

# NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT RƯỢU ĐẾ QUI MÔ HỘ TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH VĨNH LONG

Nguyễn Kim Đông<sup>1</sup>, Phan Văn Thom<sup>1</sup> và Lý Nguyễn Bình<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Alcohol made of rice or glutinous rice are very popular in Vietnam. The aerobic- and anaerobic fermentation was followed as a model of study. As results, optimal fermentation durations were obtained for both steps. The contents of different volatile compounds including acetaldehyde, methanol, ester, total acid, isobutanol, isopentanol and furfural present in the final products were determined, giving a good relation between the materials used and the product quality. During the distillation processes, the presence of the aforementioned volatile compounds in differently condensed fractions was also investigated showing a good picture helpful for practically handling of distillation process.*

**Keywords:** *Distillation, aerobic fermentation, anaerobic fermentation, acetaldehyde, methanol*

**Title :** *Study on alcohol production using rice at household scale in Vinh Long province*

## TÓM TẮT

*Rượu được sản xuất từ nguyên liệu gạo nếp là rất phổ biến ở Việt Nam. Quá trình lên men hai giai đoạn được chọn lựa là mô hình nghiên cứu bao gồm lên men hiếu khí và lên men yếm khí. Thời gian lên men thích hợp của mỗi giai đoạn đã được xác định. Hàm lượng hợp chất bay hơi bao gồm acetaldehyde, methanol, ester, acid tổng, isobutanol, isopentanol và furfural của các mẫu rượu được sản xuất từ các loại gạo/nếp và men khác nhau được phân tích, qua đó cung cấp thông tin về mối liên hệ giữa nguyên liệu đầu vào và chất lượng sản phẩm. Tiến trình bay hơi và ngưng tụ của các chất bay hơi trong quá trình chưng cất thủ công cũng được khảo sát chi tiết giúp nhà sản xuất có cơ sở thực tiễn để điều hành sản xuất.*

**Từ khoá:** *chưng cất, lên men hiếu khí, lên men yếm khí, acetaldehyde, methanol*

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lên men là hình thức được biết đến lâu đời nhất của công nghệ sinh học thực phẩm, là đối tượng quan trọng của hoạt động nghiên cứu khoa học. Nhiều nhà khoa học trên thế giới đã có những công trình nghiên cứu liên quan đến lợi ích và tầm quan trọng của các thực phẩm lên men cũng như các sản phẩm lên men từ ngũ cốc. Hàm lượng và chất lượng của các protein ngũ cốc có thể được cải thiện bằng cách lên men (Wang và Fields 1978; Chavan *et al.*, 1988). Tinh bột và chất xơ có xu hướng giảm trong thời gian lên men đối tượng ngũ cốc (El-Tinay *et al.*, 1979). Vitamin nhóm B nói chung thể hiện sự gia tăng trong lên men (Chavan *et al.*, 1989). Đồ uống có cồn bao gồm các loại bia, rượu vang và rượu mạnh đóng một vai trò quan trọng trong đời sống văn hóa. Nhiều loại đồ uống có cồn được sản xuất và tiêu thụ trên toàn thế giới. Ở Châu Á, rượu gạo là loại đồ uống có cồn phổ

<sup>1</sup> Trường Đại học Tây Đô

<sup>2</sup> Khoa Nông nghiệp và SHUD, Trường Đại học Cần Thơ

biến với nhiều tên gọi khác nhau tùy vào từng vùng miền như rượu “Sake” là sản phẩm truyền thống phổ biến và nổi tiếng của người Nhật (Iwata *et al.*, 2003), rượu “Satho” là sản phẩm truyền thống nổi tiếng của Thái Lan, rượu “Sochu” là sản phẩm rượu truyền thống nổi tiếng của Hàn Quốc. Ở phạm vi một quốc gia, đồ uống có cồn từ các vùng miền khác nhau cũng có sự khác nhau về nguyên liệu, nhiệt độ lên men và nhiều yếu tố khác nhưng có chung một nguyên liệu là ngũ cốc (Haard *et al.*, 1999). Ở Việt Nam, rượu cổ truyền từ lâu đã là niềm tự hào và không chỉ được biết đến vì hương vị độc đáo, đặc trưng của nó, mà thông qua cách thưởng thức rượu cổ truyền của địa phương có thể tìm về cội nguồn văn hóa của địa phương ấy. Ở nước ta, rượu cổ truyền phần lớn được nấu ở các làng nghề với sản lượng đáng kể. Các sản phẩm rượu có tên tuổi thường gắn với tên làng nghề như rượu Làng Vân Bắc Giang, rượu San Lùng Lào Cai, rượu Bầu Đá Bình Định, rượu Xuân Thạnh Trà Vinh, rượu Phú Lễ Bến Tre,... Ngoài các sản phẩm rượu từ các làng nghề truyền thống có chất lượng cao, phần lớn các sản phẩm rượu khác do người dân tự mày mò để nấu. Do việc thực hành sản xuất là thủ công, lạc hậu, thiết bị sản xuất thô sơ nên rượu được sản xuất ra có rất nhiều tạp chất độc, ảnh hưởng xấu tới sức khỏe của người tiêu dùng và không đạt yêu cầu về chất lượng theo Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7043:2002). Bài báo này được tiến hành nhằm xác định các giải pháp tổng thể để nâng cao chất lượng của sản phẩm rượu để sản xuất tại Vĩnh Long với tiêu chí sản phẩm đạt Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043:2002.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1 Phương tiện nghiên cứu

#### 2.1.1 Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng và phòng Thí nghiệm Chuyên sâu, Trường Đại học Cần Thơ. Địa điểm bố trí thí nghiệm là cơ sở rượu Liêu Dừng số 1863, tổ 17, ấp Thuận Phú A, xã Thuận An, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long.

#### 2.1.2 Thời gian thực hiện đề tài

Đề tài được thực hiện từ tháng 7/2011 đến tháng 01/2012.

#### 2.1.3 Nguyên liệu thí nghiệm

Nguyên liệu bao gồm tằm gạo Jasmine, nếp Phú Tân (An Giang), men Hoàng Anh (của cơ sở Ngọc Khải, 232E ấp Tân Vĩnh Thuận, xã Tân Ngãi, thành phố Vĩnh Long), và men Tân Phát Lợi (địa chỉ khu phố 3, Gia Ray, Xuân Lộc, Đồng Nai).

### 2.2 Phương pháp thí nghiệm

#### 2.2.1 Thí nghiệm 1: Nghiên cứu xác định thời gian ủ hiếu khí thích hợp cho quá trình đường hoá tinh bột của nguyên liệu

**Mục đích:** Tìm ra thời gian ủ hiếu khí thích hợp cho quá trình đường hóa tinh bột trong hai loại nguyên liệu là tằm Jasmine và nếp Phú Tân sử dụng hai loại men là men Hoàng Anh và men Tân Phát Lợi.

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 nhân tố với 12 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Nhân tố A là loại nguyên liệu, với A1 là tằm Jasmine,

A2 là nếp Phú Tân. Nhân tố B là loại men, với B1 là men Hoàng Anh, B2 là men Tân Phát Lợi. Nhân tố N là thời gian ủ hiếu khí, với N2 là 2 ngày, N3 là 3 ngày và N4 là 4 ngày.

**Chỉ tiêu phân tích:** hàm lượng đường glucose

**Cách thực hiện:** Thí nghiệm được bố trí tại lò rượu Liêu Dững xã Thuận An, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Tầm Jasmine và nếp được cân chính xác mỗi mẻ 10 kg được xử lý sạch và ngâm khoảng 4 – 5 giờ, sau đó cho vào túi lưới đưa vào nồi nấu dùng hơi nước nấu chín, để nguội tự nhiên đến nhiệt độ 30 – 40°C, xới cho tơi ra và trải đều lên mặt phẳng sạch. Sau đó cơm được trộn đều với 100g men, cho vào thùng lên men thể tích 45 lít, tạo khoảng trống ở giữa khối cơm để tạo sự thoáng khí, đập nắp hờ và ủ trong 2, 3 và 4 ngày. Mỗi ngày lấy mẫu kiểm tra hàm lượng đường glucose và tinh bột sót. Hàm lượng tinh bột xác định bằng thiết bị quang phổ, đường glucose xác định bằng sắc ký lỏng cao áp.

*2.2.2 Thí nghiệm 2: Nghiên cứu xác định thời gian ủ yếm khí thích hợp cho quá trình lên men chính*

**Mục đích:** Tìm ra thời gian ủ yếm khí thích hợp cho quá trình lên men rượu sử dụng hai loại nguyên liệu là tầm Jasmine và nếp Phú Tân cùng với hai loại men là men Hoàng Anh và men Tân Phát Lợi cho ra hàm lượng các chất bay hơi như isobutanol, isopentanol, acid tổng, acetaldehyde, methanol, ester và furfural là thấp nhất.

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 nhân tố với 12 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Nhân tố A là loại nguyên liệu, với A1 là tầm Jasmine, A2 là nếp Phú Tân. Nhân tố B là loại men, với B1 là men Hoàng Anh, B2 là men Tân Phát Lợi. Nhân tố N là thời gian ủ yếm khí, với N4 là 4 ngày, N5 là 5 ngày và N6 là 6 ngày.

**Chỉ tiêu phân tích:** hàm lượng isobutanol, isopentanol, acid tổng, acetaldehyde, methanol, ester, furfural sinh ra trong quá trình lên men.

**Cách thực hiện:** Thí nghiệm được bố trí tại lò rượu Liêu Dững xã Thuận An, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Tầm Jasmine và nếp được cân chính xác mỗi mẻ 10 kg được xử lý sạch và ngâm khoảng 4 – 5 giờ, sau đó cho vào túi lưới đưa vào nồi nấu dùng hơi nước nấu chín, để nguội tự nhiên đến nhiệt độ 30 – 40°C, xới cho tơi ra và trải đều lên mặt phẳng sạch. Sau đó cơm được trộn đều với 100g men, cho vào thùng lên men thể tích 45 lít, tạo khoảng trống ở giữa khối cơm để tạo sự thoáng khí, đập nắp hờ và ủ trong 2 ngày. Sau 2 ngày, chan 20 lít nước đập nắp kín và ủ trong 4, 5 và 6 ngày, sau đó cất lấy rượu. Thu sản phẩm sau chưng cất theo thứ tự 1 lít đầu tách riêng và 7 lít còn lại gộp chung, tổng lượng rượu thu được là 8 lít. Thực hiện tương tự cho tất cả các mẫu thí nghiệm. Trong đó, với phần 7 lít, thực hiện phân tích hàm lượng các chất bay hơi như acetaldehyde, isobutanol, isopentanol, furfural, ester, acid tổng, methanol. Hàm lượng còn được xác định bằng sắc ký khí (GC). Đo lượng cồn ở 1 lít đầu và lượng cồn ở 7 lít còn lại tính được hàm lượng cồn thu được của toàn mẻ rượu và năng suất là số lít rượu 30% (v/v) còn được sinh ra từ 1 kg gạo hoặc nếp.

### 2.2.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát tiến trình bay hơi và ngưng tụ của các hợp chất isobutanol, isopentanol, acid tổng, acetaldehyde, methanol, ester, furfural trong quá trình chưng cất rượu

**Mục đích:** Khảo sát tiến trình bay hơi và ngưng tụ của các tạp chất trong quá trình chưng cất để có hướng xử lý các hợp chất này.

**Cách thực hiện:** Trong quá trình chưng cất mỗi mẻ rượu, sản phẩm rượu ngưng tụ được lần lượt hứng vào chai, 10 chai đầu mỗi chai 200 mL, các chai sau mỗi chai 1000 mL. Thu mẫu theo thứ tự trên cho đến hết mẻ rượu. Các mẫu rượu này được tiến hành phân tích chất lượng thông qua định lượng các hợp chất acid tổng (mg/L), ester (mg/L), acetaldehyde (mg/L), furfural (mg/L), methanol % (v/v), isobutanol (mg/L) và isopentanol (mg/L).

### 2.2.4 Phân tích hóa học

#### Xác định acid tổng số của rượu

Trong quá trình lên men rượu có nhiều loại acid hữu cơ khác nhau được tạo thành, trong đó chủ yếu là acid acetic. Vì thế, người ta thường biểu diễn độ acid trong rượu theo acid acetic. Lấy 100 mL rượu cho vào bình tam giác 250 mL. Nối với hệ thống ống sinh hàn, đun sôi 15 phút để đuổi hết CO<sub>2</sub> rồi sau đó làm lạnh đến nhiệt độ phòng, cho vào 3 ÷ 4 giọt phenolphthalein rồi dùng dung dịch NaOH 0,1N chuẩn đến xuất hiện màu hồng nhạt. Hàm lượng acid tổng có trong rượu được biểu diễn bằng công thức:

$$Ax = \frac{V * 6 * 1000}{C} \text{ (mg/L)}$$

V: số mL dung dịch NaOH 0,1N tiêu hao khi chuẩn độ

C: nồng độ cồn trong dung dịch đem phân tích

6: số mg acid acetic tương ứng với 1 mL NaOH 0,1N

1000: hệ số chuyển đổi

#### Xác định hàm lượng methanol

Hàm lượng methanol trong toàn bộ thí nghiệm được xác định dựa vào qui định của ngành y tế (TCVN – TQTP 006:2004). Trong môi trường acid dưới tác dụng của KMnO<sub>4</sub>, methanol bị oxy hóa thành aldehyde formic, rồi tác dụng với acid cromotropic để tạo sản phẩm có màu tím. Đo độ hấp phụ quan của sản phẩm này trên máy UV-VIS ở bước sóng 575 nm cùng với dãy chuẩn methanol được chuẩn bị trong cùng điều kiện. Độ nhạy của phương pháp là 0,00008%. Sai số của phương pháp trong khoảng xác định là 2 – 6%.

#### Xác định hàm lượng glucose

Các mẫu được hút 1ml cho vào lọ 1,5 mL mang ly tâm (Biofuge fresco, Đức) 13000 vòng/phút trong 10 phút. Lọc thông qua bộ lọc 0,45 micromet (Màng Nylon, Supelco, Bellefonte, Mỹ) trước khi phân tích HPLC. 20 µL của mỗi mẫu tiêm cho phân tích HPLC (10A, Shimadzu, Nhật Bản). Đầu dò RID với một cột Carbonhydrat C18 (250 x 4 mm, 5 µm; Merck). Các dung môi sử dụng là nước khử ion (dung môi A) và acetonitrile (dung môi B) với tốc độ dòng chảy 1 mL/phút. Rửa giải được chọn chế độ chạy đẳng dòng, hỗn hợp pha động là acetonitrile và nước khử ion (75:25 v/v).

### **Xác định hàm lượng furfural**

Lấy một lượng mẫu lọc qua màng lọc 0.2  $\mu\text{m}$ , sau đó bơm 20  $\mu\text{L}$  vào thiết bị HPLC, dùng đầu dò UV- Vis, chạy mẫu và đo ở bước sóng 280 nm, cột pha đảo là LichroCART<sup>(R)</sup> C18 (250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Merck). Các dung môi sử dụng là đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 2.7 (dung môi A) và methanol (dung môi B), với tốc độ dòng chảy 0,8 mL/phút. Rửa giải chọn chế độ chạy đẳng dòng, hỗn hợp pha động gồm đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 2.7 và methanol (50:50 v/v).

### **Xác định hàm lượng ester**

Lấy một lượng mẫu lọc qua màng lọc 0.2  $\mu\text{m}$ , sau đó bơm 20  $\mu\text{L}$  vào thiết bị HPLC, dùng đầu dò UV- Vis, chạy mẫu và đo ở bước sóng 210 nm, cột pha đảo là LichroCART<sup>(R)</sup> C18 (250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Merck). Các dung môi sử dụng là đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 2.7 (dung môi A) và methanol (dung môi B) với tốc độ dòng chảy 0,8 ml/phút. Rửa giải chọn chế độ chạy đẳng dòng, hỗn hợp pha động gồm đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 2.7 và methanol (50:50 v/v).

### **Xác định hàm lượng isobutanol, isopentanol, acetaldehyde**

Sử dụng phương pháp sắc ký khí (GC) để định lượng các hợp chất dễ bay hơi có trong mẫu rượu. Quá trình phân tích sử dụng thiết bị GC-14A (Shimadzu) được trang bị một cột thủy tinh chứa pha tĩnh DEGS-PS 80/100 mesh (Supelco, Sigma – Aldrich Co, Singapore). Tốc độ dòng của khí (nitơ 99,99 %) là 2 mL/ phút. Chế độ split (chia tỷ lệ 1/10) bằng cách tiêm trực tiếp vào một GC. Nhiệt độ buồng tiêm mẫu được duy trì ở mức 120°C. Nhiệt độ lò đã được lập trình nhiệt độ đầu 70°C trong 0 phút, nhiệt độ cuối 150°C, tỷ lệ tăng 5°C/phút, thời gian cuối trong 0 phút. Đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID) đã được thiết lập là 125°C. Mẫu rượu hóa hơi và tiêm vào thiết bị GC với thể tích 0,3 mL.

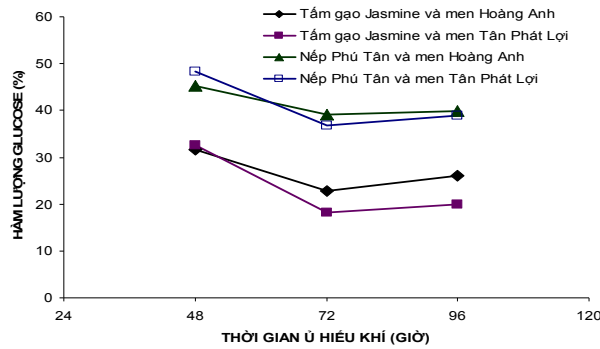
#### *2.2.5 Phân tích thống kê*

Các số liệu thô được xử lý bằng Excel, sau đó tiến hành phân tích phương sai. Nếu phép thử F chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa tiến hành so sánh cặp theo phép thử Tukey được áp dụng cho chỉ tiêu glucose và năng suất rượu 30° cồn dùng phần mềm Minitab16 (Bản quyền © 2011 bởi Minitab Inc.).

## **3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1 Thời gian ủ hiếu khí thích hợp cho quá trình đường hóa tinh bột nguyên liệu**

Trong quá trình đường hoá (Hình 1), sau 48 giờ ủ hiếu khí, hàm lượng glucose tạo thành có giá trị cao và cao nhất ứng với hai nghiệm thức nếp Phú Tân và men Hoàng Anh (45,7%), nếp Phú Tân và men Tân Phát Lợi (48,3%). Lượng đường glucose giảm sau 72 và 96 giờ ủ. Như vậy, sau 48 giờ ủ hiếu khí, hàm lượng glucose thu được là cao nhất. Đây là khoảng thời gian thích hợp cho quá trình đường hóa.



Hình 1: Sự thay đổi hàm lượng glucose trong thời gian lên men hiếu khí

### 3.2 Thời gian ủ yếm khí thích hợp trong quá trình lên men chính

**Acetaldehyde** là một sản phẩm phụ thuộc trực tiếp từ quá trình lên men rượu. Hơn nữa, quá trình oxy hóa acetaldehyde có thể dẫn đến sự hình thành của một lượng nhỏ acid acetic (De LA Presa - Owen và Noble, 1997). Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy rằng lượng acetaldehyde của các nghiệm thức dao động từ 82,92 – 265,81 mg/L, trong khi hàm lượng acetaldehyde trong rượu Sherry Fino được công bố là 254 – 257 mg/L (Moreno *et al.*, 2005). Các số liệu cho thấy, trong quá trình lên men yếm khí, hàm lượng acetaldehyde của các mẫu có xu hướng tăng sau đó giảm hoặc luôn luôn giảm, trừ nghiệm thức nếp Phú Tân và men Tân Phát Lợi. Theo đó, sau 6 ngày ủ yếm khí, nguyên liệu là tầm Jasmine cho hàm lượng acetaldehyde của các mẫu lần lượt là 82,92 mg/L (men Hoàng Anh) và 108,93 mg/L (men Tân Phát Lợi), trong khi nguyên liệu nếp Phú Tân cho hàm lượng acetaldehyde của mẫu là 156,58 mg/L (men Hoàng Anh). Từ đó cho thấy acetaldehyde là một tạp chất khó kiểm soát và biến đổi theo thời gian lên men. Nhìn chung, thời gian ủ 6 ngày cho hàm lượng acetaldehyde thấp và thấp nhất là với nguyên liệu tầm Jasmine. Tuy nhiên, tất cả đều không đạt yêu cầu theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043:2002 dành cho rượu lên men và chưng cất. Kết quả cũng cho thấy là cùng loại men là Hoàng Anh nhưng nguồn nguyên liệu khác nhau là tầm Jasmine hoặc nếp Phú Tân cũng làm thay đổi hàm lượng acetaldehyde sinh ra. So sánh cặp nghiệm thức tầm Jasmine và men Hoàng Anh 82,92 mg/L và tầm Jasmine và men Tân Phát Lợi 108,93 mg/L vào ngày 6 cho thấy hai loại men Hoàng Anh, Tân Phát Lợi lên men cùng một nguyên liệu là tầm Jasmine nhưng nghiệm thức tầm Jasmine và men Hoàng Anh cho hàm lượng acetaldehyde thấp hơn so với tầm Jasmine và men Tân Phát Lợi. Tương tự, nghiệm thức nếp Phú Tân và men Hoàng Anh cho lượng acetaldehyde là 156,58 mg/L thấp hơn giá trị 187,27 mg/L của nghiệm thức nếp Phú Tân và men Tân Phát Lợi. Điều này cho thấy, hàm lượng acetaldehyde hình thành bị chi phối đáng kể bởi nguồn men.

**Ethyl acetate** là một ester chính có trong rượu gạo truyền thống và có ảnh hưởng đáng kể đến các đặc tính cảm quan của rượu và các sản phẩm chưng cất. Ethyl acetate ở nồng độ thấp có thể đóng góp vào tính chất trái cây của rượu vang (Apostolopoulou *et al.*, 2005; Zoecklein *et al.*, 1995). Bảng 1 cho thấy lượng ethyl acetate của các nghiệm thức biến đổi trong khoảng 133,42 – 479,28 mg/L thấp hơn lượng ethyl acetate trong rượu Chenin Blanc (32,0 - 724,2 mg/L) (Lilly *et al.*, 2000). Sau 6 ngày lên men yếm khí, nguyên liệu là tầm Jasmine cho hàm lượng

ethyl acetate của các mẫu lần lượt là 133,42 mg/L (men Hoàng Anh) và 193,35 mg/L (men Tân Phát Lợi), đạt yêu cầu theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043:2002, trong khi nguyên liệu nếp Phú Tân cho hàm lượng ethyl acetate của mẫu là 289,33 mg/L (men Hoàng Anh) và 353,32 mg/L (men Tân Phát Lợi) không đạt yêu cầu theo Tiêu chuẩn Việt Nam. Kết quả trên cho thấy rằng nguyên liệu tấm gạo Jasmine cho hàm lượng ethyl acetate thấp hơn so với nguyên liệu nếp Phú Tân và men Hoàng Anh cho hàm lượng ethyl acetate thấp hơn men Tân Phát Lợi. Theo dõi hàm lượng ethyl acetate sinh ra theo thời gian lên men cho thấy lượng ethyl acetate sinh ra ở ngày 6 thấp hơn so với lượng ethyl acetate sinh ra ở ngày 4 và ngày 5 (trừ nghiệm thức nếp Phú Tân và men Tân Phát Lợi ở ngày 4). Từ các kết quả trên cho thấy lượng ethyl acetate biến đổi bởi thời gian lên men, nguyên liệu sử dụng cho lên men và loại men. Thời gian lên men tốt nhất là ngày 6, nguyên liệu cho hàm lượng ethyl acetate thấp là tấm Jasmine và loại men tốt nhất là men Hoàng Anh.

**Bảng 1: Hàm lượng các chất bay hơi trong quá trình lên men chính**

Cơ chất & men	Số ngày ủ	Năng suất Rượu 30° cồn (L/kg)	Acetaldehyde (mg/L)	Methanol (% v/v)	Ester (mg/L)	Furfural (mg/L)	Acid tổng (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Isopentanol (mg/L)
A1B1	4	1,16a	128,29	0,06	459,36	0,28	528,84	841,28	618,00
	5	1,22a	144,46	0,06	243,32	0,24	502,42	644,48	464,45
	6	1,22a	82,92	0,07	133,42	0,19	583,97	523,96	346,02
A1B2	4	1,20a	179,84	0,06	314,55	0,23	541,84	688,13	414,29
	5	1,23a	183,67	0,06	268,52	0,24	468,44	520,37	391,99
	6	1,23a	108,93	0,05	193,35	0,20	512,47	633,88	369,75
A2B1	4	1,11a	265,81	0,05	450,45	0,18	896,30	577,94	369,07
	5	1,22a	183,37	0,06	466,60	0,17	998,72	442,10	300,03
	6	1,22a	156,58	0,05	289,33	0,17	723,97	570,29	373,78
A2B2	4	1,17a	158,66	0,05	306,88	0,20	883,59	366,28	245,24
	5	1,27a	153,07	0,07	479,28	0,19	983,99	473,16	321,55
	6	1,27a	187,27	0,05	353,32	0,18	825,73	499,40	269,47
TCVN 7043 – 2002			≤ 50	≤ 0,1	≤ 200	vết	/	/	/

Ghi chú: / không có giá trị so sánh; các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại

Giá trị hàm lượng tạp chất được tính cho một lít rượu 100% (v/v) cồn

A1B1: tấm Jasmine và men Hoàng Anh

A2B1: nếp Phú Tân và men Hoàng Anh

A1B2: tấm Jasmine và men Tân Phát Lợi

A2B2: nếp Phú Tân và men Tân Phát Lợi

**Methanol** không phải là một sản phẩm bình thường của quá trình lên men rượu. Việc kiểm soát hàm lượng methanol trong các loại đồ uống có cồn là đặc biệt quan trọng vì độc tính của nó. Hàm lượng methanol trong các mẫu phân tích dao động giữa 0,05 và 0,07 % v/v không vượt quá mức tối đa chấp nhận được (0,1% v/v) đối với các loại rượu trắng Việt Nam. Hàm lượng methanol không vượt Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043 – 2002. Điều này cho thấy lý do chính mà hàm lượng methanol thấp như vậy là do nguyên liệu sử dụng trong quá trình lên men là gạo và nếp có hàm lượng pectin thấp. Nồng độ methanol trong các nghiệm thức cao hơn so với hàm lượng methanol được tìm thấy trong loại rượu Sherry Fino (68,6 - 80,1

mg/L) (Moreno *et al.*, 2005), các loại rượu vang Mecia (121 -138 mg/L) (Calleja và Falque, 2005), và gần tương đương với rượu Kiwi (485 -768 mg/L) (Soufleros *et al.*, 2004) và thấp hơn so với rượu hoa quả và trái cây chưng cất Mouro (371,3 - 1980,7 mg/L) (Soufleros *et al.*, 2004). Sự hiện diện của hợp chất này có thể không ảnh hưởng đến cảm quan của đồ uống có cồn do ngưỡng cảm nhận nó là rất cao. Tuy nhiên, có một số tác động tiêu cực do độc tính của methanol. Uống rượu với hàm lượng methanol cao có thể gây mù mắt hoặc thậm chí tử vong (Cortés *et al.*, 2005).

Furfural được hình thành trong quá trình lên men trong điều kiện acid và/hoặc phản ứng maillard do mất nước của đường lên men (pentoses) (Apostolopoulou *et al.*, 2005). Furfural có tính độc. Hàm lượng furfural tìm thấy ở các nghiệm thức (Bảng 1) trong khoảng từ 0,17 đến 0,28 mg/L. Số liệu thu được này tương đồng với số liệu phân tích được từ rượu Sherry Fino (KPH - 4,08 mg/L) (Moreno *et al.*, 2005). Kết quả thí nghiệm cho thấy trong quá trình lên men yếm khí, hàm lượng furfural hiện diện có xu hướng giảm dần từ ngày lên men thứ 4 đến ngày lên men thứ 6. Hàm lượng furfural đo ở ngày thứ 6 của các nghiệm thức tằm Jasmine và men Hoàng Anh là 0,19 mg/L, tằm Jasmine và men Tân Phát Lợi là 0,20 mg/L, nếp Phú Tân và men Hoàng Anh là 0,17 mg/L và nếp Phú Tân và men Tân Phát Lợi là 0,18 mg/L.

**Isobutyl alcohol** (2 - methyl -1 propanol) được mô tả như là rượu và hương vị của dung môi rượu (Peinado *et al.*, 2006). Nồng độ isobutyl alcohol trong đồ uống có cồn khá khác nhau. Đối với mẫu tằm gạo và nếp trong thí nghiệm này hàm lượng isobutyl alcohol đã được phát hiện nằm trong khoảng 366,28 – 841, 28 mg/L. Hàm lượng isobutyl alcohol này cao hơn so với isobutyl alcohol đã được tìm thấy trong rượu vang Mencia (41 – 64 mg/L) (Moreno *et al.*, 2005), trong rượu Sake (110 - 120 mg/L) (Asano *et al.*, 1999), trong rượu Monastrell (73-144 mg/L) (Mateo *et al.*, 2001), và trong rượu vang Chenin blanc (12,5 - 34,1 mg/L) (Lilly *et al.*, 2000). Isobutyl alcohol được hình thành trong quá trình lên men rượu từ sự phản ứng giữa ethanol và ester acetic (Apostolopoulou *et al.*, 2005). Ở các ngày lên men 4, 5 và 6 nồng độ isobutyl alcohol biến đổi lên xuống rất phức tạp. Tiêu chuẩn Việt Nam không qui định ngưỡng của hàm lượng isobutyl alcohol trong rượu, chỉ tiêu này do nhà sản xuất tự công bố.

**Isoamyl alcohol** (3- methyl – 1- butanol) phát hiện trong các mẫu phân tích ứng với các nghiệm thức được trình bày ở bảng 1 dao động từ 245,24 đến 618,00 mg/L, cao hơn trong rượu Sake (196 – 247 mg/L) (Asano *et al.*, 1999) và rượu Sherry fino (300 – 380 mg/L) (Moreno *et al.*, 2005). Isoamyl alcohol đóng góp tạo nên hương vị rượu vang và tạo đặc trưng hương vị trái cây (Selli *et al.*, 2004). Isoamyl alcohol được hình thành trong quá trình lên men bởi kiểu phản ứng decarboxylation đối với leucine (Boulton *et al.*, 1996; Kana *et al.*, 1988). Hàm lượng isoamyl alcohol ở các nghiệm thức và thời gian lên men biến đổi cũng rất phức tạp. Tiêu chuẩn Việt Nam không qui định ngưỡng của hàm lượng isoamyl alcohol trong rượu, chỉ tiêu này do nhà sản xuất tự công bố.

Lên men rượu thường đề cập đến việc chuyển đổi hóa học của carbohydrates thành ethanol hoặc acid sử dụng nấm men trong điều kiện kỵ khí. Kết thúc quá trình lên men sản phẩm chính là rượu và các sản phẩm phụ khác như glycerol và các rượu bậc cao khác (Zoecklein *et al.*, 1995). Bảng 1 tóm tắt kết quả xác định hàm lượng



ethanol từ lên men rượu gạo ứng với các nghiệm thức được xác định bằng kỹ thuật sắc ký khí cho thấy rằng lượng ethanol ứng với các nghiệm thức không khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Điều này có thể giải thích là do qui trình sản xuất rượu giống nhau chỉ khác nhau về loại men và nguyên liệu nếp và tấm gạo. Năng suất sinh ethanol không khác nhau cho thấy hai loại men Hoàng Anh, men Tân Phát Lợi có hoạt lực tương đương nhau. Năng suất ethanol sinh ra ở các nghiệm thức 1,11 – 1,27 (L/kg) rượu 30% (v/v), tương đương với năng suất rượu men thuần 1,218 (L/kg) rượu 30% (v/v) (Nhan Thanh Thúy, 2010).

Trong quá trình lên men rượu gạo có rất nhiều loại acid hữu cơ khác nhau được tạo thành (các acid acetic, citric, malic, lactic và succinic), trong đó, acid acetic chiếm một phần đáng kể. Acid acetic xuất hiện trong quá trình lên men rượu do thành phần của hạt gạo có polysaccharides, protein và chất béo (Juliano, 1985). Các loại nấm như *Aspergillus* spp. và *Rhizopus* spp. là nhân tố giúp tạo ra acid hữu cơ. Thoukis *et al.* (1965) báo cáo rằng trong quá trình lên men rượu có sự gia tăng nồng độ acid tổng số và thay đổi thành phần acid hữu cơ của môi trường lên men. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng acid tổng (Bảng 1) sinh ra dao động trong khoảng 468,44 – 998,72 mg/L, cao hơn kết quả phân tích acid tổng của rượu lên men bằng nấm men thuần sản xuất tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ và tại các nông hộ (90,028 – 651,537 mg/L) (Nhan Thanh Thúy, 2010). TCVN 7043 – 2002 không qui định hàm lượng acid tổng. Nhìn chung, hàm lượng acid tổng ở rượu sản xuất từ nguyên liệu tấm Jasmine thấp hơn rượu sản xuất từ nguyên liệu nếp Phú Tân.

Nhìn chung, ở thí nghiệm này qua quan sát thấy rằng thời gian lên men yếm khí tốt nhất cho hai loại nguyên liệu tấm gạo Jasmine và nếp Phú Tân và hai loại men Hoàng Anh, Tân Phát lợi là 6 ngày. Hai mẫu rượu tốt nhất được chọn từ hai loại nguyên liệu là Tấm gạo Jasmine và nếp Phú Tân sử dụng men Hoàng Anh. Cơ sở cho quá trình chọn lựa thời gian lên men yếm khí và hai mẫu rượu tốt nhất là dựa trên hàm lượng acetaldehyde, ester, furfural vì các chỉ tiêu này có qui định hàm lượng tối thiểu trong TCVN 7043 – 2002. Các chỉ tiêu bay hơi khác thấp hơn tiêu chuẩn hay do nhà sản xuất tự công bố.

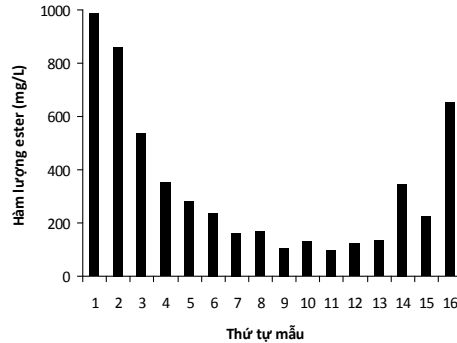
### **3.3 Kết quả khảo sát tiến trình bay hơi và ngưng tụ các chất ester, acetaldehyde, furfural, methanol, acid tổng, isobutanol và isopentanol trong quá trình chưng cất**

Chưng cất là quá trình tách rượu và các chất mùi dễ bay hơi khỏi dịch lên men, sản phẩm thu được là rượu thô. Quá trình thu mẫu được thực hiện theo cách thức thu riêng 10 phân đoạn đầu mỗi phân đoạn 200 mL, các phân đoạn tiếp theo mỗi phân đoạn 1 lít cho đến cuối quá trình chưng cất. Hàm lượng các chất có trong các phân đoạn rượu được trình bày ở các hình 2 đến 8.

#### ***Ester (ethyl acetate)***

Ethyl acetate là ester phổ biến nhất trong rượu vang là sản phẩm dễ bay hơi được tạo ra trong quá trình lên men. Mặc dù các loại ester có vai trò góp phần tạo hương vị cho rượu nhưng nó vẫn là một tạp chất, theo qui định của TCVN 7043 – 2002 hàm lượng ethyl acetate không được vượt quá 200 mg/l trong 1 lít rượu 100% (v/v) cồn. Các acid và rượu tác dụng với nhau sẽ tạo ra những ester tương ứng, ester còn có thể được tạo ra từ phản ứng giữa các aldehyde. Ethyl acetate được tạo

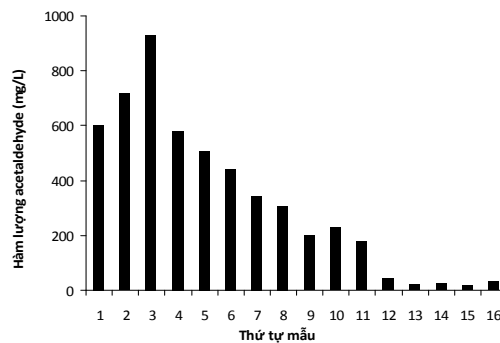
thành từ sự tương tác giữa ethanol và acid acetic. Ethyl acetate là rất dễ bay hơi và có điểm sôi thấp là 77°C. Do các đặc tính này, ester có thể được loại bỏ từ hỗn hợp bằng cách nung nóng. Vì thế, trong quá trình chưng cất ethyl acetate được xem là tạp chất đầu. Hình 2 cho thấy 6 phân đoạn rượu chưng cất đầu tiên (1 – 6) có hàm lượng ethyl acetate rất cao, vượt TCVN 7043 – 2002. Các phân đoạn từ thứ 7 đến 13 có hàm lượng ethyl acetate đạt tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043 – 2002. Các mẫu rượu lấy ra cuối khắp rượu có hàm lượng ethyl acetate tăng lên.



Hình 2: Sự hiện diện của hợp chất ester trong các phân đoạn của sản phẩm trong quá trình chưng cất

**Acetaldehyde**

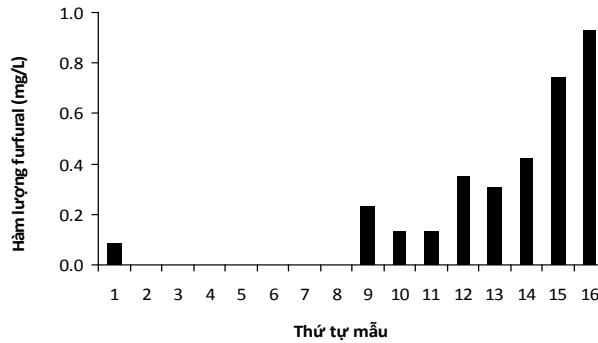
Trong quá trình lên men rượu, acetaldehyde là aldehyde phổ biến nhất có mặt trong sản phẩm và thường vượt mức qui định 50 mg/l rượu 100% (v/v) cồn. Kết quả xác định hàm lượng acetaldehyde trong các phân đoạn của một mẻ rượu (Hình 3) cho thấy ở 11 phân đoạn rượu đầu, hàm lượng acetaldehyde là rất cao, vượt tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043 – 2002. Từ phân đoạn thứ 12 trở về sau, hàm lượng acetaldehyde đạt mức thấp và thỏa mãn tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043 – 2002. Do đặc tính dễ bay hơi, trong quá trình chưng cất rượu, hợp chất acetaldehyde thường bay hơi và ngưng tụ nhiều ở giai đoạn đầu, càng về sau lượng acetaldehyde bay hơi và ngưng tụ càng ít đi. Có thể dựa theo qui luật ngưng tụ này để tổ chức lại việc chưng cất rượu theo phương thức thủ công nhằm mục đích có được sản phẩm rượu có hàm lượng acetaldehyde đạt Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043 – 2002. Cách thức tiến hành là tách riêng 10 phân đoạn rượu đầu (khoảng 2 lít) để xử lý khử bỏ hợp chất acetaldehyde sau đó phối trộn trở lại.



Hình 3: Sự hiện diện của hợp chất acetaldehyde trong các phân đoạn của sản phẩm trong quá trình chưng cất

**Furfural**

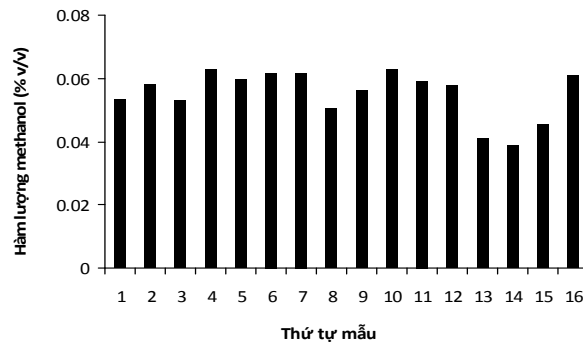
Furfural là tạp chất cuối trong quá trình chưng cất rượu có công thức hóa học  $C_5H_4O_2$ , có tính độc với cơ thể người. Furfural có nhiệt độ bay hơi là  $162^{\circ}C$ . Kết quả trình bày ở Hình 4 cho thấy ở 8 phân đoạn rượu đầu hàm lượng furfural rất thấp, về cuối khắp rượu, từ phân đoạn thứ 9 đến phân đoạn thứ 16 hàm lượng furfural hiện diện tăng dần phù hợp với qui luật bay hơi và ngưng tụ của nó. Ở giai đoạn đầu của quá trình chưng cất hàm lượng rượu còn cao nên độ bay hơi của furfural thấp, về cuối hàm lượng ethanol trong dịch hèm còn ít và nhiệt độ của dịch hèm tăng cao tạo điều kiện cho sự bay hơi của furfural. Bên cạnh đó, phản ứng của nhiệt với acid hay với các carbohydrate khác trong dịch hèm đã góp phần tạo ra furfural cho nên về cuối khắp rượu furfural tăng cao.



**Hình 4: Sự hiện diện của hợp chất furfural trong các phân đoạn của sản phẩm trong quá trình chưng cất**

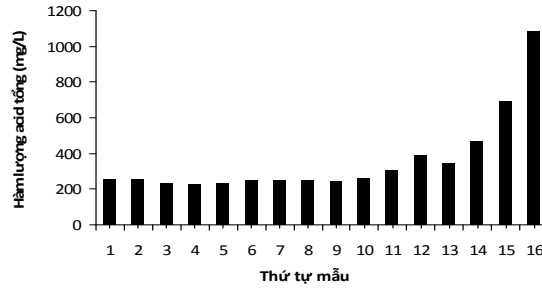
**Methanol**

Methanol cũng gọi là methyl alcohol là một hợp chất hóa học với công thức phân tử  $CH_3OH$  (thường viết tắt MeOH). Đây là rượu đơn giản nhất, nhẹ, dễ bay hơi, không màu, dễ cháy chất lỏng với một mùi đặc trưng. Methanol là chất độc đối với cơ thể người, có thể gây mù mắt thậm chí tử vong nếu uống nhiều methanol. Kết quả trình bày ở Hình 5 cho thấy hàm lượng methanol hiện diện trong các phân đoạn rượu thay đổi lên xuống trong khoảng 0,04 – 0,07 (% v/v) từ đầu cho đến cuối khắp rượu. Methanol có nhiệt độ bay hơi là  $65^{\circ}C$  thấp hơn nhiệt độ bay hơi của ethanol nên cũng được xem là tạp chất đầu trong quá trình chưng cất.



**Hình 5: Sự hiện diện của hợp chất methanol trong các phân đoạn của sản phẩm trong quá trình chưng cất**

**Acid tổng**

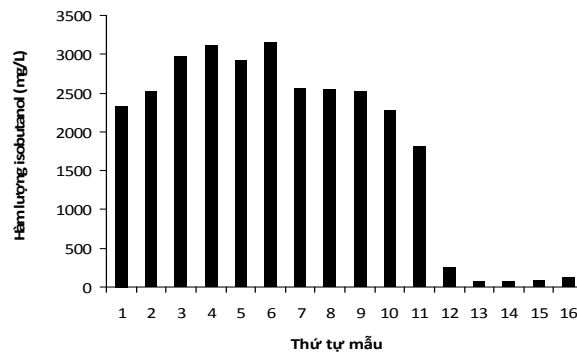


**Hình 6: Sự hiện diện của hợp chất acid trong các phân đoạn của sản phẩm trong quá trình chưng cất**

Quá trình lên men rượu truyền thống luôn tạo ra các acid hữu cơ khác nhau như acid acetic, lactic, citric,... trong đó acid acetic chiếm hàm lượng lớn nhất. Acid acetic là chất lỏng không màu, có vị chua, tan vô hạn trong nước. Hình 6 trình bày sự hiện diện của acid acetic trong quá trình chưng cất, theo đó càng về cuối quá trình chưng cất acid acetic xuất hiện càng nhiều. Acid acetic có nhiệt độ sôi là 118,1°C trong khi nhiệt độ sôi của ethanol là 78°C và nước là 100°C nên càng về cuối quá trình chưng cất thì thu càng nhiều tạp chất này.

**Isobutanol (2-methylpropyl alcohol)**

Isobutanol là một trong những sản phẩm phụ quan trọng được tạo thành trong quá trình lên men rượu. Hàm lượng isobutanol tuy ít nhưng nếu lẫn vào rượu etylic sẽ gây ảnh hưởng xấu đến chất lượng sản phẩm làm cho sản phẩm rượu có mùi khó chịu. Trong quá trình chưng cất rượu, isobutanol hiện diện ở mức cao ở 11 phân đoạn rượu đầu sau đó giảm dần cho đến cuối khạp rượu (Hình 7).

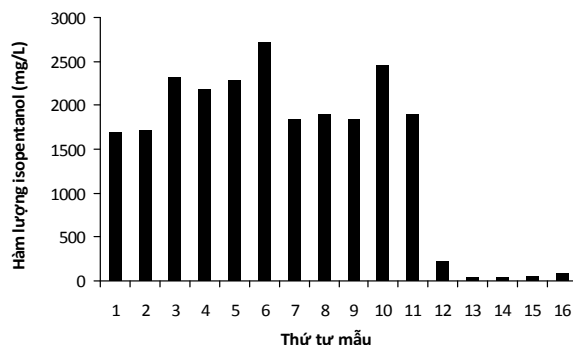


**Hình 7: Sự hiện diện của hợp chất isobutanol trong các phân đoạn của sản phẩm trong quá trình chưng cất**

**Isopentanol (còn được gọi là isopentyl)**

Isopentanol là một hợp chất rượu, không màu có nhiệt độ sôi 131,1°C. Trong quá trình lên men rượu gạo truyền thống hàm lượng isopentanol được tìm thấy với nồng độ cao. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7043 – 2002 không qui định hàm lượng tối thiểu cho isopentanol nhưng qui định chỉ tiêu này do nhà sản xuất tự công bố. Hình 8 cho thấy isopentanol hiện diện không theo qui luật trong quá trình chưng

cát. Hai phân đoạn rượu đầu hàm lượng isopentanol thấp có thể do nhiệt độ chưng cất mới bắt đầu tăng, từ phân đoạn thứ 3 đến phân đoạn thứ 11 hàm lượng isopentanol biến thiên lên xuống nhưng ở mức cao, từ phân đoạn thứ 12 đến cuối khá rượu lượng isopentanol còn lại ở mức rất thấp.



Hình 8: Sự hiện diện của hợp chất isopentanol trong các phân đoạn của sản phẩm trong quá trình chưng cất

#### 4 KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu, một số kết luận sau được rút ra: thời gian lên men hiếu khí và yếm khí thích hợp cho hai loại men Hoàng Anh, Tân Phát Lợi trên hai loại nguyên liệu tấm gạo Jasmine và nếp Phú Tân (An Giang) là 2 ngày (48 giờ) và 6 ngày (144 giờ). Trong quá trình chưng cất rượu, các hợp chất acetaldehyde, isobutanol, isopentanol bay hơi và ngưng tụ tập trung ở giai đoạn đầu sau đó giảm dần đến khi kết thúc quá trình chưng cất. Các hợp chất furfural và acid tổng bay hơi và ngưng tụ tập trung ở cuối quá trình chưng cất. Các hợp chất ester bay hơi và ngưng tụ nhiều ở giai đoạn đầu và cuối quá trình chưng cất. Hợp chất methanol bay hơi và ngưng tụ theo hướng không có biến động trong suốt quá trình chưng cất.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Apostolopoulou AA, Flouros AI, Demertzis PG, Akrida-Demertzi K. 2005. Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates, *Food Cont*, 16: 157-164.
- Asano T, Inoue T, Kurose N, Hiraoka N, Kawakita S. 1999. Improvement of isoamyl acetate productivity in sake yeast by isolating mutants resistant to econazole. *J. Biosci. Bioeng*, 87: 697-699.
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE. 1996. Principles and practices of winemaking, 1<sup>st</sup> Edn, *Chapman and Hall*, New York, USA, pp: 604.
- Calleja A. and E. Falqué (2005), Volatile composition of Mencía wines, *Food Chem*, 90: 357-363.
- Cortés S, Luisa Gil M, Fernández E. 2005. Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits. *Food Control*, 16: 383-388.
- Chavan UD, Chavan JK, Kadam SS. 1988. Effect of fermentation on soluble proteins and in vitro protein digestibility of sorghum, green gram and sorghumgreen gram blends. *J. Food Sci.* 53: 1574.
- De LA Presa-owen C, Noble AC. 1997. Effect of storage at elevated temperatures on aroma of Chardonnay wines. *Am. J. Enol. Viticult*, 48: 310-316.

- El-Tinay AH, Abdel-Gadir AM, El-Hidai M. 1979. Sorghum fermented kiswa bread. I. Nutritive value of kiswa. *J. Sci, Food Agric.* 30: 859.
- Haard N, Odunfa S, Lee C-H, Quintero –Ramirez R, Lorence – Quinones A, Wachter – Radarte C. 1999. Fermented cereals: a global perspective, *FAO Agricultural services bulletin No.1.*
- Iwata H., Suzuki T., and Aramaki I. (2003), Purification and Characterization of Rice  $\alpha$ -Glucosidase, a Key Enzyme for Alcohol Fermentation of Rice polish, *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 95(1): 106 – 108.
- Juliano BO. 1985. Rice: chemistry and technology (2<sup>nd</sup> ed.), St. Paul: American Association of Cereal Chemists.
- Kana K, Kanellaki M, Kouinis J, Koutinas AA. 1988. Alcoholic production from raisin extracts: Volatile by-products. *J. Food Sci.*, 53: 1723-1749.
- Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS. 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity of flavor profiles of wine and distillates, *Applied Environ. Microbiol.*, 66: 744-753.
- Mateo J.J., M. Jiménez A. Postor and T. Huerta (2001), Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles, *Food Res. Int.*, 34: 307-314.
- Moreno JA, Zea L, Moyano L, Medina M. 2005. Aroma compounds as markers of the changes in cherry wines subjected to biological ageing, *Food Control*, 16: 333-338.
- Nhan Thanh Thuý (2010), *Ứng dụng qui trình công nghệ cải tiến sản xuất rượu đế lên men ở một số nông hộ*, Luận văn thạc sĩ khoa học Công nghệ Sinh học, Viện nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Peinado R.A., J.C. Mauricio and M. Juan (2006), Aromatic series in sherry wines with gluconic acid subjected to different biological aging conditions by *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*, *Food Chem*, 945: 232-239.
- Soufleros EH, Mygdalia AS. Natskoulis P. 2004. Characterization and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate Mouro by flavor compounds and mineral analysis, *Food Chem*, 86: 625-636.
- Thoukis G,Ueda M, Wright D. 1965. The formation of succinic acid during alcoholic fermentation, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:1- 8.
- Wang YD and ML Fields (1978), Feasibility of home fermentation to improve the amino acid balance of corn meal. *J, Food Sci.* 43: 1104
- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS. 1995. Wine analysis and production, 1<sup>st</sup> Edn, Chapman and Hall, New York, USA, pp: 644.