

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.013

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH NẤM MEN TRONG LÊN MEN RƯỢU VANG CAM SÀNH (*Citrus nobilis* Var. *Typica* Hassk.)

Nguyễn Phúc Trường¹ và Nguyễn Văn Thành^{2*}

¹Học viên cao học ngành Công nghệ sinh học

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Thành (email: nvthanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 10/08/2021

Ngày nhận bài sửa: 30/09/2021

Ngày duyệt đăng: 26/02/2022

Title:

Isolation, selection and identification of natural yeasts for orange wine fermentation

Từ khóa:

Lên men, phân lập, rượu vang cam, *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords:

Fermentation, isolation, orange wine, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The study aimed to isolate and select high active yeast train from fermented orange juice to produce high quality orange wine. The results of study were followed, 15 yeast strains were isolated from orange juices in Tra Vinh, Vinh Long, and Can Tho. Based on the classification keys of yeasts (morphology, physiology, and biochemistry), the 15 isolated yeast strains were generally characterized as two genera: *Saccharomyces* and *Hanseniaspora*. Results of selective experiment from yeasts belong to *Saccharomyces* showed that the yeast strain TVK1 isolated from orange juice in Tra Vinh showed the best fermented activities such as the fastest fermentation by Durham test (14 hours) the highest ethanol content (13.0% v/v) and lowest remained sugar (7.17 °Brix). The orange wine fermented by the yeast TVK1 with the optimal fermentation parameters 0.15% pectinase enzyme, 23°Brix, pH 4.0 and 10⁷CFU/mL of yeast cell density inoculated and incubated at 30°C, 8 days of fermentation, the ethanol content has been reached to 13%(v/v). The orange wine product has good smell, taste and color. Identification of yeast by DNA sequencing showed the superior yeast strain TVK1 belong to *Saccharomyces cerevisiae*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt tính lên men cao từ quả cam sành, để lên men rượu vang cam sành chất lượng cao. Kết quả đã phân lập được 15 dòng nấm men từ dịch quả cam sành thu thập tại các tỉnh Trà Vinh, Vĩnh Long và thành phố Cần Thơ. Dựa vào khóa phân loại nấm men, 15 dòng nấm men phân lập thuộc 02 giống *Saccharomyces* và *Hanseniaspora*. Dòng nấm men TVK1 phân lập được từ dịch quả cam thu ở Trà Vinh thuộc giống *Saccharomyces* lên men rượu vang cam tốt nhất như lên men nhanh nhất (14 giờ), hàm lượng ethanol cao nhất (13,0% v/v) và lượng đường sót thấp nhất (7,17 °Brix). Rượu vang cam sành lên men từ nấm men TVK1 với các thông số ban đầu: 0,15% enzyme pectinase, 23°Brix, pH 4,0 và nấm men 10⁷tế bào/mL, lên men ở 30°C, 8 ngày cho độ cồn cao nhất (13% v/v), mùi vị thơm ngon, màu sắc sáng đẹp đặc trưng của sản phẩm rượu vang cam. Định danh dòng nấm men TVK1 bằng phương pháp giải trình tự DNA đã xác định được TVK1 tương đồng 99% với *Saccharomyces cerevisiae*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam sành là một giống cây ăn quả thuộc chi Cam chanh có quả gần như quả cam, có nguồn gốc từ Việt Nam. Quả cam sành rất dễ nhận ra nhờ lớp vỏ dày, sần sùi giống bề mặt mảnh sành và thường có màu lục nhạt (khi chín có sắc cam), các múi thịt có màu cam. Cam sành có tên khoa học là *Citrus nobilis* Lour. var. *nobilis* (Hiệp và ctv., 2004). Cam sành là loại quả giàu các chất dinh dưỡng như vitamin C, chất xơ, folate, chất chống oxy hóa nhưng rất ít calo và đường rất có lợi cho sức khỏe. Là một giống cây ăn quả thuộc chi Cam chanh phân bố rộng khắp Việt Nam từ Tuyên Quang, Hà Giang, Yên Bái tới Vĩnh Long, Tiền Giang, Hậu Giang, Cần Thơ nhưng nhìn chung cam sành thích hợp với vùng đất phù sa cổ màu mỡ, khí hậu mát ẩm. Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) có khoảng 30.000 ha cam sành, tập trung ở các tỉnh như Vĩnh Long, Hậu Giang, Cần Thơ, Trà Vinh, Đồng Tháp. Lâu nay, nhà vườn trồng cam sành tại ĐBSCL chưa có đầu mối bao tiêu ổn định, chủ yếu bán cho thương lái. Do sản lượng hiện nay quá nhiều dẫn đến cung vượt cầu nên cam bị rớt giá. Cam sành chủ yếu được sử dụng với dạng tươi, thời gian bảo quản tương đối ngắn nên thị trường tiêu thụ chưa rộng và giá cả chưa ổn định. Nghiên cứu chế biến rượu vang cam là vấn đề rất được quan tâm hiện nay. Nhằm tận dụng nguồn nông sản dồi dào này, góp phần nâng cao giá trị kinh tế và đáp ứng nhu cầu đa dạng của người tiêu dùng, việc nghiên cứu đưa loại trái cây này vào chế biến các sản phẩm thực phẩm là vấn đề cấp thiết. Một trong những phương pháp cải tiến nâng cao chất lượng là sử dụng nguồn nấm men tự nhiên được phân lập từ nguyên liệu cho quá trình sản xuất rượu vang sẽ cho rượu có độ rượu cao, chất lượng rượu ổn định và mùi vị đặc trưng (Phạm, 2009). Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn các dòng nấm men có hoạt lực cao từ dịch quả cam để sử dụng hiệu quả cho tiến trình lên men rượu vang cam sành chất lượng cao, góp phần đa dạng hóa sản phẩm, nâng cao giá trị kinh tế của cam sành, loại quả rất bổ dưỡng và phổ biến ở ĐBSCL.

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện nghiên cứu

Trái cam sành được thu hoạch ngẫu nhiên tại Trà Vinh, Vĩnh Long và Cần Thơ, sau đó được vận chuyển về Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Nấm men

Saccharomyces cerevisiae (Pháp (Lesaffre 59703 Macrq, France), nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (USA) (từ đại học Uni. of California UC Davis) và 1 dòng nấm men viên Hải Anh Quan được mua tại chợ Xuân Khánh – thành phố Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm men từ dịch nước cam lên men

Trái cam sành chín (sử dụng cả vỏ) đem ép lấy nước bằng máy ép nguyên liệu thu dịch quả và cho khoảng 10 mL vào bình tam giác 100 mL có môi trường YPD (Yeast extract Peptone-D-glucose) tăng sinh ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Môi trường YPDA (Yeast extract -Peptone-D-glucose-Agar) được phân lập đến khi có được những dòng nấm men thuần chủng và định danh các dòng nấm men này bằng phương pháp hình thái học (hình dạng, kích thước tế bào, nảy chồi) kết hợp với phương pháp sinh hóa (khả năng lên men đường, phân giải ure) dựa vào khóa phân loại nấm men của Kurtzman and Fell (1998), Lượng và ctv. (2006) và Phạm (2009).

2.2.2. Tuyển chọn nấm men có hoạt tính lên men cao từ các dòng nấm men phân lập

Nghiên cứu được thực hiện nhằm so sánh khả năng lên men và chọn ra dòng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất để lên men rượu vang cam.

Xử lý nguyên liệu trước khi lên men: Cam được ép lấy nước và được ủ với enzyme pectinase 0,15ml/100mL, 40°C trong 2 giờ để phân hủy pectin và vị đắng có trong nước cam; điều chỉnh pH 4,2, Brix 22 và thanh trùng ở 88- 91°C bằng microwave trong 15 giây (Nikdel & Mackellar, 1992). Tế bào nấm men được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh khối đến khi mật số tế bào nấm men đạt 10⁸ tế bào/mL dịch lên men. Dịch quả cam là 9 mL được cho vào ống nghiệm có chuông Durham, tiếp tục cho vào 1 mL dung dịch các dòng nấm men, vặn chặt nắp lại và lắc ngang phân tán đều (quan sát thấy hết sủi bọt khí). Song song đó, thí nghiệm được tiến hành trong bình tam giác với 99 mL dịch quả cam + 1 mL dịch nấm men, lên men 8 ngày ở nhiệt độ 30°C. Độ rượu được đo bằng phương pháp chưng cất, độ Brix đo bằng Brix kế. Dòng nấm men có hoạt lực lên men tốt nhất được tuyển chọn dựa vào thời gian lên men nhanh nhất và cho độ rượu cao nhất.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của các nhân tố đến quá trình lên men rượu vang cam

Nghiên cứu sự ảnh hưởng của các nhân tố chính: Mật số nấm men (MSNM), độ Brix, pH đến quá trình lên men rượu vang cam nhằm tìm ra nghiệm

thức/tổ hợp thích hợp nhất cho lên men rượu vang cam. Thí nghiệm được bố trí theo phương thức thừa số với 3 nhân tố, 3 mức độ và 3 lần lặp lại. Nhân tố A: Độ Brix là 18, 23, 27 (A1, A2, A3); nhân tố B: pH dịch lên men là 3,5, 4,0, 4,5 (B1, B2, B3); nhân tố C: Mật số nấm men (tế bào/mL) là 10^3 , 10^5 , 10^7 tế bào/1mL (C1, C2, C3).

2.2.4. Tối ưu hoá quy trình lên men rượu vang cam

Thí nghiệm được tiến hành lên men với các chỉ tiêu tối ưu đã tìm được ở các thí nghiệm trên bao gồm độ Brix và pH ban đầu, dòng nấm men, mật số nấm men. Thí nghiệm được thực hiện với thể tích 1,5 lít. Kết thúc quá trình lên men rượu vang cam sẽ tiến hành phân tích các chỉ tiêu hóa lý: độ cồn, ester, aldehyde, methanol, acetic acid, SO_2 và đánh giá cảm quan sản phẩm rượu vang cam theo “Quy trình đánh giá cảm quan sản phẩm rượu vang trái cây theo tiêu chuẩn Việt Nam 3215-79”.

2.2.5. Định danh nấm men bằng phương pháp giải trình tự gen

Dòng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất được chọn để giải trình tự đoạn gen bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Korabecna, 2007) và sử dụng chương trình Nucleotide Blast để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với trình tự của

các dòng nấm men trong ngân hàng gen trên NCBI với phần mềm BLASTN.

2.3. Các chỉ tiêu phân tích và xử lý thống kê

Các chỉ tiêu phân tích: Xác định pH bằng pH kế, xác định độ Brix bằng khúc xạ kế và xác định hàm lượng ethanol sinh ra qua hệ thống chưng cất và hiệu chỉnh về 20°C (Thuờng và Hằng, 2007). Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV.I.

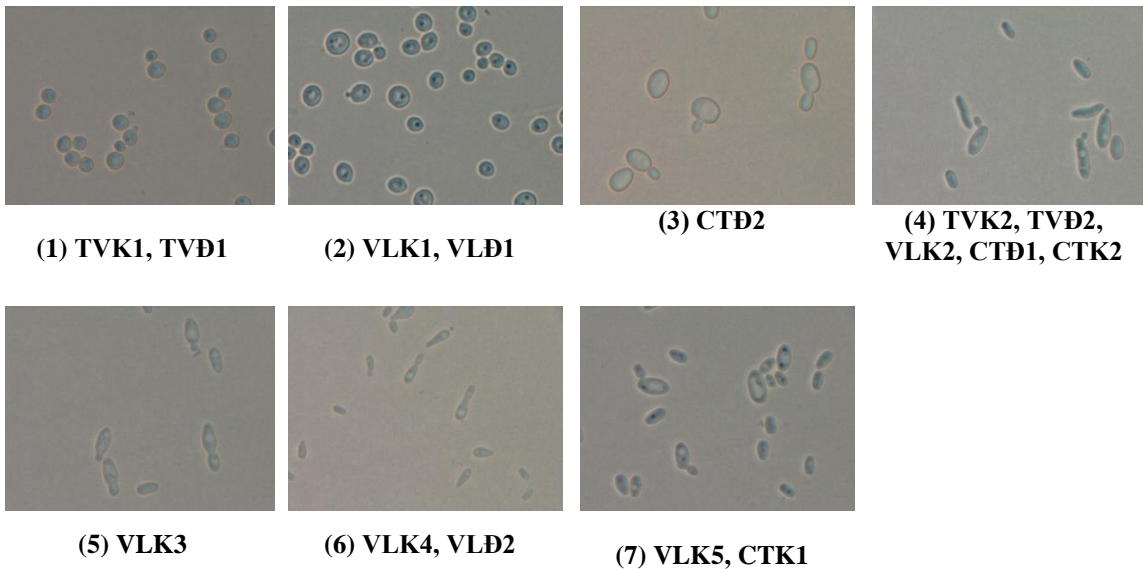
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh đến mức độ giống các dòng nấm men phân lập từ quả cam sành lên men

Theo Lượng (2003), có thể định danh sơ bộ các dòng nấm men dựa vào đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh lý sinh hóa của nấm men. Đặc điểm hình thái nấm men bao gồm mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường YPDA sau 2 – 3 ngày, hình thái tế bào, kiểu nảy chồi của tế bào nấm men, sự hình thành bào tử trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Đặc điểm sinh lý sinh hóa bao gồm: khả năng lên men đường glucose, sucrose và khả năng phân giải urea của nấm men.

3.1.1. Đặc điểm hình thái của 15 dòng nấm men được phân lập

Theo Phẩm (2009), tế bào nấm men có hình dạng phổ biến như hình cầu, hình oval, hình elip, hình trụ hoặc đôi khi kéo dài thành hình sợi.



Hình 1. Hình dạng 7 nhóm nấm men của 15 dòng nấm men phân lập được

Kết quả mô tả đặc điểm hình thái tế bào nấm men cho thấy 15 dòng nấm men có thể xếp thành 7 nhóm hình dạng đặc trưng như sau:

Nhóm 1: nấm men có hình cầu nhỏ, gồm dòng nấm men TVK1, TVĐ1

Nhóm 2: nấm men có hình cầu lớn, gồm dòng nấm men VLK1, VLĐ1

Nhóm 3: nấm men có hình ovan, gồm dòng nấm men CTĐ2

Nhóm 4: nấm men có hình elip dài, gồm: TVK2, TVĐ2, VLK2, CTĐ1, CTK2

Nhóm 5: nấm men có hình elip nhọn gồm dòng nấm men VLK3

Nhóm 6: nấm men có hình elip nhỏ gồm dòng nấm men VLK4, VLĐ2

Nhóm 7: nấm men có hình elip gồm dòng nấm men VLK5, CTK1

3.1.2. Đặc điểm nảy chồi của 15 dòng nấm men phân lập

Theo Phạm (2009), nảy chồi là hình thức sinh sản vô tính điển hình của nấm men. Chồi có thể mọc ra theo bất kỳ hướng nào (nảy chồi đa cực) hoặc nảy chồi lưỡng cực hoặc chỉ nảy chồi ở một cực nhất định (nảy chồi một cực). Quan sát nảy chồi của 15 dòng nấm men, đại diện là 7 nhóm hình dạng như đã trình bày ở trên, kết quả cho thấy có 2 hình thức nảy chồi là nảy chồi nhiều hướng và nảy chồi lưỡng cực. Kết quả quan sát sự nảy chồi của các nhóm được thể hiện ở Hình 1.

3.1.3. Đặc điểm hình thành bào tử của 15 dòng nấm men phân lập

Theo Phạm (2009), khả năng tạo bào tử và hình dạng của bào tử là dấu hiệu loài của nấm men. Nấm men chỉ hình thành bào tử trong môi trường nghèo chất dinh dưỡng. Kết quả hình thành bào tử của các dòng nấm men phân lập được trong môi trường thạch nước cho thấy sau 6 tuần nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C có 7 nhóm nấm men hình thành bào tử được mô tả ở Hình 1 và Bảng 1.

Bảng 1. Tổng hợp đặc điểm hình thái và sinh hóa của 15 dòng nấm men được phân lập

Nhóm hình dạng nấm men	Dòng nấm men	Đặc điểm hình thái		Hình thành bào tử	Đặc điểm sinh hóa		
		Hình dạng nấm men	Tế bào nảy chồi		Khả năng lên men đường		Khả năng đồng hóa urea
					Glucose	Saccharose	
1	TVK1, TVĐ1	Cầu nhỏ	Nhiều hướng	1 – 2 bào tử hình tròn	+	+	-
2	VLK1, VLĐ1	Cầu lớn	Nhiều hướng	1 – 2 bào tử hình tròn	+	-	-
3	CTĐ2	Ovan	Nhiều hướng	1 – 2 bào tử hình tròn	+	-	-
4	TVK2, TVĐ2, VLK2, CTĐ1, CTK2	Elip dài	Nhiều hướng	1 – 2 bào tử hình tròn	+	-	-
5	VLK3	Elip nhọn nhỏ	Lưỡng cực	1 – 2 bào tử hình tròn	+	-	-
6	VLK4, VLĐ2	Elip nhỏ	1 cực	1 – 2 bào tử hình tròn	+	-	-
7	VLK5, CTK1	Elip	Nhiều hướng	1 – 2 bào tử hình tròn	+	-	-

(Ghi chú: +: đồng hóa hoặc lên men -: không đồng hóa hoặc không lên men)

3.1.4. Khả năng lên men đường glucose, sucrose trong chuồng Durham và phân giải urê của 48 dòng nấm men

Khả năng lên men các loại đường là một trong những chỉ tiêu quan trọng được sử dụng để phân loại nấm men. Khả năng lên men đường của 48 dòng nấm men phân lập được nuôi cấy trên các loại đường glucose và sucrose (2%) trong ống nghiệm 10 mL

có chuồng Durham theo phương pháp của Kurtzman and Fell (1998) được thể hiện ở Bảng 1.

Sự thay đổi màu sắc của môi trường Christensen khi nuôi cấy nấm men phân lập sau thời gian ủ 7 ngày thể hiện hoạt tính phân giải urea của các dòng nấm men được thể hiện qua Bảng 1. Theo phương pháp định danh của Dũng và ctv. (1972), nếu nấm men có khả năng sinh enzyme urease để phân giải

urea thì môi trường sẽ chuyển sang màu đỏ sẫm. Nguyên nhân là do môi trường Christensen có chứa chất chỉ thị màu phenol red, môi trường có màu vàng ở pH = 6,8. Khi nấm men có enzyme urease để phân giải urea thành CO₂ và NH₃, lượng NH₃ tăng lên làm pH tăng khiến môi trường chuyển sang màu đỏ. Kết quả quan sát sự chuyển màu không có nhóm nào phản ứng với urea.

Qua kết quả tổng hợp các đặc điểm phân loại nấm men của 15 dòng nấm men, đặc điểm hình thái nấm men và đặc điểm sinh hóa có thể định danh sơ bộ 15 dòng nấm men như sau:

Các dòng nấm men thuộc nhóm 1 (TVK1, TVĐ1) hình cầu nhỏ, nhóm 2 (VLK1, VLĐ1) hình cầu lớn, nhóm 3 (CTĐ2) hình ovan, nhóm 4 (TVK2, TVĐ2, VLK2, CTĐ1, CTK2) hình elip dài và nhóm 7 (VLK5, CTK1) hình elip có những đặc điểm gần giống nhau như: tế bào sinh dưỡng nảy chồi nhiều hướng, sinh sản hữu tính bằng cách hình thành bào tử túi, mỗi túi bào tử chứa 1 – 2 bào tử hình tròn, sử dụng đường lên men, không đồng hóa urea. Những đặc điểm này tương tự với mô tả hình thái, phân loại sơ bộ đến giống/chi nấm men *Saccharomyces* của Lượng và ctv. (2003), Kurtzman and Fell (1998) với mô tả giống nấm men *Saccharomyces* có tế bào sinh dưỡng nảy chồi nhiều hướng, hình cầu, hình ovan, elip kéo dài, tạo thành 1 – 4 bào tử hình tròn, bề mặt nhẵn, sử dụng đường lên men và không đồng hóa urea. Như vậy, có thể kết luận 12 dòng nấm men phân lập TVK1, TVĐ1, VLK1, VLĐ1, VLK2, CTĐ1, CTK2, TVK2, TVĐ2, CTĐ2, VLK5, CTK1 là giống nấm men *Saccharomyces*.

Dòng nấm men thuộc nhóm 5 (VLK3) nấm men hình elip nhọn và nhóm 6 (VLK4, VLĐ2) nấm men

hình elip nhỏ có đặc điểm: tế bào sinh dưỡng nảy chồi lưỡng cực, đơn cực, 1 – 2 bào tử hình tròn, sử dụng đường lên men, không đồng hóa urea. Những đặc điểm này tương tự với mô tả hình thái, phân loại sơ bộ đến giống nấm men *Hanseniaspora* của Phẩm (2005) và Kurtzman and Fell (1998) với mô tả giống *Hanseniaspora* có tế bào nảy chồi 1 cực hay 2 cực, các tế bào hình ô van hay dạng quả chanh châu Âu, 1- 4 bào tử hình mũ hay hình cầu, sử dụng đường lên men và không đồng hóa urea. Như vậy, có thể kết luận 3 dòng nấm men phân lập VLK3, VLK4, VLĐ2 là giống nấm men *Hanseniaspora*.

Kết quả cho thấy ở 3 địa điểm thu mẫu Trà Vinh, Vĩnh Long, Cần Thơ với điều kiện lên men tự nhiên và lên men có bổ sung đường đã phân lập được 15 dòng nấm men, bước đầu định danh 15 dòng nấm men này thuộc 2 giống nấm men *Saccharomyces* và *Hanseniaspora*.

3.2. Hoạt tính lên men của các dòng nấm men phân lập thuộc giống *Sacharomyces*

Mười dòng nấm men thuộc giống *Saccharomyces* được chọn để tiến hành khảo sát và so sánh với khả năng lên men với các dòng nấm men đối chứng. Thí nghiệm được tiến hành đồng thời trong chuông Durham và bình tam giác.

3.2.1. Hoạt tính lên men dịch quả của các dòng nấm men phân lập trong chuông Durham

Chiều cao cột khí CO₂ trong chuông Durham thể hiện cường độ lên men của các dòng nấm men ở từng thời điểm lên men khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy có sự khác biệt về khả năng lên men nước cam của các chủng nấm men phân lập men giữa các dòng nấm men.

Bảng 2. Chiều cao cột khí CO₂ (cm) của 13 dòng nấm men theo thời gian lên men

TT	Dòng nấm men	Thời gian lên men (giờ)				
		5	10	12	14	16
1	CTK1	-	-	-	0,1	0,4
2	CTK2	-	-	-	0,2	0,5
3	CTĐ2	-	0,2	0,4	0,8	1,5
4	VLK1	-	0,2	0,5	0,7	1,5
5	VLK2	-	-	-	-	0,2
6	VLK3	-	-	0,4	0,5	1,0
7	VLK4	-	-	0,3	0,5	1,0
8	VLK5	-	-	-	-	0,2
9	TVK1	0,5	1,5	2,5	4,5	
10	TVK2	-	0,1	0,2	0,3	0,5
11	Men Pháp	0,2	1,0	2,0	4,0	4,5
12	Men viên	0,1	0,6	1,5	3,0	4,0
13	<i>S.cerevisiae</i> (USA)	0,5	1,5	2,8	4,0	4,5

*Ghi chú: - chưa xuất hiện cột khí; số liệu trong bảng tính bằng cm, 4,5cm là chiều cao tối đa của ống Durham

Qua kết quả khảo sát (Bảng 2), dòng nấm men phân lập TVK1 có hoạt tính lên men mạnh nhất (làm đầy 100% ống Durham trong 14 giờ), các dòng còn lại lên men dài hơn (16 giờ). Theo Phạm (2005), trong điều kiện hiếm khí, nấm men sử dụng lượng nguồn cacbon (chủ yếu là đường) tạo ra sản phẩm chủ yếu là ethanol và khí CO₂. Lượng khí CO₂ sinh ra sẽ đẩy ống Durham, đo cột khí CO₂ sinh ra để xác định sự lên men mạnh hay yếu. Kết quả Durham này chỉ là cơ sở ban đầu cần phải kết hợp với phương pháp lên men trong bình tam giác mới có thể xác định dòng nấm men có hoạt lực lên men cao nhất.

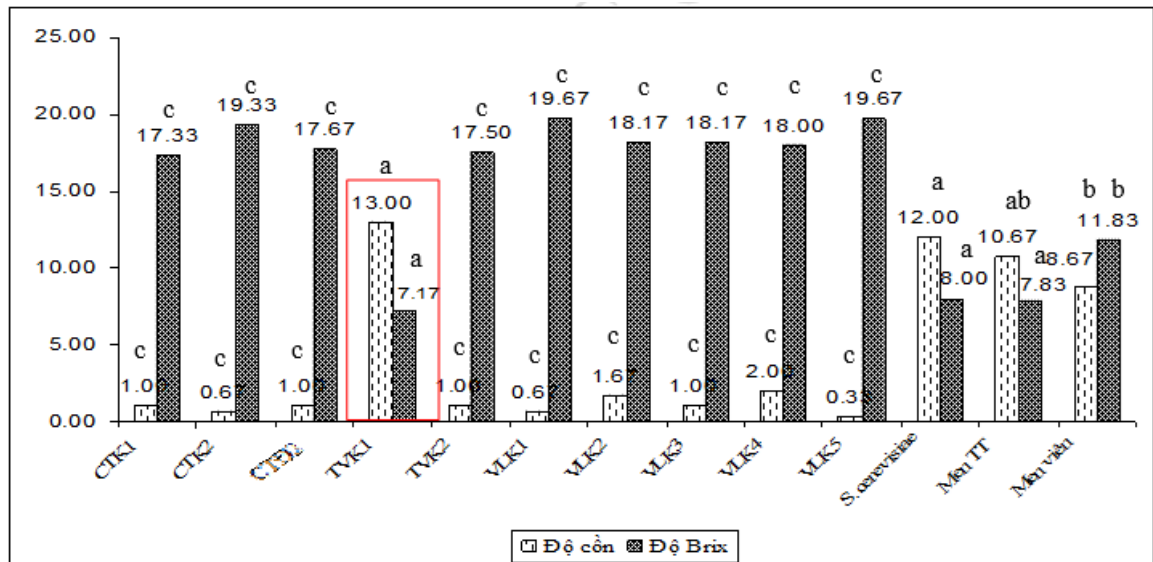
Qua kết quả khảo sát (Bảng 2), vì dòng nấm men phân lập TVK1 có hoạt tính lên men mạnh nhất nên có thời gian đầy 100% ống Durham (14 giờ), nhanh

hơn các dòng nấm men khác. Theo Phạm (2005), trong điều kiện hiếm khí, nấm men sử dụng lượng nguồn cacbon (chủ yếu là đường) tạo ra sản phẩm chủ yếu là ethanol và khí CO₂. Lượng khí CO₂ sinh ra sẽ đẩy ống Durham, đo cột khí CO₂ sinh ra để xác định sự lên men mạnh hay yếu.

3.2.2. Hoạt tính lên men dịch quả của các dòng nấm men phân lập trong bình tam giác

Thí nghiệm được thực hiện nhằm khảo sát khả năng lên men được tiến hành với mật số nấm men 10⁶ tế bào/mL, thời gian ủ là 8 ngày ở 30°C, pH 4,0 và 22°Brix. Kết quả được trình bày trong Hình 2.

Khả năng lên men của các dòng nấm men phân lập so với nấm men thị trường



Hình 2. Độ còn và độ Brix sau lên men của các dòng nấm men (**Saccharomyces cerevisiae* USA), Men TT (*Saccharomyces cerevisiae* (France), men viên Hải Anh Quan

Kết quả ở Hình 2 cho thấy dòng nấm men TVK1 có khả năng lên men cho độ rượu cao nhất (13% v/v) và độ Brix giảm thấp (7,17°Brix), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các dòng nấm men đã phân lập còn lại và có độ rượu cao hơn độ rượu thu được của dòng nấm men đối chứng (12, 10,67 và 11,83% v/v). Mặt khác, TVK1 cũng là dòng nấm men lên men nhanh nhất trong chuông Durham.

Theo Phạm (2009), độ Brix biểu thị hàm lượng đường tổng số của một dung dịch. Sự biến đổi của hàm lượng đường trong quá trình lên men là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng lên men của các dòng nấm men. Trong quá trình lên men, nấm men sử dụng đường trong điều kiện kỵ khí tạo thành rượu

etylic. Sau khi lên men rượu, hàm lượng đường còn sót lại nhiều sẽ ảnh hưởng đến mùi vị sản phẩm, vì đường sót sẽ được vi khuẩn lactic sử dụng tạo thành lactic acid, làm chua dịch lên men. Độ rượu là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng lên men rượu của nấm men. Vì thế, độ rượu càng cao và hàm lượng đường sót lại thấp sau khi lên men thể hiện năng lực chuyển hóa đường thành rượu và hiệu suất lên men rượu của nấm men cao. Do đó, dòng nấm men TVK1 được chọn là dòng nấm men tốt nhất để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo và cũng được định danh bằng phương pháp giải trình tự.

3.3. Ảnh hưởng của các nhân tố pH, độ Brix, mật số nấm men ban đầu đến quá trình lên men rượu vang cam

Thí nghiệm được bố trí với 3 nhân tố và 3 mức độ: pH (3,5, 4,0, 4,5), độ Brix (18, 23, 27) và mật số nấm men (10^3 , 10^5 , 10^7 tế bào/mL), để tìm ra nghiệm thức tốt nhất. Sau 8 ngày lên men, kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Độ cồn, Brix và pH sau lên men từ dòng nấm men TVK1

NT	Tổ hợp pH, Brix, mật số nấm men	pH	Brix	Độ cồn
1	3,5 - 18 - 10^3	3,73	6,00	10,00 ^{defg}
2	3,5 - 18 - 10^5	3,72	6,50	10,50 ^{cdef}
3	3,5 - 18 - 10^7	3,70	6,50	9,50 ^{efg}
4	3,5 - 23 - 10^3	3,74	9,75	11,50 ^{abcd}
5	3,5 - 23 - 10^5	3,76	8,50	11,50 ^{abcd}
6	3,5 - 23 - 10^7	3,74	8,50	10,00 ^{defg}
7	3,5 - 27 - 10^3	3,72	17,00	11,00 ^{bcde}
8	3,5 - 27 - 10^5	3,74	17,50	11,50 ^{abcd}
9	3,5 - 27 - 10^7	3,76	18,00	10,00 ^{defg}
10	4,0 - 18 - 10^3	4,00	6,25	8,50 ^{gh}
11	4,0 - 18 - 10^5	4,04	6,00	10,00 ^{defg}
12	4,0 - 18 - 10^7	3,97	6,00	9,00 ^{fgh}
13	4,0 - 23 - 10^3	4,29	8,00	12,00 ^{abc}
14	4,0 - 23 - 10^5	4,18	8,00	11,50 ^{abcd}
15	4,0 - 23 - 10^7	4,08	8,00	13,00 ^a
16	4,0 - 27 - 10^3	4,10	14,25	12,50 ^{ab}
17	4,0 - 27 - 10^5	4,13	13,75	12,00 ^{abc}
18	4,0 - 27 - 10^7	4,12	13,50	12,00 ^{abc}
19	4,5 - 18 - 10^3	4,29	6,75	7,50 ^h
20	4,5 - 18 - 10^5	4,56	7,00	9,00 ^{fgh}
21	4,5 - 18 - 10^7	4,39	7,00	10,00 ^{defg}
22	4,5 - 23 - 10^3	4,04	10,75	12,00 ^{abc}
23	4,5 - 23 - 10^5	4,46	9,50	12,00 ^{abc}
24	4,5 - 23 - 10^7	4,53	8,75	12,50 ^{ab}
25	4,5 - 27 - 10^3	4,06	14,50	11,00 ^{bcde}
26	4,5 - 27 - 10^5	4,55	12,00	11,50 ^{abcd}
27	4,5 - 27 - 10^7	4,46	13,00	11,50 ^{abcd}

*Ghi chú: Các số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$)

Kết quả cho thấy các nghiệm thức có độ Brix ban đầu là 18, nhìn chung cho độ rượu thấp hơn so với nghiệm thức ở độ Brix 23 và độ Brix 27. Kết quả này chứng tỏ rằng những nghiệm thức được bố trí với độ Brix cao sẽ có độ rượu tương đối cao hơn so với những nghiệm thức được bố trí với độ Brix thấp. Tuy nhiên, các nghiệm thức với độ Brix 27 (7, 8, 9, 16, 17, 18, 25, 26, 27) sau khi lên men độ Brix còn lại khá cao nhưng độ cồn vẫn chưa đạt giá trị cao nhất. Bên cạnh đó, khi quan sát về sự tác động của

mật số nấm men lên quá trình lên men rượu, những nghiệm thức có mật số nấm men 10^3 tế bào/mL lên men không tốt bằng những nghiệm thức có mật số nấm men 10^5 , 10^7 tế bào/mL.

Mặt khác, những nghiệm thức dịch phối chế ban đầu trong cùng độ Brix và mật số nấm men, ở các giá trị pH ban đầu là 4,0, nấm men hoạt động tốt hơn và cho độ rượu cao ở các nghiệm thức ở pH = 3,5 và pH = 4,5. Theo Nguyễn Công Hà (2000), nấm men phát triển tốt ở pH từ 3,8 đến 4,0. Nguyên nhân là do sự hoạt động của nấm men trong quá trình lên men kỵ khí sinh ra CO_2 và một số acid hữu cơ làm giảm pH của dịch phối chế ban đầu (Phẩm, 2009). Như vậy, pH ở các nghiệm thức mặc dù giảm vẫn phù hợp cho nấm men phát triển.

Theo Phẩm (2009), độ rượu là chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng lên men rượu của nấm men. Độ rượu cao cũng là điều kiện tốt trong quá trình bảo quản vì ở độ rượu cao có thể ức chế vi khuẩn phát triển. Kết quả trình bày ở Bảng 3 cho thấy nghiệm thức 15 (với pH 4,0, Brix 23, mật số nấm men 10^7 tế bào/mL) cho độ rượu cao nhất là 13 %v/v, không khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức: 16, 24 (12,5% v/v); 13, 17, 18, 22, 23 (12% v/v); 4, 5, 8, 14, 26, 27 (11,50% v/v). Tuy nhiên, nghiệm thức 15 cho độ rượu cao nhất là 13 % (v/v), vẫn còn thấp hơn nghiệm thức cao nhất trong nghiên cứu rượu vang mít của Hơ (2017) là 15,08% (v/v). Nguyên nhân có thể là nguồn nguyên liệu mít có độ đường cao và có một số chất thích hợp hơn cho nấm men trong quá trình sản xuất rượu vang. Tuy nhiên, kết quả thí nghiệm là tương đương với nghiên cứu của Vũ và Thành (2018) khi nghiên cứu lên men rượu vang dâu hạ châu lượng cồn thu được cũng chỉ cao nhất là 13,33% (v/v), có thể 2 loại nước trái này tương đương nhau và thấp hơn lượng đường trong mít. Mặt khác, kết quả thí nghiệm cao hơn nhiều kết quả nghiên cứu của Niêm và ctv. (2018) khi nghiên cứu phân lập và tuyển chọn dòng nấm men lên men rượu cà na với điều kiện lên men ban đầu pH 3,5, độ Brix 20 và mật số nấm men 10^6 tế bào/mL, dịch lên men kết quả đạt được hàm lượng ethanol 7,44% (v/v).

Kết quả thể hiện ở Bảng 5 là kết quả thực nghiệm với nghiệm thức 15 (pH = 4, 23°Brix và MSNM 10^7 tế bào/mL) cho độ rượu cao nhất 13% v/v.

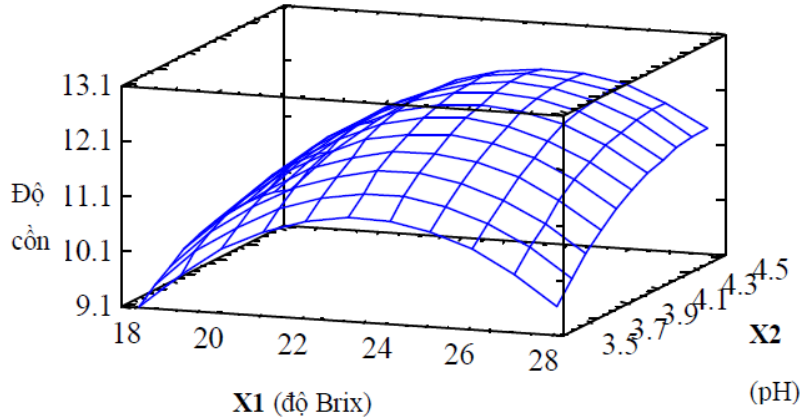
Kết quả độ cồn đo được ở Bảng 3 là kết quả thực nghiệm, các thông số pH, độ Brix, mật số nấm men tối ưu được tìm ra thông qua phân tích hồi quy dựa trên số liệu thu thập được bằng chương trình Statgraphics plus 4.0 với độ tin cậy 95%.

Từ đó phương trình hồi quy như sau:

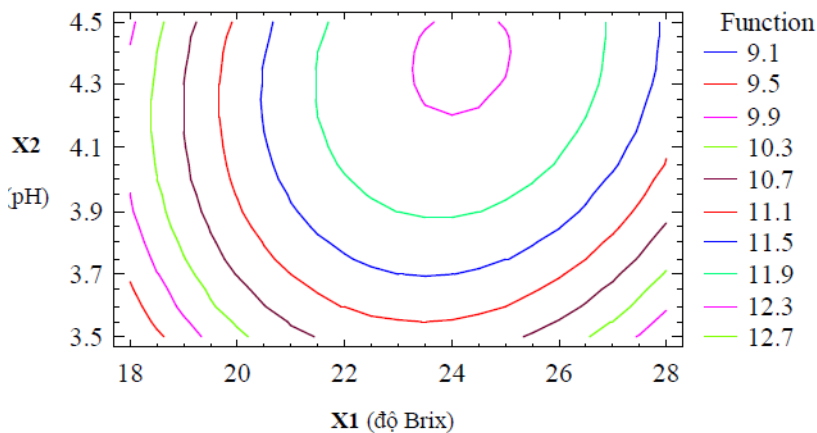
$$Y = - 14,28 + 1,63256.X_1 - 4,42668.X_3 + 3,3495.X_2 - 0,0635802.X_1^2 + 0,135246.X_1.X_3 + 0,406762.X_1.X_2 - 0,0763889.X_3^2 + 1,49385.X_3.X_2 - 1,88889.X_2^2 - 0,0420082.X_1.X_3.X_2; R^2= 75,3491$$

(với Y là độ cồn tính toán, X₁ (độ Brix), X₂ (pH), X₃ (mật số nấm men))

Biểu đồ mặt đáp ứng (Hình 3) và biểu đồ đường đồng mức (Hình 4) từ phương trình hồi quy như sau:



Hình 3. Biểu đồ mặt đáp ứng thể hiện sự tương quan giữa độ Brix và pH ban đầu đến quá trình tạo ethanol



Hình 4. Biểu đồ đường đồng mức thể hiện sự tương quan giữa độ Brix và pH đến quá trình tạo ethanol

Kết quả thống kê cho thấy với mật số nấm men ($10^3, 10^5, 10^7$ tế bào/mL) khác biệt không ý nghĩa, vì vậy cố định mật số nấm men chúng vào ban đầu là 10^7 tế bào/mL vì mật số nấm men 10^7 tế bào/mL cũng nằm trong tổ hợp nghiệm thức 15 cho độ rượu cao nhất (13% v/v). Thay các giá trị X₁, X₂ và X₃ vào phương trình hồi quy ta tìm được

độ Brix tối ưu sẽ là 22 và pH tối ưu là 4,3. Độ cồn tính toán là 12,07% (v/v).

Như vậy, kết quả giải phương trình hồi quy cho thấy độ rượu tính toán được là 12,07% (v/v). Độ mật số nấm men cố định là 10^7 thì pH tối ưu là 4,3 và độ

Brix tối ưu là 22. Các thông số tối ưu này cho sản phẩm có độ rượu là 12,07% v/v thấp không nhiều so với độ rượu thực nghiệm ở nghiệm thức 15 (13% v/v). Kết quả này cho thấy bố trí thí nghiệm đã gần tối ưu với nghiệm thức 15 (pH = 4, °Brix = 24 và MSNM = 10^7 tế bào/mL) và lượng rượu đạt được xem như tối ưu 13% v/v.

3.4. Tối ưu hóa quy trình lên men rượu vang cam

Thí nghiệm được thực hiện với các chỉ tiêu tối ưu ở các thí nghiệm trên dùng nấm men sử dụng là TVK1, pH 4,3, độ Brix 22, mật số nấm men 10^7 tế bào/mL.

Kết thúc quá trình lên men rượu vang cam thu được sẽ đem phân tích các chỉ tiêu ethanol, methanol, acid tổng, ester, SO₂, aldehyde, kết quả được nêu trong Bảng 4.

Bảng 4. Các chỉ tiêu phân tích sản phẩm rượu vang (*)

Các chỉ tiêu phân tích	Giá trị các chỉ tiêu trong TCVN	Rượu vang cam có sử dụng enzyme pectinase
Ethanol (%v/v)		13% v/v
Ester	(TCVN 1273:86)	624,8 mg/l R100°
Methanol (g/l)	< 0,1% (TCVN 1273:86)	< 0,1%
acetic acid (g/l)	< 1,5 g/l (TCVN 1273:86)	0,33 g/l/R100°
SO ₂ (mg/l)	< 350 mg/l (TCVN 7045:02)	1,60 mg/lR100°
Aldehyde	< 50 mg/lR100° (TCVN 1273:86)	0,0 mg/lR100°

*Kết quả phân tích từ Trung tâm Y tế Dự phòng – thành phố Cần Thơ

Các chỉ tiêu khác của mẫu rượu nằm trong tiêu chuẩn cho phép và không bổ sung enzyme pectinase (Mẫu 2) được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả đánh giá cảm quan rượu vang cam giữa 2 mẫu có bổ sung enzyme pectinase 0,15% (Mẫu 1)

Bảng 5. Kết quả đánh giá cảm quan rượu vang cam (theo TCVN 1273:86)

Rượu vang cam	Độ trong và màu sắc	Mùi	Vị	Ý thích
	4,66	3,66	4,0	4,0

– Mùi: Mẫu rượu cam tương có mùi thơm đặc trưng cho sản phẩm nhưng hơi khó nhận thấy.

– Vị: Có vị ngọt vừa phải, đặc trưng cho sản phẩm.

– Ý thích: Sản phẩm rượu vang cam đạt giá trị cảm quan tốt.

3.5. Định danh dòng nấm men TVK1 bằng phương pháp giải trình tự

Dòng TVK1 được định danh bằng phương pháp giải và phân tích trình tự gene 18S rRNA. Kết quả giải trình tự như sau:

GGGCCTTCGTAATTTAGTAATATTTGAA
 ATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGA
 GAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGA
 TGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGT
 GCGCGGTCTTGCTAGGCCTGTAAGTTTCTTT
 CTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTG
 TGCTTTTGTTATAGGACAATTAACCCTT
 TCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATAT
 CTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCA
 ATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAC
 AATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAA
 AACAAGAATTTTCGTAACACTGGAAATTTTAA
 AATATTAACAACTTCAACAACGGATCTCT
 TGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATT
 CCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
 TGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCC

TGTTTGAGCGTCATTCCTTCTCAAACATTC
 TGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGT
 TAACCTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGAT
 GTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCG
 TGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTT
 TTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTT
 TATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATA
 AGAAGAGAGCGTCTAGGCCAACAATGTTC
 TAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGT
 ACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCG
 GAGGAAAAGGATCATTAAAGAAATTTAAT
 AATTTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCA
 GAGCATGAGAGCTTTTACTGGGGCAAGAA
 GACAGAGATGGGAGAGTCCAGCCCCGGGCC
 TGCGCTTAAGTGCGCGGATCTTGCTAGGGC
 TTGTTAGTTTTCTTTCTTGCTTATTCAACGG
 TGAGCAGATTTCTGTGCTTTGTTGATAGGA
 CATTAAACGATTCATACAACACACGCTGAGT
 TCGTTCTGCACTTTTCTTTGGGCAATCCGT
 AGCATCAGGGGGGCTAGA

Trình tự đoạn gene được giải gồm 1.100 base nitrogen và đoạn gene này được so sánh với các gene 18S rRNA của nấm men trong ngân hàng gene trên NCBI với phần mềm BLASTN. Kết quả nhận được cho thấy đoạn gene 18S rRNA của dòng nấm men TVK1 có độ tương đồng đến 99% so với trình tự gene 18S rRNA của *Saccharomyces cerevisiae* isolate YN3 với số đăng ký trên ngân hàng gene quốc tế là (KJ5026621) (Hình 5).

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomyces cerevisiae isolate YN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer	1469	1778	98%	0.0	99%	KJ502662.1
Saccharomyces cerevisiae isolate B-NC-12-0203 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom	1465	1465	73%	0.0	99%	KF728786.1
Saccharomyces cerevisiae isolate YN2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer	1463	1773	98%	0.0	99%	KJ502661.1
Saccharomyces cerevisiae strain Chicha 05 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp	1461	1771	98%	0.0	99%	KC183726.1
Saccharomyces cerevisiae strain ZP 541 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	1461	1760	97%	0.0	99%	EU145764.1

Download GenBank Graphics Sort by: E value Next Previous Descriptions

Saccharomyces cerevisiae isolate YN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [gb|KJ502662.1](#) Length: 841 Number of Matches: 2

Related Information

Hình 5. Sự tương đồng của dòng TVK1 với dòng *Saccharomyces cerevisiae* YN3 có đăng kí trên ngân hàng gene quốc tế là KJ5026621

Kết quả định danh đã xác định dòng TVK1 là *Saccharomyces cerevisiae*. Đây là loại nấm men hữu dụng trong công nghiệp sản xuất rượu, nó không chỉ lên men dịch quả hay môi trường chứa hàm lượng đường cao mà còn tạo ra những sản phẩm với hương vị đặc trưng. *Saccharomyces cerevisiae* có dạng hình cầu, oval hoặc elip, hình thái thay đổi tùy theo loài và môi trường nuôi cấy nấm men, cấu tạo đơn bào, sinh sản chủ yếu bằng cách nảy chồi, có thể đồng hóa phosphor, kali và các hợp chất hữu cơ. Loài *Saccharomyces cerevisiae* có thể lên men ở nồng độ rượu cao, *S. cerevisiae* được phân lập từ rượu vang thốt nốt có thể lên men rượu có nồng độ 15% v/v rượu (alcohol) trong môi trường (Kumar et al., 2011).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 15 dòng nấm men từ quả cam thu tại vườn ở thành phố Cần Thơ, Vĩnh Long và Trà Vinh. Dựa trên mô tả đặc điểm hình thái và sinh lý sinh hóa bước đầu đã xác định được chúng thuộc 2 giống nấm men *Saccharomyces* và *Hanseniaspora*. Dòng nấm men TVK1 phân lập từ dịch cam Trà Vinh lên men tự nhiên (được tuyển chọn từ 10 dòng nấm men phân lập thuộc giống *Saccharomyces*) là dòng nấm men có hoạt lực lên men cao nhất (độ rượu đạt được 13% v/v). Rượu vang cam lên men từ dòng nấm men TVK1, dịch quả cam được xử lý enzyme pectinase 0,15%, cho hàm lượng ethanol 13% (v/v), mùi vị thơm ngon, màu sắc sáng đẹp đặc trưng của sản phẩm rượu vang cam. Phương pháp giải trình tự được sử dụng để định danh, kết quả đã xác định dòng TVK1 là loài *Saccharomyces cerevisiae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Korabecna, M., (2007). The Variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2, 783-787.

Kumar, R.S., Shankar, T., & Anandapandian, K.T.K.. (2011). Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. *International Research Journal of Microbiology*, 2(10), 399-405.

Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (1998). "The Yeasts, a Taxonomic Study," 4th Edition, Elsevier, Amsterdam, 77-102.

Nikdel, S., & MacKellar, D. (1992). A microwave system for continuous pasteurization of orange juice. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 105, 108 – 110.

Phạm, L. Đ. (2009). *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.

Thường, N. Đ., & Hằng, N. T. (2007). *Công nghệ sản xuất và kiểm tra rượu ethylic*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.

Lượng, N. Đ. (2003). Công nghệ vi sinh vật - Tập 3. *Thực phẩm lên men truyền thống*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Lượng, N. Đ., Huyền, P. T., & Tuyết, N. A. (2006). *Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2 – Thí nghiệm vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

- Hiệp, N. H., Dũng, T. N., Sơn, Đ. T., & Dược, N. V. (2004). Đa dạng sinh học của giống cây có múi ở huyện Gò Quau, tỉnh Kiên Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 1, 111-121.
- Dũng, N. L., Mượu, Đ. X., Tiến, N. P., Thạch, Đ. Đ., & Ty, P. V. (1972). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật tập 1*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Hơn, N. P. (2017). *Phân lập và tuyển chọn nấm men tự nhiên lên men rượu vang mít lá bàng tại tỉnh An Giang* (Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học). Trường Đại học Cần Thơ.
- Thành, N. V., Thủy, N. M., Quế, T. T., & Tuyên, N. T. M. (2013). Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang khóm. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 25, 27-35.
- Vũ, N. V., & Thành, N. V. (2018). Phân lập và tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang dâu Hạ Châu (*Baccaurea ramiflora* L.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54, 22 - 32. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.137>
- Niêm, N. T., Tâm, H. N. T., & Độ, N. D. (2018). Phân lập và tuyển chọn dòng nấm men lên men rượu vang cà na (*Canarium album*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(1B), 44-49. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.007>
- TIÊU CHUẨN VIỆT NAM (TCVN 3215-79). (1979). *Sản phẩm thực phẩm phân tích cảm quan phương pháp cho điểm*. Cục kiểm tra chất lượng sản phẩm và hàng hóa Ủy ban khoa học và kỹ thuật Nhà nước.