% trong 500 giờ đầu tiên, sau đó cho nước nho chảy qua thì HĐML lại tăng lên 60% sau khoảng 300 giờ phản ứng. Nếu cho vang vào thì HĐML lại giảm từ từ rồi lại tăng trở lại nếu dùng dịch nho [6].

Một số tác giả đã so sánh khả năng phân giải axit malic trong vang của các tế bào *Lcn. oenos* được cố định trong alginate với những tế bào tự do được bổ sung vào vang trong 24 giờ và ở 25°C. Thành phần vang trong khoảng pH từ 2-4,5; cồn từ 8-16%V; và 0-100mg/l SO<sub>2</sub> tổng số. Các tác giả nhận thấy các tế bào cố định có thể duy trì hoạt động giảm axit malic ngay cả ở độ cồn cao, độ pH thấp và nồng độ SO<sub>2</sub> cao trong khi đó ở điều kiện này hoạt động của các tế bào tự do bị giảm tới mức không đáng kể.

Các tế bào được cố định có thể mang lại nhiều lợi thế cho việc giảm độ axit trong vang có độ cồn cao, nồng độ SO<sub>2</sub> và pH thấp và không có ảnh hưởng của sinh trưởng vi khuẩn trong vang nhưng cũng có những bất lợi như khả năng nhiễm vi sinh vật làm hỏng vang, mất khả năng hoạt động kéo dài và việc các tế bào cố định hoặc các hợp chất cố định đi vào trong vang. Gần đây người ta đã sử dụng nhiều chất mang

khác hoặc là đơn lẻ hoặc là phối hợp với nhau và cố định tế bào trong hai lớp vỏ. Điều đó đã cải thiện rất nhiều chất lượng chất mang và làm cho kỹ thuật cố định tế bào có thể ứng dụng vào sản xuất quy mô lớn không chỉ ở giai đoạn lên men phụ mà ở cả giai đoạn lên men chính nữa.

#### **2.1.4. Vi khuẩn *Leuconostoc oenos* - tác nhân của quá trình lên men malolactic**

##### **2.1.4.1. Đặc tính sinh học: [1,22,23]**

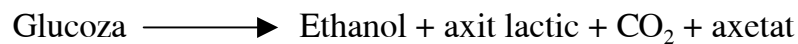
*Leuconostoc oenos* là một loại liên cầu khuẩn Gram dương ( $\text{Gr}^+$ ) nằm trong hệ vi khuẩn sinh axit lactic chịu được độ cồn và axit tương đối cao (pH tương đối thấp) như ở rượu vang và sâm-panh. Có nhiều loại *Leuconostoc* nhưng chỉ có *Lcn.oenos* là có giá trị ứng dụng trong công nghiệp đặc biệt là công nghiệp sản xuất rượu vang vì nó có enzym malolactic được sinh ra dưới tác dụng cảm ứng của axit malic.

*Leuconostoc oenos* có kích thước nhỏ nhất trong các loài vi khuẩn lactic có trong vang, đường kính tế bào của chúng thường nhỏ hơn 0,7 micromet. *Leuconostoc oenos* tạo ra các khuẩn lạc rất bé màu trong mờ sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường đặc. Ngược lại các loài *Leuconostoc* không phải *oenos* tạo ra khuẩn lạc trong thời gian nhanh hơn nhiều chỉ khoảng 3 ngày. Sự phân biệt này càng thấy rõ khi nuôi cấy trên môi trường lỏng. Trong khi *Leuconostoc* khác loài *oenos* và trực khuẩn, cầu khuẩn phát triển rất nhanh trên môi trường lỏng (sau 48 giờ có  $\text{OD} \geq 1,5 \div 3,0$  đo ở  $\lambda = 600\text{nm}$ ) thì *Leuconostoc oenos* mãi sau 120 giờ mới đạt  $\text{OD} \geq 0,6 \div 1,2$ . *Leuconostoc oenos* thường phát triển thích hợp trên các môi trường axit nhưng rất khó nuôi cấy trên các môi trường nhân tạo.

Trong cùng loài *Leuconostoc oenos* khả năng lên men đường của mỗi chủng mỗi khác. Có chủng lên men được hoàn toàn L-arabinoza và D-fructoza ở các pH 4,5,7 nhưng có chủng lại không lên men được L-arabinoza và chỉ lên men yếu ớt D-fructoza. Đối với các loại đường khác thì tác dụng của *Leuconostoc oenos* rất yếu hoặc không xác định được. Nhìn chung người ta có thể dựa vào khả năng lên men D-glucosa và sự tạo thành D-lactic để phân biệt *Leuconostoc* với các loài khác. Trong khi trên môi trường thực nghiệm dùng D-glucosa không chứa fructoza và axit malic *Leuconostoc oenos* cần có khoảng thời gian 15 ngày để chuyển hoá glucosa rồi ngừng phát triển thì

các loài vi khuẩn lactic khác chỉ cần có 2 ngày mà thôi. Ở đây lượng axit D-lactic tạo thành so với lượng lactic tổng ở loài *Leuconostoc oenos* đạt từ 95% trở lên, còn ở các loài khác chỉ đạt 25-44%.

Sơ đồ chuyển hoá glucoza ở *Leuconostoc oenos* như sau:



#### 2.1.4.2. Enzim trong *Leuconostoc oenos*:

*Leuconostoc oenos* có nhiều loại enzym. Hoạt tính enzym của loài này gần tương tự như hoạt tính enzym của trực khuẩn và cầu khuẩn. Thế nhưng hoạt tính một số loại enzym của các chủng trong loài *Leuconostoc oenos* lại có sự khác nhau khá rõ. Người ta nhận thấy hoạt lực enzym glucosidaza ở các chủng thuộc loài *Leuconostoc oenos* đều rất mạnh, đặc biệt là  $\alpha$ -D-galactosidaza,  $\alpha$ -D-arabinoza,  $\alpha$  và  $\beta$ -D-glucosidaza,  $\beta$ -D-xylosidaza. Các enzym  $\beta$ -glucosidaza tác dụng ngược lên trên các cơ chất và thủy phân các antocyanin có trong nước ép nho hoặc trong vang đỏ. Do vậy vang đỏ thường bị giảm màu và có sự tích lũy không ổn định glucoza và fructoza trong quá trình lên men malolactic. [1]

Các enzym esteraza ở loài *Leuconostoc oenos* thủy phân được các este của axit béo từ C<sub>4</sub> đến C<sub>9</sub> và C<sub>18</sub> nhưng lại không thủy phân được este của axit béo từ C<sub>10</sub> gây ức chế quá trình sinh trưởng và hoạt động của *Leuconostoc oenos* [24]. *Leuconostoc oenos* có khả năng chống chịu tốt đối với một số loại kháng sinh như streptomycin, gentamycin, lincomycin và neomycin, đối với các kháng sinh khác thì khả năng chống chịu của chúng không rõ ràng. Đáng chú ý là vi khuẩn *Leuconostoc oenos* chống chịu được các chất kháng sinh rất đặc trưng đối với các vi khuẩn yếm khí tuyệt đối hay yếm khí tùy tiện.

Tất cả các loại vi khuẩn thuộc loài *Leuconostoc oenos* đều không có khả năng tạo dextran do vậy không làm nhớt môi trường vì thế rượu vang lắng trong được một cách dễ dàng.

Hoạt độ enzym malolactic của *Leuconostoc oenos* có một ý nghĩa cực kỳ quan trọng vì nó có vai trò lớn trong việc tạo nên chất lượng cảm quan của rượu vang. Nhờ

có enzym này mà axit malic chuyển thành axit lactic và CO<sub>2</sub> tạo cho rượu vang có độ chua thích hợp cũng như có vị đắng dịu. Mặt khác cũng nhờ enzym này mà axit xitric được chuyển hoá thành các chất khác có vai trò tổ hợp nên hình thơm đặc trưng cho vang. Hoạt độ malolactic của *Leuconostoc oenos* có giá trị cao nhất ở pH 3 và thấp dần theo chiều tăng của pH. Hoạt độ này phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ axit malic vì axit malic là chất cảm ứng cho sự hình thành enzym malolactic. Khi nồng độ axit malic bằng hoặc lớn hơn 10g/l thì hoạt độ malolactic của *Leuconostoc oenos* là cao nhất. Ngược lại nếu nồng độ axit malic nhỏ hơn 10g/l thì hoạt độ malolactic thấp dần.

### **2.1.5. Ảnh hưởng của điều kiện công nghệ và môi trường đến quá trình lên men malolactic.**

#### **2.1.5.1. Ảnh hưởng của pH:**

pH có ảnh hưởng rất sâu sắc đến sinh trưởng, phát triển, cũng như khả năng phân giải axit malic của *Leuconostoc oenos*. Đây là yếu tố quyết định đến tiến trình lên men malolactic. Khoảng pH tối ưu cho sự phát triển cũng như phân giải axit malic của các chủng vi khuẩn là rất khác nhau ngay cả trong cùng một loài. Vi khuẩn *Leuconostoc oenos* có thể phát triển được bắt đầu từ pH=2,9 nhưng pH tối thích cho sự phát triển của chủng vi khuẩn này lại là 4,5-6,5.

Sở dĩ vi khuẩn *Lcn.oenos* chuyển hoá được axit malic thành axit lactic vì trong tế bào của nó có chứa enzym malolactic. Do bản chất của enzym là protein nên hoạt lực của nó chỉ phù hợp với một số khoảng pH nhất định, nếu không sẽ xảy ra hiện tượng keo tụ hoặc biến tính protein và sẽ dẫn tới mất hoạt lực enzym. Các nghiên cứu chỉ ra rằng pH tối thích cho sự chuyển hoá axit malic thành axit lactic là ở pH < 3. Theo kết quả nghiên cứu của Tiến sĩ Liên Thanh [1] thì pH 4,5 là thích hợp nhất cho quá trình chuyển hoá cơ chất để tạo thành sinh khối của chủng *Lcn.oenos* đã được sử dụng trong các thí nghiệm còn pH 3,1 lại là pH tối thích cho sự phân giải axit malic của các chủng vi khuẩn này.

Qua các kết quả trên cho thấy môi trường vang non là rất thích hợp cho sự phân huỷ axit malic vì các chủng vi khuẩn có hoạt độ malolactic cao trong khoảng pH của vang non, tuy nhiên lại không thích hợp cho sự sinh trưởng của chúng. Đây cũng là

một điểm gây khó khăn cho việc khởi động quá trình lên men malolactic. Tuy nhiên vẫn hoàn toàn có thể khắc phục được điểm này nhờ các biện pháp kỹ thuật.

#### 2.1.5.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ:

Thông thường nhiệt độ 20°C là nhiệt độ tối ưu để lên men malolactic, tuy nhiên trong quá trình sản xuất chỉ có ở các cơ sở có hệ thống cấp lạnh mới có thể điều chỉnh được tương đối chính xác nhiệt độ này. Chỉ một số ít chủng vi khuẩn có khả năng lên men malolactic ở 15°C, còn dưới 15°C thì quá trình lên men malolactic rất khó xảy ra.

#### 2.1.5.3. Ảnh hưởng của nồng độ cồn:

Thông thường nếu nồng độ ethanol vượt quá 10%V thì quá trình lên men malolactic sẽ bị ức chế một cách mạnh mẽ. Nhưng *Leuconostoc* và *Pediococcus* thì lại chịu được nồng độ cồn 12-14%V. Khi nồng độ cồn vượt quá 15%V thì sự phát triển của vi khuẩn không diễn ra nữa, tuy nhiên quá trình lên men malolactic vẫn có thể xảy ra. Như vậy cồn ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn mạnh hơn là vào chính quá trình lên men malolactic, so với pH và nhiệt độ thì ảnh hưởng của nồng độ cồn đến quá trình lên men malolactic là ít sâu sắc hơn. Kết quả nghiên cứu của TS Liên Thanh cũng cho thấy khi nồng độ cồn là 11%V thì vi khuẩn vẫn còn phát triển yếu, đến 13%V thì vi khuẩn hoàn toàn không phát triển số lượng vi khuẩn giảm dần ngay từ ngày đầu, đến 15%V thì vi khuẩn bị tiêu diệt sau 5 ngày.

#### 2.1.5.4. Ảnh hưởng của SO<sub>2</sub>:

Trong sản xuất rượu vang người ta sử dụng SO<sub>2</sub> để chống oxy hoá và kháng khuẩn vì SO<sub>2</sub> có tác dụng ức chế một vài loại enzym oxy hoá-khử và ức chế sự phát triển của một số loại vi khuẩn lactic hay vi khuẩn axetic bất lợi. Một phần SO<sub>2</sub> ở dạng tự do còn một phần chúng kết hợp với các cấu tử khác có trong rượu vang. Trong quá trình lên men cồn, SO<sub>2</sub> kết hợp với nhiều chất khác, sau quá trình này ảnh hưởng của SO<sub>2</sub> lên vi khuẩn có giảm đi nhưng vẫn còn có những tác dụng nhất định.

Nhìn chung trong vang hàm lượng SO<sub>2</sub> tổng số khoảng 100-150mg/l tức là khoảng 1-10mg SO<sub>2</sub> dưới dạng tự do/l là đủ để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn có trong vang. Tại vùng Bordeaux của Pháp nhiều năm kinh nghiệm cho thấy điều kiện

để quá trình lên men malolactic có thể tiến hành tốt đẹp là nồng độ  $\text{SO}_2$  tổng số không lớn hơn 40-50 mg/l (tức khoảng 5mg/l  $\text{SO}_2$  tự do).

Như vậy có thể nói rằng ngoài những tác dụng quan trọng trong quá trình chế biến vang thì  $\text{SO}_2$  cũng lại là một chất ức chế đáng kể quá trình lên men malolactic sau này. Vì vậy để quá trình lên men malolactic thực hiện được một cách tốt đẹp thì cần phải sunfit hoá nước nho một cách vừa phải để các vi khuẩn có lợi có thể sinh trưởng và phát triển được.

#### 2.1.5.5. Ảnh hưởng của các loại đường:

Đường cũng là một cơ chất quan trọng trong quá trình phát triển của vi khuẩn *Lcn.oenos*. Tuy đường không phải là cơ chất chính trong quá trình lên men malolactic nhưng thành phần đường trong môi trường cũng có những ảnh hưởng đáng kể đến sự sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn. Theo kết quả nghiên cứu của Tiến sĩ Liên Thanh thì khi trong môi trường chỉ có fructoza hoặc glucoza làm cơ chất thì nhận thấy fructoza có tác dụng kích thích sinh trưởng mạnh hơn đường glucoza [1]. Như vậy nhận thấy rằng đường dạng xetoza như fructoza kích thích sinh trưởng mạnh hơn đường dạng andoza như glucoza và tốc độ chuyển hoá đường xetoza nhanh hơn tốc độ chuyển hoá andoza.

#### 2.1.5.6. Ảnh hưởng của nguồn nitơ:

Nguồn nitơ có ảnh hưởng khá nhiều đến sự phát triển của *Leuconostoc oenos*. Theo nghiên cứu của Tiến sĩ Liên Thanh thì cao nấm men có tác dụng kích thích sinh trưởng của *Leuconostoc oenos* tốt nhất, sau đó là cao thịt, còn pepton thì hầu như không có tác dụng kích thích sinh trưởng của chủng vi khuẩn này nhưng môi trường tổ hợp của cả ba loại vẫn cho kết quả tốt nhất. [1]

Tuy nhiên trong quá trình lên men malolactic thì nguồn dinh dưỡng nitơ trong môi trường rất dồi dào do sau khi kết thúc quá trình lên men rượu lượng nấm men còn lại trong vang non sẽ tự phân (do trong tế bào của chúng có chứa hệ enzym thuỷ phân protein), nguồn nitơ tự phân của nấm men là một nguồn đạm rất lý tưởng cho sự phát triển của *Lcn.oenos*.

#### 2.1.5.7. Ảnh hưởng của axit malic và các axit hữu cơ khác:

\***Axit malic:** là chất cảm ứng cho sự hình thành enzym malolactic, vì vậy trong môi trường buộc phải có thành phần này. Nếu chỉ xét về mặt sinh trưởng và phát triển thì axit malic hầu như không có tác dụng gì trong việc kích thích sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *Lcn.oenos* kể cả hai dạng D và L, thậm chí còn có tác dụng ức chế khi nồng độ vượt quá 10g/l. Như vậy sự có mặt của axit malic là cần thiết để làm chất cảm ứng nhằm thu được vi khuẩn *Lcn.oenos* có hoạt lực malolactic cao nhưng chỉ trong giới hạn nồng độ cho phép để không gây ức chế cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng, các nghiên cứu cho thấy nồng độ axit malic cho hoạt độ malolactic của vi khuẩn cao nhất là 10g/l đối với dạng DL và 5g/l đối với dạng L.

\***Axit lactic:** ức chế sự phát triển của *Lcn.oenos*. Khi nồng độ axit này là 0,5 g/l thì sinh khối giảm rất nhanh chỉ còn khoảng 50% so với mẫu đối chứng; tăng nồng độ axit lên gấp đôi thì sinh khối giảm 57,5%; tăng gấp 6 lần thì sinh khối giảm 79,2% và khi nồng độ axit lactic là 5g/l thì *Lcn.oenos* hoàn toàn không phát triển được nữa.

Sự tiêu hao đường glucoza phụ thuộc vào nồng độ axit lactic có trong môi trường, khi nồng độ axit lactic tăng lên thì lượng đường glucoza tiêu hao sẽ giảm, và sự tiêu hao đường sẽ chấm dứt khi nồng độ axit lactic 5g/l. Tuy nhiên tác dụng ức chế của axit lactic sẽ giảm đi nếu môi trường có mặt đồng thời cả axit malic. Vì vậy trong lên men malolactic thì dù nồng độ axit malic có tăng lên thì sinh khối *Lcn.oenos* cũng vẫn tăng do trong vang luôn có một lượng axit malic do nguyên liệu đưa vào hoặc được hình thành trong quá trình lên men rượu.

**\*Axit xitric và axit tartric:** Hai axit này có trong quả và đi vào dịch lên men vang. Khi môi trường có fructoza thì axit xitric có tác dụng kích thích sự phát triển của *Lcn.oenos* ở các nồng độ từ 2-7,5 g/l. Khi môi trường có mặt glucoza thì axit xitric hầu như không có tác dụng kích thích sinh trưởng. Điều tương tự cũng đúng đối với axit tartric. Người ta cũng nhận thấy rằng ngay cả khi có mặt axit malic và hexoza thì axit tartric cũng không có tác dụng kích thích sinh trưởng. Trong giai đoạn lên men phụ *Lcn.oenos* không có khả năng chuyển hoá axit tartric, đây là điểm có lợi vì vang sẽ tránh bị “trở chua” do biến đổi của axit này.

Ngoài ra axit oxalic ức chế hoàn toàn hoạt độ enzym malolactic. Axit maleic, axit pyruvic không ức chế malolactic nội bào.

#### 2.1.5.8. Ảnh hưởng qua lại của nấm men và *Lcn.oenos*:

Theo kết quả nghiên cứu của Tiến sĩ Liên Thanh [1] thì khi tiếp giống đồng thời *Saccharomyces* với lượng tế bào  $5 \times 10^5$ /ml và *L.oenos* với lượng tế bào  $10^6$ /ml thì sau 3 ngày nuôi cấy lượng tế bào nấm men tăng từ  $5 \times 10^5$  lên  $7 \times 10^7$ , trong khi đó lượng vi khuẩn sống sót giảm 10%, nguyên nhân là do sự cạnh tranh các yếu tố dinh dưỡng có trong môi trường. Đến ngày thứ 4 khi nấm men đã dừng phát triển và độ cồn đã đạt cao thì vi khuẩn bắt đầu phát triển và tăng lên tới  $5 \times 10^7$ /ml. Lên men rượu kết thúc sau 12 ngày và axit malic hoàn toàn bị thoái biến sau 22 ngày.

Vi khuẩn tiếp tục tăng và lượng tế bào đạt trên  $10^8$ /ml nhờ sử dụng axit xitric sau khi nguồn đường và axit malic đã cạn kiệt, tức là sự tiêu hao axit xitric cốt là để tăng sinh khối của *Lcn.oenos* chứ không phải để tạo axit axetic. Axit axetic được chủ yếu tạo thành trong giai đoạn lên men chính.

Nếu tiếp vi khuẩn vào ngày thứ ba thì sự sinh trưởng của vi khuẩn bị ức chế mạnh mẽ vì lúc này nấm men còn phát triển mạnh và cồn đã tăng cao. Nếu tiếp sau ngày thứ 9 thì sự sinh trưởng ít bị ảnh hưởng vì lúc này nấm men đã ngừng hoạt động và số lượng lớn tế bào đã chết và giải phóng chất dinh dưỡng vào môi trường tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn phát triển.

Tuy nhiên nhìn chung các chủng nấm men và vi khuẩn *Lcn.oenos* khác nhau thì ảnh hưởng giữa chúng cũng khác nhau khi nuôi cấy hỗn hợp. Nhiều chủng nấm men khi nuôi cấy chung với *Lcn.oenos* thì thời gian lên men rượu bị kéo dài 5-7 ngày

so với mẫu đối chứng nhưng có chủng lại không bị ảnh hưởng gì thậm chí còn làm giảm thời gian lên men chính, trong trường hợp này lên men rượu có thể kết thúc sớm 3-5 ngày.

Theo Beelman và Kunkee [25,26] thấy rằng việc cấy đồng thời nấm men và vi khuẩn có kết quả tốt, việc lên men rượu và lên men malolactic đạt được đồng thời. Nhưng một số công trình khác đã quan sát thấy sự kém sinh trưởng của vi khuẩn cũng như việc giảm chậm của axit malic khi chúng được cấy đồng thời với men giống. Điều này cho thấy tầm quan trọng của nấm men tự phân trong việc cung cấp các chất dinh dưỡng chính cho sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Như vậy ảnh hưởng qua lại giữa nấm men và vi khuẩn là rất phức tạp phụ thuộc vào đặc điểm riêng của từng chủng giống mỗi loại. Vì vậy bất cứ một nghiên cứu nào cũng nên tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng qua lại giữa hai chủng nấm men và vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu để có thể tìm được thời điểm bổ sung vi khuẩn thích hợp tránh sự ức chế lẫn nhau giữa các chủng.

## **2.2. Quá trình làm trong rượu vang**

### ***2.2.1. Mục đích của quá trình làm trong rượu vang:***

Độ trong là một trong những đòi hỏi số một về chất lượng của rượu vang đối với người tiêu dùng. Hiện tượng đục là một dung dịch có mặt các tiểu phần và các chất lơ lửng mà nó làm chệch ánh sáng từ hướng đi thông thường, nó là một nhân tố gây ảnh hưởng không tốt khi đánh giá chất lượng rượu vang. Do đó việc đo độ trong có liên quan tới việc xác định độ đục, nó phụ thuộc vào số lượng và kích cỡ của các tiểu phần trong dung dịch lơ lửng. Nhiều công trình nghiên cứu đã kết luận rằng rượu vang có thể được làm trong trong thời gian ngắn bằng việc loại bỏ các tiểu phần này. Mục đích chính của quá trình ổn định rượu vang là để đảm bảo độ trong được lâu dài và ngăn chặn quá trình lắng cặn. Quá trình ổn định vang bị ảnh hưởng bởi các điều kiện như: nhiệt độ, sự ôxi hoá hay ánh sáng nơi mà rượu vang được tàng trữ. Các cơ chế hoá và sinh học gây ra đục hay lắng cặn và các quá trình xử lý hiệu quả để làm ổn định rượu vang trước khi đóng chai cũng đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu.

Quá trình lắng cặn tự nhiên là quá trình kết lắng của các tiểu phần trong dung dịch lơ lửng và sự hấp phụ của chúng trên các vách của các thùng chứa rượu vang bằng trọng lực. Sau khi quá trình lên men malolactic, rượu vang đỏ có chứa các tiểu phần từ dịch quả nho, nấm men và vi khuẩn, các muối, các chất keo và các chất không kết tinh khác. Các yếu tố bên ngoài như nhiệt độ, ôxy, các chất tanin từ gỗ sồi cũng sẽ làm thúc đẩy hoặc hạn chế quá trình kết lắng. Việc làm trong rượu vang cũng có thể thực hiện bằng tách cặn, nhất là khi rượu vang được tàng trữ trong các thùng chứa có kích cỡ nhỏ. Quá trình lắng tự nhiên thường xảy ra rất nhanh trong quá trình sản xuất vang đỏ và vang trắng khô, nhưng lại chậm hơn trong các loại vang trắng ngọt.

Còn quá trình làm trong là việc bổ sung một chất với mục đích để tạo ra hiện tượng kết bông và lắng cặn trong vang non chưa ổn định keo [28]. Để đạt được độ trong cần thiết ổn định về mặt hoá lý, người ta thường bổ sung có chủ định các chất có khả năng hấp phụ, các chất này có thể kết tủa một phần các thành phần hoà tan có mặt trong rượu vang, và thường được gọi là các tác nhân làm trong [27]. Các chất này sẽ “giảm giữ” các tiểu phần gây đục và không ổn định trong vang, do vậy mà rượu sẽ ổn định và trong hơn. Bằng cảm quan người ta có thể thấy rằng quá trình làm trong có cả thay đổi tốt và xấu, tùy thuộc vào chủng loại và chất lượng các tác nhân làm trong sử dụng thì rượu vang sẽ có vị êm dịu hơn hay sẽ có tác dụng ngược lại.

Một số thí dụ điển hình về hoạt tính của một số tác nhân làm trong:

- (1) Sự loại bỏ tannin và các hợp chất polyphenol gây nâu hóa bằng các chất làm trong có bản chất protein như casein, isinglass, albumin và gelatin.
- (2) Hấp phụ protein rượu vang bằng đất trao đổi ví dụ như bentonit.
- (3) Sự loại bỏ các hợp chất mono- và poly- phenol phân tử nhỏ bằng các vật liệu polyamide như là polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) và nylon.
- (4) Sự loại bỏ các mùi không mong đợi của vang bằng sunphat đồng hoặc một số chất khác.
- (5) Sự loại bỏ các hạt keo và các kết tủa mới hình thành bằng các vật liệu gelatin.

### **2.2.2. Một số tác nhân làm trong:**

Các tác nhân làm trong có thể được phân loại thành một trong các nhóm dưới đây. Các nhóm bao gồm các chất protein (casein, albumin, isinglass và gelatin), đất hoạt tính (các dạng bentonit và các loại đất khác), các polyme với các thành phần trơ hoặc pirridone (nilon và PVPP) và các chất keo có khả năng hoà tan hạn chế (polysaccharide tự nhiên và các chất kết tủa ferroxyanide cùng các muối của nó).

#### **2.2.2.1. Các chất trợ lắng có bản chất protein:**

Mục đích của việc bổ sung các chế phẩm có bản chất protein vào rượu vang nhằm làm dịu và giảm tính chất se lưỡi của rượu vang, nó còn làm giảm màu bằng cách hấp phụ và kết tủa các thành phần phenol và tanin. Tất cả các loại protein này đều có bản chất tự nhiên và thường sử dụng trong thực tế là các dạng tinh khiết. Bốn loại thông dụng nhất hay được áp dụng trong rượu vang là casein, gelatin, albumin và isinglass.[27]

Gelatin là sản phẩm thuỷ phân các gân và da của động vật. Nó được phân loại như một dẫn xuất collagen và có trọng lượng phân tử lớn [27]. Các gelatin tinh thể được hoà tan trong nước nóng với nhiệt độ 40-50°C, với xử lý cho rượu vang đỏ thì lượng sử dụng thường thay đổi từ 3-10g/l [28]

Casein là một hỗn hợp các protein trong sữa khi kết tủa bằng axit, phần lớn ở dạng  $\alpha$  và  $\beta$ . [27]. Bột casein thường không hoà tan trong nước tinh khiết nhưng hoà tan tốt trong môi trường kiềm, lượng sử dụng thường từ 10-20 g/hl, đôi khi lên tới 50g/hl [28]

Albumin là hỗn hợp của các protein của lòng trắng trứng: ovalbumin và conalbumin. Hàm lượng ovalbumin chiếm 50% trong protein của lòng trắng trứng còn conalbumin chỉ chiếm khoảng 15%. Albumin là một nhóm các protein có khả năng hoà tan trong nước, bao gồm albumin huyết thanh bò(BSA) [27]. Đối với lòng trắng trứng tươi thì lượng sử dụng khoảng 3-8g /225lít rượu (một cái lòng trắng trứng tương ứng khoảng 4 g chất khô). Còn với lòng trắng trứng đông lạnh thì khi để hết đông ở nhiệt độ thường thì sử dụng ngay lập tức với lượng 75-200ml/hl [28].

Isinglass là protein dạng keo từ thành phần của bong bóng cá, có trọng lượng phân tử và các đặc tính tương tự như gelatin. Khả năng hoà tan trong nước lạnh của isinglass tốt hơn gelatin. Các tác nhân làm trong thường hoà tan từ 1 đến 5 % trong nước tùy thuộc vào bản chất của chất làm trong. Trong một số trường hợp nhất định thì hoà tan trong dung dịch muối (NaCl hoặc KCl) hoặc ở pH kiềm (bằng  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Đặc điểm chung của tất cả các protein này là chúng có điểm đẳng điện gần với dãy pH của rượu vang (Haurowitz 1963). Do vậy, các chất trợ lắng chỉ có khả năng hoà tan giới hạn trong rượu vang và các phân tử của chúng vận chuyển toàn bộ các điện tích dương, vì vậy với bất kì lượng protein được bổ sung vào mà dư thừa thì sẽ bị loại bỏ bằng tác nhân có bản chất là bentonit. Điểm đẳng điện của protein cũng có tác động đến các phức hệ protein- tanin tương ứng sẽ được hình thành (Oh và Hoff 1987). Các dạng chất tanin hình thành phức hệ hiệu quả ở giá trị pH tương đương điểm đẳng điện của protein nhưng kém hiệu quả tại giá trị pH cao hơn.

#### 2.2.2.2. Đất hoạt tính:

Bentonit được sử dụng rộng rãi để hấp phụ các thành phần có bản chất là protein của rượu vang. Bentonit thường được sử dụng để làm trong rượu vang và dấm.

Bentonit là một loại đất tự nhiên với các dạng cấu tạo như:  $\text{Mg}$ ,  $\text{Ca}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{SiO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (Siddiqui 1968). Nguồn của đất hoạt tính bentonit có tác động không đáng kể đến các đặc tính của nó, và sự khác biệt chủ yếu đó là các tỷ lệ của các ion  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ , và  $\text{Na}^+$  trong các lưới phân tử. Bentonit được sản xuất ở Đức và Bắc Phi thường được sử dụng tại các nước Châu Âu có các dạng  $\text{Ca}^{++}$  trội hơn và kèm theo là hoà tan trong nước kém hơn và khả năng tiếp nhận protein kém hơn tính theo một đơn vị trọng lượng. Bentonit được sản xuất từ Wyoming thường được sử dụng tại Mỹ ở dạng  $\text{Na}^+$ , hoà tan trong nước tốt hơn và khả năng tiếp nhận protein tốt hơn so với dạng  $\text{Ca}^{++}$  (Blande và Boulton 1988).

Bentonit có cấu trúc mà có thể trương nở sau khi tiếp xúc với nước. Sau 2 ngày ngâm trong nước, dung dịch bentonit sẽ có khả năng hấp thụ tốt nhất. Bentonit có bản chất là một chất trợ với các hợp chất phenol trong rượu vang ngoại trừ các anthocyanin mang điện tích dương. Các đất hoạt tính dạng  $\text{Na}^{++}$  có khả năng hấp phụ protein gấp

đôi dạng  $\text{Ca}^{++}$  được sử dụng là các tác nhân làm trong trong rượu vang( Sudraud và Caye 1985). Đã có nhiều công trình nghiên cứu để so sánh về hai dạng hợp chất này( Rankine và Emerson 1963, Jacob 1965), tuy nhiên với dạng  $\text{Na}^+$  thì khả năng hấp phụ trên mỗi đơn vị cặn lắng cao hơn. Khả năng hấp phụ của đất hoạt tính bentonit ở  $\text{pH}=3,0$  cao gấp ba lần ở  $\text{pH} = 4,5$  ( Kakob 1968). Cơ chế trao đổi cation phụ thuộc vào dạng ion, các ion  $\text{Na}^+$  ( hoặc là  $\text{Ca}^{++}$ ) từ bentonit đi vào rượu vang, khi đó nó hấp phụ các protein trong quá trình trao đổi.

Bentonit cũng được coi là các chất trợ lắng để làm trong dịch quả và làm giảm mức độ các chất khác hơn là protein (Mobius và Gortges 1976). Chúng có khả năng hấp phụ đáng kể các amino axit và các thành phần khác trong nước quả. Các đặc điểm không mong muốn của bentonit là sự kết chặt kém của các cặn lắng của bentonit, điều này có thể được khắc phục bằng việc sử dụng trợ lọc diatomit để làm trong rượu vang sau khi xử lí. Bentonit thường trương nở ở trong nước với nồng độ 5-15%, Bentonit trương nở tốt hơn trong nước ấm ( $50\text{-}60^\circ\text{C}$ ). [28]

#### *2.2.2.3.Các chất cao phân tử tổng hợp:*

Các nguyên liệu như polyglyxin, polyamit (nilon) và polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) là các sản phẩm tổng hợp với các nguyên tử cacbon và oxy có trên bề mặt mà chúng tác dụng như các chất hấp phụ. Cả nylon và PVPP là các chất bột màu trắng không có khả năng hoà tan mà thường được sử dụng trong rượu vang. Do PVPP có khả năng hấp phụ hiệu quả hơn, nên nó thường được ưu tiên sử dụng hơn là nylon (Caputi và Peterson 1965, Rossi và Singleton 1966; Fuller và Berg1965). Các chất này thường được đưa vào khi xử lí các mẻ, sau đó được để lắng và lọc tách ra khỏi rượu vang và thải bỏ [27]. PVPP có ái lực mạnh đối với các hợp chất polyphenol[28], ở pháp thường sử dụng với hàm lượng cao nhất là 80g/hl. PPVP còn được sử dụng để làm mất màu trực tiếp trong vang trắng hay để loại bỏ các chất màu không mong muốn, nó thường sử dụng để làm giảm vị se lưỡi và làm mềm các loại rượu vang có lượng tanin cao. Điểm đáng quan tâm trong thực tế đối với các tác nhân làm trong này được thể hiện trong khả năng hấp phụ các chất phenol đơn phân như: catechin (hay các flavonoid) chiếm ưu thế hơn so với các chất phenol lưỡng phân ( Rossi và

Singleton 1966). Còn đối với các hợp chất mạch dài thì khả năng hấp phụ hiệu quả hơn khi sử dụng các chất trợ lắng có bản chất protein. Các catechin thường liên quan tới quá trình nâu hoá trong rượu vang trắng và được xem là các chất đắng đặc thù trong tự nhiên hơn cả ngưỡng cảm nhận là 20 mg/L ( Singleton và Noble 1976).

Trên đây là các tác nhân làm trong thường sử dụng nhất, ngoài ra người ta còn sử dụng một số tác nhân khác có bản chất keo như: các Polysaccharit tự nhiên ( agar, alginat...), than hoạt tính., huyền phù silicagen...

### ***2.2.3.Các phản ứng giữa protein và tanin:***

Các tác động kỵ nước thường xảy ra giữa tanin và các vùng không có cực của protein ( Martin và cộng sự , 1990, Haslam, 1993). Một số tác giả khác như Oh và cộng (sự 1980) cho rằng đây là một kiểu tương tác ưu tiên do bản chất kỵ nước của tanin, được mô tả bởi sự hấp phụ của chúng lên các nhựa polyester. Các phản ứng này chính là nguồn gốc của các phức hợp được tăng cường bởi các liên kết hydro. Những hiện tượng bề mặt này không chỉ phụ thuộc vào số lượng các nhóm phenol trên bề mặt phân tử ( Haslam và Lilley, 1985) mà còn phụ thuộc vào các tỉ lệ cân xứng của mỗi nhóm. Hơn nữa ở hàm lượng protein thấp thì các polyphenol sẽ liên kết với bề mặt của protein ở một hoặc nhiều vị trí, hình thành một lớp mà khả năng hút nước kém hơn là khi chỉ có một mình protein. Điều này dẫn đến quá trình kết tụ lại và lắng xuống. Còn khi hàm lượng protein cao, thì các hiện tượng tương tự xảy ra với sự hình thành của các liên kết chéo giữa các phân tử protein.

Sự tương tác của protein phụ thuộc vào các đặc tính của tanin như: kích cỡ, cấu trúc, điện tích... Các tương tác này cũng biến đổi tùy theo thành phần của tanin: các tanin được hình thành từ procyanidin được liên kết bởi liên kết chéo ethyl, hay các tanin được liên kết với các anthocyanin, hay phức hợp tanin với polysaccharit. Ở pH=3,5, các phân tử này có điện tích khác nhau phụ thuộc vào nguồn gốc của nó. Cũng như tanin, các đặc tính của protein (thành phần, cấu trúc, kích cỡ, điện tích các amino axit) đóng vai trò chủ yếu trong các phản ứng này. Hơn nữa, các protein mà có hàm lượng proline cao thì có ái lực lớn đối với các chất tanin (Hagerman và Butler,

1980a, Mehansho và cộng sự, 1988). Các chất làm trong có bản chất là protein mang điện tích dương ở pH=3,5.

#### ***2.2.4.Ảnh hưởng của môi trường đến sự tương tác giữa tanin và protein:***

- Thông thường lượng protein được bổ sung vào càng lớn thì lượng tanin được loại bỏ càng nhiều. Tuy nhiên phản ứng này còn phụ thuộc vào loại protein, và các nhà khoa học chưa thấy có sự tương quan trực tiếp giữa lượng protein được bổ sung vào và lượng tanin bị loại bỏ. Độ đục, cũng như chủng loại và lượng cặn lắng phức hợp protein và tanin phụ thuộc vào hàm lượng của rất nhiều chất (Calderon và cộng sự, 1968).

- Ở pH từ 2 - 4 thì quá trình kết bông giữa tanin và protein xảy ra nhanh hơn, và các tiểu phân lắng cặn tốt hơn ở độ chua thấp ( Ribéreau-Gayon và cộng sự, 1977). Với cùng một lượng tác nhân làm trong bổ sung vào thì số lượng tanin được loại bỏ sẽ tăng phụ thuộc vào pH của rượu vang. Đối với rượu vang đỏ thì lượng tanin sẽ tăng thêm gấp đôi giữa pH 3,4-3,9.

- Sự có mặt các cation  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , đặc biệt là  $\text{Fe}^{3+}$  là không thể thiếu trong quá trình kết bông và lắng các phức hợp protein và tanin (Ribéreau-Gayon, 1934). Các phức chất tanin và sắt mang điện tích âm phản ứng với các protein mang điện tích dương (Ribéreau-Gayon và cộng sự, 1977). Ôxy hoà tan cũng thúc đẩy quá trình kết bông và làm dễ dàng hình thành ion sắt hóa trị 3.

- Các loại polysaccharit có các ảnh hưởng khác nhau. Các chất cao phân tử (như glucan) có hoạt động “bảo vệ” để ngăn cản quá trình kết bông và kết lắng, nghĩa là ngăn cản quá trình làm trong. Các polysaccharit cũng có tác động “hoạt hoá”, sự có mặt của pectin, arabinogalactan và axit polygalacturonic sẽ làm tăng cường độ đục và rất thích hợp cho quá trình làm trong, trong khi đó các polysaccharit trung tính không có ảnh hưởng.

- Calderon và cộng sự (1968) đã kết luận rằng ái lực của tanin đối với gelatin trong môi trường có nồng độ cồn cao sẽ bị giảm, và phức hợp sau khi hình thành thì lại bị hoà tan. Với nồng độ cồn từ 11-13% thì không ảnh hưởng.

- Ở nhiệt độ thấp ( $15^{\circ}\text{C}$ ) làm tăng quá trình kết lắng và làm trong là do sự chuyển động các chất làm nâu hoá giảm, sẽ làm tăng khả năng kết bông các chất keo, do vậy mà người ta thường tiến hành quá trình làm trong vào mùa đông.

#### ***2.2.5. Ảnh hưởng của quá trình làm trong lên các hợp chất phenol và các chất hương trong rượu vang:***

Quá trình lắng trong vang đỏ với gelatin để làm trong và ổn định rượu vang bằng việc loại bỏ các chất màu keo không ổn định thì sự giảm cường độ màu và hàm lượng các chất phenol không quá lớn, nhưng chủ yếu ảnh hưởng tới các anthocyanin liên kết (chỉ số PVP) và chủ yếu là các phân tử tanin lớn (chỉ số thẩm tách và EtOH) và các phân tử tanin trùng hợp (chỉ số HCl). Kết quả là các chỉ số này giảm tương ứng với việc rượu vang có hương dịu hơn. Các flavanol đơn phân tử và các procyanidin hai và ba phân tử cũng không bị ảnh hưởng bởi quá trình làm trong.

Sự mất mát các hợp chất bay hơi trong suốt quá trình làm trong rất ít và hầu như không thể nhận thấy được, phụ thuộc vào rượu vang và loại tác nhân làm trong và lượng sử dụng. Mỗi loại chất làm trong có ái lực với những hợp chất thơm nhất định. Quá trình làm trong có thể cũng gây ra sự giảm cường độ các chất tạo hương.[28]

### PHẦN III : NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Giống vi sinh vật và điều kiện nuôi dưỡng :

Sử dụng 04 chủng *Leuconostoc oenos* của Pháp LF 01 (chủng thương mại của hãng Martin Vilatte) và ba chủng LF 02, LF 03 và LF 04 là những chủng trong sưu tập giống của Viện nghiên cứu vang tại Pháp. Các chủng này được bảo quản ở nhiệt độ -18°C và phân lập theo phương pháp pha loãng trong nước muối sinh lí và phân phối trên đĩa thạch môi trường MRS, nuôi ở nhiệt độ 25 °C.

Sử dụng hai chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* kí hiệu là SLS và LV<sub>7</sub> của Bộ sưu tập giống của Bộ môn công nghệ đồ uống - Viện Công nghiệp thực phẩm.

#### 3.2. Môi trường và hoá chất:

##### 3.2.1. Môi trường thạch:

Cấy truyền và bảo quản trên môi trường thạch MRS của DE MAN và cộng sự, đề xuất năm 1960. Môi trường này có thành phần như sau : Pepton 10 g , cao nấm men 5 g , nước thịt 10g , axetat natri 5 g , xitrat amon 0,1 g , glucoza 20 g, Tween 80 1ml , K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0,1g , MnSO<sub>4</sub> 0,05 , nước cất điền đủ 1 lít , pH 5,4 -6,2 .

##### 3.2.2. Môi trường nhân giống thu sinh khối:

Tỷ lệ giống giữa các cấp là 10%. Môi trường sử dụng là môi trường lỏng PL10JR của CAVIN và cộng sự, đề xuất năm 1988. Môi trường PL10JR có các thành phần sau: pepton 10g , nước chiết nấm men 5g, xitrat amon 0,1g, axetat natri 2g, Tween 80 1ml , K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub> 0,1g, MnSO<sub>4</sub> 0,05 , nước nhỏ 100 ml, nước cất vừa đủ 1 lít , pH 4,5 .

##### 3.2.3. Môi trường thử hoạt độ malolactic (HĐML) :

Axit D,L - malic khoảng 20g/l pha trong đệm CH<sub>3</sub>COOH - CH<sub>3</sub>COONa, MgSO<sub>4</sub> 1,2 g/l, MnSO<sub>4</sub> 1,2 g/l.

#### 3.3. Cố định tế bào : [2]

Li tâm dịch lên men chứa các tế bào *Leuconostoc oenos* trên máy Hettich Zentrifugen Universal 16A 4000 v/ph trong 30 phút lấy sinh khối rửa 2 lần bằng nước

muối sinh lí và tiến hành cố định trong chất mang Ca-alginat theo (4). Nồng độ Ca-alginat là 3%,  $\text{CaCl}_2$  2%, nồng độ tế bào ẩm (25% chất khô) trong Ca-alginat thay đổi theo yêu cầu nghiên cứu từ 5 - 20 %. Tế bào cố định có dạng hình cầu, đường kính trung bình 2-3 mm ; Ở đây dưới áp suất  $1\text{kg/cm}^2$  dung dịch tế bào/ Na-alginat chảy vào chậu đựng  $\text{CaCl}_2$  có nồng độ đã định và gel hoá ngay lập tức. Các hạt hình thành sẽ được lưu lại trong dung dịch (khuấy liên tục) trong thời gian nhất định để có độ bền cơ học mong muốn. Sau đó sử dụng ngay hoặc bảo quản trong dung dịch  $\text{CaCl}_2$  0,5% trong tủ lạnh  $2 - 4^\circ\text{C}$  . Nếu thay đổi tốc độ gió thổi đồng trục với kim tạo hạt, ta có thể nhận được các hạt Ca-alginat với đường kính to nhỏ tùy ý.

#### **3.4. Lên men malolatic rượu vang nhờ các tế bào vi khuẩn tự do hoặc cố định:**

Lên men gián đoạn nhờ các tế bào tự do trong bình tam giác 1000 ml. Ở đây sinh khối vi khuẩn được bổ sung vào vang non ở cuối giai đoạn lên men cồn (sau 10 ngày kể từ khi lên men bắt đầu).

Lên men liên tục nhờ các tế bào cố định được thực hiện trong thiết bị lên men Bioflo của hãng New Brunswick Scientific dung tích 1,2 lít.

#### **3.5. Phân tích:**

##### **3.5.1. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn:**

- Độ đục (OD) của các dịch nuôi vi khuẩn được đo trên máy so màu: dịch lên men pha loãng 5 lần, đo ở bước sóng 600 nm.
- Xác định sinh khối ướt bằng cách li tâm 100 ml dịch men nhờ máy li tâm 4000 v/ph trong 30 phút , cân trọng lượng nhờ cân phân tích, kết quả được nhân với 10 cho giá trị sinh khối ẩm của vi khuẩn trong 1 lít dịch men.
- Xác định sinh khối vi khuẩn bằng cách sấy khô đến trọng lượng không đổi ở nhiệt độ  $105^\circ\text{C}$  (li tâm 100 ml dịch men lấy sinh khối, rửa 2 lần bằng nước cất rồi sấy khô). Kết quả thu được nhân với 10 thì sẽ được trọng lượng khô của vi khuẩn trong 1 lít dịch men.

**3.5.2. Đo pH:** đo bằng máy đo pH Mettler-Toledo 320 của Anh.

**3.5.3. Nồng độ cồn:** xác định bằng thiết bị của hãng Dujarin-Salleron ( Pháp)

**3.5.4. Axit tổng:** chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N

**3.5.5. Xác định axit D, L - malic và hoạt độ malolactic (HĐML) :**

- **Định lượng axit D,L-malic :** Dựa theo phương pháp của Alan E. Goodban và J. Benjamin Stark (3). Đầu tiên sử dụng cột ion âm hấp thụ hết ion dương trong dịch, sau đó hấp thụ các axit, kể cả axit malic trên cột ion dương. Ở đây các chất trung tính chảy ra ngoài theo dịch thải. Bước tiếp theo là dùng dung dịch kiềm yếu để tách các axit yếu như lactic, glycolic và glyceric ra khỏi nhựa. Cuối cùng dùng dung dịch kiềm mạnh để tách axit malic. Người ta thêm 2,7- naphthalenediol và axit  $H_2SO_4$  vào dung dịch chứa axit malic và đun nóng. Phản ứng đầu tiên tạo ra axit malonaldehydic. Phản ứng tiếp theo phân huỷ  $CO_2$  và nước. Có lẽ axit malonaldehydic tác dụng với hoá chất tạo thành hydroxynaphthalene- $\alpha$ -pyrone theo phản ứng Pechman. Phần lớn các axit khác có thể ảnh hưởng tới kết quả phân tích đã bị tách khi giải hấp lần một hoặc tạo nên chất màu không có độ hấp thụ thích hợp ở bước sóng  $\lambda = 390$  nm. Toàn bộ quá trình được tiến hành như sau : Dùng cột buret thứ nhất dài khoảng 20 cm, cho bông thuỷ tinh xuống đáy để giữ cho nhựa không chảy ra ngoài và đổ đầy nhựa IRA-400 dạng cacbonat sao cho thể tích nhựa đạt khoảng 10ml. Đối với cột thứ hai cũng vậy, dài khoảng 20cm, đổ đầy nhựa Dowex-50 dạng hydro sao cho thể tích nhựa là 10ml và để cột thứ nhất lên trên cột thứ hai sao cho dịch ở cột thứ nhất có thể chảy trực tiếp vào cột thứ hai.

Hấp thu axit hữu cơ : Dịch mẫu phân tích phải có nồng độ axit tổng không quá hơn 3 meq (đương lượng milimol) hoặc không chứa ít hơn 0,008 meq axit malic. Để hấp phụ axit hữu cơ người ta cho mẫu vào cột thứ nhất và cho chảy tự do qua cả hai cột, rửa cột thứ nhất ba lần, mỗi lần bằng 10ml nước cất. Sau đó bỏ cột thứ nhất ra và bắt đầu rửa cột thứ hai ( làm tương tự như khi rửa cột thứ nhất). Việc rửa cột thứ hai có thể không cần thiết nếu không xác định axit lactic hoặc axit glycolic.

Tách axit hữu cơ : Đầu tiên cho năm lần, mỗi lần 10ml 0,25N  $(NH_4)_2CO_3$  chảy qua cột thứ hai. Dung dịch hứng được chỉ chứa axit lactic, glycolic và axit glyceric. Những axit này sẽ ảnh hưởng đến màu sau này nên bỏ riêng và không dùng tới. Tiến hành tách đợt hai trong năm lần liên tiếp, mỗi lần bằng 10ml 1N  $(NH_4)_2CO_3$ . Số

lượng dịch thu được trong năm lần này đựng trong cùng một bình tam giác chứa axit malic và dùng để phân tích.

**Tạo mẫu :** Người ta tạo mẫu bằng cách cho 1ml dịch vừa thu hồi ( chứa khoảng 5-80  $\gamma$  axit-malic) vào trong ống nghiệm ( 25 x 200 nm), thận trọng nhỏ từ từ 6ml axit- $H_2SO_4$  ( chảy theo thành), vừa cho axit vừa lắc nhẹ ống nghiệm, sau đó cho thêm 0,1ml dung dịch 2,7-naphthalenediol và làm nóng 20 phút trong bếp cách thủy. Sau khi đó làm lạnh, so màu tại máy so màu bước sóng  $\lambda = 390$  nm, đọc trị số OD thu được. Dựa vào đồ thị chuẩn ta tính được nồng độ axit malic trong dịch thu hồi và từ đó tính được dư lượng axit malic của mẫu cần phân tích. Trong khoảng từ 5-80  $\gamma$  axit malic đồ thị chuẩn sẽ có dạng đường thẳng ( nồng độ axit malic tỷ lệ thuận với OD).

- **Xác định Hoạt độ malolactic ( HĐML ):** HĐML là khả năng phân giải axit D,L-malic của một gam sinh khối vi khuẩn ươm ở dạng cố định hay tự do trong một giờ, xác định theo Rossi và Clementi ( 78) : cho 50 gam hạt cố định vào 50 ml dung dịch axit D,L-malic (3.2.3) lên men ở 25 °C ( hoặc nhiệt độ thí nghiệm) trong thời gian nhất định, thường là 16, 24 giờ hoặc lâu hơn. Tính HĐML theo công thức:

$$HĐML = M / 5CT \text{ ( g/g.h)}$$

Trong đó: M=hiệu số nồng độ axit D,L-malic giữa hai thời điểm phân tích (g/l)

C = lượng sinh khối vi khuẩn ươm sau li tâm tham gia phản ứng ( g )

T = Thời gian phản ứng ( h)

### 3.5.6. Định lượng nồng độ aldehyt, este và cồn bậc cao

Nhờ máy sắc ký khí Shimadzu LZC8A của Nhật:

Cột CW-1500 ; Detector FID, máy ghi CR3A

Áp suất khí nitơ 1,2 kg/cm<sup>2</sup> ; Áp suất khí hydro 0,5 kg/cm<sup>2</sup>

Áp suất khí 0,3 kg/cm<sup>2</sup>; Nhiệt độ bơm mẫu vào detector 150<sup>0</sup>C

Nhiệt độ cột tách 70<sup>0</sup>C.

### 3.5.7. Định lượng axit hữu cơ bằng sắc ký lỏng cao áp:

Nhờ máy sắc ký lỏng cao áp SHIMADZU của Nhật: Cột CW-1500 (4mm,3m); máy bơm LC-8A, áp lực 5-15 at; Detector SPD-6AV; Máy tích hợp C-R5A; Chất mang là Acetonitrin  $CH_3CN$ .

### **3.6. Phương pháp cảm quan:**

Thành lập Hội đồng cảm quan theo phương pháp so sánh cặp đôi. Hai mẫu rượu vang được chuẩn bị, một mẫu là rượu vang chưa qua giai đoạn lên men malolactic và một mẫu đã qua lên men malolactic. Các thành viên hội đồng được mời trả lời câu hỏi liệu hai mẫu rượu có khác nhau về độ chua và hương vị tổng thể. Kết quả cảm quan dựa trên các phiếu trả lời của các thành viên hội đồng.

### **3.7. Chuẩn bị các chất làm trong:**

\*Polyclar 10: phadung dịch 10% trong nước, khuấy đều trong 60 phút.

\*Bentonit: pha thành dung dịch 10% trong nước.

\*Gelatin: Pha thành dung dịch 5% trong nước nóng 80<sup>0</sup>C.

## PHẦN IV : KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 4.1. Lựa chọn giống vi khuẩn có hoạt độ malolactic cao:

Nuôi cấy cả 4 chủng giống vi khuẩn vào các bình tam giác 500 ml chứa môi trường PL10JR nuôi ở nhiệt độ 25 °C và theo dõi sự phát triển của chúng theo thời gian. Đo OD, xác định nồng độ sinh khối và HĐML tương đối của sinh khối vi khuẩn.

Kết quả bảng 1 và 2 cho thấy trong số 4 chủng vi khuẩn thì LF01 phát triển nhanh hơn cả, chỉ sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường lỏng OD đã đạt giá trị cực đại và giá trị cực đại này cũng cao hơn của 3 chủng còn lại. Nồng độ sinh khối thu được của 4 chủng sau 3 ngày nuôi cấy cũng chỉ ra kết quả tương tự, LF01 có nồng độ sinh khối cao nhất (4,99 g/l), vượt trội giá trị này của 3 chủng LF02, LF04 và đặc biệt là LF03 (3,88 g/l). Bên cạnh khả năng sinh trưởng và phát triển tốt chủng LF01 còn có HĐML tuyệt đối cao hơn các chủng khác, nếu coi HĐML của LF01 là 100,0 (%) thì của các chủng còn lại lần lượt là : 89,3; 90,5; và 85,2.

**Bảng 1: Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến OD của 4 chủng vi khuẩn trên môi trường PL10JR**

| Thời gian<br>( ngày) | OD     |        |        |        |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|
|                      | LF01   | LF02   | LF03   | LF04   |
| 0                    | 0,080  | 0,090  | 0,060  | 0,080  |
| 1                    | 0,5320 | 0,4972 | 0,4254 | 0,4370 |
| 2                    | 0,8886 | 0,8103 | 0,7156 | 0,7985 |
| 3                    | 1,1006 | 1,0097 | 0,8532 | 0,8671 |
| 4                    | 0,9845 | 0,9103 | 1,0007 | 1,0054 |
| 5                    | 0,7820 | 0,7268 | 0,8015 | 0,7950 |

**Bảng2. HĐML tương đối của sinh khối các loại vi khuẩn sau 3 ngày nuôi trong tam giác 500 ml**

| Chỉ tiêu phân tích           | Loại giống <i>Leuconostoc oenos</i> |        |        |        |
|------------------------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|
|                              | LF01                                | LF02   | LF03   | LF04   |
| Sinh khối ẩm ( g/l )         | 4,99                                | 4,3    | 3,88   | 4,104  |
| OD (600 nm)                  | 1,1006                              | 1,0097 | 0,8532 | 0,8671 |
| HĐML tuyệt đối ( g/gtbẩm./h) | 0,240                               | 0,214  | 0,217  | 0,204  |
| HĐML tương đối (%)           | 100,0                               | 89,3   | 90,5   | 85,2   |

Như vậy các kết quả trên đã cho thấy rằng chủng LF01 là tốt nhất trong số 4 chủng vi khuẩn, không những phát triển nhanh trên môi trường lỏng mà còn có HĐML cao nhất. Vì thế chọn chủng LF01 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

#### **4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường tới sự sinh trưởng phát triển của chủng vi khuẩn LF01**

Trong phần này chúng tôi tiến hành khảo sát một số các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn LF01 nhằm tìm ra môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu nhận sinh khối.

Trong các thí nghiệm ở phần này chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản có thay đổi một số thành phần theo mục đích của từng thí nghiệm.

##### **4.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ cồn tới sinh trưởng của LF01:**

Do nồng độ cồn etylic trong vang thường là 12 -15%V nên trong loạt thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của cồn tới sinh trưởng của chủng LF01 chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản có bổ sung cồn theo nồng độ lần lượt là: 0, 5, 10, 12, 15 (%V).

Kết quả ghi lại trên bảng 3.

Các số liệu cho thấy tại nồng độ cồn thấp ( 0 - 5%V ) giá trị OD của LF01 đều đạt cực đại sau 4 ngày nuôi cấy, còn tại các nồng độ cồn cao ( 10; 12; 15%V) thì giá trị OD và sinh khối sau 5 ngày mới đạt cực đại. Như vậy rõ ràng nồng độ cồn cao đã kéo dài giai đoạn tiềm phát của vi khuẩn. Hơn thế, giá trị OD cực đại ở nồng độ cồn thấp cao hơn rất nhiều so với nồng độ cồn cao (OD 1,0330 ở 5%V và 0,6415 ở 10%V). Rõ ràng là nồng độ cồn không những làm cho vi khuẩn phát triển chậm mà còn ức chế khả năng phát triển tối đa của chúng.

**Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến OD của LF 01**

| Thời gian<br>(ngày) | Nồng độ cồn (% V) |               |               |               |               |
|---------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                     | 0                 | 5             | 10            | 12            | 15            |
| 0                   | 0,0600            | 0,0400        | 0,0300        | 0,0400        | 0,0250        |
| 1                   | 0,8145            | 0,7785        | 0,3455        | 0,2525        | 0,2390        |
| 2                   | 1,0020            | 0,9455        | 0,5650        | 0,4050        | 0,3700        |
| 3                   | 1,0190            | 1,0090        | 0,6010        | 0,5011        | 0,4445        |
| 4                   | <b>1,1030</b>     | <b>1,0330</b> | 0,6230        | 0,5710        | 0,4650        |
| 5                   | 0,9841            | 0,9581        | <b>0,6415</b> | <b>0,5910</b> | <b>0,4930</b> |
| 6                   |                   |               | 0,5650        | 0,5240        | 0,4425        |

Qua kết quả trên có thể thấy rằng cồn có tác dụng ức chế khả năng tạo sinh khối của LF01. Vì vậy muốn thu sinh khối tốt nhất thì trong môi trường dinh dưỡng không nên có cồn với nồng độ vượt quá 5%V.

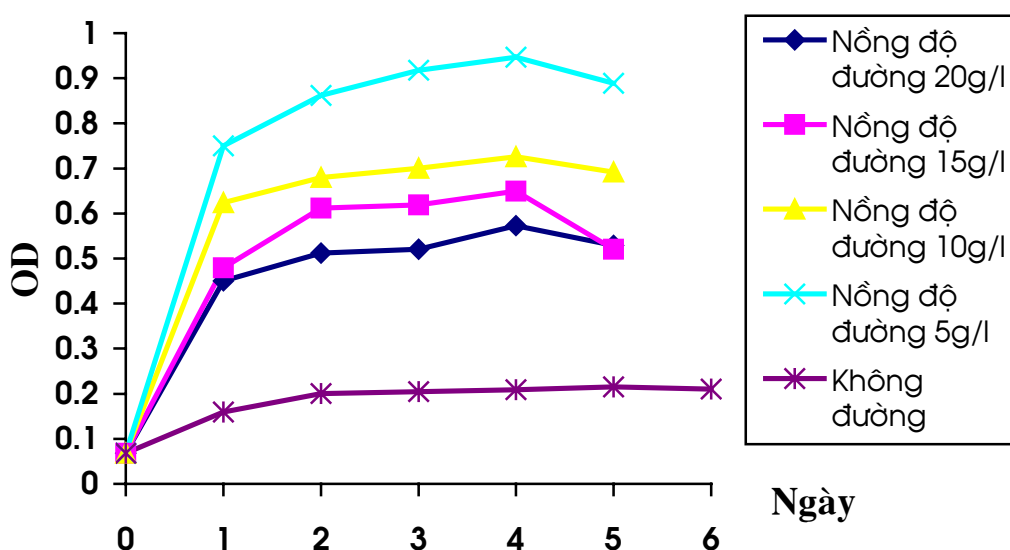
#### ***4.2.2. Ảnh hưởng của chủng loại và nồng độ đường:***

Đường nho chủ yếu là fructoza và glucoza, trong đó glucoza chiếm 56,67-65,60g/l và fructoza 48,52-58,87g/l. Vì thế chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường cũng như ảnh hưởng của từng loại đường hoặc hỗn hợp hai loại đường trên tới sự phát triển của LF01 nhằm tìm ra một môi trường có thành phần và nồng độ đường phù hợp nhất cho việc thu sinh khối của chủng này.

Thí nghiệm đầu tiên là tìm ảnh hưởng của chủng loại đường, chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản có thay thế lần lượt: glucoza 10g/l; fructoza 10g/l và hỗn hợp hai loại đường mỗi loại 5g/l. Thí nghiệm thứ hai tìm ảnh hưởng của nồng độ đường, môi trường cơ bản có nồng độ đường lần lượt: 0; 5; 10; 15; 20g/l. Kết quả thể hiện ở bảng 4 và hình 2.

Số liệu cho thấy khi môi trường không có đường thì vi khuẩn hầu như không phát triển; Có đường nồng độ 5g/l thì vi khuẩn phát triển tốt nhất; nhưng khi nồng độ đường tăng cao thì lại ức chế sự phát triển của chúng, nhất là ở 20g/l.

Mặt khác vi khuẩn phát triển trong môi trường có đường fructoza tốt hơn môi trường có glucoza (OD cực đại với fructoza 0,9016 và với glucoza là 0,8833). Như vậy vi khuẩn đồng hoá đường fructoza tốt hơn đường glucoza. Khi môi trường chỉ có riêng rẽ từng loại đường thì OD sau 5 ngày mới đạt cực đại; Ngược lại khi có cả hai loại đường thì chỉ sau 4 ngày đã đạt cực đại và đạt cao hơn hẳn các trường hợp khác (OD 0,9016 khi chỉ có từng loại đường và 0,9680 khi có hỗn hợp cả hai loại đường). Như vậy môi trường đường hỗn hợp có ảnh hưởng kích thích sinh trưởng của chủng vi khuẩn này cả về thời gian và khả năng phát triển tối đa.



**Hình 2:** Ảnh hưởng của nồng độ đường tới OD của chủng LF01

**Bảng 4:** Ảnh hưởng của thành phần đường đến OD của LF 01

| Thời gian<br>(ngày) | Không<br>đường | Glucoza (G)<br>10g/l | Fructoza (F)<br>10g/l | Hỗn hợp(G +F)<br>5g/l + 5g/l |
|---------------------|----------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|
| 0                   | 0.0025         | 0.0200               | 0.0250                | 0.0275                       |
| 1                   | 0.1430         | 0.4233               | 0.4800                | 0.8400                       |
| 2                   | 0.1850         | 0.7716               | 0.8000                | 0.9330                       |
| 3                   | 0.1898         | 0.8550               | 0.8750                | 0.9415                       |
| 4                   | 0.1921         | 0.8650               | 0.8816                | <b>0.9680</b>                |
| 5                   | <b>0.2055</b>  | <b>0.8833</b>        | <b>0.9016</b>         | 0.8895                       |
| 6                   | 0.2001         | 0.8500               | 0.8516                |                              |

Như vậy môi trường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của LF01 là môi trường có hỗn hợp hai loại đường glucoza và fructoza với nồng độ đường không vượt quá 10g/l.

#### ***4.2.3. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ hữu cơ :***

Nguồn nitơ hữu cơ cũng là một thành phần môi trường khá quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn, để nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần này đến sinh trưởng của LF01 chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản được bổ sung lần lượt các nguồn nitơ như cao nấm men 15g/l, pepton 15g/l, cao thịt 15g/l, hỗn hợp các loại trên mỗi loại 5g/l. Để dàng nhận thấy rằng trong tất cả các thí nghiệm OD của vi khuẩn đạt cực đại sau 4 ngày. Như vậy các loại nitơ đưa vào thí nghiệm không khác nhau về mức độ ảnh hưởng đến thời gian phát triển. Trong các môi riêng rẽ từng loại nitơ vi khuẩn đều phát triển khá, khá nhất là cao nấm men, sau đó là cao thịt và cuối cùng là pepton (OD lần lượt là 0,6735; 0,4095 và 0,5325). Song tốt nhất vẫn là môi trường có hỗn hợp cả 3 loại nitơ ( OD cao nhất 1,008).

**Bảng 5: Ảnh hưởng của nguồn nitơ tới OD của LF 01**

| Thời gian<br>(ngày) | Cao nấm men   | Pepton        | Cao thịt      | Hỗn hợp 3 loại |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 0                   | 0.0890        | 0.0269        | 0.0276        | 0.0600         |
| 1                   | 0.4935        | 0.2055        | 0.3150        | 0.6300         |
| 2                   | 0.5940        | 0.351         | 0.4515        | 0.8049         |
| 3                   | 0.6615        | 0.4035        | 0.5115        | 0.9650         |
| 4                   | <b>0.6735</b> | <b>0.4095</b> | <b>0.5325</b> | <b>1.0080</b>  |
| 5                   | 0.6120        | 0.3720        | 0.4875        | 0.9950         |

Như vậy nguồn nitơ hữu cơ đã có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng phát triển cực đại của vi khuẩn LF01. Để thu sinh khối tốt nhất trong môi trường nên có cả 3 loại nitơ hữu cơ là cao nấm men, pepton, cao thịt.

#### ***4.2.4. Ảnh hưởng của axit D,L-malic:***

Chúng ta đã biết axit malic là một chất cảm ứng cho quá trình tạo enzym malolactic của vi khuẩn *Leuconostoc oenos*, vì vậy đây là một thành phần cần thiết trong môi trường dinh dưỡng, tuy nhiên cần khảo sát để tìm được nồng độ thích hợp của axit malic trong môi trường để không gây ức chế quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Loạt thí nghiệm trong phần này được thực hiện với mục đích trên.

Môi trường cơ bản được bổ sung axit D,L-malic với các nồng độ: 0; 5g/l; 10g/l; 20g/l. Tiến hành nhân giống và phân tích các chỉ tiêu. Kết quả thể hiện ở bảng 6.

Khi nồng độ D,L-malic cao thì thời gian phát triển để đạt được OD cực đại bị kéo dài (5 ngày đối với D,L-malic <10g/l và 8 ngày khi D,L-malic >10g/l). Như vậy nồng độ axit D,L- malic cao đã làm kéo dài giai đoạn tiềm phát của vi khuẩn. OD cực đại trong môi trường không có và có axit D,L - malic với hàm lượng 5g/l không có sự khác biệt đáng kể. Điều này cho thấy axit D,L-malic

không kích thích sinh trưởng mà hơn thế, khi nồng độ quá cao còn ức chế sự phát triển tối đa của vi khuẩn (OD cực đại môi trường axit D,L-malic 5g/l là 0,8526; 10g/l là 0,8501; 20g/l là 0,5295). Như vậy rõ ràng là tuy axit D,L-malic là một chất cảm ứng cho quá trình tạo enzym malolactic nên rất cần thiết trong thành phần môi trường dinh dưỡng nhưng nồng độ quá cao lại làm ức chế khả năng phát triển cả về thời gian và khả năng phát triển tối đa của LF01. Có thể thấy rằng để thu sinh khối vi khuẩn tốt nhất nên chọn nồng độ axit malic trong môi trường không quá 10g/l.

**Bảng 6: Ảnh hưởng của nồng độ axit D,L- malic tới OD của LF 01**

| Thời gian (ngày) | Không có axit malic | D,L- Malic 5 g/l | D,L -Malic 10 g/l | D,L- Malic 20 g/l |
|------------------|---------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 0                | 0.0200              | 0.0200           | 0.0250            | 0.0100            |
| 1                | 0.5655              | 0.5310           | 0.4500            | 0.2625            |
| 2                | 0.6900              | 0.6525           | 0.6750            | 0.3765            |
| 3                | 0.7590              | 0.7500           | 0.7552            | 0.4103            |
| 4                | 0.8010              | 0.8250           | 0.8137            | 0.4500            |
| 5                | <b>0.8624</b>       | <b>0.8526</b>    | 0.8250            | 0.4800            |
| 6                | 0.7951              | 0.8025           | 0.8325            | 0.4950            |
| 7                |                     |                  | 0.8475            | 0.5130            |
| 8                |                     |                  | <b>0.8501</b>     | <b>0.5295</b>     |

#### ***4.2.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy:***

Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng phát triển của vi khuẩn. Để tìm được nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men malolactic chúng tôi đã tiến hành khảo sát khoảng nhiệt độ 15-30°C (*Leuconostoc oenos* thường thích nghi tốt ở môi trường nhiệt độ không cao quá).

**Bảng 7:** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự phát triển của LF 01

| Thời gian (ngày) | 15 °C        | 20 °C        | 25 °C         | 30°C         |
|------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| 0                | 0.082        | 0.082        | 0.082         | 0.082        |
| 1                | 0.342        | 0.438        | 0.600         | 0.6735       |
| 2                | 0.468        | 0.579        | 0.6765        | 0.789        |
| 3                | 0.615        | 0.7815       | 0.885         | 0.849        |
| 4                | <b>0.798</b> | <b>0.840</b> | <b>0.8865</b> | <b>0.855</b> |
| 5                | 0.7965       | 0.7935       | 0.8400        | 0.843        |
| 6                | 0.7395       | 0.7845       | 0.834         | 0.840        |

Kết quả cho thấy nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng khá lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn thể hiện ở giá trị cực đại của OD. Tại nhiệt độ 25°C sự phát triển của vi khuẩn là tốt nhất. Vì vậy có thể chọn nhiệt độ 25 °C làm nhiệt độ nuôi cấy thu sinh khối cũng như thực hiện quá trình lên men malolactic.

#### ***4.2.6. Ảnh hưởng của pH môi trường tới sự phát triển của LF01:***

pH môi trường ảnh hưởng nhiều đến khả năng sống sót và hoạt lực enzym của vi sinh vật. Để tìm được khoảng pH thích hợp nhất cho thu sinh khối chúng tôi tiến hành điều chỉnh pH môi trường về các giá trị khác nhau: 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5 nhân giống và theo dõi sự phát triển OD dịch giống.

**Bảng 8:** Ảnh hưởng của pH tới sự phát triển của LF 01

| Thời gian<br>(ngày) | Giá trị pH   |              |              |              |              |              |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                     | 3            | 3,5          | 4,0          | 4,5          | 5,0          | 5,5          |
| 0                   | 0.082        | 0.082        | 0.082        | 0.082        | 0.082        | 0.082        |
| 1                   | 0.051        | 0.205        | 0.275        | 0.400        | 0.616        | 0.586        |
| 2                   | 0.054        | 0.26 9       | 0.4110       | 0.451        | 0.712        | 0.621        |
| 3                   | 0.06         | <b>0.343</b> | 0.522        | 0.590        | 0.819        | 0.665        |
| 4                   | <b>0.082</b> | 0.25         | 0.537        | <b>0.591</b> | <b>0.855</b> | <b>0.745</b> |
| 5                   | 0.082        | 0.245        | <b>0.539</b> | 0.560        | 0.840        | 0.710        |
| 6                   | 0.075        | 0.233        | 0.532        | 0.556        | 0.840        | 0.706        |

Chủng LF01 phát triển tốt nhất tại pH 5, tương đối khá tại pH 5,5; kém nhất tại pH 3 và 3,5. Như vậy có thể thấy môi trường vang không thuận lợi lắm cho sự phát triển của loại vi khuẩn này. Chọn pH môi trường nhân giống là 5 để có thể thu được sinh khối tốt nhất.

Tóm lại, điều kiện tốt nhất cho quá trình sinh trưởng phát triển của vi khuẩn là nuôi 4-5 ngày ở 25 °C và một lít môi trường ngoài các yếu tố vi lượng như môi trường cơ bản còn có các thành phần chủ yếu sau : fructoza 5g, glucoza 5g, pepton 5g, cao nấm men 5g, cao thịt 5g và axit D,L-malic 10 g, pH 5,0.

Chúng tôi đã dùng môi trường này nuôi LF01 lấy sinh khối để cố định tế bào và nhân giống các cấp ở quy mô phòng thí nghiệm trong lên men malolactic nhờ tế bào tự do.

#### **4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến hoạt độ malolactic của các tế bào *Leuconostoc oenos* LF01 cố định trong hạt Ca-alginat.**

Phương pháp lên men malolactic nhờ tế bào vi khuẩn cố định có nhiều ưu điểm như giúp cho quá trình lên men malolactic không ảnh hưởng đến giai đoạn làm trong của vang do các tế bào được nhốt trong các hạt gel và dễ dàng tách ra khỏi dịch sau khi quá trình được hoàn thành, đặc biệt khả năng tái sử dụng của các hạt tế bào cố định sẽ mang lại hiệu quả kinh tế do giảm bớt công đoạn nhân giống vi khuẩn. Do đó chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ malolactic của vi khuẩn được cố định trong Ca-alginat để từ đó nhằm xác định quy trình lên men malolactic nhờ tế bào cố định ở quy mô phòng thí nghiệm.

Chúng ta đã biết HĐML chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố như: điều kiện môi trường lên men, nồng độ tế bào trong hạt. Trong phần này chúng tôi tiến hành các thí nghiệm xác định các điều kiện cần thiết để hạt cố định cho HĐML cao.

#### **4.3.1. Ảnh hưởng của pH môi trường đến HĐML của các hạt cố định:**

Cho các hạt cố định LF01 vào dung dịch axit D,L-malic thử HĐML có các giá trị pH lần lượt là 3,1; 3,5; 4,0; 4,5 lên men trong thời gian 4 ngày, phân tích dư lượng axit D,L-malic trong dịch ở các thời điểm khác nhau thu được kết quả thể hiện trong bảng 9, 10.

Số liệu cho thấy tại tất cả các pH nồng độ axit D,L-malic giảm rất nhanh trong ngày đầu tiên, sau đó giảm rất chậm. Nguyên nhân của việc giảm chậm này có thể rất nhiều nhưng có lẽ chủ yếu là do pH của dung dịch đã thay đổi theo chiều bất lợi cho hoạt động của enzym phân giải axit D,L-malic. Trong khoảng pH thí nghiệm, pH 4,5 là thích hợp nhất cho HĐML của các hạt tế bào cố định. Nếu coi HĐML trong ngày đầu tiên tại pH 4,5 là 100 thì HĐML tại các pH khác từ cao xuống thấp lần lượt là 94,1 ; 90,3 và 89,1 (%). Xu hướng rõ nét là tối thích của sinh trưởng cũng lân cận với pH tối thích của HĐML. Vì pH của vang thường không cao hơn 4,5 nên chúng tôi không khảo sát tiếp các giá trị pH cao hơn. Trong thí nghiệm của chúng tôi, HĐML tuyệt đối tương ứng là 0,0631; 0,0594; 0,0570 và 0,0561 g D,L- malic/g tb.ẩm/ h. Như vậy trong khoảng pH nghiên cứu thì pH 4,5 cho HĐML cao nhất.

**Bảng 9: Dư lượng axit D,L-malic (g/l) sau thời gian phản ứng tại các pH khác nhau**

| <b>Thời gian phản ứng(ngày)</b> | <b>pH</b> |      |      |      |
|---------------------------------|-----------|------|------|------|
|                                 | 3,1       | 3,5  | 4,0  | 4,5  |
| 0                               | 24        | 24   | 24   | 24   |
| 1                               | 7,18      | 6,9  | 6,17 | 5,06 |
| 2                               | 6,85      | 5,47 | 4,56 | 4,39 |
| 3                               | 6,72      | 5,06 | 4,29 | 4,39 |
| 4                               | 6,38      | 5,16 | 4,39 | 4,49 |

**Bảng 10: HĐML trong 16 giờ đầu tiên ở các pH khác nhau**

| Hoạt độ malolactic<br>(HĐML)                     | pH     |        |        |               |
|--------------------------------------------------|--------|--------|--------|---------------|
|                                                  | 3,1    | 3,5    | 4,0    | 4,5           |
| HĐML tuyệt đối (g axit malic/ g tế bào ẩm x giờ) | 0,0561 | 0,0570 | 0,0594 | <b>0,0631</b> |
| HĐML tương đối (%)                               | 89,1   | 90,3   | 94,1   | <b>100</b>    |

**4.3.3.Ảnh hưởng của nồng độ cồn tới HĐML của các hạt cố định:**

Cồn là một tác nhân ức chế sinh trưởng của LF01 làm cho sinh khối thu được ít và do vậy ảnh hưởng lớn tới khả năng phân giải axit D,L-malic của dịch men. Nhưng cồn ảnh hưởng như thế nào đối với khả năng phân giải axit malic của tế bào cố định thì ta chưa rõ. Để làm rõ vấn đề này chúng tôi đã cho tế bào cố định vào dung dịch axit D,L-malic thử hoạt độ bổ sung cồn với các nồng độ khác nhau: 5; 10; 15; 20 %V, lên men trong 24 giờ và phân tích dư lượng axit D,L-malic tại thời điểm 16 và 24 giờ.

**Bảng 11: Dư lượng axit D,L-malic (g/l) và trạng thái dung dịch sau khi phản ứng**

| Thời gian<br>phản ứng ( h) | Nồng độ cồn (% V) |       |        |         |
|----------------------------|-------------------|-------|--------|---------|
|                            | 5                 | 10    | 15     | 20      |
| 0                          | 18,5              | 18,5  | 18,5   | 18,5    |
| 16                         | 6,38              | 7,83  | 8,87   | 8,21    |
| 24                         | 5,45              | 6,09  | 6,84   | 6,38    |
| Độ trong của dịch          | trong             | trong | có vẩn | hơi đục |
| Tế bào vi khuẩn            | không             | không | không  | không   |

Số liệu bảng 11 cho thấy, nồng độ cồn trong dịch có ảnh hưởng tới khả năng phân giải axit D,L-malic của LF01 cố định trong Ca-alginat, đặc biệt là đối với cồn nồng độ cao từ 15%V trở lên. Ở đây có nhận xét là tại các dung dịch có nồng độ cồn cao dịch hơi bị đục tuy hạt không bị vỡ và không có tế bào vi khuẩn nào lọt ra ngoài. Lí do của hiện tượng này chúng tôi chưa lí giải được và dự đoán rằng có thể cồn đã có tác động nào đó đến cấu trúc của hạt và thời gian còn chưa đủ dài để hạt bị phá vỡ.

#### **4.3.4. Ảnh hưởng của nồng độ tế bào trong hạt cố định:**

Nồng độ tế bào trong hạt cố định có ý nghĩa rất lớn đến HĐML của các tế bào cố định trong hạt. Nếu như HĐML tỷ lệ thuận với nồng độ tế bào trong hạt thì nồng độ giống càng cao càng có ý nghĩa kinh tế và kĩ thuật. Để làm rõ vấn đề này chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm thay đổi nồng độ giống ảm từ 5% đến 15% so với dung dịch alginat và tiến hành thử HĐML của các hạt cố định với nồng độ giống khác nhau, xác định dư lượng axit D,L-malic. Số liệu thu được thể hiện ở bảng 12, 13.

**Bảng 12: Ảnh hưởng của nồng độ giống trong hạt tới dư lượng axit D,L-malic trong dung dịch**

| <b>Thời gian phản ứng<br/>(h)</b> | <b>Nồng độ giống (%)</b> |           |           |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
|                                   | <b>5</b>                 | <b>10</b> | <b>15</b> |
| 0                                 | 20,0                     | 20,0      | 20,5      |
| 16                                | 7,39                     | 5,12      | 4,41      |
| 24                                | 6,05                     | 4,44      | 4,10      |
| 48                                | 4,65                     | 4,36      | 4,07      |
| 72                                | 4,71                     | 4,13      | 4,02      |
| 96                                | 4,48                     | 4,13      | 3,99      |
| pH                                | 3,42                     | 3,18      | 3,17      |
| Độ trong của dịch                 | trong                    | trong     | trong     |
| Tế bào vi khuẩn                   | không                    | không     | không     |

**Bảng 13: HĐML của các hạt cố định với các nồng độ tế bào khác nhau sau 16 giờ phản ứng**

| Chỉ tiêu đánh giá sau 16h          | Nồng độ tế bào trong hạt (%) |        |        |
|------------------------------------|------------------------------|--------|--------|
|                                    | 5                            | 10     | 15     |
| Lượng axit malic tiêu hao (g/l)    | <b>12,61</b>                 | 14,88  | 15,59  |
| Lượng tế bào tham gia phản ứng (g) | <b>2,5</b>                   | 5,0    | 7,5    |
| HĐML tuyệt đối(gmalic/gtb ẩm/h)    | <b>0,06305</b>               | 0,0372 | 0,0260 |
| HĐML tương đối (%)                 | <b>100,00</b>                | 59,00  | 41,23  |

Số liệu bảng 13 cho thấy HĐML bị ảnh hưởng rất nhiều bởi nồng độ giống trong hạt. Mặc dù trong cùng một đơn vị thời gian lượng axit D,L-malic tiêu hao ở các mẫu có hạt cố định với nồng độ giống cao nhiều hơn là ở mẫu hạt có nồng độ giống thấp, nhưng mối quan hệ này không tỷ lệ thuận. Trong thí nghiệm của chúng tôi HĐML tuyệt đối của các mẫu sắp xếp theo chiều tăng của nồng độ tế bào trong hạt lần lượt là 0,06303 ; 0,0372; 0,0260 và HĐML tương đối tương ứng là 100,0 ; 59,0 và 41,23. Như vậy HĐML của hạt có nồng độ tế bào 15 % chỉ bằng hơn 40% so với hạt có 5%. Vì vậy có thể thấy rằng tuy tại các thời điểm hạt cố định với nồng độ giống cao cho dư lượng axit D,L-malic thấp hơn nhưng xét về HĐML tuyệt đối thì lại thấp hơn nhiều hạt cố định với nồng độ giống thấp, do đó dùng hạt cố định với nồng độ giống thấp có lợi hơn về mặt kinh tế vì để tạo một lượng sinh khối lớn dùng cho cố định cũng rất tốn kém. Vì vậy chúng tôi tiếp tục các thí nghiệm tiếp sau với hạt có nồng độ giống 5% .

#### ***4.3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến HĐML của các hạt cố định***

Nhiệt độ luôn luôn là yếu tố kích thích có giới hạn sinh trưởng và hoạt độ các loại enzym của vi sinh vật. Qua các thí nghiệm ở trên ta đã thấy để có nhiều sinh khối ta phải nuôi LF01 ở nhiệt độ 25 °C . Song ngoài khía cạnh sinh khối thì một câu hỏi đặt ra là liệu nhiệt độ tác động tới HĐML của hạt cố định như thế

nào. Để trả lời vấn đề này chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm khảo sát tại ba thang nhiệt độ khác nhau là 16, 25 và 35 °C. Hạt được cố định với nồng độ giống 5 %, thử HĐML trong môi trường thử hoạt lực và phân tích dư lượng axit D,L-malic và tính HĐML.

Số liệu bảng 14, 15 cho thấy HĐML của các hạt cố định có giá trị cao nhất tại nhiệt độ 25 °C và đạt 0,0632 g/gtb ẩm/h, tại nhiệt độ 16 °C hay 35 °C HĐML của các hạt cố định chỉ bằng hơn 80% HĐML tại 25 °C. Điều đáng mừng là enzym malolactic của LF01 hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ khá rộng, từ 16-35°C, điều này không gây cản trở cho việc thực hiện quá trình lên men malolactic tại những nước có khí hậu thay đổi nhiều như nước ta.

**Bảng 14 :** Dư lượng axit D,L-malic sau thời gian phản ứng tại các nhiệt độ khác nhau của các hạt cố định LF01

| Thời gian phản ứng<br>( h ) | Nhiệt độ phản ứng (°C) |              |          |
|-----------------------------|------------------------|--------------|----------|
|                             | 16                     | 25           | 35       |
| 0                           | 18,14                  | <b>18,14</b> | 18,14    |
| 16                          | 7,515                  | <b>5,50</b>  | 7,006    |
| 24                          | 6,676                  | <b>4,15</b>  | 5,595    |
| Độ trong của dịch           | trong                  | trong        | trong    |
| Tế bào vi khuẩn             | không có               | không có     | không có |

**Bảng 15 :** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến HĐML của các hạt cố định LF01

| Chỉ tiêu phân tích<br>hoặc tính toán sau 16 h | Nhiệt độ phản ứng (°C) |               |        |
|-----------------------------------------------|------------------------|---------------|--------|
|                                               | 16                     | 25            | 35     |
| Lượng axit D,L-malic tiêu hao (g/l)           | 10,625                 | <b>12,64</b>  | 11,13  |
| Lượng tế bào tham gia phản ứng ( g )          | 2,5                    | <b>2,5</b>    | 2,5    |
| HĐML tuyệt đối ( gmalic/gtb ẩm/h)             | 0,0531                 | <b>0,0632</b> | 0,0556 |
| HĐML tương đối (%)                            | 84,02                  | <b>100,00</b> | 87,97  |

#### 4.3.6. Ảnh hưởng của nồng độ đường tới HĐML của các hạt cố định:

Khi lên men vang người ta thường dùng môi trường có nồng độ đường khoảng 20 %. Nếu đưa vi khuẩn *Leuconostoc oenos* vào để thực hiện lên men malolactic ngay từ đầu thì vi khuẩn phải chịu sức ép của nồng độ đường cao. Nếu chờ đến khi qua giai đoạn lên men rượu ( nồng độ đường xuống thấp) thì vi khuẩn lại phải chịu sức ép của môi trường còn nồng độ cao. Để có thể chủ động sử dụng vi khuẩn malolactic, nhất là dưới dạng hạt cố định, chúng tôi tiến hành thí nghiệm xem xét mối quan hệ giữa nồng độ đường và HĐML của các hạt cố định. Kết hợp với các thí nghiệm phần 4.3.3 để cân nhắc tìm ra một thời điểm tốt nhất cho việc tiếp giống vi khuẩn sao cho HĐML đạt được cao nhất. Sử dụng môi trường thử hoạt lực có bổ sung đường với các nồng độ 5; 10; 15; 20%. Kết quả thu được ghi lại ở bảng 16, 17 .

Theo các số liệu, sau 16 giờ lên men nồng độ đường trong dịch có ảnh hưởng không đáng kể tới HĐML của các hạt cố định. Tại nồng độ 5% HĐML là 0,063 g malic/g tb. ẩm/h và tại nồng độ 20% (cao hơn 4 lần) HĐML vẫn còn 0,0605 g malic/g tb. ẩm/h và bằng 96,03% so với HĐML tại nồng độ đường 5%.

**Bảng 16 : Ảnh hưởng của nồng độ đường tới HĐML  
của các hạt cố định LF01**

| Thời gian phản ứng<br>(h) | Nồng độ đường (%) |          |          |          |
|---------------------------|-------------------|----------|----------|----------|
|                           | 5                 | 10       | 15       | 20       |
| 0                         | 18,756            | 18.756   | 18.756   | 18,756   |
| 16                        | 6,1419            | 6,3199   | 6,5106   | 6,6632   |
| 24                        | 5,94              | 6,27     | 6,42     | 6,62     |
| Độ trong của dịch         | trong             | trong    | trong    | trong    |
| Tế bào vi khuẩn           | không có          | không có | không có | không có |

**Bảng 17 : Ảnh hưởng của nồng độ đường tới HĐML  
của các hạt cố định LF01**

| Chỉ tiêu phân tích<br>hoặc tính toán sau 16 h | Nồng độ đường (%) |        |        |        |
|-----------------------------------------------|-------------------|--------|--------|--------|
|                                               | 5                 | 10     | 15     | 20     |
| Lượng axit D,L-malic tiêu hao (g/l)           | 12,614            | 12,436 | 12,246 | 12,093 |
| Lượng tế bào tham gia phản ứng ( g)           | 2,5               | 2,5    | 2,5    | 2,5    |
| HĐML tuyệt đối ( gmalic/gtb.ăm/h)             | 0,0630            | 0,0622 | 0,0612 | 0,0605 |
| HĐML tương đối (%)                            | 100,00            | 98,73  | 97,14  | 96,03  |

#### ***4.3.7. Lên men malolactic nhờ các tế bào *L. oenos* LF01 cố định trong hạt Ca-alginat***

Chúng tôi đã thí nghiệm theo hai cách:

- Cách thứ nhất cho 50 gam hạt xúc tác vào 50 ml vang sau lên men rượu đã lọc trong, giữ ở 25 °C trong 16 giờ rồi phân tích sự thay đổi nồng độ của hai axit hữu cơ chính là D,L-malic và axit lactic.

- Cách thứ hai cho 800 g hạt cố định LF01 (HĐML trung bình khoảng 0,05 g/g tế bào ăm/h) vào bình 1200 lít của Bioflo rồi bơm vang non ( chứa 2,75g/l D,L-malic) vào bình để chuyển hoá axit D,L-malic theo phương pháp lên men liên tục; nhiệt độ lên men 25 °C ; nồng độ tế bào ăm trong hạt là 5%, 5 giờ đầu tiên không bổ sung, sau đó bổ sung vang non với tốc độ 2,65 ml/ph ( theo tính toán tốc độ thích hợp dựa trên tổng lượng tế bào tham gia phản ứng, nồng độ axit D,L-malic trong vang non và thời gian tiếp xúc dự kiến là 5 giờ). Lấy mẫu phân tích vào các thời điểm 0, 5, 10, 16, 24 ,48,72 ,96... Kết quả ghi ở bảng 18 và 19.

**Bảng 18: Thành phần vang trước và sau khi phản ứng với LF01  
cố định trong hạt Ca-alginat ( thí nghiệm thứ nhất)**

| Các chỉ tiêu phân tích | Trước phản ứng | Sau phản ứng |
|------------------------|----------------|--------------|
| Cồn ( % )              | 11,8           | 12,0         |
| Axit D,L-malic (g/l )  | 4,0            | không        |
| Axit lactic            | 1,0            | 3,95         |
| pH                     | 3,89           | 4,05         |
| Vị của vang            | chua gắt       | chua dịu     |

Số liệu bảng 18 chỉ ra rằng hạt cố định LF01 phản ứng rất tốt đối với axit D,L-malic trong vang non : chỉ sau 16 giờ tiếp xúc vang non đã không còn dấu vết của axit malic, vị dịu. Từ kết quả này chúng tôi nghĩ rằng có thể dùng những hạt cố định này để phân giải axit D,L-malic theo kiểu lên men liên tục. Vì vậy chúng tôi đã tiến hành tiếp thí nghiệm thứ hai như đã nêu ở trên.

**Bảng 19 : Biến đổi pH và D,L-malic của vang sau thời gian lên men  
liên tục nhờ các hạt cố định LF01 tại thiết bị Bioflo ( thí nghiệm 2)**

| Thời gian (h) | pH   | D,L-malic (g/l) |
|---------------|------|-----------------|
| 0             | 3,56 | 2,75            |
| 5             | 3,95 | 0,13            |
| 10            | 3,76 | 0,12            |
| 16            | 3,73 | 0,12            |
| 24            | 3,75 | 0,13            |
| 48            | 3,78 | 0,14            |
| 72            | 3,69 | 0,14            |
| 96            | 3,72 | 0,13            |
| 120           | 3,78 | 0,12            |

Những số liệu ghi ở bảng 19 đã xác nhận dự đoán trên là đúng. Trong quá trình lên men liên tục, tốc độ bổ sung vang non 2,65 ml/ph (hay tốc độ pha loãng 0,159 l/l/h ) theo tính toán là phù hợp làm cho nồng độ axit D,L-malic trong vang non từ 2,75 g/l ban đầu xuống còn khoảng 0,1 g/l. Như vậy bước đầu đã có thể khẳng định rằng có thể thực hiện quá trình lên men malolactic theo phương pháp liên tục nhờ các tế bào vi khuẩn cố định. Tuy nhiên vẫn đòi hỏi phải có các nghiên cứu tiếp theo để làm sao duy trì được HĐML của các hạt cố định trong quá trình lên men.

#### ***4.3.8. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian sử dụng đến HĐML của các hạt cố định.***

Chúng tôi tiến hành các thí nghiệm này với mục đích tìm hiểu HĐML cũng như nồng độ tế bào trong các hạt cố định thay đổi như thế nào theo thời gian sử dụng. Dùng 50 g hạt cố định với nồng độ tế bào 5% cho vào 50 ml vang non ( sau lên men còn 10 ngày), lên men trong 16 h. Sau khi kết thúc hạt được rửa sạch và tiếp tục làm như trên. Số lần lặp lại là 7 lần, sau mỗi lần dịch vang được phân tích các chỉ tiêu như: pH, chuẩn độ axit tổng, dư lượng axit D,L-malic, làm tiêu bản để xem có tế bào không. Đếm số tế bào trong 1 g hạt sau mỗi lần tái sử dụng.

Kết quả của thí nghiệm chỉ ra một xu hướng chung rõ nét là theo chiều tăng của số lần tái sử dụng hạt cố định thì pH dịch vang sau lên men giảm dần và gần trở về pH trước khi lên men, chuẩn độ axit tổng tăng dần gần đạt giá trị ban đầu. Đặc biệt là dư lượng axit D,L-malic có sự khác biệt đáng kể sau mỗi lần tái sử dụng ( lần 1: 1,477, lần 7: 3,5732 ). Rõ ràng là HĐML của các hạt cố định đã bị giảm đáng kể sau mỗi lần tái sử dụng. Một điều rất đáng chú ý là sau mỗi lần tái sử dụng thì nồng độ tế bào sống trong hạt lại giảm đi đáng kể ( $10^{12}$  tế bào/ 1g hạt trước khi sử dụng chỉ còn  $10^6$  tế bào/1 g hạt sau khi lên men 7 lần). Tuy nhiên trong dịch vang sau lên men không thấy tế bào vi khuẩn, điều này cho thấy rằng các tế bào vi khuẩn trong hạt đã bị chết dần trong quá trình sử dụng chứ không phải thoát ra ngoài. Điều này có thể phần nào lý giải nguyên nhân giảm hoạt lực

của các hạt cố định theo thời gian sử dụng, có lẽ trong môi trường khắc nghiệt với nồng độ cồn cao các tế bào vi khuẩn đã chết dần, tuy nhiên HĐML vẫn còn duy trì trong một khoảng thời gian nhất định do hệ enzym malolactic có trong tế bào.

**Bảng 20: Các chỉ tiêu phân tích dịch vang thử hoạt lực hạt cố định theo thời gian sử dụng**

| <b>Lần sử dụng</b> | <b>pH</b> | <b>Chuẩn độ (số ml NaOH 0,1N)</b> | <b>Dư lượng D,L-malic (g/l)</b> | <b>Tế bào trong dịch</b> | <b>Nồng độ tế bào sống trong 1g hạt</b> |
|--------------------|-----------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|
| 0                  | 2,79      | 1,1                               | 4,016                           | -                        | $10^{12}$                               |
| 1                  | 3,22      | 0,5                               | 1,1749                          | không có                 | $2 \times 10^{10}$                      |
| 2                  | 3,09      | 0,7                               | 2,0193                          | không có                 | -                                       |
| 3                  | 3,04      | 0,9                               | 2,6780                          | không có                 | $10^9$                                  |
| 4                  | 3,00      | 1                                 | 2,82044                         | không có                 | -                                       |
| 5                  | 2,97      | 1                                 | 3,0722                          | không có                 | $4 \times 10^7$                         |
| 6                  | 2,90      | 1                                 | 3,1384                          | không có                 | -                                       |
| 7                  | 2,86      | 1                                 | 3,2223                          | không có                 | $10^6$                                  |

Mặt khác để tìm hiểu bản chất của hiện tượng HĐML bị giảm chúng tôi đã hoạt hoá hạt cố định sau lần sử dụng thứ 7 trong môi trường dinh dưỡng (môi trường vẫn được dùng để thu sinh khối vi khuẩn như đã nêu trên), đếm số lượng tế bào có trong 1 g hạt sau khi hoạt hoá, tiếp tục thử hoạt lực như trên: 50 g hạt đã hoạt hoá trong 50 ml vang non có nồng độ axit D,L-malic 4,016g/l, lên men trong 16 h, sau khi kết thúc đo pH, chuẩn độ axit tổng, dư lượng axit D,L-malic . Kết quả được ghi trong bảng 21.

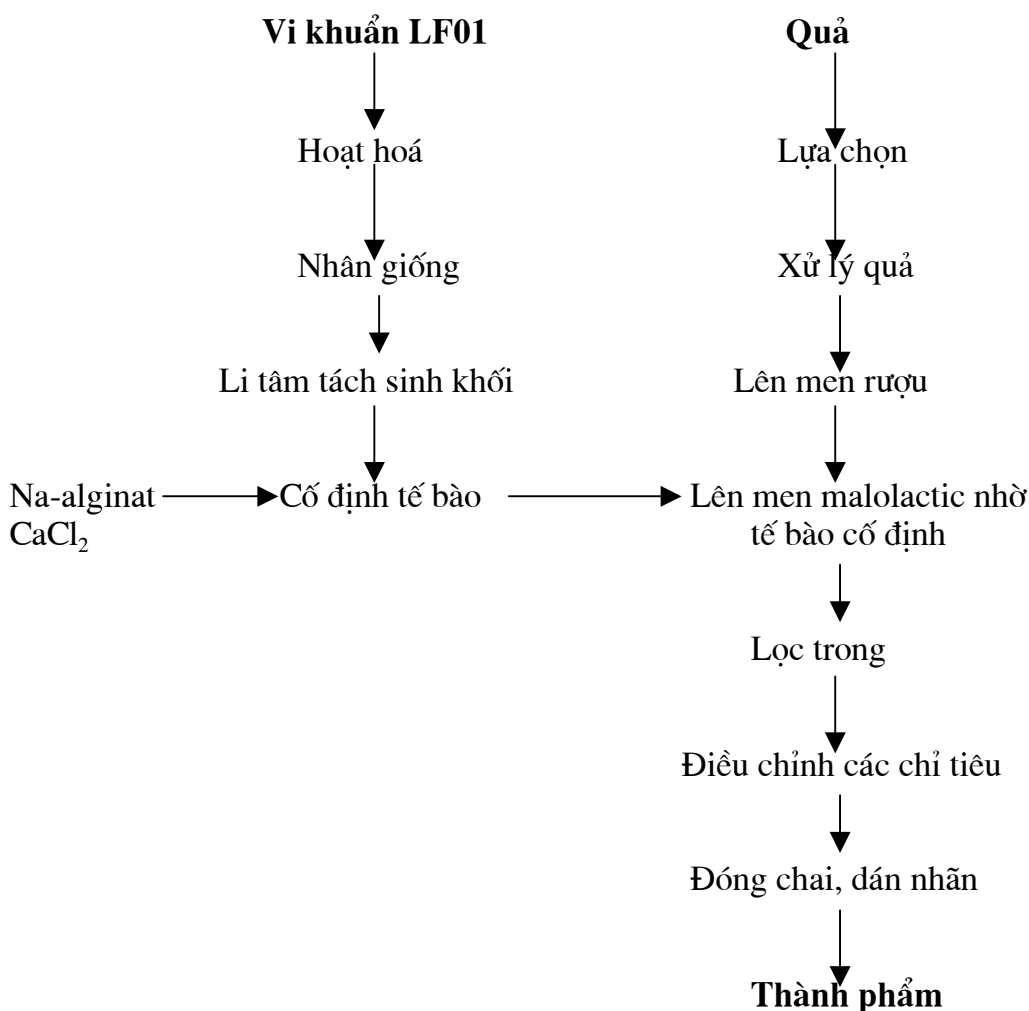
**Bảng 21: Các chỉ tiêu phân tích dịch vang thử hoạt lực hạt cố định vi khuẩn LF01 sau 16 h lên men trước và sau khi hoạt hoá**

|                       | <b>Nồng độ tế bào sống<br/>trong 1 g hạt</b> | <b>pH</b> | <b>Chuẩn độ (ml<br/>NaOH 0,1N)</b> | <b>Dư lượng<br/>D,L-malic<br/>(g/l)</b> |
|-----------------------|----------------------------------------------|-----------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Trước hoạt hoá</i> | $10^6$                                       | 2,86      | 1                                  | 3,2223                                  |
| <i>Sau hoạt hoá</i>   | $10^{11}$                                    | 3,08      | 0,6                                | 2,0905                                  |

Từ kết quả trên thấy rằng nồng độ tế bào sau khi hoạt hoá đã tăng lên đáng kể (từ  $10^6$  tế bào/1g hạt sau 7 lần sử dụng lên  $10^{11}$  tế bào/1g hạt sau khi hoạt hoá), các chỉ số phân tích dịch vang thử hoạt lực sau 16 giờ lên men của hạt cố định đã có sự thay đổi lớn: pH đối với hạt trước hoạt hoá là 2,86 thì sau hoạt hoá là 3,08; chuẩn độ axit tổng là 1 đối với hạt chưa hoạt hoá và 0,6 đối với hạt sau hoạt hoá, đặc biệt dư lượng axit D,L malic đã có sự khác biệt đáng kể (3,2223 g/l đối với hạt chưa hoạt hoá và 2,0905 đối với hạt cố định sau hoạt hoá). Như vậy có thể thấy HĐML của hạt đã qua một thời gian sử dụng được cải thiện đáng kể sau khi được hoạt hoá. Điều này có thể giải thích là do trong môi trường dinh dưỡng đầy đủ các tế bào vi khuẩn trong hạt đã sinh trưởng phát triển tăng về số lượng, tăng HĐML và làm rõ nhận xét đã nêu trên, muốn duy trì HĐML trong hạt cố định theo thời gian sử dụng thì phải duy trì được sự sống của các tế bào trong hạt.

#### 4.3.9. Quy trình lên men malolactic nhờ tế bào cố định

Với các kết quả nghiên cứu trên chúng tôi đã định ra một sơ đồ lên men malolactic theo phương pháp cố định tế bào như sau:



**Hình 3 : Sơ đồ lưu trình công nghệ lên men malolactic nhờ vi khuẩn cố định trong Ca-alginat**

#### 4.4. Lên men malolactic nhờ tế bào tự do:

Với điều kiện hiện nay ở Việt nam thì công nghệ cố định tế bào vẫn chưa thực sự dễ dàng áp dụng trong sản xuất đại trà vì thế chúng tôi tiếp tục nghiên cứu công nghệ lên men malolactic nhờ tế bào tự do để có thể áp dụng vào thực nghiệm ở quy mô pilot.

#### 4.4.1. Nghiên cứu thời điểm thích hợp để bổ sung vi khuẩn:

Tiến hành lên men và bổ sung vi khuẩn tại các thời điểm khác nhau: Nồng độ nhân giống nấm men là 10%, nồng độ vi khuẩn là 5 g sinh khối ẩm (hàm ẩm 80%)/ lít môi trường.

M1: Mẫu đối chứng không bổ sung vi khuẩn

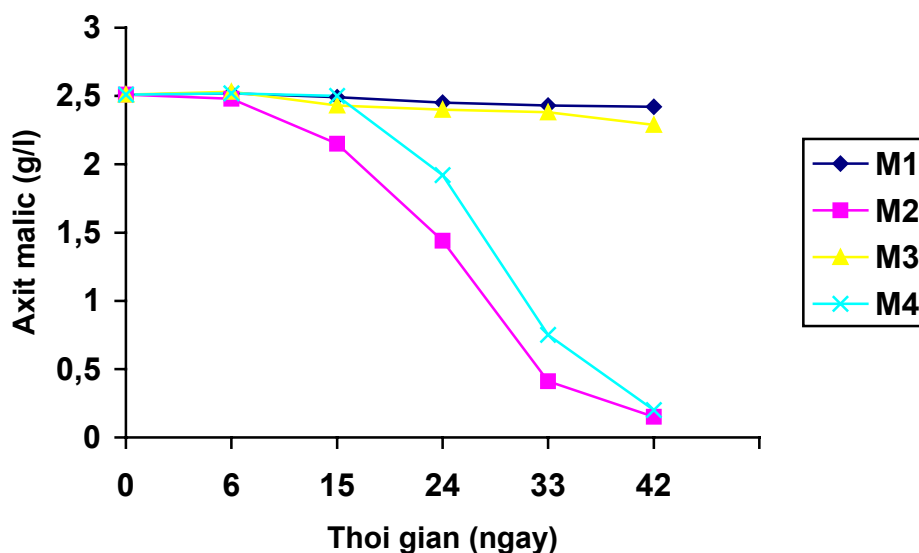
M2: Bổ sung đồng thời nấm men và vi khuẩn

M3: Bổ sung vi khuẩn vào thời điểm nấm men phát triển ở pha logarit (ngày thứ 3 của quá trình lên men cồn)

M4: Bổ sung sau khi kết thúc lên men chính.

Vi khuẩn được nhân giống trong môi trường thu sinh khối sau đó được ly tâm để tách sinh khối và bổ sung vào các thời điểm lên men. Trong quá trình lên men theo dõi biến đổi của các chỉ tiêu: đường, pH, axit tính theo số ml NaOH 0.1 N chuẩn độ 1 ml dịch lên men, axit malic (g/l).

Kết quả được chỉ ra trong bảng 22 và hình 4.



**Hình 4. Biến đổi axit malic theo thời gian của các mẫu bổ sung vi khuẩn tại các thời điểm khác nhau**

**Bảng 22:** Theo dõi động học quá trình lên men có bổ sung vi khuẩn *Leuconostoc oenos*

| Thời gian<br>(ngày) | Mẫu          |      |                              |                        |              |      |                              |                        |              |      |               |                        |              |      |               |                        |
|---------------------|--------------|------|------------------------------|------------------------|--------------|------|------------------------------|------------------------|--------------|------|---------------|------------------------|--------------|------|---------------|------------------------|
|                     | M1           |      |                              |                        | M2           |      |                              |                        | M3           |      |               |                        | M4           |      |               |                        |
|                     | Đường<br>(%) | pH   | Axit<br>(ml<br>NaOH<br>0.1N) | Axit<br>malic<br>(g/l) | Đường<br>(%) | pH   | Axit<br>(ml<br>NaOH<br>0.1N) | Axit<br>malic<br>(g/l) | Đường<br>(%) | pH   | Axit<br>(g/l) | Axit<br>malic<br>(g/l) | Đường<br>(%) | pH   | Axit<br>(g/l) | Axit<br>malic<br>(g/l) |
| 0                   | 23.5         | 3.93 | 0.53                         | 2.51                   | 23.5         | 3.93 | 0.53                         | 2.51                   | 23.5         | 3.93 | 0.53          | 2.51                   | 23.5         | 3.93 | 0.53          | 2,51                   |
| 1                   | 18.7         | 3.89 | 0.55                         | -                      | 18.3         | 3.89 | 0.56                         | -                      | 18.9         | 3.88 | 0.56          | -                      | 18.5         | 3.89 | 0.55          | -                      |
| 3                   | 11.67        | 3.84 | 0.6                          | -                      | 11.5         | 3.75 | 0.63                         | -                      | 11.85        | 3.84 | 0.6           | -                      | 11.72        | 3.83 | 0.61          | -                      |
| 6                   | 6.09         | 3.69 | 0.66                         | 2.52                   | 5.78         | 3.64 | 0.72                         | 2.48                   | 6.3          | 3.70 | 0.67          | 2.53                   | 6.34         | 3.70 | 0.67          | 2.52                   |
| 9                   | 4.17         | 3.68 | 0.68                         | -                      | 4.04         | 3.61 | 0.73                         | -                      | 4.27         | 3.69 | 0.68          | -                      | 4.21         | 3.69 | 0.69          | -                      |
| 12                  | 1.90         | 3.67 | 0.7                          | -                      | 1.58         | 3.62 | 0.73                         | -                      | 1.88         | 3.69 | 0.69          | -                      | 2.0          | 3.69 | 0.7           | -                      |
| 15                  | -            | 3.68 | 0.69                         | 2.49                   | -            | 3.60 | 0.73                         | 2.15                   | -            | 3.69 | 0.70          | 2.43                   | -            | 3.68 | 0.69          | 2.50                   |
| 18                  | -            | 3.67 | 0.68                         | -                      | -            | 3.63 | 0.72                         | -                      | -            | 3.70 | 0.68          | -                      | -            | 3.68 | 0.69          | -                      |
| 21                  | -            | 3.68 | 0.68                         | -                      | -            | 3.67 | 0.67                         | -                      | -            | 3.69 | 0.68          | -                      | -            | 3.71 | 0.67          | -                      |
| 24                  | -            | 3.68 | 0.67                         | 2.45                   | -            | 3.73 | 0.63                         | 1.44                   | -            | 3.68 | 0.69          | 2.40                   | -            | 3.72 | 0.65          | 1,92                   |
| 27                  | -            | 3.67 | 0.66                         | -                      | -            | 3.75 | 0.61                         | -                      | -            | 3.70 | 0.69          | -                      | -            | 3.75 | 0.63          | -                      |
| 30                  | -            | 3.69 | 0.66                         | -                      | -            | 3.80 | 0.59                         | -                      | -            | 3.70 | 0.67          | -                      | -            | 3.80 | 0.60          | -                      |
| 33                  | -            | 3.68 | 0.67                         | 2.43                   | -            | 3.86 | 0.57                         | 0.41                   | -            | 3.70 | 0.67          | 2.38                   | -            | 3.86 | 0.57          | 0,75                   |
| 36                  | -            | 3.68 | 0.66                         | -                      | -            | 3.90 | 0.56                         | -                      | -            | 3.70 | 0.66          | -                      | -            | 3.89 | 0.55          | -                      |
| 39                  | -            | 3.69 | 0.65                         | -                      | -            | 3.93 | 0.54                         | -                      | -            | 3.71 | 0.66          | -                      | -            | 3.92 | 0.54          | -                      |
| 42                  | -            | 3.67 | 0.66                         | 2.42                   | -            | 3.93 | 0.54                         | 0.15                   | -            | 3.71 | 0.66          | 2.29                   | -            | 3.93 | 0.53          | 0.20                   |
| 45                  | -            | 3.68 | 0.66                         | -                      | -            | 3.93 | 0.54                         | -                      | -            | 3.72 | 0.65          | -                      | -            | 3.95 | 0.52          | -                      |

Kết quả bảng 22 và hình 4 cho thấy rằng:

- Quá trình lên men khi có và không bổ sung vi khuẩn không có gì khác biệt đáng kể, điều này chỉ ra rằng vi khuẩn đã không gây ra sự đối kháng đối với nấm men. Khi lên men bổ sung vi khuẩn đồng thời với nấm men axit tạo thành trong quá trình lên men có cao hơn một chút so với khi lên men không bổ sung vi khuẩn, điều này cho thấy vi khuẩn *Leuconostoc* trong môi trường giàu đường có sử dụng cơ chất đường để lên men tạo axit lactic, tuy nhiên không nhiều nhưng cũng gây nguy cơ làm tăng độ chua của vang. Quá trình phân giải axit malic diễn ra rất tốt, tốc độ phân giải nhanh nhất so với các thời điểm bổ sung khác. Sau 42 ngày từ khi bắt đầu quá trình lên men vang thì axit malic gần như đã bị phân huỷ hết.

- Khi bổ sung vi khuẩn tại thời điểm nấm men đạt pha logarit thì khả năng phân giải axit malic trong quá trình lên men malolactic sau đó là không đáng kể, như vậy quá trình lên men malolactic khi bổ sung vi khuẩn ở thời điểm này là không có hiệu quả. Điều này có thể được lý giải là do thời điểm này nấm men đang phát triển mạnh nên có thể đã cạnh tranh nguồn dinh với vi khuẩn, ức chế sự phát triển của vi khuẩn nên dẫn tới quá trình lên men malolactic diễn ra quá chậm chạp.

- Bổ sung vi khuẩn vào thời điểm kết thúc quá trình lên men tuy có nhược điểm là lúc này nồng độ cồn khá cao nhưng bù lại quá trình lên men cồn không bị ảnh hưởng gì, chủng vi khuẩn đã được tuyển chọn có khả năng chịu cồn nên tốc độ phân huỷ axit malic cũng khá cao, có kém hơn một chút so với khi bổ sung vi khuẩn từ đầu nhưng bù lại không gây nên nguy cơ rủi ro nào.

- Với sự cân nhắc lợi hại, để giảm bớt rủi ro và vẫn đảm bảo thời gian phân huỷ axit malic nhanh chúng tôi lựa chọn thời điểm bổ sung vi khuẩn thích hợp nhất cho quá trình lên men malolactic là khi kết thúc quá trình lên men rượu. Hơn thế nữa thời điểm bổ sung này rất dễ dàng thao tác, dễ khống chế các điều kiện môi trường thích hợp cho mỗi loài đặc biệt khi có sử dụng  $\text{SO}_2$  để bảo quản dịch quả thì thời điểm bổ sung này giúp cho khả năng ức chế của  $\text{SO}_2$  đối với vi khuẩn cũng giảm bớt do sau khi kết thúc lên men rượu nồng độ  $\text{SO}_2$  trong môi đã giảm hơn đáng kể so với ban đầu. Có thể khắc phục nồng độ cồn cao gây ức chế vi khuẩn bằng cách tăng lượng sinh khối bổ sung ban đầu.

#### **4.4.2. Nghiên cứu lựa chọn nồng độ vi khuẩn thích hợp cho lên men malolactic**

Sau khi đã lựa chọn được thời điểm bổ sung vi khuẩn sau khi kết thúc quá trình lên men rượu, để khắc phục nhược điểm là nồng độ cồn cao có thể sẽ diệt một số lượng tế bào vi khuẩn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xác định nồng độ vi khuẩn thích hợp đưa vào môi trường lên men để khởi động quá trình lên men malolactic để quá trình diễn ra tốt nhất.

Sử dụng các nồng độ vi khuẩn đưa vào môi trường là 5, 10, 15 g sinh khối ẩm / lít vang non. Các mẫu được ký hiệu là M1, M2, M3, M4 tương ứng với mẫu đối chứng và các nồng độ vi khuẩn bổ sung như trên.

Theo dõi động học quá trình lên men malolactic qua các chỉ tiêu độ axit (ml NaOH 0.1N), pH, axit malic (g/l).

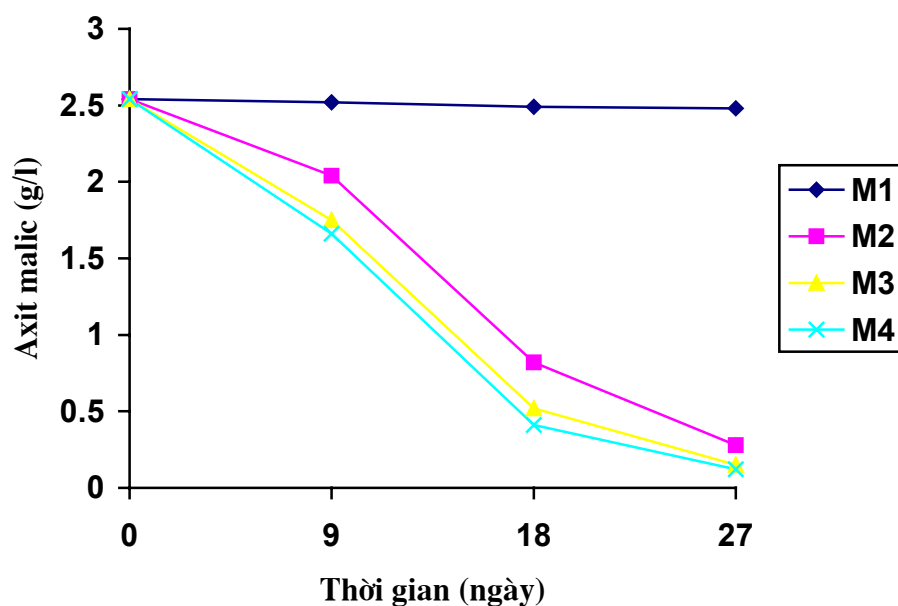
Kết quả chỉ ra trong bảng 23 và hình 5.

Kết quả này cho thấy rằng khi tăng nồng độ vi khuẩn thì tốc độ quá trình lên men malolactic tăng lên đáng kể thể hiện qua hàm lượng axit malic giảm mạnh hơn. Tuy nhiên có thể nhận thấy khi tăng nồng độ axit malic lên 15 g sinh khối ẩm/ l vang non thì tuy tốc độ giảm malic có tăng lên so với mẫu bổ sung vi khuẩn nồng độ 10g sinh khối ẩm /lít nhưng không nhiều, cũng sau 27 ngày lên men malolactic thì nồng độ axit malic của hai mẫu còn lại gần như nhau, trong khi đó trong sản xuất việc tăng gấp rưỡi lượng sinh khối vi khuẩn bổ sung sẽ khá tốn kém, do đó tính về lợi ích kinh tế chúng tôi chọn nồng độ vi khuẩn bổ sung cho lên men malolactic là 10 g sinh khối ẩm/lít vang non.

**Bảng 23:** Quá trình lên men malolactic với các nồng độ vi khuẩn bổ sung khác nhau

| Thời gian<br>(ngày) | Các chỉ tiêu |                           |                        |      |                           |                        |      |                           |                        |      |                           |                        |
|---------------------|--------------|---------------------------|------------------------|------|---------------------------|------------------------|------|---------------------------|------------------------|------|---------------------------|------------------------|
|                     | M1           |                           |                        | M2   |                           |                        | M3   |                           |                        | M4   |                           |                        |
|                     | pH           | Axit (ml<br>NaOH<br>0,1N) | Axit<br>malic<br>(g/l) | pH   | Axit (ml<br>NaOH<br>0,1N) | Axit<br>malic<br>(g/l) | pH   | Axit (ml<br>NaOH<br>0,1N) | Axit<br>malic<br>(g/l) | pH   | Axit (ml<br>NaOH<br>0,1N) | Axit<br>malic<br>(g/l) |
| 1                   | 3.67         | 0.69                      | 2.54                   | 3.67 | 0.69                      | 2.54                   | 3.67 | 0.69                      | 2.54                   | 3.67 | 0.69                      | 2.54                   |
| 3                   | 3.67         | 0.69                      | -                      | 3.68 | 0.69                      | -                      | 3.69 | 0.68                      | -                      | 3.70 | 0.68                      | -                      |
| 6                   | 3.69         | 0.68                      | -                      | 3.70 | 0.68                      | -                      | 3.70 | 0.67                      | -                      | 3.73 | 0.65                      | -                      |
| 9                   | 3.68         | 0.66                      | 2.52                   | 3.71 | 0.66                      | 2,04                   | 3.76 | 0.64                      | 1.75                   | 3.79 | 0.62                      | 1.66                   |
| 12                  | 3.67         | 0.67                      | -                      | 3.75 | 0.64                      | -                      | 3.79 | 0.61                      | -                      | 3.85 | 0.58                      | -                      |
| 15                  | 3.69         | 0.66                      | -                      | 3.82 | 0.59                      | -                      | 3.84 | 0.58                      | -                      | 3.89 | 0.56                      | -                      |
| 18                  | 3.68         | 0.65                      | 2.49                   | 3.86 | 0.56                      | 0,82                   | 3.89 | 0.55                      | 0.52                   | 3.92 | 0.54                      | 0.41                   |
| 21                  | 3.68         | 0.66                      | -                      | 3.90 | 0.54                      | -                      | 3.94 | 0.52                      | -                      | 3.93 | 0.53                      | -                      |
| 24                  | 3.67         | 0.66                      | -                      | 3.93 | 0.53                      | -                      | 3.95 | 0.51                      | -                      | 3.94 | 0.52                      | -                      |
| 27                  | 3.69         | 0.65                      | 2.48                   | 3.95 | 0.52                      | 0.28                   | 3.96 | 0.52                      | 0.15                   | 3.95 | 0.51                      | 0.12                   |
| 30                  | 3.70         | 0.65                      | -                      | 3.96 | 0.52                      | -                      | 3.96 | 0.52                      | -                      | 3.95 | 0.50                      | -                      |

*Ngày 1: Ngày bắt đầu quá trình lên men malolactic*



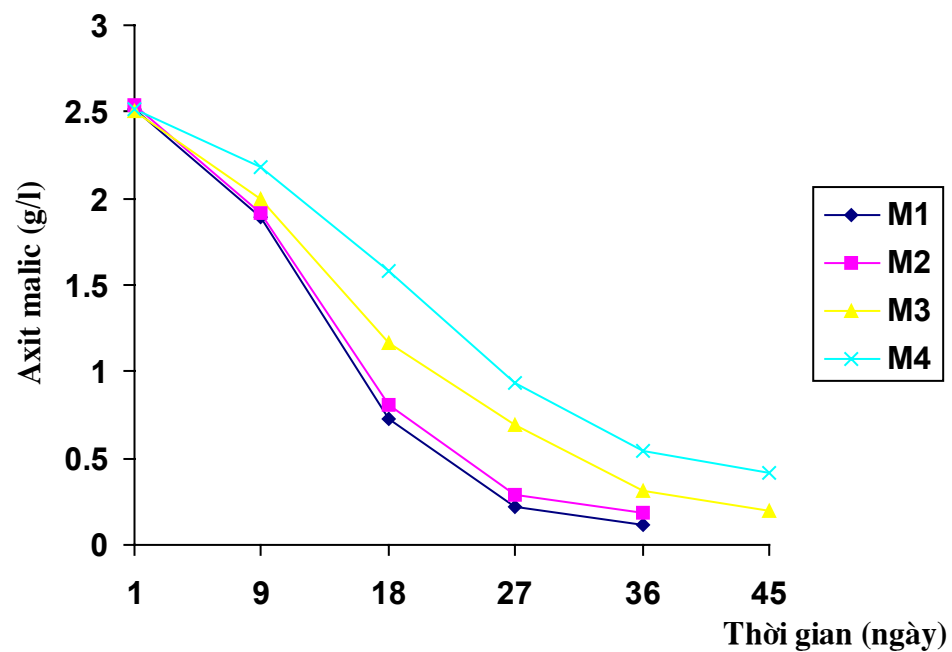
**Hình 5. Biến đổi nồng độ axit malic của các mẫu với các nồng độ vi khuẩn bổ sung khác nhau**

#### **4.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ $SO_2$ trong quá trình xử lý dịch quả ban đầu đến quá trình lên men malolactic**

Chúng ta biết rằng khả năng chống chịu với  $SO_2$  của vi khuẩn và nấm men rất khác nhau, vi khuẩn thường nhạy cảm hơn với  $SO_2$ . Vì thế nếu sử dụng  $SO_2$  trong bảo quản dịch quả thì liệu nồng độ bảo quản như thế nào là thích hợp để không gây trở ngại cho quá trình lên men malolactic. Để trả lời cho câu hỏi này chúng tôi tiến hành lên men vang với dịch quả có nồng độ  $SO_2$  tổng số trước khi lên men là 60, 80, 100 mg/l. Sau khi kết thúc lên men chính thì bổ sung vi khuẩn với nồng độ 10g sinh khối ẩm/lít.

Theo dõi quá trình lên men malolactic với các chỉ tiêu pH, độ axit, axit malic.

Kết quả được trình bày trong bảng 24 và hình 6.



**Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ  $\text{SO}_2$  trong dịch quả ban đầu đến biến đổi axit malic trong lên men malolactic**

**Bảng 24:** Ảnh hưởng của nồng độ SO<sub>2</sub> trong dịch quả ban đầu tới quá trình lên men malolactic

| Thời gian<br>(ngày) | Các chỉ tiêu |                     |                  |      |                     |                  |      |                     |                  |      |                     |                  |
|---------------------|--------------|---------------------|------------------|------|---------------------|------------------|------|---------------------|------------------|------|---------------------|------------------|
|                     | M1           |                     |                  | M2   |                     |                  | M3   |                     |                  | M4   |                     |                  |
|                     | pH           | Axit (ml NaOH 0,1N) | Axit malic (g/l) | pH   | Axit (ml NaOH 0,1N) | Axit malic (g/l) | pH   | Axit (ml NaOH 0,1N) | Axit malic (g/l) | pH   | Axit (ml NaOH 0,1N) | Axit malic (g/l) |
| 1                   | 3.65         | 0.70                | 2.51             | 3.65 | 0.71                | 2.54             | 3.64 | 0.72                | 2.50             | 3.64 | 0.72                | 2.51             |
| 3                   | 3.67         | 0.68                | -                | 3.66 | 0.70                | -                | 3.64 | 0.71                | -                | 3.65 | 0.72                | -                |
| 6                   | 3.70         | 0.67                | -                | 3.70 | 0.68                | -                | 3.65 | 0.70                | -                | 3.67 | 0.71                | -                |
| 9                   | 3.74         | 0.64                | 1,89             | 3.73 | 0.65                | 1.92             | 3.67 | 0.68                | 2.0              | 3.68 | 0.70                | 2.18             |
| 12                  | 3.83         | 0.59                | -                | 3.77 | 0.62                | -                | 3.69 | 0.66                | -                | 3.70 | 0.68                | -                |
| 15                  | 3.87         | 0.56                | -                | 3.80 | 0.60                | -                | 3.72 | 0.65                | -                | 3.71 | 0.67                | -                |
| 18                  | 3.91         | 0.54                | 0,73             | 3.84 | 0.58                | 0.81             | 3.76 | 0.63                | 1.17             | 3.74 | 0.65                | 1.58             |
| 21                  | 3.92         | 0.53                | -                | 3.88 | 0.56                | -                | 3.81 | 0.59                | -                | 3.75 | 0.64                | -                |
| 24                  | 3.94         | 0.52                | -                | 3.92 | 0.54                | -                | 3.84 | 0.58                | -                | 3.79 | 0.61                | -                |
| 27                  | 3.95         | 0.52                | 0.22             | 3.93 | 0.54                | 0.29             | 3.86 | 0.57                | 0.69             | 3.82 | 0.59                | 0.93             |
| 30                  | 3.96         | 0.52                | -                | 3.93 | 0.53                | -                | 3.88 | 0.56                | -                | 3.84 | 0.58                | -                |
| 33                  | 3.96         | 0.51                | -                | 3.94 | 0.52                | -                | 3.89 | 0.54                | -                | 3.86 | 0.56                | -                |
| 36                  | 3.96         | 0.51                | 0,12             | 3.94 | 0.51                | 0.18             | 3.92 | 0.53                | 0.31             | 3.87 | 0.56                | 0.54             |
| 39                  | -            | -                   | -                | -    | -                   | -                | 3.92 | 0.53                | -                | 3.90 | 0.55                | -                |
| 42                  | -            | -                   | -                | -    | -                   | -                | 3.94 | 0.52                | -                | 3.91 | 0.55                | -                |
| 45                  | -            | -                   | -                | -    | -                   | -                | 3.94 | 0.52                | 0.20             | 3.92 | 0.54                | 0.41             |

*Ngày 1: Ngày bắt đầu quá trình lên men malolactic*

Kết quả cho thấy khi tăng nồng độ  $\text{SO}_2$  trong dịch lên men ban đầu thì quá trình lên men malolactic sau đó bị ảnh hưởng đáng kể thể hiện qua tốc độ phân giải axit malic bị giảm đi rõ rệt, thời gian lên men malolactic bị kéo dài thêm. Tuy nhiên ở nồng độ  $\text{SO}_2$  ban đầu 100 mg/l tuy quá trình bị kéo dài nhưng vẫn có khả năng kết thúc được quá trình lên men malolactic, như vậy nồng độ này chỉ có thể ức chế chứ chưa tiêu diệt được chủng vi khuẩn này. Do đó để hiệu quả của quá trình lên men malolactic được tốt và tiết kiệm thời gian nên khống chế nồng độ  $\text{SO}_2$  ban đầu dưới 100 mg/l.

Qua các kết quả nghiên cứu trên có thể thấy rằng các điều kiện công nghệ thích hợp cho quá trình lên men malolactic là:

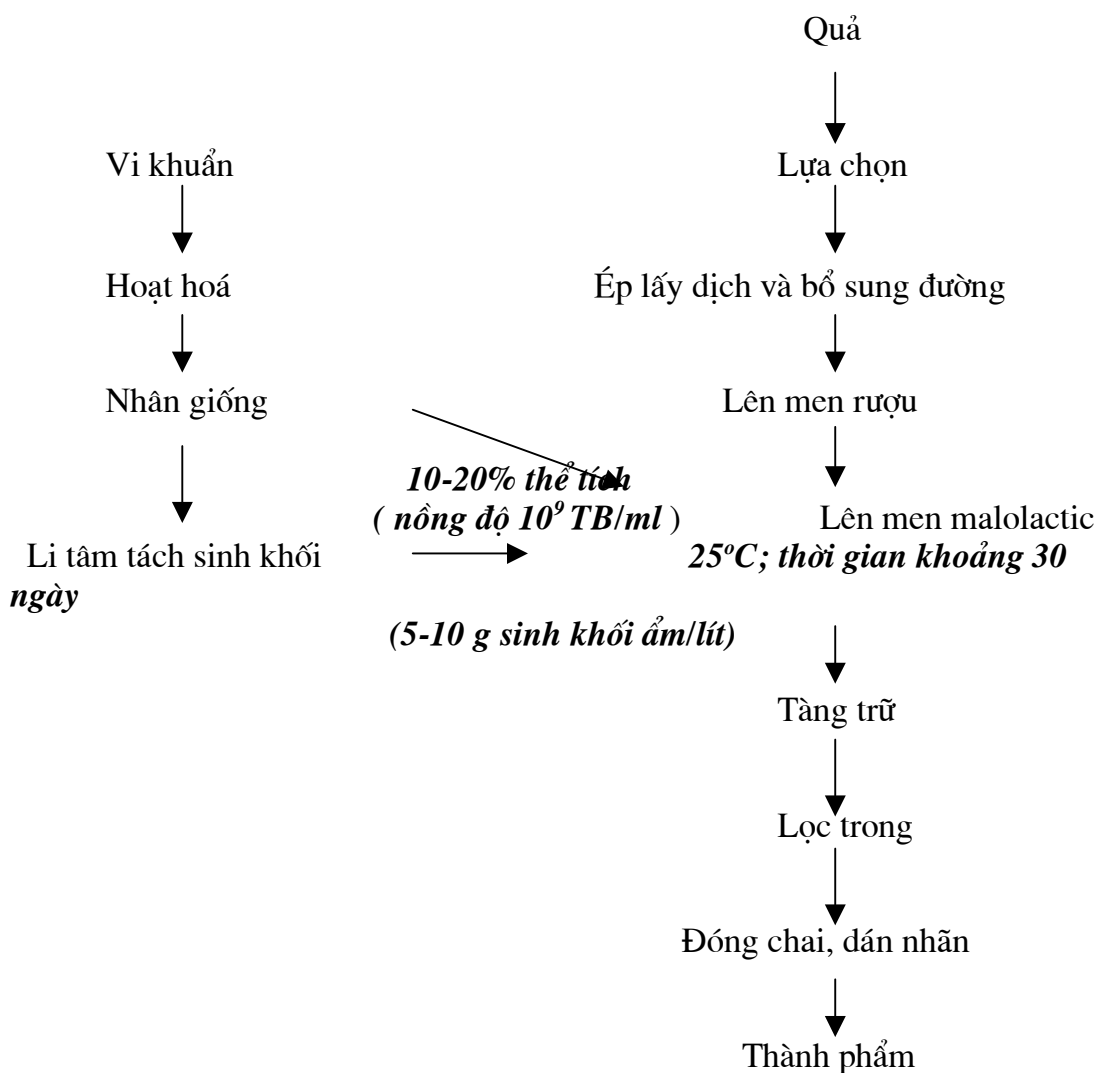
Nhiệt độ lên men : 25 °C

Thời điểm bổ sung vi khuẩn: Kết thúc lên men rượu

Nồng độ  $\text{SO}_2$  tổng số trong dịch quả ban đầu: <100 mg/l

Nồng độ vi khuẩn: 5 ÷ 10 g sinh khối ẩm/ lít (Độ ẩm 80%) tương đương với nồng độ giống lỏng từ 10-20% thể tích lên men (nồng độ tế bào trong giống là  $10^9$  TB/ml).

Chúng tôi đưa ra sơ đồ công nghệ cho quá trình lên men malolactic như sau:



**Hình 7 : Sơ đồ lưu trình công nghệ lên men malolactic nhờ tế bào tự do**

#### 4.5. Lên men malolactic để nâng cao chất lượng vang quy mô pilot.

Chúng tôi áp dụng quy trình lên men malolactic để thực nghiệm trên thiết bị 3000 lít, tại xưởng thực nghiệm Viện Công nghiệp thực phẩm.

Nấm men được nhân giống và tiến hành lên men ở nhiệt độ 25°C

Vi khuẩn được nhân giống qua các cấp và bổ sung vào dịch vang non với nồng độ giống tương đương 5 g sinh khối ẩm/ lít vang non. Sau khi kết thúc lên men chính, quá trình lên men malolactic được tiến hành ở điều kiện 25°C, trong quá trình lên men theo dõi các chỉ tiêu pH, độ axit (ml NaOH 0.1N) và sau khi kết thúc quá trình lên men malolactic hạ nhiệt độ xuống 10°C, tàng trữ thêm khoảng 1 tháng, sau đó lọc trong, đánh giá chất lượng sản phẩm thực nghiệm.

**Bảng 25. Động học quá trình lên men rượu và lên men malolactic tại thiết bị 3000 lít**

| Thời gian (ngày)     | °Bx  | Đường tổng (%) | OD (pha loãng 10 lần) | pH   | Axit (ml NaOH 0.1 N) | Axit malic (g/l) | Cồn (%V) |
|----------------------|------|----------------|-----------------------|------|----------------------|------------------|----------|
| 0                    | 22   | 18.77          | 0.111                 | 3.57 | 0.52                 | 2.35             |          |
| 1                    | 20.5 | 15.93          | 0.207                 | 3.54 | 0.53                 | -                |          |
| 2                    | 19.0 | 13.23          | 0.237                 | 3.54 | 0.54                 | -                |          |
| 3                    | 17.2 | 10.53          | 0.241                 | 3.53 | 0.55                 | -                |          |
| <b>Tiếp đường</b>    |      |                |                       |      |                      |                  |          |
| 4                    | 16.5 | 10.38          | 0.255                 | 3.49 | 0.58                 | -                |          |
| 5                    | 14.2 | 9.31           | 0.272                 | 3.47 | 0.61                 | -                |          |
| 6                    | 13.2 | 7.852          | 0.296                 | 3.45 | 0.63                 | -                |          |
| 7                    | 12.0 | 6.746          | 0.287                 | 3.45 | 0.63                 | -                |          |
| 8                    | 11.0 | 5.76           | 0.281                 | 3.45 | 0.63                 | -                |          |
| 9                    | 10.5 | 4.42           | 0.269                 | 3.46 | 0.61                 | -                |          |
| 10                   | 10.2 | 3.66           | 0.252                 | 3.46 | 0.62                 | -                |          |
| 11                   | 10.0 | 3.51           | 0.230                 | 3.45 | 0.61                 | -                |          |
| 12                   | 9.8  | 3.288          | 0.221                 | 3.46 | 0.61                 | -                | 14.2     |
| <b>Tiếp vi khuẩn</b> |      |                |                       |      |                      |                  |          |
| 13                   | 9.0  | 2.222          | 0.246                 | 3.48 | 0.60                 | 2.37             |          |
| 14                   | 9.0  | 1.73           | 0.179                 | 3.49 | 0.60                 | 2.31             |          |
| 15                   | 8.2  | 1.32           | 0.186                 | 3.51 | 0.59                 | 2.26             |          |

|                        |     |      |       |      |      |      |      |
|------------------------|-----|------|-------|------|------|------|------|
| 18                     | 8.0 | 1.15 | 0.178 | 3.58 | 0.57 | 1.94 |      |
| 21                     | -   | -    | 0.167 | 3.60 | 0.54 | 1.59 |      |
| 24                     | -   | -    | 0.162 | 3.63 | 0.52 | 1.27 |      |
| 27                     | -   | -    | 0.162 | 3.64 | 0.51 | 0.93 |      |
| 30                     | -   | -    | 0.160 | 3.67 | 0.50 | 0.74 |      |
| 33                     | -   | -    | 0.155 | 3.69 | 0.49 | 0.56 |      |
| 36                     | -   | -    | 0.149 | 3.71 | 0.48 | 0.48 |      |
| 39                     | -   | -    | 0.093 | 3.73 | 0.48 | 0.35 |      |
| 42                     | -   | -    | 0.090 | 3.74 | 0.47 | 0.26 |      |
| 45                     | -   | -    | 0.085 | 3.74 | 0.47 | 0.20 |      |
| 48                     | -   | -    | 0.08  | 3.74 | 0.47 | 0.20 | 14.0 |
| Hạ nhiệt độ xuống 10°C |     |      |       |      |      |      |      |

**Bảng26. Thành phần hóa lý và đánh giá cảm quan vang sau lên men malolactic**

| <b>Chỉ tiêu</b>      | <b>Vang trước khi lên men malolactic</b> | <b>Vang sau khi lên men malolactic</b> |
|----------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|
| pH                   | 3.46                                     | 3.74                                   |
| Axit (ml NaOH 0.1 N) | 0.61                                     | 0.47                                   |
| Axit malic (g/l)     | 2.37                                     | 0.2                                    |
| Độ cồn (%V)          | 14.2                                     | 14.0                                   |
| Đường sót (%)        | 3.3                                      | vết                                    |
| Cảm quan             | Vị chua gắt                              | Vị chua dịu, hài hòa                   |

Động học quá trình thực nghiệm tại thiết bị 3000 lít diễn ra bình thường, chỉ sau 12 ngày quá trình lên men chính kết thúc, đạt nồng độ cồn khá cao (14,2 %V). Quá trình lên men malolactic được tiếp nối và sau khoảng 33 ngày lên men malolactic thì hầu như toàn bộ axit malic đã bị chuyển hóa thành axit lactic, pH dịch vang tăng lên đáng kể và axit chuẩn độ giảm xuống cảm quan đánh giá thấy vang có hương vị hài hoà hơn, vị chua dịu và hương thơm tốt. Như vậy có thể thấy

rằng quá trình lên men malolactic đã có ảnh hưởng rất tốt tới chất lượng của vang, chỉ sau khoảng 45 ngày lên men malolactic đã giúp cho hương vị vang non trở nên hài hoà cân đối hơn.

Chúng tôi đã gửi mẫu (mẫu rượu vang có lên men malolactic và mẫu đối chứng không qua lên men malolactic) đi phân tích thành phần một số sản phẩm phụ như este, aldehyt, rượu bậc cao... bằng phương pháp thử theo TCVN 1273 – 86 AOAC.97 tại Viện Dinh Dưỡng. Kết quả chỉ ra trong bảng sau.

**Bảng 27. Hàm lượng các sản phẩm phụ của rượu vang lên men malolactic và mẫu đối chứng**

| STT | Các chỉ tiêu                          | Mẫu không MLF | Mẫu có MLF |
|-----|---------------------------------------|---------------|------------|
| 1   | Acetaldehyt (mg/l 100 <sup>0</sup> )  | 95            | 110        |
| 2   | Etylacetat (mg/l 100 <sup>0</sup> )   | 115           | 65         |
| 3   | Propanol (mg/l 100 <sup>0</sup> )     | 52            | 41         |
| 4   | Iso- Butanol (mg/l 100 <sup>0</sup> ) | 210           | 74         |
| 5   | Iso- Amylic (mg/l 100 <sup>0</sup> )  | 520           | 930        |
| 6   | N- Butanol (mg/l 100 <sup>0</sup> )   | 315           | 298        |
| 7   | Formaldehyt (mg/l 100 <sup>0</sup> )  | 56            | -          |
| 8   | Propanal (mg/l 100 <sup>0</sup> )     | 80            | -          |
| 9   | Axeton (mg/l 100 <sup>0</sup> )       | 92            | -          |
| 10  | Methylacetat (mg/l 100 <sup>0</sup> ) | 56            | -          |
| 11  | Iso-Propanol (mg/l 100 <sup>0</sup> ) | 35            | -          |

Căn cứ kết quả trên cho thấy khi có lên men malolactic, các rượu bậc cao không có lợi như iso-butanol, iso-propanol, propanal giảm hẳn hoặc biến mất hoàn toàn. Thêm nữa, các aldehyt và xeton không mong đợi như formaldehyt, axeton cũng không còn. Tỷ lệ các chất thơm tạo nên hình thơm của vang cũng cân đối, hài hòa hơn.

#### 4.6. Nghiên cứu sử dụng một số chất trợ lắng làm trong rượu vang

Để rút ngắn giai đoạn làm trong rượu vang và góp phần làm ổn định độ trong của rượu vang trong quá trình lưu thông chúng tôi đã nghiên cứu sử dụng một số chất làm trong có bản chất hoá học khác nhau như đất trợ lắng bentonit, polyme tổng hợp Polyclar 10, gelatin bổ sung vào giai đoạn làm trong rượu vang để lựa chọn được chất làm trong phù hợp.

##### 4.6.1. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng Polyclar 10 để làm trong vang:

Polyclar 10 được xử lí rồi được đưa vào rượu vang sau khi lên men malolactic với các hàm lượng khác nhau từ 0 - 1000mg/l, các mẫu rượu được tàng trữ ở nhiệt độ 10°C. Tiến hành đo OD của dịch rượu vang hàng ngày ở bước sóng 620nm. Kết quả chỉ ra ở bảng 28 và 29.

**Bảng 28: Ảnh hưởng của hàm lượng Polyclar 10  
tới hiệu quả lắng trong rượu vang**

| Ngày | Hàm lượng Polyclar 10 (mg/l) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|      | 0                            | 100   | 200   | 300   | 400   | 500   | 600   | 700   | 800   | 900   | 1000  |
| 0    | 0,873                        | 0,913 | 0,972 | 0,984 | 0,993 | 1,024 | 1,135 | 1,160 | 1,191 | 1,207 | 1,302 |
| 1    | 0,770                        | 0,727 | 0,725 | 0,707 | 0,692 | 0,680 | 0,656 | 0,640 | 0,636 | 0,610 | 0,599 |
| 2    | 0,711                        | 0,664 | 0,658 | 0,610 | 0,609 | 0,607 | 0,584 | 0,573 | 0,559 | 0,544 | 0,527 |
| 3    | 0,670                        | 0,625 | 0,607 | 0,573 | 0,571 | 0,555 | 0,544 | 0,526 | 0,514 | 0,495 | 0,477 |
| 4    | 0,665                        | 0,618 | 0,593 | 0,568 | 0,562 | 0,544 | 0,526 | 0,514 | 0,495 | 0,477 | 0,465 |
| 5    | 0,661                        | 0,600 | 0,571 | 0,547 | 0,537 | 0,517 | 0,498 | 0,479 | 0,458 | 0,444 | 0,433 |
| 6    | 0,649                        | 0,589 | 0,562 | 0,544 | 0,519 | 0,500 | 0,485 | 0,468 | 0,455 | 0,434 | 0,423 |
| 7    | 0,645                        | 0,586 | 0,558 | 0,537 | 0,495 | 0,480 | 0,465 | 0,450 | 0,442 | 0,431 | 0,421 |
| 8    | 0,641                        | 0,583 | 0,554 | 0,531 | 0,490 | 0,472 | 0,452 | 0,442 | 0,439 | 0,429 | 0,419 |

**Bảng 29: Ảnh hưởng của hàm lượng Polyclar 10  
tới chất lượng cảm quan của rượu vang**

| <b>Nồng độ polyclar<br/>(mg/l)</b> | <b>Các chỉ tiêu cảm quan</b> |                          |
|------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
|                                    | <b>Màu sắc</b>               | <b>Hương vị</b>          |
| 0                                  | đỏ đậm                       | chua dịu, vị hơi đắng    |
| 100                                | đỏ nhạt                      | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 200                                | đỏ nhạt                      | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 300                                | đỏ nhạt                      | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 400                                | hồng                         | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 500                                | hồng                         | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 600                                | hồng                         | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 700                                | hồng                         | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 800                                | hồng                         | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 900                                | hồng                         | vị chua hơn, ít đắng hơn |
| 1000                               | hồng                         | vị chua hơn, ít đắng hơn |

Kết quả trên cho thấy khi tăng nồng độ chất làm trong polyclar 10 thì độ trong của vang tăng dần thể hiện ở chỉ số OD giảm dần. Nồng độ Polyclar 10 càng cao thì có giá trị OD càng thấp. Tuy nhiên Polyclar 10 ảnh hưởng lớn đến chất lượng cảm quan của vang. Về màu sắc các mẫu có bổ sung Polyclar 10 tuy có màu sắc tươi sáng hơn, nhưng mất màu đỏ ban đầu của rượu và màu nhạt dần theo chiều tăng của lượng Polyclar 10 bổ sung. Đó là do bản chất của polyme này hấp phụ mạnh các hợp chất polyphenol và các chất tiền thân tạo sự nâu hoá trong vang đỏ. Hơn nữa tuy các mẫu bổ sung polyclar 10 làm giảm vị đắng của vang nhưng lại làm cho vang có vị chua gắt. Chúng tôi nhận thấy Polyclar 10 có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng cảm quan của vang đỏ, do vậy mà chúng tôi không lựa chọn sử dụng làm trong cho rượu vang đỏ.

#### 4.6.2. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng gelatin để làm trong vang:

Gelatin được xử lí rồi được đưa vào rượu vang sau khi lên men phụ với các hàm lượng khác nhau từ 0 - 500mg/l, các mẫu rượu được tàng trữ ở nhiệt độ 10°C. Tiến hành đo OD của dịch rượu vang hàng ngày ở bước sóng 620nm. Kết quả chỉ ra ở bảng 30.

**Bảng 30: Ảnh hưởng của hàm lượng gelatin  
tới hiệu quả lắng trong rượu vang**

| Ngày | Hàm lượng gelatin (mg/l) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|      | 0                        | 50    | 100   | 150   | 200   | 250   | 300   | 350   | 400   | 450   | 500   |
| 0    | 0,873                    | 1,345 | 1,398 | 1,403 | 1,415 | 1,423 | 1,501 | 1,514 | 1,589 | 1,641 | 1,675 |
| 1    | 0,770                    | 1,298 | 1,291 | 1,285 | 1,274 | 0,841 | 0,766 | 0,616 | 0,540 | 0,532 | 0,530 |
| 2    | 0,711                    | 1,156 | 1,149 | 1,100 | 0,870 | 0,569 | 0,535 | 0,458 | 0,411 | 0,389 | 0,389 |
| 3    | 0,670                    | 0,985 | 0,912 | 0,899 | 0,743 | 0,504 | 0,472 | 0,420 | 0,372 | 0,357 | 0,356 |
| 4    | 0,665                    | 0,945 | 0,876 | 0,811 | 0,680 | 0,494 | 0,470 | 0,396 | 0,357 | 0,347 | 0,357 |
| 5    | 0,661                    | 0,851 | 0,822 | 0,798 | 0,590 | 0,436 | 0,413 | 0,362 | 0,336 | 0,335 | 0,332 |
| 6    | 0,649                    | 0,763 | 0,758 | 0,714 | 0,571 | 0,429 | 0,406 | 0,357 | 0,329 | 0,328 | 0,322 |
| 7    | 0,645                    | 0,642 | 0,626 | 0,611 | 0,500 | 0,410 | 0,389 | 0,349 | 0,329 | 0,325 | 0,322 |
| 8    | 0,641                    | 0,635 | 0,621 | 0,598 | 0,471 | 0,389 | 0,376 | 0,345 | 0,329 | 0,323 | 0,321 |

Kết quả cho thấy với việc đưa gelatin vào rượu vang cũng tương tự như với Polyclar 10. Cùng với sự tăng nồng độ gelatin bổ sung, độ trong của vang tăng dần thể hiện ở chỉ số OD giảm mạnh so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên chất lượng cảm quan lại bị ảnh hưởng rất rõ rệt. Do gelatin hấp phụ các hợp chất phenol khiến dịch vang trở nên tươi sáng hơn, nhưng cũng như các chất trợ lắng có bản chất protein khác sẽ loại bỏ các hợp chất phenol phân tử lượng cao, các sắc tố tía

và anthoxyanyl đã bị polyme hoá ra khỏi vang do đó màu đỏ tía của vang bị nhạt đi một cách rõ rệt khi bổ sung gelatin kể cả với hàm lượng bổ sung nhỏ nhất là 50mg/l. Mặt khác các mẫu bổ sung gelatin bị mất hương thơm đặc trưng của nguyên liệu quả so với mẫu đối chứng, có vị chua gắt và làm giảm mạnh vị chất của vang, vị trở nên đắng hơn hẳn mẫu đối chứng. Do vậy chúng tôi không lựa chọn sử dụng gelatin cho quá trình lắng trong vang đỏ.

**Bảng 31: Ảnh hưởng của hàm lượng gelatin  
tới chất lượng cảm quan của rượu vang**

| Nồng độ gelatin<br>(mg/l) | Các chỉ tiêu cảm quan |                                |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------------|
|                           | Màu sắc               | Hương vị                       |
| 0                         | đỏ đậm                | chua dịu, vị hơi đắng          |
| 50                        | đỏ nhạt               | vị chua hơn, đắng hơn          |
| 100                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 150                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 200                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 250                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 300                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 350                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 400                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 450                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |
| 500                       | hồng                  | vị chua hơn, ít chất, đắng hơn |

#### ***4.6.3. Nghiên cứu sử dụng chất trợ lắng bentonit để làm trong vang:***

Bentonit được xử lí rồi đưa và rượu vang sau khi lên men phụ với các hàm lượng khác nhau từ 0 - 4 g/l, các mẫu rượu được tàng trữ ở nhiệt độ 10<sup>0</sup>C. Tiến hành đo OD của dịch rượu vang hàng ngày ở bước sóng 620nm. Kết quả chỉ ra ở bảng 32.

**Bảng 32: Ảnh hưởng của hàm lượng bentonit  
tới hiệu quả lắng trong rượu vang**

| Ngày | Hàm lượng bentonit (g/l) |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|      | 0                        | 0,5   | 1     | 1,5   | 2     | 2,5   | 3     | 3,5   | 4     |
| 0    | 0,873                    | 1,357 | 1,820 | 1,866 | *     | *     | *     | *     | *     |
| 1    | 0,770                    | 0,710 | 0,697 | 0,542 | 0,518 | 0,518 | 0,497 | 0,490 | 0,489 |
| 2    | 0,711                    | 0,677 | 0,652 | 0,538 | 0,515 | 0,515 | 0,497 | 0,490 | 0,411 |
| 3    | 0,670                    | 0,623 | 0,620 | 0,520 | 0,500 | 0,449 | 0,487 | 0,487 | 0,487 |
| 4    | 0,665                    | 0,618 | 0,611 | 0,520 | 0,500 | 0,499 | 0,485 | 0,481 | 0,481 |
| 5    | 0,661                    | 0,603 | 0,595 | 0,516 | 0,496 | 0,495 | 0,480 | 0,473 | 0,473 |
| 6    | 0,649                    | 0,591 | 0,581 | 0,507 | 0,486 | 0,484 | 0,471 | 0,467 | 0,466 |
| 7    | 0,645                    | 0,589 | 0,580 | 0,507 | 0,483 | 0,480 | 0,470 | 0,467 | 0,466 |
| 8    | 0,641                    | 0,584 | 0,579 | 0,507 | 0,482 | 0,478 | 0,470 | 0,467 | 0,466 |

\*Giá trị OD>2

Khi tăng hàm lượng bentonit bổ xung thì vang trong dần, thể hiện ở chỉ số OD giảm dần. Song khi tăng hàm lượng bentonit lên quá 2g/l thì chỉ số OD giảm không đáng kể. Thời gian xử lí bentonit lên quá 6 ngày thì chỉ số OD giảm không đáng kể, điều đó chứng tỏ với thời gian tác động 6 ngày là đủ để bentonit hấp phụ hết các cơ chất của chúng và lắng xuống đáy thùng. Việc sử dụng bentonit để làm tác nhân làm trong cho rượu vang không gây ảnh hưởng xấu đáng kể đến chất lượng cảm quan của vang. Ngoài khả năng loại bỏ protein, bentonit còn loại bỏ các hợp chất tích điện dương như anthocyanyl và loại bỏ một cách gián tiếp các hợp chất phenol khác. Tất cả các mẫu có bổ sung bentonit đều cho màu sắc tươi tắn hơn mẫu đối chứng do giảm được sự oxy hoá trong vang. Do loại bỏ anthocyanyl nên sắc tía trong các mẫu bổ sung bentonit bị giảm đôi chút, với hàm lượng bentonit bổ xung từ 0,5-2 g/l thì sự nhạt màu không đáng kể, các mẫu có màu tương tự mẫu đối chứng. Khi bổ xung bentonit với hàm lượng 2,5-4 g/l thì màu của vang nhạt đi đôi chút. Sử dụng bentonit còn có ưu điểm hơn là cải thiện về hương vị của vang, tạo cho vang có hương tươi hơn và vị đắng giảm đi đôi chút khiến vị của vang trở nên hài hoà hơn.

**Bảng 33: Ảnh hưởng của hàm lượng Bentonit  
tới chất lượng cảm quan của rượu vang**

| <b>Hàm lượng<br/>Bentonit (g/l)</b> | <b>Các chỉ tiêu cảm quan</b> |                         |
|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
|                                     | <b>Màu sắc</b>               | <b>Hương vị</b>         |
| 0                                   | đỏ đậm                       | vị hơi đắng             |
| 0,5                                 | đỏ                           | vị ít đắng hơn          |
| 1                                   | đỏ                           | vị ít đắng hơn          |
| 1,5                                 | đỏ, màu sáng                 | ít đắng hơn, vị hài hoà |
| 2                                   | đỏ, màu sáng                 | ít đắng hơn, vị hài hoà |
| 2,5                                 | đỏ nhạt, màu sáng            | ít đắng hơn, vị hài hoà |
| 3                                   | đỏ nhạt, màu sáng            | ít đắng hơn, vị hài hoà |
| 3,5                                 | đỏ nhạt, màu sáng            | ít đắng hơn, vị hài hoà |
| 4                                   | đỏ nhạt, màu sáng            | ít đắng hơn, vị hài hoà |

Từ tất cả các nhận xét trên, chúng tôi quyết định sử dụng bentonit với hàm lượng 2 g/l để lắng trong vang đỏ, thời gian xử lý là 6 ngày.

Rượu vang được xử lý bằng bentonit cho độ trong rất ổn định, đến thời điểm hiện nay sau khi được đóng chai hơn 1 năm rượu vang vẫn trong suốt, màu đỏ tươi tắn đặc trưng của nguyên liệu.

#### **4.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu quả và tốc độ lắng trong**

Ở thí nghiệm này chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới quá trình lắng trong rượu vang. Sử dụng hai mẫu nghiên cứu như sau: mẫu đối chứng (rượu vang lắng trong tự nhiên, ký hiệu ĐC) và mẫu rượu vang có sử dụng chất làm trong Bentonit (ký hiệu là B) với hàm lượng bổ sung là 2g/l. Kết quả OD ở bước sóng 620 nm được thể hiện ở bảng 34.

**Bảng 34: Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ  
đến tốc độ và hiệu quả lắng trong**

| Ngày | 5 <sup>0</sup> C |       | 10 <sup>0</sup> C |       | 15 <sup>0</sup> C |       | 20 <sup>0</sup> C |       | 25 <sup>0</sup> C |       |
|------|------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
|      | ĐC               | B     | ĐC                | B     | ĐC                | B     | ĐC                | B     | ĐC                | B     |
| 0    | 0,873            | 1,866 | 0,873             | 1,866 | 0,873             | 1,866 | 0,873             | 1,866 | 0,873             | 1,866 |
| 1    | 0,768            | 0,516 | 0,770             | 0,518 | 0,777             | 0,521 | 0,782             | 0,525 | 0,792             | 0,528 |
| 2    | 0,710            | 0,515 | 0,711             | 0,515 | 0,721             | 0,518 | 0,725             | 0,521 | 0,734             | 0,526 |
| 3    | 0,661            | 0,499 | 0,670             | 0,500 | 0,674             | 0,505 | 0,678             | 0,509 | 0,684             | 0,518 |
| 4    | 0,652            | 0,497 | 0,665             | 0,500 | 0,669             | 0,501 | 0,673             | 0,504 | 0,678             | 0,516 |
| 5    | 0,645            | 0,494 | 0,661             | 0,496 | 0,665             | 0,498 | 0,668             | 0,499 | 0,671             | 0,511 |
| 6    | 0,639            | 0,482 | 0,649             | 0,486 | 0,653             | 0,491 | 0,657             | 0,494 | 0,663             | 0,498 |
| 7    | 0,637            | 0,480 | 0,645             | 0,483 | 0,651             | 0,489 | 0,655             | 0,493 | 0,659             | 0,495 |
| 8    | 0,636            | 0,478 | 0,641             | 0,480 | 0,648             | 0,488 | 0,654             | 0,491 | 0,657             | 0,497 |

Qua sự biến đổi chỉ số OD ta thấy nhiệt độ có ảnh tới tốc độ và hiệu quả lắng trong song không nhiều, ở nhiệt độ càng thấp thì tốc độ lắng trong có diễn ra nhanh hơn nhưng không đáng kể. Qua cảm quan hương và vị của vang lắng trong ở các nhiệt độ khác nhau, chúng tôi nhận thấy nhiệt độ lắng trong có ảnh hưởng rất lớn tới chất lượng cảm quan của vang. Vang được tàng trữ ở 5<sup>0</sup>C và 10<sup>0</sup>C có hương tươi, vị êm dịu và hài hoà. Tàng trữ ở 15<sup>0</sup>C khi uống cho cảm giác hơi sốc, đặc biệt khi vang được tàng trữ ở 20<sup>0</sup>C và 25<sup>0</sup>C khi uống cho cảm giác rất sốc và hương rất nồng. Do đó nhiệt độ tàng trữ vang không nên vượt quá 10<sup>0</sup>C.

## PHẦN V: KẾT LUẬN

1. Đã tuyển chọn được 1 chủng vi khuẩn *Leuconostoc oenos* có hoạt độ malolactic cao và xác định được các điều kiện nuôi cấy và môi trường thích hợp nhất với chủng vi khuẩn này: fructoza 5g/l, glucoza 5g/l, pepton 5g/l, cao nấm men 5g/l, cao thịt 5g/l, axit D,L-malic 10g/l, pH 5, nhiệt độ nuôi cấy 25°C.
2. Cố định vi khuẩn trong gel Ca-alginat và xác định được các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ malolactic của các hạt cố định. Tiến hành lên men malolactic nhờ các tế bào cố định tại quy mô phòng thí nghiệm, sau khoảng 20 ngày thì lượng axit malic trong rượu vang được chuyển hoá hết.
3. Xây dựng quy trình công nghệ lên men malolactic nhờ tế bào vi khuẩn tự do: nhiệt độ lên men : 25 °C, thời điểm bổ sung vi khuẩn: kết thúc lên men rượu, nồng độ SO<sub>2</sub> tổng số trong dịch quả ban đầu: <100 mg/l, nồng độ vi khuẩn: 5÷10 g sinh khối ẩm/ lít (Độ ẩm 80%) tương đương với nồng độ giống lỏng từ 10-20% thể tích lên men (nồng độ tế bào trong giống là 10<sup>9</sup>TB/ml).
4. Thực nghiệm sản xuất rượu vang trải qua quá trình lên men malolactic trên thiết bị 3000 lít. Chất lượng rượu vang được cải thiện đáng kể: vị chua dịu, hài hoà, được nhiều người ưa thích.
5. Nghiên cứu sử dụng các chất làm trong rượu vang: PPVP, gelatin, bentonit và lựa chọn được bentonit là thích hợp nhất với nồng độ xử lý là 2g/l, thời gian phản ứng là 6 ngày. Nhiệt độ tàng trữ thích hợp nhất là 5-10°C.
6. Đã chuyển giao công nghệ sản xuất rượu vang cho 2 cơ sở sản xuất là: Công ty cổ phần Đường Biên Hoà và Công ty Bia và nước giải khát Quảng Ninh.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thị Liên Thanh, Nghiên cứu một số đặc tính sinh lý và hoá sinh của *Leuconostoc oenos* ứng dụng trong sản xuất rượu vang  
Luận án TSKH, Đại học Bách khoa Hà nội, 1997.
2. Giang Thế Bính, Đặng Kim Tuyền, Klaus Korner, Cố định tế bào *Sorangium cellulosum* So ce 12 trong Ca-alginat để sản xuất Socragicin.  
Các công trình nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học và công nghiệp thực phẩm giai đoạn 1986-1995, Viện Công nghiệp Thực phẩm, NXB KHKT Hà nội 1996, tr. 180-184.
3. Alan E.Goodban and J.Benjamin Stark  
Rapid method for determination of malic acid  
Analytical Chemistry-Vol.29, No.2, February 1957, p.283-287.
4. O.Colagrande, A.Silva, M.D. Fumi, Recent Applications of Biotechnology in wine production. Biotechnol. Prog., 1994, 10, p. 2-18.
5. L.I. Conomous, M.Kanellaki, S.Voliotis, K.Agelopoulos, Continuous wine making by delignified cellulosis materials supported biocatalyst, an attractive process for industrial application. Applied Biochem. and Biotechnol., Vol. 60, 1996, p. 303-313.
6. S. Gestrelus, Potential application of immobilized viable cells in the food industry; Malolactic fermentation of wine. Enzyme Engineering, Vol.6, 1982, p. 245-250.
7. T. Henick-Kling, T.E. Acree, Modification of wine flavor by malolactic fermentation. International workshop held in Verona on April 17<sup>th</sup> 1998 organized by Lallemand, p.17-22.
8. R.E. Kunkee, Induction of malolactic fermentation with starter cultures: A California prospective. International workshop held in Verona on April 17<sup>th</sup> 1998 organized by Lallemand, p. 69-70.
9. R.E. Kunkee, A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by lactic acid bacteria in beverage and food, 1975, p.29-42.

10. S.O. Lee, M.Y. Pack, Immobilization of *Leuconostoc oenos* cells for wine deacidification. Korean J. Food Sci. Technology, Vol.12, No.4 (1980), p. 299-304.
11. T. Henick-Kling, T.W.E. Saudine, D.A. Heatherbell, Evaluation malolactic bacteria isolated from Oregon wines. Appl. Environ. Microbiol. 55 (8), 2016.
12. P. Naouri, P. Chagnaud, A. Arnaud, P.Galzy, J. Mathieu, A new technology for Malolactic bioconversion in wine. Journal of wine research, 1991, Vol.2, No.1, p. 5-20.
13. J. Silver, T. Leighton, Control of malolactic fermentation in wine. Isolation and characterisation of a new malolactic organism. Amer. J. Enol. Vitic. 32 (1), 1981, p. 64-72.
14. P. Spettoli, A.Bottacin, M.P. Nuti, A.Zamorani, Immobilization of *Leuconostoc oenos* ML 34 in Ca-alginate gels and its application to wine technology. Am. J. Enol. Vitic., 33, 1982, p.1-5.
15. P. Spettoli, A.Bottacin, M.P. Nuti, A.Zamorani, Properties of malolactic activity purified from *Leuconostoc oenos* ML 34 by affinity chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 48 (4), 1984, p. 900-903.
16. G.J. Pilone, R.E. Kunkee, Sensory characterization of wines fermented with several malolactic strains of bacteria. Am. J. Enol. Vitic. 16, 1965, p.224-230.
17. G.J. Pilone, R.E. Kunkee, Chemical characterization of wines fermented with various malolactic bacteria. Appl. Microbiol., 14, 1966, p. 608-615.
18. B.C. Rankine, Influence of yeast strains and malolactic fermentation on composition and quality of table wines. Am. J. Enol. Vitic 23, 1972, p. 152-158.
19. R.E. Kunkee, C.S. Ough, M.A. Amerine, Induction of malolactic fermentation of must and wine with bacteria. Am. J. Enol. Vitic., 15, 1964, 178-183.
20. R.E.Kunkee, Malolactic fermentation. Adv. Appl. microbiol., 9, 1967, 235-279.
21. B.C. Rankine, J.C.M. Fornachon, D.A. Bridson, K.M. Celli, Malolactic fermentation in Australian dry red wine. J. Sci. Food Agri., 21, 1970, 471-476.
22. L.M.T. Dicks, H. Schoeman, M.A. Vivier, J.S. Pretorius, Taxonomy of malolactic bacteria and biological control of spoilage microorganisms in wine. International workshop held in Verona on April 17<sup>th</sup> 1998 organized by Lallemand, p.9-16

23. W.J. Kelly, R.V. Asmundson, D.H. Hopcroft, Growth of *Leuconostoc oenos* under Anaerobic conditions. *Am. J. Enol.Vitic.*, Vol. 40, No.4, 1989.
24. P.J. Costello, P.R. Monk, T.H. Lee, Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust.*, 35, 1983, p.14-18.
25. R.B. Beelman, A.Gavin, R.M. Keen, A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malolactic fermentation in Eastern wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol.27, No.3, 1977.
26. R.E. Kunkee, Malolactic fermentation and wine making in *Chemistry of wine making*. American chemistry society, Washington DC. *Adv. Chem. Ser.*137, p.151-170.
27. Roger B.Boulton, Vernon L.Singleton, Linda F.Bisson, Ralph E. Kunkee  
Principles and practices of winemaking. An Aspen publication Aspen Publisher, Inc.Gaithersburg, Maryland, 1998.
28. P.Rihereau-Gayon, Y.Glories, A.Maujean and D.Dubourdieu  
*Handbook of Enology*, volume 2. The chemistry of wine and stabilization and treatments. 2000, John Wiley and Sons Ltd.