

SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG MEN THUẦN TRONG LÊN MEN RƯỢU NẾP THAN

Ngô Thị Phương Dung¹

ABSTRACT

Amylomyces rouxii and Saccharomyces cerevisiae were applied as the inoculation for the defined starter processing. The mixed ingredients of broken maize and rice husk were favourable to be used for production of mould starter powder, and the incubation time was 6 days. The yeast starter powder was prepared in a 20l fermentation tank, in which the yeast level was found at 10^9 cells/yeast starter powder. The ratio of 1,5% mould starter and 0,4% yeast starter was found to be favourable for making purple glutinous rice wine. Rice flour, rice flour and cassava flour were able to be used as raw ingredients in production of defined starter. The alcoholic fermentation ability of defined starter was found to decrease during the storage; however, the ethanol contents produced by using starter after 12 months of storage was still highly performed (16,2% (v/v) ở 20°C). Three undesirable bacterial isolates in defined starter were characterized as Bacillus subtilis/amyloliquefaciens that is not produced toxic substance and not considered as a human pathogen.

Keywords: *Amylomyces rouxii, Saccharomyces cerevisiae, defined starter*

Title: *Production and application of defined starter for purple glutinous rice wine processing*

TÓM TẮT

Amylomyces rouxii và Saccharomyces cerevisiae được sử dụng làm giống chủng cho qui trình sản xuất men rượu thuần. Bắp mánh và trấu là cơ chất thích hợp cho môi trường sản xuất bột mốc, và thời gian ủ mốc là 6 ngày. Qui trình sản xuất bột men được thử nghiệm trong bình 20lít, và mật số tế bào nấm men có thể đạt đến 10^9 tế bào/g bột men. Tỷ lệ gồm 1,5% bột mốc và 0,4% bột men là thích hợp cho qui trình sản xuất rượu nếp than. Thành phần là bột gạo, hỗn hợp bột gạo và bột khoai mì thích hợp làm môi trường để sản xuất men rượu thuần gồm tổ hợp mốc và men. Hoạt tính men rượu có chiều hướng giảm trong quá trình lên men rượu sau thời gian tồn trữ, tuy vậy nồng độ cồn đạt được khi sử dụng men rượu sau 12 tháng tồn trữ vẫn còn thể hiện khá cao (16,2 % (v/v) ở 20°C). Vi khuẩn lây nhiễm trong men rượu thuần có tên Bacillus subtilis/amyloliquefaciens là loài vi khuẩn không sinh độc tố và không nhiễm bệnh đối với người.

Từ khóa: *Amylomyces rouxii, Saccharomyces cerevisiae, men rượu thuần*

1 GIỚI THIỆU

Ở Việt Nam, Rượu Nếp Than là một thức uống có cồn rất phổ biến và đặc biệt ưa thích do hương vị thơm ngon và màu đỏ đẹp hấp dẫn. Tuy nhiên năng suất rượu làm ra không được ổn định và chất lượng sản phẩm rượu vẫn chưa đạt tiêu chuẩn nhà nước, đặc biệt là các chỉ tiêu chất lượng về hóa lý, vi sinh và an toàn thực phẩm.

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học

Điều này đã gây mối nguy hại cho sức khỏe của người tiêu dùng và tỉ lệ gia tăng về ngộ độc gần đây đã được cảnh báo nghiêm trọng trên các thông tin đại chúng và trên báo chí. Chính vì thế mà sản phẩm rượu truyền thống vốn nổi tiếng từ rất lâu đời nhưng vẫn không thể mở rộng được để phục vụ rộng rãi hơn nữa cho người tiêu dùng trong nước, cũng như không thể xuất khẩu ra thị trường nước ngoài. Do đó, cần hoàn thiện qui trình công nghệ sản xuất rượu một cách khoa học và cải tiến chất lượng sản phẩm rượu thành phẩm; từ đó mới có thể sản xuất ra sản phẩm đạt chất lượng và an toàn cho người tiêu dùng, mở rộng được quy mô sản xuất, góp phần tích cực cải thiện thu nhập và nâng cao đời sống cho phần đông người lao động địa phương.

Nhiều nghiên cứu khoa học đã xác định hệ vi sinh vật trong men làm rượu, đặc biệt là nấm mốc và nấm men (Lee, and Fujio, 1999; Nout, and Aidoo, 2002; Dung *et al.*, 2007), là một trong những yếu tố chủ yếu có vai trò rất quan trọng trong quá trình lên men rượu và ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng sản phẩm cuối cùng. Việc sử dụng nguồn giống vi sinh vật thuần chủng có hoạt tính cao và có tính ổn định trong quá trình lên men rượu là rất cần thiết. Nội dung đề tài này gồm xác định hoạt tính của *Amylomyces rouxii* và *Saccharomyces cerevisiae* đã được phân lập và tuyển chọn do có hoạt tính cao trong quá trình đường hóa và rượu hóa (Dung *et al.*, 2005; Dung *et al.*, 2006), nghiên cứu điều kiện sản xuất và sử dụng men giống thuần, đánh giá tính ổn định của men giống sau thời gian tồn trữ, và phân lập định danh vi khuẩn lây nhiễm trong quá trình sản xuất men rượu thuần.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

- Giống chủng: nấm mốc *Amylomyces rouxii* (20.3, CBS 111757; LU2043) và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (2.1, LU1250).
- Các nguyên liệu: Bắp mảnh, trấu, tấm gạo, cám, bột gạo, bột khoai mì, gạo nếp than.
- Hóa chất: dùng trong phương pháp nhuộm huỳnh quang, phân tích hóa lý, nuôi cấy vi sinh vật, và bộ kit thử glucose oxidase (Megazyme – GLC 9/96).
- Môi trường nuôi cấy và phân lập: PGA, PCA, MEA.
- Các thiết bị và dụng cụ dùng trong phòng thí nghiệm CNSH thực phẩm và Sinh hóa.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xác định hoạt tính *A. rouxii* và *S. cerevisiae*

Nuôi cấy nấm mốc 5 ngày và nấm men 2 ngày trên môi trường PGA ủ ở 30°C, chuẩn bị giống chủng bằng nước muối sinh lý 0,85%, mật số bào tử hay tế bào đạt 10⁶/ml. Xác định hoạt tính *A. rouxii* trong quá trình đường hóa từ gạo nếp than và hoạt tính *S. cerevisiae* trong quá trình lên men rượu từ dịch đường hóa.

2.2.2 Sản xuất bột mốc thuần từ nấm mốc *A. rouxii*

Thử nghiệm môi trường: sử dụng các loại cơ chất như tấm gạo, bột khoai mì, cám và bắp mảnh để tiến hành nuôi mốc. Trấu nhỏ được bổ sung vào môi trường với tỷ lệ 30% so với khối lượng cơ chất nhằm tạo độ xốp. Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Mẫu thu hoạch được sấy khô ở 42°C.

Xác định thời gian ủ: gồm 3 nghiệm thức (5, 6, 7 ngày ủ) và 3 lần lặp lại; sử dụng môi trường nuôi từ kết quả của thí nghiệm trước; bổ sung khoáng là KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaSO_4 .

Khảo sát tỉ lệ sử dụng bột mốc: sau khi chọn môi trường nuôi và thời gian ủ mốc thích hợp, tiến hành thí nghiệm thử tỉ lệ sử dụng bột mốc. Có 4 nghiệm thức: 0,5%; 1%; 1,5% và 2% bột mốc so với cơ chất và có 3 lần lặp lại.

Hoạt tính bột mốc được xác định trong quá trình đường hóa từ gạo nếp than.

2.2.3 Sản xuất bột men thuần từ nấm men *S. cerevisiae*

Sinh khối nấm men được nuôi trong bình lên men 20l chứa môi trường PG trong 16 giờ. Sau khi ly tâm 7000 vòng/phút, 20 phút ở 4°C, khối men thu hoạch được trộn với bột gạo đã được sấy khử trùng ở 100°C trong 17 giờ và làm nguội đến 30-40°C. Mẫu thu hoạch được sấy khô ở 42°C. Tiến hành thử tỉ lệ sử dụng bột men cho quá trình lên men rượu từ dịch đường hóa gạo nếp than ở 20°Brix. Có 4 nghiệm thức: 0,2%; 0,4%; 0,6% và 0,8% bột men so với cơ chất và có 3 lần lặp lại. Thu hoạch dịch lên men và phân tích các chỉ tiêu.

2.2.4 Xác định tỉ lệ phối hợp bột mốc và bột men trong sản xuất rượu nếp than

Thí nghiệm gồm 2 nhân tố 3 mức độ và 3 lần lặp lại. Tỉ lệ so với cơ chất là bột mốc (1%; 1,5% và 2%) và bột men (0,2%; 0,4% và 0,8%). Gạo nếp than sau khi ngâm 4 giờ được hấp ở 100°C trong 1 giờ, để nguội, chùng bột mốc vào khối nếp hấp, trộn đều và đem ủ ở 30°C. Sau 3 ngày, tiến hành chan nước đã vô trùng và chùng bột men, ủ ở 30°C trong 5 ngày. Thu dịch lên men và tiến hành phân tích các chỉ tiêu.

2.2.5 Sản xuất men rượu thuần gồm tổ hợp nấm mốc và nấm men

Qui trình dựa trên phương pháp cổ truyền sản xuất viên men rượu và được cải tiến ở một số bước thích hợp dựa vào những kết quả tối ưu đạt được trong các thử nghiệm. Giống chủng gồm *A. rouxii* và *S. cerevisiae* đã phát triển trên môi trường thạch nghiêng. Thí nghiệm thử tìm ra cơ chất thích hợp và điều kiện chuẩn bị đơn giản để có thể sử dụng trong sản xuất men rượu với số lượng lớn, có 5 nghiệm thức với 3 lần lặp lại.

2.2.6 Đánh giá tính ổn định của men giống qua quá trình tồn trữ

Men rượu thuần sau thời gian tồn trữ là 3, 6, 9 và 12 tháng trong bọc PP, ép miệng, ở 4°C được xác định hoạt tính trong quá trình lên men rượu.

Bột mốc sau khi được sản xuất và tồn trữ trong bọc PP ép miệng, ở nhiệt độ môi trường xung quanh sau 3, 6 và 9 tháng được xác định mật số bào tử và hoạt tính trong quá trình đường hóa.

Bột men sau khi được sản xuất và tồn trữ, lấy mẫu sau 1, 3 và 5 tháng để xác định mật số và hoạt tính trong quá trình lên men rượu. Điều kiện khảo sát gồm cách đóng gói, nhiệt độ, và thời gian tồn trữ.

2.2.7 Phân lập và định danh vi khuẩn nhiễm trong quá trình sản xuất men giống

Vi khuẩn nhiễm được phân lập bằng môi trường PCA và tồn trữ trong MEA. Định danh vi khuẩn qua phân tích hình thái, nuôi cấy, thử trao đổi chất cacbon và nitơ (Biolog GP), ly trích DNA và phân tích bộ gen bằng PCR (primer 16S500F & 16S500R). Kết quả định danh được phân tích và xác định bằng chương trình Bionumerics, Biolog và BLAST (NCBI website).

2.3 Phương pháp phân tích

Khả năng đường hóa của nấm mốc: phát triển của khuẩn ty, rỉ dịch đường từ khối nếp lên men, đo pH, xác định glucoz bằng kit thử glucoz oxidaz, đo thể tích dịch rỉ.

Khả năng lên men rượu của nấm men: sự sinh gas (bọt khí trong waterlock), đo pH, xác định glucoz, xác định rượu etylic bằng chung cất.

Xác định mật số vi sinh vật bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang.

Xác định độ ẩm của bột giống thuần bằng phương pháp sấy.

Phân tích thống kê bằng chương trình StatGraphics Plus Version 5, Manugistics, Inc., Rockville, USA.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hoạt tính của *A. rouxii* và *S. cerevisiae*

Sự xuất hiện của khuẩn ty mốc và dịch rỉ tăng dần theo thời gian trong quá trình ủ, dịch rỉ sinh ra nhiều, rất sánh và trong, hàm lượng glucoz đạt đến 27,93%w/v cho thấy khả năng đường hóa cao của *A. rouxii* và đạt chất lượng dùng làm nguồn giống chủng. Trong dịch đường hóa có chứa nhiều loại đường khác nhau như: glucoz, maltoz, fructoz, ...nhưng chủ yếu là glucoz. *S. cerevisiae* chủ yếu sử dụng đường glucoz để chuyển hóa thành rượu, vì vậy có sự tương quan giữa hàm lượng glucoz còn lại với nồng độ cồn sinh ra. Hàm lượng glucoz còn lại nhiều thì nồng độ cồn thấp và ngược lại. Trong thí nghiệm này, glucoz trong dịch đường hóa là 13,67% (w/v), sau 4 ngày lên men thu hoạch mẫu đem phân tích thấy có độ cồn đạt 6,2 %v/v ở 20°C và lượng glucoz trong dịch lên men còn 3,49% (w/v). Điều này cho thấy nấm men có khả năng lên men mạnh và nhanh, biến đổi gần như hoàn toàn lượng glucoz tiêu thụ thành etanol.

Việc xác định hoạt tính đường hóa cao của nấm mốc và khả năng lên men mạnh của nấm men là rất quan trọng, cần phải thực hiện mỗi khi bắt đầu sử dụng làm nguồn giống chủng cho quá trình sản xuất, vì đây là khâu đầu tiên trong quá trình sản xuất, trong khi vi sinh vật rất nhạy, dễ bị ảnh hưởng bởi điều kiện nuôi cấy và qua quá trình tồn trữ.

3.2 Sản xuất bột mốc thuần

3.2.1 Môi trường sản xuất bột mốc

Do yêu cầu thực tế của các đơn vị cơ sở phối hợp để thử nghiệm, có trường hợp khi chỉ sử dụng nấm mốc để thử khả năng đường hóa trong khi có trường hợp chỉ cần sử dụng nấm men để thử khả năng lên men rượu, vì vậy bột mốc và bột men được thử nghiệm sản xuất riêng biệt nhau. Thử nghiệm sản xuất bột mốc từ 5 loại môi trường khác nhau, để tìm ra cơ chất thích hợp cho nấm mốc phát triển. Các loại cơ chất được tuyển chọn dựa trên nguyên tắc là chọn các loại cơ chất thông thường, rẻ tiền, dễ tìm và phổ biến trong vùng.

Kết quả mật số bào tử nấm mốc được xác định bằng phương pháp đếm huỳnh quang và khả năng đường hóa của bột mốc trên khối nếp hấp ở Bảng 1. Khi chủng các loại bột mốc MT1, MT2, MT3 khuẩn ty gần như không xuất hiện trên khối nếp hấp sau 3 ngày ủ mốc mặc dù lượng dịch rỉ thu được khá nhiều nhưng rất đục và lỏng. Nhưng khi chủng hai loại bột mốc còn lại là MT4 và MT5 thì dịch rỉ sinh ra từ khối nếp hấp nhiều, sánh và trong; khuẩn ty phát triển phủ đều khắp bề mặt khối nếp. Kết quả thống kê cho thấy sự khác biệt về hoạt tính của 5 loại bột mốc dựa trên thể tích dịch rỉ và hàm lượng glucoz sinh ra trong dịch rỉ sau giai đoạn ủ mốc có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Môi trường MT4 là môi trường thích hợp nhất cho nấm mốc phát triển.

Bảng 1: Mật số bào tử và khả năng đường hóa của nấm mốc

Môi trường	Loại cơ chất	Thành phần cơ chất (%)	Log bào tử/g bột mốc	Glucoz (%w/v)	Thể tích dịch rỉ (ml)
MT1	Tấm gạo	100	- ¹	0,11c ³	31,54a
MT2	Tấm gạo	80	-	0,46c	27,60b
	Bột khoai mì	20			
MT3	Tấm gạo	80	-	0,15c	30,12a
	Cám	20			
MT4	Bắp mảnh	100	6,6 ²	24,18a	30,78a
MT5	Bắp mảnh	80	6,2	12,21b	31,01a
	Cám	20			

1 không phát hiện bào tử trên buồng đếm.

2 Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

3 Các giá trị có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.2.2 Xác định thời gian ủ thích hợp để sản xuất bột mốc

Nấm mốc được nuôi trong các bọc nylon có xom những lỗ nhỏ nhằm tạo sự thoáng khí trong quá trình ủ mốc. Sự xuất hiện dịch rỉ tăng dần theo thời gian ủ mốc. Sau 3 ngày, dịch rỉ sinh ra rất nhiều, sánh và trong. Khuẩn ty nấm mốc xuất hiện ít trên khối nếp, chứng tỏ nấm mốc phát triển theo chiều hướng sinh enzym và đường hoá. Hàm lượng glucoz trong dịch rỉ đạt đến 26,49 (%w/v) cho thấy hoạt tính đường hóa cao của nấm mốc. Sau 3 ngày ủ, giá trị pH giảm từ 6,02 xuống trong khoảng 5,12-5,14. Kết quả này chứng tỏ sự thành công của quá trình ủ mốc vì nếu khối mốc ủ bị nhiễm khuẩn, giá trị pH sẽ giảm đáng kể xuống còn pH 3,0-3,5. Mật số

bào tử ở ba nghiệm thức đều đạt 10^6 bào tử/g bột mốc, trong khi hàm lượng glucoz của dịch rỉ ở nghiệm thức ủ 5 ngày thấp hơn so với ủ 6 ngày và 7 ngày với độ tin cậy 95%. Lượng glucoz sinh ra giữa ủ 6 ngày và 7 ngày khác biệt không ý nghĩa, do đó nghiệm thức 6 ngày là thời gian ủ thích hợp thích để sản xuất bột mốc.

Bảng 2: Hoạt tính đường hóa của bột mốc qua các thời gian ủ

Nghiệm thức	Thời gian ủ mốc (ngày)	Độ ẩm bột mốc (% w/v)	Xuất hiện dịch rỉ			Thể tích dịch rỉ (ml)	Hàm lượng glucoz (% w/v)
			1 ngày	2 ngày	3 ngày		
A1	5	6,02 ¹	+ ²	++	+++	45,00b ³	24,01b
A2	6	5,80	+	++	+++	47,33a	26,49a
A3	7	5,78	+	++	+++	47,00a	26,28a

¹ Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

² Mức độ xuất hiện của dịch rỉ tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

³ Các giá trị có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.2.3 Khảo sát tỉ lệ sử dụng bột mốc

Giá trị pH sau ủ mốc ở cả 4 nghiệm thức nằm trong khoảng 5,22 – 5,26. Hàm lượng glucoz khác biệt có ý nghĩa ở các nghiệm thức nhưng đều đạt mức khá cao 22,86 – 26,74 (%w/v). Lượng glucoz sinh ra trong dịch rỉ từ khối nếp hấp ở nghiệm thức sử dụng 0,5% bột mốc có giá trị thấp nhất, kể đến là nghiệm thức sử dụng 1,0% bột mốc. Ở hai nghiệm thức sử dụng 1,5% và 2% bột mốc có lượng glucoz trong dịch rỉ khác biệt không ý nghĩa. Như vậy với tỉ lệ bột mốc sử dụng thấp hơn nhưng vẫn cho hàm lượng glucoz trong dịch rỉ cao, cho thấy tỉ lệ sử dụng 1,5% bột mốc là thích hợp để sử dụng cho quá trình đường hóa.

Bảng 3: Hoạt tính đường hoá của nấm mốc qua các tỉ lệ sử dụng

Nghiệm thức	Tỉ lệ bột mốc (%)	Xuất hiện dịch rỉ			Thể tích dịch rỉ (ml)	Glucoz (% w/v)
		1 ngày	2 ngày	3 ngày		
A1	0,5	+ ¹	++	+++	36,97b ²	22,86c
A2	1,0	+	++	+++	40,67b	24,80b
A3	1,5	+	++	+++	42,67a	26,41a
A4	2,0	+	++	+++	44,00a	26,74a

¹ Mức độ xuất hiện của dịch rỉ tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

² Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.3 Sản xuất bột men thuần và khảo sát tỉ lệ sử dụng bột men

Bột men được sản xuất theo yêu cầu thực tế của một số cơ sở đã có sẵn dịch rỉ đường và chỉ cần nguồn giống chủng là nấm men để thực hiện quá trình lên men rượu. Nấm men được nuôi trong trong bình 20lít và mật số tế bào nấm men trong bột men đạt 10^9 tế bào/g bột men. Độ ẩm của bột men là 5,21 (w/w). Khả năng lên men rượu của bột men qua các tỉ lệ sử dụng khác nhau được trình bày trong Bảng 4. Kết quả cho thấy trừ nghiệm thức sử dụng 0,2% bột men thì sự lên men diễn ra yếu và chậm hơn, còn ở 3 nghiệm thức còn lại bột khí CO₂ sinh ra nhiều, sự lên men diễn ra mạnh mẽ và nhanh chóng. Độ pH của dịch sau lên men (4,5) thấp hơn

so với trước khi lên men, đây là do trong quá trình chuyển hoá đường thành rượu, nấm men đã phân giải đường thành các sản phẩm trung gian như các axit hữu cơ, làm giảm pH của dịch lên men.

Kết quả thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về khả năng lên men ở bốn tỉ lệ sử dụng dựa trên lượng glucoz và độ còn trong dịch sau lên men, xác định được tỉ lệ 0,4% bột men là thích hợp sử dụng cho quá trình lên men rượu dịch đường của gạo nếp than.

Bảng 4: Khả năng lên men của bột men qua các tỉ lệ sử dụng

Nghịem thức	Tỉ lệ Bột men (%)	Bọt khí/2 phút (ngày)				Glucoz (%w/v)		Độ còn (% v/v)
		1	2	3	4	Trước lên men	Sau lên men	
A1	0,2	0 ¹	8	5	3	18.67	1,10a ²	9,50b
A2	0,4	0	12	8	1		0,89b	10,13a
A3	0,6	0	12	8	1		0,89b	10,13a
A4	0,8	0	16	6	1		0,74b	10,45a

¹ Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

² Các giá trị có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.4 Xác định tỉ lệ sử dụng phối hợp bột mốc và bột men

Quá trình lên men rượu gồm hai giai đoạn chủ yếu: giai đoạn nấm mốc tạo dịch đường lên men được từ nguồn nguyên liệu tinh bột và nấm men chuyển hoá đường lên men thành cồn. Thí nghiệm nhằm chọn ra tỉ lệ phối hợp bột mốc và bột men tối ưu ứng dụng cho quá trình lên men rượu. Kết quả cho thấy ở cùng một tỉ lệ chủng bột mốc, glucoz trong dịch sau lên men ở các nghịem thức khi chủng 0,2% bột men cao hơn và etanol thấp hơn so với khi chủng 0,4% và 0,8%. Trong khi đó, glucoz và etanol ở hai tỉ lệ chủng 0,4% và 0,8% không khác biệt. Ở cùng một tỉ lệ chủng bột men với các tỉ lệ chủng bột mốc khác nhau, glucoz và etanol trong dịch sau lên men có sự khác biệt. Các nghịem thức sử dụng tỉ lệ bột mốc 1,5% và 2% cho etanol cao hơn sử dụng 1,0% bột mốc. Điều này có thể giải thích với hoạt tính mạnh, nấm men có khả năng lên men gần như tối đa lượng đường trong dịch ri, do đó hàm lượng đường cao sẽ tạo ra hàm lượng etanol cao. Tỉ lệ phối hợp gồm 1,5% bột mốc và 0,4% bột men được chọn là mức độ chủng tối ưu cho quá trình sản xuất rượu nếp than (Bảng 5).

3.5 Môi trường sản xuất men rượu thuần gồm tổ hợp nấm mốc và nấm men

Hoạt tính men rượu sản xuất từ các môi trường khác nhau được xác định thông qua khả năng đường hóa (Bảng 6) và rượu hóa (Bảng 7) của quá trình lên men rượu từ gạo nếp than.

Bảng 5: Các chỉ tiêu về lên men khi sử dụng các tỉ lệ phối trộn bột mốc và bột men

Mẫu	Tỉ lệ bột mốc (%)	Tỉ lệ bột men (%)	Xuất hiện dịch rỉ (ngày)				Bọt khí (2phút/ngày)				Glucos (%w/v)		Độ cồn (%v/v)
			1	2	3	4	5	6	7	8	Sau ủ mốc	Sau lên men	
A1B1		0,2	+ ¹	++	+++	0 ²	3	11	8	4	23,96b ³	1,46a	9,34e
A1B2	1,0	0,4	+	++	+++	0	2	12	9	2	24,35b	1,04b	10,9d
A1B3		0,8	+	++	+++	0	2	15	12	1	24,11b	0,87c	11,55c
A2B1		0,2	+	++	+++	0	2	12	10	2	26,44a	0,78c	12,18bc
A2B2	1,5	0,4	+	++	+++	0	4	18	12	0	26,68a	0,18e	13,75a
A2B3		0,8	+	++	+++	0	5	20	10	1	26,61a	0,18e	13,83a
A3B1		0,2	+	++	+++	0	3	15	10	0	26,7a	0,56d	12,81b
A3B2	2,0	0,4	+	++	+++	0	7	19	12	1	26,47a	0,19e	13,83a
A3B3		0,8	+	++	+++	0	8	20	13	0	26,78a	0,19e	13,83a

¹ Mức độ xuất hiện của dịch rỉ tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

² Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

³ Các giá trị có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Bảng 6: Khả năng đường hoá của men rượu thuần ở các nghiệm thức môi trường

Nghiệm thức	Cơ chất		Xuất hiện khuẩn ty			Xuất hiện dịch rỉ			Glucos ^z (%w/v)
	Loại	Thành phần (%)	1 ngày	2 ngày	3 ngày	1 ngày	2 ngày	3 ngày	
1	Bột gạo	100	- ¹	++++ ²	++++	-	+++ +	+++ +	11,35b ₃
2	Bột gạo + Bột mì	80:20	-	++++	++++	-	+++	+++ +	13,31a
3	Bột gạo + Trấu	95:5	-	++	+++	-	-	+	-
4	Bột gạo + Trấu	95:5	-	-	+++	-	-	+	-
5	Bột gạo + Bột bắp	80:20	-	++++	++++	-	+++	+++ +	9,22c

¹ không thể hiện hoặc không có.

² Mức độ xuất hiện của dịch rỉ tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

³ Giá trị trung bình ba lần lặp lại có các mẫu tự giống nhau khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Giá trị pH trong khoảng 4,30 - 4,80 thể hiện quá trình lên men diễn ra bình thường ở các nghiệm thức. Ở giai đoạn đầu của quá trình lên men rượu, bọt khí sinh ra rất nhiều, điều này chứng tỏ hoạt lực của nấm men rất mạnh, có khả năng chuyển hóa đường thành rượu tốt, đặc biệt ở các nghiệm thức 1, 2 và 5. Số lượng bọt khí giảm

dần ở những ngày tiếp theo, chúng tỏ nấm men đã chuyển dần đường thành rượu và lượng CO₂ sinh ra càng ít. Glucoz trong dịch sau khi lên men còn rất ít (0,03%w/v) và kết quả độ cồn tạo ra cho thấy hiệu suất lên men rượu của nấm men là rất cao.

Bảng 7: Khả năng lên men rượu của men rượu thuần ở các nghiệm thức môi trường

Nghiệm thức	Cơ chất		Bọt khí trong 2 phút			pH	Độ cồn ở 20°C
	Loại	Thành phần (%)	1 ngày	2 ngày	4 ngày		
1	Bột gạo	100	32 ¹	8	0	4,60	14,0a ²
2	Bột gạo + Bột mì	80:20	44	7	0	4,80	14,0a
3	Bột gạo + Trấu	95:5	29	12	1	4,70	12,70ab
4	Bột gạo + Trấu	95:5	2	4	3	4,45	5,30c
5	Bột gạo + Bột bắp	80:20	35	10	0	4,76	12,0b

¹ Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

² Các giá trị có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.6 Tính ổn định của men rượu thuần qua quá trình tồn trữ

3.6.1 Hoạt tính của bột mốc sau thời gian tồn trữ

Sau thời gian tồn trữ bột mốc trong bọc PP ép miệng và bảo quản ở nhiệt độ môi trường xung quanh, kết quả phân tích cho thấy mật số bào tử giảm nhẹ nhưng vẫn duy trì ở mức 10⁶ bào tử/gam bột mốc. Độ ẩm bột mốc tăng theo thời gian tồn trữ và có mối tương quan nghịch giữa độ ẩm bột mốc và hoạt tính. Bột mốc có độ ẩm thấp sẽ có hoạt tính cao và ngược lại. Hàm lượng glucoz trong dịch rỉ của bột mốc sau 3 tháng tồn trữ (25,3%w/v) không khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% so với trước khi tồn trữ (25,8%w/v), nhưng glucoz ở nghiệm thức sau 6 tháng (23%w/v) và 9 tháng (21%w/v) tồn trữ giảm có ý nghĩa so với trước khi tồn trữ. Tuy vậy qua đây kết quả cho thấy hoạt tính đường hoá của nấm mốc trong bột mốc là khá ổn định sau một thời gian dài tồn trữ ở điều kiện môi trường xung quanh.

3.6.2 Hoạt tính của bột men sau thời gian tồn trữ

Hoạt tính của bột men sau 1, 3 và 5 tháng tồn trữ được đánh giá qua quá trình lên men rượu từ dịch đường hóa nếp than (Bảng 8). Ở bột men trước khi tồn trữ hàm lượng etanol của dịch lên men là 11,5 %v/v.

Dựa trên hoạt tính nấm men sau 1, 3, và 5 tháng tồn trữ cũng như yếu tố nguồn nguyên liệu, xác định cách trữ bột men trong bọc PP ép miệng ở 4°C là thích hợp nhất cho quá trình tồn trữ bột men. Bột men trữ ở nghiệm thức này vẫn giữ hoạt tính cao sau 5 tháng tồn trữ với độ cồn 10,17 (%v/v). Tuy vậy bột men trữ trong bọc PP ép miệng trữ ở môi trường xung quanh vẫn có khả năng lên men tốt sau 3 tháng với độ cồn 9,34 (%v/v). Mật số tế bào của bột men trữ ở các nghiệm thức có chiều hướng giảm nhưng vẫn giữ ở mức ban đầu là 10⁹ tế bào/g bột men.

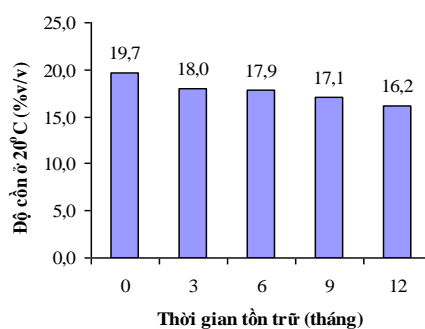
Bảng 8: Hoạt tính bột men sau thời gian tồn trữ

Nghiệm thức	Nhiệt độ trữ (°C)	Cách đóng gói	Hàm lượng etanol (%v/v)		
			1 tháng	3 tháng	5 tháng
A1B1	4	Bọc nhôm, ép miệng	11,5a*	11a	10.17a
A1B2		Bọc PP, ép miệng	11,5a	10.83a	10.17a
A1B3		Bọc PP, cột dây thun	11,5a	10b	9,34b
A2B1	25	Bọc nhôm, ép miệng	10,64b	9,34c	8,21c
A2B2		Bọc PP, ép miệng	10,64b	9,34c	8,21c
A2B3		Bọc PP, cột dây thun	10,17b	8,63d	7,27e
A3B1	Môi trường	Bọc nhôm, ép miệng	10,62b	9,34c	8,21c
A3B2	xung quanh (29-34)	Bọc PP, ép miệng	10,62b	9,34c	8,21c
A3B3		Bọc PP, cột dây thun	10,31b	8,71d	7,27e

* Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại có mẫu tự giống nhau khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.6.3 Hoạt tính men rượu thuần qua thời gian tồn trữ

Thí nghiệm này sử dụng men rượu thuần đã được sản xuất và tồn trữ trong bọc PP, ép miệng và bảo quản ở 4°C. Kết quả cho thấy khi sử dụng men rượu thuần qua quá trình tồn trữ (3, 6, 9 và 12 tháng) để tiến hành lên men rượu từ khối nếp hấp, hàm lượng cồn sinh ra có giảm theo thời gian tồn trữ nhưng vẫn còn khá cao (Hình 1). Điều này chứng tỏ hệ vi sinh vật gồm nấm mốc *A. rouxii* và nấm men *S. cerevisiae* trong men rượu thuần thể hiện được tính ổn định trong hoạt tính đường hóa và khả năng lên men rượu sau một thời gian dài tồn trữ (12 tháng).

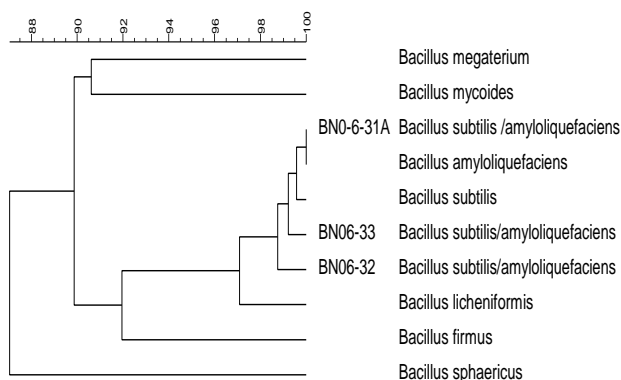


Hình 1: Hoạt tính của men rượu thuần qua thời gian tồn trữ

3.7 Phân lập và định danh vi khuẩn nhiễm trong quá trình sản xuất men rượu thuần

Trong quá trình chuẩn bị men rượu thuần dù chỉ sử dụng nguồn giống thuần gồm tổ hợp nấm mốc và nấm men để chủng vào khối bột nhào, nhưng qua quá trình quan sát và đếm mật số vi sinh vật đã phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn. Đây là những loài vi khuẩn không mong muốn do bị lây nhiễm trong qui trình sản xuất. Tuy mật số hiện diện ở mức độ thấp (10^2 - 10^3 CFU/g), nhưng đây là nguồn giống chủng ban đầu sử dụng trong quá trình sản xuất rượu, vì vậy chúng sẽ có cơ hội

phát triển mật số nhiều hơn nhanh chóng trong quá trình lên men sau đó. Do yêu cầu về an toàn thực phẩm nên rất cần thiết thực hiện công tác phân lập và định danh các vi khuẩn không mong muốn này. Kết quả phân lập được ba dòng vi khuẩn đánh số theo thứ tự là BN06-31A, BN06-32 và BN06-33. Qua kết quả phân tích về hình thái, khả năng trao đổi cacbon và nitơ và phân tích bộ gen (Hình 2), các dòng vi khuẩn này được định danh thuộc loài *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. Đây là loài không gây độc tố và gây bệnh cho người.



Hình 2: Kết quả phân tích bộ gen của ba dòng vi khuẩn

4 KẾT LUẬN

Bắp mành và trấu là cơ chất thích hợp cho môi trường sản xuất bột mốc từ *Amylomyces rouxii* với thời gian ủ là 6 ngày. Qui trình sản xuất bột men từ *Saccharomyces cerevisiae* được thử nghiệm trong bình 20lít, và mật số đạt đến 10^9 tế bào/g bột men. Tỷ lệ gồm 1,5% bột mốc và 0,4% bột men là thích hợp cho qui trình sản xuất rượu nếp than. Thành phần bột gạo và bột khoai mì thích hợp làm môi trường để sản xuất men rượu thuần gồm tổ hợp mốc và men. Hoạt tính men rượu có chiều hướng giảm trong quá trình lên men rượu sau thời gian tồn trữ, tuy vậy nồng độ còn đạt được khi sử dụng men rượu sau 12 tháng tồn trữ vẫn còn thể hiện khá cao. Vi khuẩn lây nhiễm trong men rượu thuần có tên *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* là loài vi khuẩn không sinh độc tố và không nhiễm bệnh đối với người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2005. Development of defined mixed-culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 429-441.
- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2006. Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. *Food Microbiology* 23, 331-340.
- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2007. Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (*men*). *Food Science and Technology/LWT* 40, 130-135.

- Lee, A.C., and Fujio, Y. (1999) Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 51-55.
- Nout, M. J. R., and Aidoo, K. E. (2002) Asian Fungal Fermented Food. In *The Mycota. Vol. X "Industrial applications"*. Ed. H. D. Osiewacz, pp. 23-47. Berlin-Heideberg- New York: Springer-Verlag.