

Phân lập và tuyển chọn nấm men có khả năng lên men rượu từ trái măng cầu xiêm *Annona muricata*

Đoàn Thị Kiều Tiên¹, Đỗ Thị Tuyết Nhung¹, Lê Trí Ân¹, Trần Hoàng Hiệp¹,
Huỳnh Thị Ngọc Mi², Nguyễn Ngọc Thanh², Huỳnh Xuân Phong^{2*}

¹Khoa Công nghệ thực phẩm và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ

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

Ngày nhận bài 23/3/2021; ngày chuyển phản biện 29/3/2021; ngày nhận phản biện 7/5/2021; ngày chấp nhận đăng 14/5/2021

Tóm tắt:

Rượu vang là loại thức uống có lợi sức khỏe và đang có xu hướng phát triển ngày càng đa dạng nhờ các chất có hoạt tính sinh học cao, khả năng kháng oxy hóa trong trái cây được giữ nguyên sau khi lên men bởi nấm men. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn nấm men có khả năng lên men rượu vang măng cầu xiêm. Nghiên cứu đã phân lập được 8 chủng nấm men, trong đó tuyển chọn được 5 chủng nấm men NM1.1, NM1.2, NM2.1, NM3.1 và NM3.2 có khả năng lên men rượu vang măng cầu. Sản phẩm rượu sau lên men sử dụng chủng NM1.1 với điều kiện ban đầu là 22°Brix, pH 4,5, tỷ lệ nấm men bổ sung là 1% (w/v) ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong thời gian 12 ngày cho hàm lượng ethanol là 10% v/v, methanol là 1,304 g/l và SO₂ là 10,9 mg/l, đạt Quy chuẩn Việt Nam QCVN 6-3:2010/BYT.

Từ khóa: *Annona muricata*, kháng oxy hóa, măng cầu xiêm, nấm men, rượu vang măng cầu xiêm.

Chỉ số phân loại: 2.10

Giới thiệu

Ngày nay ngành công nghiệp sản xuất rượu vang từ trái cây ngày càng phát triển, do đó nguồn nấm men cần thiết cho sự lên men cũng được quan tâm nhiều hơn. Trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn nguồn nấm men tự nhiên từ trái cây, như dưa hấu [1], khóm, cam [2, 3], thốt nốt [4], trái giắc [5]... Nhiều nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng các chủng nấm men được phân lập từ các nguồn trái cây cung cấp để lên men cho chính nguồn trái cây đó có hiệu quả đặc trưng cho từng loại rượu và sản phẩm rượu vang cũng đạt chất lượng theo yêu cầu [1, 2].

Rượu vang trái cây là một thức uống có lợi cho sức khỏe và đang có xu hướng phát triển ngày càng đa dạng. Rượu vang được sản xuất từ nhiều nguồn trái cây khác nhau như nho, cam, chuối, táo... Bên cạnh đó, các loại trái như giắc, cam, nho, chanh hay măng cầu xiêm... cũng chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học cao, có khả năng kháng oxy hóa, kháng viêm hay được sử dụng nhiều trong y học dân gian, đã góp phần không nhỏ trong việc lựa chọn nguồn nguyên liệu trái cây lên men, giúp ngành công nghiệp rượu vang ngày càng phát triển.

Măng cầu xiêm có tên khoa học là *Annona muricata*, thuộc họ Annonaceae và được biết với tiếng Anh là Soursop, có nguồn gốc từ Nam Mỹ, phân bố rộng rãi ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu cho thấy sự hiện diện của alkaloid, acetogenin và cyclopeptide trong măng cầu xiêm - là những hợp chất có tầm quan trọng, thu hút nhiều sự quan tâm về mặt dược học của nhiều nhà

khoa học. Măng cầu xiêm được người dân Indonesia sử dụng rộng rãi trong việc điều trị tiểu đường, chống viêm, diệt côn trùng, trị sốt rét, chống ung thư, kháng khuẩn và chống oxy hóa. Chiết xuất ethanol của lá măng cầu xiêm có chứa steroid, alkaloid, flavonoid, phenolic và saponin, đặc biệt có hoạt tính chống oxy hóa bằng cách loại bỏ gốc DPPH với IC₅₀ là 141,127 g/ml [6]. Lá và thịt măng cầu xiêm có khả năng kháng oxy hóa cao hơn các thành phần khác của cây do có chứa nhiều hợp chất phenol, flavonoid, alkaloid và essential lipid... [7]. Với các đặc tính sinh học vượt trội đã và đang được nghiên cứu hiện nay cho thấy, măng cầu xiêm là nguồn nguyên liệu tiềm năng trong lên men rượu vang đạt chất lượng tốt cho nhu cầu về ẩm thực và sức khỏe của con người.

Nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn nấm men có khả năng lên men rượu vang măng cầu, góp phần tạo nên sự đa dạng và phong phú cho ngành sản xuất rượu vang từ trái cây.

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu

Ba mẫu măng cầu xiêm được thu mua ở ba địa điểm khác nhau thuộc ấp 7, xã Thới Hưng, huyện Cờ Đỏ, TP Cần Thơ. Măng cầu xiêm được chọn phải chín đều nguyên vẹn, tươi, không bị hư hỏng, không sâu bệnh hay dập nát.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập nấm men: măng cầu chín được cắt miếng nhỏ tại 5 vị trí khác nhau (bao gồm phần thịt và vỏ), sau đó được nghiền nhỏ lấy nước. Lấy 2-3 g nước măng cầu nuôi tăng sinh trong môi trường YPD đã được chuẩn bị sẵn ở nhiệt độ phòng (28-30°C). Sau

*Tác giả liên hệ: Email: hxphong@ctu.edu.vn

Isolation and selection of yeasts from soursop *Annona muricata* for wine fermentation

Thi Kieu Tien Doan¹, Thi Tuyet Nhung Do¹, Tri An Le¹,
Hoang Hiep Tran¹, Thi Ngoc Mi Huynh²,
Ngoc Thanh Nguyen², Xuan Phong Huynh^{2*}

¹Food Technology and Biotechnology Faculty, Can Tho University of Technology

²Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

Received 23 March 2021; accepted 14 May 2021

Abstract:

Wine is a healthy drink and is becoming more diverse thanks to the substances with high biological activity and fully preserved the antioxidant capacity in the fruit after fermentation by yeast. This study aims to isolate yeasts that are capable of soursop fermentation. There were eight yeast strains isolated, in which five strains of yeasts NM1.1, NM1.2, NM2.1, NM3.1, NM3.2 are capable of fermenting soursop wine. Wine product after fermentation using strain NM1.1 with initial conditions of 22°Brix, pH 4.5, supplemented yeast 1% (w/v) at room temperature (28-30°C), in twelve-day, produced the ethanol content 10% v/v, methanol 1.304 g/l, and SO₂ 10.9 mg/l that meet Vietnamese standards (QCVN 6-3:2010/BYT).

Keywords: *Annona muricata*, anti-oxidation, soursop, soursop wine, yeasts.

Classification number: 2.10

48 giờ ủ môi trường tăng sinh được pha loãng đến 10⁻⁵ và cấy trải trên môi trường YPD agar, sau đó tiến hành phân lập (tách rỗng làm thuần) nấm men. Độ thuần của nấm men phân lập được kiểm tra dưới kính hiển vi x40. Nấm men thuần sau khi được phân lập sẽ được trữ giống trên môi trường YPD agar ở 4°C và trong glycerol 50% (v/v) ở -20°C.

Tuyển chọn nấm men lên men rượu măng cầu xiêm: tuyển chọn các dòng nấm men có hoạt tính lên men mạnh và nhanh các loại đường glucose 1%, saccharose 1% và nước măng cầu của các chủng nấm men phân lập được. Chủng 1 ml (10⁸ tế bào/ml) dịch tăng sinh nấm men lần lượt vào 9 ml dịch quả măng cầu, 9 ml môi trường phenol red carbohydrate broth chứa 1% đường glucose và 9 ml phenol red carbohydrate broth chứa 1% đường saccharose và ống Durham. Các khảo sát được bố trí ba lần lặp. Xác định khả năng lên men dựa vào chiều cao cột khí CO₂ sinh ra trong ống Durham ở nhiệt độ phòng (28-30°C) sau mỗi 4 giờ lên men trong vòng 48 giờ.

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men: khảo sát ảnh hưởng của giá trị pH và hàm lượng chất khô hòa tan của dịch

quả đến chất lượng sản phẩm: dịch ép măng cầu được pha loãng với nước cất (dịch ép măng cầu/nước cất = 1,5/1,0), sau đó bổ sung enzyme pectinase (0,03%) vào và ủ ở 50°C. Sau 2 giờ ủ, dịch ép măng cầu được lọc lấy phần nước trong và chỉnh về các giá trị pH (4; 4,5; 5) và °Brix (18; 20; 22). Sử dụng acid citric và đường saccharose để điều chỉnh pH và hàm lượng chất khô hòa tan. Dịch măng cầu sau khi điều chỉnh pH và °Brix, được thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/l trong 2 giờ). Chủng 1 ml môi trường nấm men vào 99 ml dịch ép măng cầu và ủ ở nhiệt độ phòng (28-30°C) với 8 ngày lên men.

Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men và thời gian lên men đến chất lượng sản phẩm: thử nghiệm được thực hiện với hàm lượng chất khô hòa tan và giá trị pH được lựa chọn từ thí nghiệm trên với tỷ lệ mật số chủng nấm men lần lượt là 1, 2 và 3%, lên men trong điều kiện nhiệt độ phòng (28-30°C) và thời gian lên men là 8, 10, 12 ngày.

Thử nghiệm lên men rượu măng cầu xiêm ở quy mô 1 l: rượu măng cầu xiêm được thử nghiệm lên men ở quy mô 1 l với các điều kiện lên men được tuyển chọn ở các thí nghiệm trên và phân tích các chỉ tiêu hóa học sau lên men (hàm lượng ethanol, methanol, acid tổng số, SO₂, hàm lượng đường tổng trước và sau lên men). Bên cạnh đó, các chỉ tiêu cảm quan về màu sắc, độ trong, mùi vị của sản phẩm cũng được đánh giá.

Phương pháp phân tích số liệu: số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphics XV và phần mềm Excel 2013.

Kết quả thảo luận

Phân lập nấm men

Qua quá trình phân lập từ 3 mẫu măng cầu xiêm đã thu được 8 chủng nấm men thuần (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm của các chủng nấm men phân lập được từ dịch ép măng cầu.

STT	Tên chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào		Hình ảnh tế bào
			Hình dạng	Kích thước (µm)	
1	NM1.1	Tròn, trắng sữa, sần, bìa sợi	Cầu	3,71x3,71	
2	NM2.1	Tròn, trắng sữa, sần, bìa sợi		4,03x4,02	
3	NM1.2	Tròn, trắng đục, sần, bìa sợi		3,96x3,26	
4	NM1.3	Tròn, trắng sữa, trơn láng, bìa nguyên	Ovan	3,75x3,41	
5	NM2.2	Tròn, trắng đục, trơn láng, bìa nguyên		3,11x2,76	
6	NM2.3	Tròn, trắng sữa, trơn láng, bìa nguyên		2,76x2,33	
7	NM3.1	Tròn, trắng sữa, trơn láng, bìa nguyên		4,25x3,97	
8	NM3.2	Tròn, trắng đục, trơn láng, bìa nguyên		3,93x3,52	

Dựa vào đặc điểm hình dạng tế bào được chia thành hai nhóm đặc trưng là tế bào hình cầu và hình ovan với đặc điểm khuẩn lạc tròn, trắng sữa, sần, bìa sợi hoặc trơn láng, bìa nguyên. Kích thước tế bào thay đổi theo từng chủng nấm men, các chủng nấm men có hình dạng tế bào hình ovan (NM1.2, NM1.3, NM2.2, NM2.3, NM3.1, NM3.2) có kích thước trung bình khoảng 2,76-4,25 x 2,33-3,97 (μm) chiếm số lượng ưu thế hơn với 6 chủng trong 8 chủng nấm men phân lập được, còn lại là 2 chủng có tế bào hình cầu (NM1.1, NM2.1) với kích thước tế bào trung bình khoảng 3,71-4,03 x 3,71-4,02 (μm).

Tuyển chọn nấm men lên men rượu mận cầu xiêm

Tất cả các chủng nấm men phân lập được thử khả năng lên men đường glucose 1%, saccharose 1% trong môi trường phenol red carbohydrate broth và dịch ép quả mận cầu. Kết quả thu được sau 48 giờ lên men được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả chiều cao cột khí CO_2 của các chủng nấm men sau 48 giờ.

Tên chủng	Chiều cao cột khí CO_2 trong chuông Durham (mm)											
	4 giờ	8 giờ	12 giờ	16 giờ	20 giờ	24 giờ	28 giờ	32 giờ	36 giờ	40 giờ	44 giờ	48 giờ
Glucose 1%	NM1.1	2,7 ^b	16,0 ^c	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
	NM1.2	1,8 ^{ab}	15,5 ^{bc}	27,3 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
	NM1.3	0 ^a	0 ^a	8,3 ^a	14,5 ^b	19,7 ^a	24,5 ^a	27,5 ^b	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
	NM2.1	5,3 ^c	16,5 ^c	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
	NM2.2	2,5 ^b	10,5 ^c	17,7 ^b	22,5 ^c	26,7 ^b	30 ^c	30 ^c	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
	NM2.3	1,3 ^{ab}	2,0 ^b	6,5 ^a	12,3 ^a	18,5 ^a	24,7 ^a	26,5 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
	NM3.1	2,8 ^b	14,0 ^d	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
	NM3.2	0 ^a	9,3 ^c	18 ^b	25 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^c	30 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a
Saccharose 1%	NM1.1	0 ^a	5,5 ^c	18 ^c	27,5 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d
	NM1.2	0 ^a	1,3 ^b	4,3 ^c	15 ^d	27 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d
	NM1.3	0 ^a	0 ^a	3,7 ^{bc}	7,7 ^b	12,3 ^c	17,5 ^c	20,5 ^c	22 ^c	24,5 ^c	26 ^c	27,5 ^b
	NM2.1	0 ^a	1,5 ^b	7,5 ^d	17 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d
	NM2.2	0 ^a	0 ^a	3,5 ^{bc}	7,5 ^b	10 ^b	13,5 ^b	16 ^b	18 ^b	21,5 ^b	24,5 ^b	26,5 ^b
	NM2.3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,3 ^a	2,5 ^a	9 ^a	14,5 ^a	18,5 ^a	22 ^a	24 ^a
	NM3.1	0 ^a	0,5 ^a	3,5 ^{bc}	13 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^c	30 ^d
	NM3.2	0 ^a	0 ^a	2,5 ^b	12,5 ^c	17,5 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^d
Dịch ép mận cầu xiêm	NM1.1	1,3 ^{bc}	11,0 ^d	21 ^c	28 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d
	NM1.2	1,0 ^b	6,5 ^c	12 ^c	20,5 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d
	NM1.3	0,0 ^a	3,5 ^b	8,3 ^b	15 ^b	20,5 ^b	22,5 ^b	24,5 ^b	26 ^b	27,5 ^b	28 ^c	28,5 ^c
	NM2.1	2,3 ^d	10,5 ^{cd}	17 ^d	25 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d
	NM2.2	1,7 ^c	8,3 ^d	13,5 ^c	17 ^c	22 ^c	23,5 ^c	25 ^b	25,5 ^b	27 ^b	27 ^b	27 ^b
	NM2.3	0,0 ^a	0,0 ^a	0,5 ^a	3,5 ^a	6,5 ^a	9,3 ^a	13 ^a	18 ^a	22,5 ^a	24,5 ^a	24,5 ^a
	NM3.1	1,0 ^b	9,7 ^c	17 ^d	27,5 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d
	NM3.2	0 ^a	3,5 ^b	13,5 ^c	21 ^d	30 ^d	30 ^d	30 ^c	30 ^c	30 ^d	30 ^d	30 ^d

Ghi chú: chiều cao tối đa của cột khí trong chuông Durham là 30 mm. Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp. Trong cùng một cột, các giá trị có các chữ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Cả 8 chủng nấm men đều có khả năng lên men đường glucose, saccharose và dịch ép mận cầu xiêm. Các chủng nấm men NM1.1, NM1.2, NM2.1, NM2.2 và NM3.1 bắt đầu lên men glucose và dịch ép mận cầu xiêm sau 4 giờ lên men đầu tiên, trong khi đó đường saccharose chưa có hiện tượng được lên men. Các chủng nấm men NM1.1, NM1.2, NM2.1, NM3.1 và NM3.2 có khả năng lên men nhanh và mạnh hơn các chủng còn lại, sau 16 giờ lên men dịch ép mận cầu xiêm chiều cao cột khí CO_2 lần lượt là 28,0; 20,5; 25,0; 27,5; 21,0 và đạt 30 mm sau 20 giờ lên men. Tuy nhiên, chủng NM2.3 có khả năng lên men thấp nhất trong 8 chủng nấm men phân lập được, chiều cao cột khí CO_2 trong ống Durham đo được sau 48 giờ lên men dịch ép mận cầu xiêm chỉ đạt 24,5 mm. Theo Đoàn Thị Kiều Tiên và cs (2018) [8] trong nghiên cứu tuyển chọn nấm men chịu nhiệt lên men rượu vang từ trái giắc của tỉnh Kiên Giang đã phân lập được 46 chủng nấm men, trong đó có các chủng nấm men *saccharomyces* sp. KG1.1, AG1.3, DT1.2, DT3.1 có thời gian lên men nhanh nhất, chiều cao cột khí CO_2 đạt 30 mm chỉ sau 6 giờ lên men và có khả năng lên men rượu vang tốt ở 37°C. Dựa vào khả năng lên men glucose, saccharose và dịch ép mận cầu bằng cách xác định chiều cao cột khí CO_2 đã tuyển chọn được 5 chủng nấm men NM1.1, NM1.2, NM2.1, NM3.1, NM3.2 cho thử nghiệm lên men rượu mận cầu. Tất cả 5 chủng nấm men được tuyển chọn thử nghiệm lên men rượu mận cầu với thể tích 100 ml, kết quả thu được sau quá trình lên men cho thấy, 2 chủng NM1.1 (11,20% v/v), NM2.1 (10,93% v/v) có hàm lượng ethanol sinh ra cao hơn, có khác biệt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các chủng NM1.2 (9,06% v/v), NM3.1 (8,93% v/v) và NM3.2 (8,36% v/v).

Ảnh hưởng của chỉ số pH và hàm lượng chất khô hòa tan ban đầu đến chất lượng của sản phẩm

Sử dụng chủng nấm men NM1.1 vào quá trình lên men, hàm lượng chất khô hòa tan ($^{\circ}\text{Brix}$) và pH của dịch lên men có sự tương tác với nhau và ảnh hưởng đến hàm lượng ethanol sinh ra của sản phẩm được trình bày ở bảng 3, giữa các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH và hàm lượng chất khô hòa tan đến chất lượng sản phẩm.

Nghiệm thức	Giá trị pH trước lên men	Nồng độ chất khô hòa tan trước lên men ($^{\circ}\text{Brix}$)	Giá trị pH sau lên men	Nồng độ chất khô hòa tan sau lên men ($^{\circ}\text{Brix}$)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
1	4,0	18	3,4 ^a	6,2 ^a	6,2 ^a
2	4,0	20	3,5 ^a	7,0 ^{abc}	8,3 ^b
3	4,0	22	3,6 ^{bc}	7,5 ^{abc}	8,9 ^b
4	4,5	18	3,5 ^b	6,7 ^{ab}	6,7 ^a
5	4,5	20	3,6 ^c	8,6 ^{bcd}	8,2 ^b
6	4,5	22	3,6 ^{bc}	9,2 ^{bc}	10,7 ^c
7	5,0	18	3,6 ^c	7,3 ^{abc}	6,6 ^a
8	5,0	20	3,6 ^c	7,6 ^{abc}	8,0 ^b
9	5,0	22	3,6 ^c	10,1 ^d	8,3 ^b

Ghi chú: các chữ khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định LSD.

Hàm lượng chất khô hòa tan và pH ban đầu của sản phẩm giảm sau khi quá trình lên men kết thúc. Kết quả cho thấy, độ Brix ban đầu càng cao sinh ra hàm lượng ethanol càng cao khi lên men ở cùng điều kiện pH, thời gian lên men và tỷ lệ nấm men. Ở nghiệm thức (1), (2) và (3) với pH ban đầu 4,0 và độ Brix ban đầu lần lượt là 18, 20 và 22 thì hàm lượng ethanol sinh ra là 6,2; 8,3 và 8,9% v/v. Khi pH ban đầu được tăng lên 4,5 thì hàm lượng ethanol cũng tăng, tuy nhiên khi pH tăng lên 5,0 thì hàm lượng ethanol ở nghiệm thức 7 (6,6% v/v), 8 (8,0% v/v) và 9 (8,3% v/v) giảm hơn so với các nghiệm thức 4 (6,7% v/v), 5 (8,2% v/v) và 6 (10,7% v/v). Trong cùng điều kiện lên men ở 22^oBrix; pH 4,5, rượu vang thốt nốt (13,67% v/v) [4] và rượu xương rồng gai (13,5% v/v) [9] có hàm lượng ethanol sinh ra cao hơn rượu mãng cầu xiêm (10,7% v/v). Điều này có thể do sự khác nhau về mật số nấm men, tính chất nguyên liệu và giống nấm men sử dụng.

Từ các kết quả có thể thấy rượu mãng cầu xiêm lên men tốt ở 22^oBrix và giá trị pH 4,5 nên các giá trị này được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men và thời gian lên men đến chất lượng của sản phẩm

Tỷ lệ nấm men và thời gian lên men ảnh hưởng lớn đến quá trình lên men. Kết quả bảng 4 cho thấy, khi ở cùng thời gian lên men, nếu tỷ lệ nấm men tăng từ 1% lên 2% thì hàm lượng ethanol sinh ra tăng. Tuy nhiên khi tỷ lệ nấm men cao quá (ở mức 3%) thì lượng cơ chất sử dụng càng nhiều, trong môi trường không đủ nồng độ cơ chất cho nấm men sử dụng để sinh trưởng thì thời gian lên men kết thúc sớm nhưng lượng ethanol sinh ra không tăng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men và thời gian lên men đến chất lượng sản phẩm.

Nghiệm thức	Tỷ lệ nấm men (%)	Thời gian lên men (ngày)	Giá trị pH sau lên men	Nồng độ chất khô hòa tan sau lên men (^o Brix)	Hàm lượng ethanol (% v/v)
1	1	8	3,5 ^a	9,7 ^b	7,0 ^a
2	1	10	3,6 ^a	7,4 ^a	9,7 ^c
3	1	12	3,6 ^a	6,5 ^a	10,6 ^c
4	2	8	3,6 ^a	9,6 ^b	8,6 ^b
5	2	10	3,5 ^a	7,2 ^a	9,8 ^{cd}
6	2	12	3,6 ^a	6,8 ^a	10,4 ^{de}
7	3	8	3,5 ^a	9,5 ^b	8,7 ^b
8	3	10	3,6 ^a	7,1 ^a	9,5 ^c
9	3	12	3,5 ^a	7,4 ^a	9,9 ^{cde}

Ghi chú: các chữ khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% theo kiểm định LSD.

Kết quả cho thấy, sau 8 ngày lên men ở nghiệm thức 1 (1% nấm men), 4 (2% nấm men), 3 (3% nấm men) thì hàm lượng ethanol sinh ra lần lượt là 7,0, 8,6 và 8,7% v/v. Hàm lượng ethanol tăng sau 10 ngày lên men và đạt cao nhất ở 12 ngày lên men, lần lượt là 10,6; 10,4 và 9,9 v/v. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu gần đây về rượu vang khóm [2]. Mật số nấm men thích

hợp cho quá trình lên men rượu khóm là 10⁶ tế bào/ml. Hàm lượng giống ít (10³ tế bào/ml) thì nguồn carbon được nấm men sử dụng để tăng sinh khối ít, hàm lượng ethanol sinh ra thấp, còn khi lượng giống quá nhiều (10⁷ tế bào/ml) sẽ xảy ra sự cạnh tranh chất dinh dưỡng, hàm lượng ethanol sinh ra cũng thấp.

Các kết quả thu được cho thấy, rượu mãng cầu xiêm lên men tốt ở pH là 4,5, 22^oBrix với tỷ lệ nấm men là 1% và thời gian lên men là 12 ngày, các điều kiện này được lựa chọn lên men rượu mãng cầu thử nghiệm ở quy mô 1 l.

Lên men rượu vang mãng cầu xiêm ở quy mô 1 l

Rượu vang mãng cầu xiêm được lên men theo các điều kiện tối ưu là pH 4,5, 22^oBrix, tỷ lệ nấm men là 1% ở nhiệt độ phòng (28-30^oC) trong 12 ngày. Rượu sau khi lên men được kiểm tra phân tích các chỉ tiêu hóa học tại Trung tâm Kiểm soát bệnh tật, Sở Y tế TP Cần Thơ (bảng 5).

Bảng 5. Kết quả phân tích chỉ tiêu hóa học của rượu vang mãng cầu xiêm.

Chỉ tiêu	Kết quả	Phương pháp thử	Mức cho phép	So sánh
Hàm lượng ethanol (ở 20 ^o C)	10% v/v	TCVN 8008:2009	≥8,5%	Đạt
Hàm lượng đường tổng trước lên men	21,11 g/100 ml	TCVN 4594:1998	Theo CBNSX	-
Hàm lượng đường tổng sau lên men	0,83 g/100 ml	TCVN 7044:2009	Theo CBNSX	-
Hàm lượng acid tổng	0,65%	AOAC930.35-2012	Theo CBNSX	-
Hàm lượng methanol (mg/l cồn 100 ^o)	1,304 g/l	FOA-1986 14/8, P301	≤10 g/l	Đạt
Hàm lượng SO ₂	10,9 mg/l	AOAC 892.02-2012	≤350 mg/l	Đạt

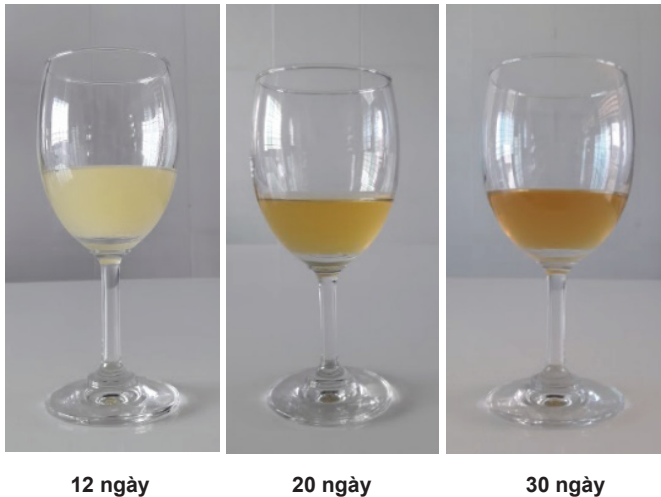
Ghi chú: CBNSX: công bố của nhà sản xuất.

Rượu mãng cầu xiêm sau khi lên men có hàm lượng ethanol (10% v/v), methanol (1.304 g/l 100^o) và hàm lượng SO₂ (10,9 mg/l), đạt Quy chuẩn Việt Nam QCVN 6-3:2010/ BYT. Nồng độ methanol trong rượu mãng cầu cao hơn rượu vang khóm (<1 g/l) [2] và rượu vang dưa hấu (0,4 g/l) [1] nhưng thấp hơn so với rượu vang giấm (2,534 g/l) [10]. Trong quá trình lên men, đường được nấm men sử dụng để tăng sinh khối và tổng hợp một số sản phẩm (rượu, CO₂, acid acetic...). Hàm lượng đường giảm từ 25,11 xuống 0,83 g/100 ml sau khi lên men. Nấm men đã sử dụng gần như hoàn toàn lượng đường được bổ sung ban đầu để thực hiện quá trình lên men.

Đánh giá cảm quan sản phẩm theo thời gian tồn trữ

Rượu mãng cầu xiêm sau khi lên men cũng được đánh giá cảm quan theo thời gian tồn trữ nhất định nhằm lựa chọn được thời gian tồn trữ thích hợp cho rượu khi đưa vào sử dụng và cho những nghiên cứu xa hơn về thời gian tồn trữ cũng như bảo quản rượu trong tương lai.

Sản phẩm có màu vàng ngà và vẫn đục, mùi ethanol còn nồng và chưa êm dịu, có vị chua mạnh sau 12 ngày lên men. Tiếp tục được bảo quản ở nhiệt độ phòng đến ngày thứ 20 (sau khi đã gạn cặn lần 1) thì sản phẩm trong dần, không còn vẫn đục nhiều và có màu nâu cánh gián nhạt. Đến ngày thứ 30, rượu chuyển sang màu nâu cánh gián đậm, không còn vị chua gắt (hình 4).



Hình 1. Sự thay đổi của rượu vang theo thời gian tồn trữ.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, chất lượng cảm quan về màu sắc, mùi vị, độ trong của sản phẩm tốt hơn sau thời gian tồn trữ dài là 30 ngày so với sản phẩm vừa kết thúc quá trình lên men hay so với sản phẩm sau 20 ngày. Như vậy thời gian tồn trữ có ý nghĩa rất quan trọng đối với chất lượng cảm quan của sản phẩm rượu vang.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 5 chủng nấm men NM1.1, NM1.2, NM2.1, NM3.1 và NM3.2 có khả năng lên men rượu mãng cầu xiêm. Sử dụng chủng nấm men NM1.1 lên men rượu mãng cầu với điều kiện lên men là 22°Brix, pH 4,5, tỷ lệ nấm men bổ sung là 1% ở nhiệt độ phòng (28-30°C) trong thời gian 12 ngày, hàm lượng ethanol đạt được là 10% v/v. Sản phẩm rượu được tồn trữ ở thời gian 30 ngày cho thấy, không còn vị chua gắt và có màu cánh gián đậm. Nghiên cứu này đã góp phần bổ sung các chủng nấm men có tiềm năng ứng dụng trong lên men rượu vang cũng như phát triển các sản phẩm lên men từ trái cây đặc trưng ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long cũng như cả nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ngô Thị Phương Dung, Lý Huỳnh Liên Hương, Huỳnh Xuân Phong (2011), “Phân lập, tuyển chọn nấm men và xác định điều kiện ảnh hưởng đến quy trình lên men rượu vang dưa hấu”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **18b**, tr.137-145.
- [2] Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Minh Thủy, Trần Thị Quế, Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, Nguyễn Phú Cường, Huỳnh Trần Toàn (2013), “Lên men rượu vang khóm (*Ananas comosus*) cầu đúc (Hậu Giang) bằng nấm men phân lập và thuần chủng”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **27**, tr.56-63.
- [3] A. Nasir, S.S. Rahman, M.M. Hossain, N. Choudhury (2017), “Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from pineapple and orange and study of metal's effectiveness on ethanol production”, *European Journal of Microbiology and Immunology*, **7(1)**, pp.76-91.
- [4] Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành, Bùi Thị Thủy Ngân (2011), “Tuyển chọn các dòng nấm men được phân lập từ nước thối nổi”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **18b**, tr.117-126.
- [5] Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Lữ Hằng Nghi, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Ngọc Thanh, Bùi Hoàng Đăng Long, Hà Thanh Toàn, Ngô Thị Phương Dung (2019), “Đánh giá khả năng duy trì hàm lượng polyphenol và hoạt tính kháng oxy hóa khi lên men rượu vang từ trái giắc ở tỉnh Cà Mau sử dụng *Saccharomyces cerevisiae* CM3.2.”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **55(2)**, tr.285-291.
- [6] I. Hasamilal, H. Natsir, N.H. Soekamto (2019), “Phytochemical analysis and antioxidant activity of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.)”, *Journal of Physics: Conference Series*, **1341**, p.032027.
- [7] C.A. Kingsley, N.O. Paulinus (2017), “Proximate composition, phytochemical analysis, and *in vitro* antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursop)”, *Food Science & Nutrition*, **5(5)**, pp.1029-1036.
- [8] Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Thị Hoàng Anh, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong, Hà Thanh Toàn, Ngô Thị Phương Dung (2018), “Tuyển chọn nấm men chịu nhiệt lên men rượu vang trái giắc (*Cayratia trifolia* L.) của tỉnh Kiên Giang”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **1**, tr.54-62.
- [9] Đinh Hữu Đông (2014), “Nghiên cứu sản xuất rượu vang từ quả xương rồng gai”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP Hồ Chí Minh*, **4**, tr.71-80.
- [10] Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Nguyễn Đức Độ, Hà Thanh Toàn, Ngô Thị Phương Dung (2018), “Khảo sát hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa của dịch trái giắc (*Cayratia trifolia*) trước và sau lên men sử dụng nấm men chịu nhiệt *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **60(8)**, tr.60-64.