



ẢNH HƯỞNG CỦA TỶ LỆ BỔ SUNG CHỨNG NẤM MEN NML04 VÀ NML02 PHÂN LẬP TỪ BÁNH MEN LÁ “BA NANG” ĐẾN KHẢ NĂNG LÊN MEN VÀ CHẤT LƯỢNG RƯỢU THÀNH PHẨM

Nguyễn Văn Huế^{1*}, Nguyễn Đức Chung¹, Trần Thị Phương Nga², Trần Thanh Quỳnh Anh¹,
Võ Thị Thu Hằng¹

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Trung tâm Y tế huyện Chư Păh, 12 Phan Đình Phùng, Chư Păh, Gia Lai, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Huế <nguyenvanhue@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 13-5-2021; Ngày chấp nhận đăng: 6-9-2021)

Tóm tắt. Nghiên cứu này khảo sát khả năng lên men và chất lượng rượu thành phẩm khi bổ sung hai chủng nấm men NML02 và NML04 được phân lập, tuyển chọn từ bánh men lá truyền thống “Ba Nang” của người đồng bào Vân Kiều ở bản Đá Bàn, xã Ba Nang, huyện Dakrong, tỉnh Quảng Trị. Kết quả cho thấy khi bổ sung 0,2 g chủng nấm men NML04 và 0,2 g chủng nấm men NML02 vào 1 kg gạo ở giai đoạn lên men lỏng (tại 25 °C và sau 9 ngày lên men) cho kết quả rượu thành phẩm với chất lượng cảm quan cao hơn so với mẫu đối chứng ở tất cả các chỉ tiêu về màu sắc, độ trong và mùi, vị. Tất cả các mẫu đều không chứa methanol. Hàm lượng aldehyde và furfural trong mẫu rượu thành phẩm từ thí nghiệm thu được là 86,25 và 0,86 mg·L⁻¹ etanol 100%, thấp hơn so với mẫu đối chứng. Chất lượng rượu thu được phụ thuộc nhiều vào tỉ lệ bổ sung nấm men.

Từ khóa: bánh men lá, chất lượng rượu, Ba Nang, NML02, NML04

Effect of addition rate of yeast strains NML04 and NML02 isolated from rice starter "Ba Nang" on fermentation ability and rice wine quality

Nguyen Van Hue^{1*}, Nguyen Duc Chung¹, Tran Thi Phuong Nga²,
Tran Thanh Quynh Anh¹, Vo Thi Thu Hang¹

¹ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

² Medical Center Chu Pah District, 12 Phan Đình Phùng St., Chư Păh, Gia Lai, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Van Hue <nguyenvanhue@hueuni.edu.vn>

(Submitted: May 13, 2021; Accepted: September 6, 2021)

Abstract. This study investigates the fermentation ability and the rice wine quality produced with yeast strains NML02 and NML04 isolated and selected from the traditional yeast starter "Ba Nang" of the Van Kieu people in Da Ban, Ba Nang Commune, Dakrong District, Quang Tri Province. The results show that the addition of 0.2 g of NML04 and 0.2 g of NML02 to 1 kg of rice at the liquid fermentation stage (25 °C and after nine days of fermentation) provides the wine with higher organoleptic quality, such as colour, clarity, smell and taste, than the control. The wine is methanol-free. The aldehyde and furfural content in the wine is 86.2 and 0.86 mg·L⁻¹ ethanol 100%, lower than that of the control. The quality of the wine obtained is heavily dependent on the yeast addition rate.

Keywords: yeast starter, rice wine quality, Ba Nang, NML02, NML04

1 Đặt vấn đề

Quá trình chế biến rượu thường dùng men giống ở các dạng bánh men khác nhau. Các loại bánh men này chứa một tập hợp các vi sinh vật có khả năng chuyển hóa tinh bột thành đường và lên men đường thành rượu. Trên thế giới, bánh men có những tên gọi khác nhau, như Murcha ở Ấn Độ, Ragi ở Indonesia, Chu ở Trung Quốc, Koji ở Nhật Bản, Nuruk ở Hàn Quốc, Ragi tapai ở Malaysia và Bubod ở Philippine [1].

Rượu men lá là một trong những loại rượu truyền thống ở Việt Nam và chủ yếu được chế biến tại các vùng sâu, vùng xa, vùng dân tộc ít người do đặc điểm nguyên liệu làm bánh men dùng cho sản xuất rượu là các loại thảo dược sẵn có ở địa phương. Một số nghiên cứu đã và đang được tiến hành để xây dựng quy trình sản xuất bánh men và rượu men lá địa phương ở một số vùng như Cao Bằng, Bắc Cạn, Bắc Giang, Lào Cai, Đắk Lắk, Nghệ An, Quảng Bình và Quảng Trị. Bánh men lá là yếu tố chính tạo nên hương vị khác biệt của rượu men lá so với các loại rượu khác. Các loài thảo dược khi thêm vào bánh men thường có hoạt tính chống oxy hóa hoặc kháng khuẩn

hoặc có cả hai đặc tính nhằm ức chế sự phát triển của các chủng vi sinh vật không hữu ích cho quá trình lên men. Đối với bánh men lá thì đến nay một số nghiên cứu về các loài thảo dược được sử dụng cũng như các thông số công nghệ trong quy trình sản xuất đã và đang được thực hiện. Theo Vu Nguyen Thanh và cs. [2], tồn tại 13 chủng nấm (kể cả nấm men) và 23 chủng vi sinh vật khác trong 52 mẫu bánh men được thu trên cả nước Việt Nam.

Nguồn vi sinh vật thuần chủng, có hoạt lực đường hoá cao và hoạt lực lên men mạnh, kết hợp với các loại lá với hàm lượng thích hợp, có tác dụng nâng cao hiệu suất lên men và chất lượng rượu thu được. Vì vậy, cần hoàn thiện hơn các điều kiện trong quá trình sản xuất rượu men lá bằng cách điều chỉnh các yếu tố tác động. Rượu men lá Ba Nang là đặc sản của vùng đồng bào miền núi phía tây tỉnh Quảng Trị, nhưng chưa có nhiều công bố liên quan đến các chủng vi sinh vật trong bánh men cũng như chất lượng rượu sản xuất từ bánh men lá này. Chúng tôi đã phân lập, định danh, tuyển chọn một số chủng có khả năng ứng dụng trong lên men rượu. Chủng nấm NML02 nằm cùng nhánh với loài nấm men *Pichia guilliermondii* thuộc chi *Pichia* với mã số AY939792.1 và EF190233.1; chủng nấm NML04 có sự tương quan di truyền với chi nấm *Candida sp.* và có mức độ trùng lặp nucleotide và độ tương đồng nucleotide cao (98–100%) với loài *Candida metapsilosis*. Đây là hai chủng được phân lập định danh và có khả năng lên men rượu tốt được tuyển chọn để nghiên cứu bổ sung vào quá trình lên men lỏng trong quá trình sản xuất rượu men lá. Hai chủng nấm này giúp sản xuất ra rượu men lá truyền thống với hiệu suất lên men cao, mang đậm hương vị Việt Nam, và có thể sánh tầm với các loại rượu truyền thống trên thế giới.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Bánh men lá được thu nhận từ người đồng bào Vân Kiều ở bản Đá Bàn, xã Ba Nang, huyện Dakrong, tỉnh Quảng Trị. Nguyên liệu gạo Khang Dân sử dụng được trồng tại xã Phú Mỹ, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế. Chủng nấm NML02 và NML04 được phân lập từ bánh men lá Ba Nang tại Khoa Cơ khí và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.2 Phương pháp

Bố trí thí nghiệm

Chúng tôi đã điều chỉnh quy trình truyền thống để làm rượu men lá sử dụng ở quy mô phòng thí nghiệm như sau: (S1), gạo Khang dân được vò sạch bằng nước cất 3–4 lần đến khi nước vò gạo trong (S2), gạo được nấu chín, còn gọi là quá trình hồ hóa tinh bột để tạo môi trường thuận lợi cho nấm mốc phát triển. Yêu cầu là cơm phải chín đều, mềm, không được quá khô hay quá ướt, không bị vón cục và kết dính vào nhau. Tỷ lệ gạo/nước khoảng 1:1,2 mL. (S3), để nguội cơm đến 30–32 °C. (S4), cấy và trộn đều với bánh men lá theo tỷ lệ bánh men/gạo 8:1 (g/kg) và ủ ở

30–32 °C trong ba ngày để nấm mốc sinh trưởng và phát triển, chuyển hóa tinh bột thành đường nhờ enzyme amylase do nấm mốc tiết ra. Vi khuẩn sinh acid hoạt động tạo môi trường có pH thuận lợi cho nấm men hoạt động. Cũng trong giai đoạn này, nấm men bắt đầu phát triển và chuyển hóa một ít đường thành rượu. Khi toàn bộ nấm mốc bao lấy hạt com, ăn sâu vào trong lõi com, dùng tay ấn vào com thấy có nước thoát ra, có mùi thơm nồng của rượu, com ăn có vị ngọt mạnh, cay và tan nhanh trong miệng là đạt yêu cầu. (S5), sau ba ngày thêm nước tiệt trùng cho ngập khối com (tỷ lệ 2 lít nước/kg gạo). (S6), lên men lỏng trong chín ngày tại 25 °C. Trong giai đoạn này, chúng tôi khảo sát tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML04 với tỷ lệ 0,1, 0,2 và 0,4 g/kg gạo, tương ứng với CT1, CT2 và CT3. (S7), tiến hành kiểm tra các chỉ tiêu, gồm hàm lượng đường tổng số, acid amine, acid tổng số của dịch lên men. Bên cạnh đó, chúng tôi tiến hành đánh giá cảm quan, xác định nồng độ rượu, hàm lượng methanol, aldehyde, furfurool của rượu thành phẩm. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần.

Xác định nồng độ rượu

Sử dụng rượu kế thủy tinh, còn gọi là tửu kế hay thước đo nồng độ rượu. Thước đo nồng độ rượu được thiết lập theo định luật Acsimet, dựa trên nguyên lý tỉ trọng của rượu càng thấp khi nồng độ rượu càng cao; mức chìm của rượu kế trong dung dịch sẽ cho biết nồng độ rượu của dung dịch. Có nhiều loại rượu kế: loại dùng để đo nồng độ từ 0 đến 50%, 50 đến 100%; mỗi vạch trên thước đo tương ứng với 1% thể tích. Đối với loại đo chính xác thì vạch chia nhỏ hơn (0,1%) và khoảng đo cũng nhỏ hơn (0–10%), thường được sử dụng để đo nồng độ rượu trong giấm sau khi chưng cất [3].

Xác định hàm lượng đường tổng số

Hàm lượng đường tổng số được xác định theo phương pháp Bertrand [4, 5].

Xác định hàm lượng acid tổng số

Dùng dung dịch kiềm chuẩn NaOH (0,1 N) để trung hòa hết acid có trong thực phẩm với phenolphthalein 0,1% làm chất chỉ thị màu [6].

Xác định hàm lượng nitơ acid amine

Xác định hàm lượng nitơ acid amine bằng phương pháp chuẩn độ formaldehyde. Các aldehyde dễ kết hợp với nhóm amine. Khi cho formaldehyde tác dụng với acid amine, nhóm amine bị methylene hóa tạo thành dẫn xuất methylene imino acid. Hợp chất tạo thành có tính acid mạnh hơn acid amine tự do, các nhóm carboxyl của chúng dễ dàng định phân bằng kiềm, qua đó gián tiếp tính được lượng nitơ amine của các acid amine có trong dung dịch [5].

Xác định hàm lượng aldehyde

Hàm lượng aldehyde xác định bằng phương pháp so màu. Cho phần mẫu thử tác dụng với thuốc thử fuchsin sulfite và rượu có hàm lượng aldehyde chuẩn. So màu của dung dịch thu được với màu của dung dịch chuẩn [7].

Xác định hàm lượng methanol

Hàm lượng methanol được xác định bằng phương pháp sắc ký khí [8].

Xác định hàm lượng furfural

Phương pháp xác định hàm lượng furfural trong rượu chưng cất bằng cách chưng cất hơi nước và đo quang phổ [9].

Phương pháp cảm quan

Sử dụng phương pháp phép thử cho điểm thị hiếu [10]. Mỗi thành viên sau khi nếm sẽ đánh giá mức độ ưa thích của mình đối với các mẫu thử theo thang điểm 1–9 trên cả bốn chỉ tiêu cảm quan: màu sắc, mùi, vị và độ trong. Các phiếu cho điểm của mỗi thành viên sẽ được tập hợp lại để xử lý thống kê cho từng chỉ tiêu ghi trên mẫu. Mẫu nào đạt số điểm cao nhất thì coi như ưa thích nhất.

Xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được quản lý và xử lý trên phần mềm Excel, phân tích phương sai một nhân tố và so sánh các giá trị trung bình bằng kiểm định Tukey (Tukey test) với mức ý nghĩa 95% trên phần mềm thống kê Minitab, phiên bản 18.0.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của tỷ lệ chủng nấm men NML04 đến khả năng lên men và chất lượng rượu thành phẩm

Tỷ lệ nấm men được cho vào dịch lên men ảnh hưởng rất lớn đến quá trình lên men. Nếu tỷ lệ nấm men cho vào thích hợp thì quá trình lên men diễn ra tốt và hiệu suất thu hồi cao, chất lượng sản phẩm tốt hơn. Nếu tỷ lệ nấm men cho vào quá nhỏ thì quá trình lên men xảy ra chậm. Nếu tỷ lệ nấm men nhiều thì sinh khối tế bào nấm men quá nhiều và môi trường dịch lên men không đủ cho nấm men phát triển; tế bào nấm men sẽ chết dần; sản phẩm sinh ra mùi vị lạ; phí một lượng nấm men đáng kể.

Bảng 1. Hàm lượng đường tổng, acid tổng và acid amine sau chín ngày lên men lỏng ở các tỷ lệ chủng nấm men NML04 khác nhau

Công thức	Hàm lượng đường tổng (%)	Hàm lượng acid tổng (%)	Hàm lượng acid amine (g·L ⁻¹)
ĐC	3,052 ^c	0,656 ^d	0,251 ^b
CT1	2,250 ^b	0,806 ^c	0,375 ^c
CT2	2,220 ^b	0,844 ^b	0,194 ^a
CT3	2,020 ^a	0,876 ^a	0,176 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$. CT1, CT2 và CT3 là công thức tương ứng với tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML04 tại 0,1, 0,2 và 0,4 g/kg gạo. ĐC: là mẫu đối chứng không bổ sung nấm men NML04.

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy khi tăng tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML04 lên thì hàm lượng đường giảm. Ngoài mẫu đối chứng, hàm lượng cao nhất ở tỷ lệ bổ sung 0,1 g (CT1) là 2,25%; thấp nhất là tỷ lệ bổ sung 0,4 g (CT3) là 2,03%. Nguyên nhân là hàm lượng đường cao làm tăng áp suất, mất cân bằng trạng thái sinh lý của nấm men; khi hàm lượng đường thấp thì không đủ cơ chất cho nấm men phát triển. Kết quả này tương đồng với kết quả của Đỗ Tiến Thành khi bổ sung chủng nấm men để cải thiện quá trình sản xuất rượu [11].

Hàm lượng acid và acid amine là hai thông số quyết định đến chất lượng của sản phẩm rượu; vì vậy, cần tìm ra tỷ lệ bổ sung chủng cho hàm lượng acid và acid amine phù hợp nhất để tạo ra sản phẩm có chất lượng cao. Hàm lượng acid cao nhất ở tỷ lệ bổ sung 0,4 g là 0,876% và thấp nhất ở tỷ lệ bổ sung 0,1 g. Quá trình lên men tạo ra nhiều acid hữu cơ; nếu tỷ lệ nấm men càng cao thì hàm lượng acid càng tăng. Hàm lượng acid cao quá ảnh hưởng đến mùi vị của sản phẩm. Bên cạnh đó, hàm lượng acid amine giảm dần khi tăng tỷ lệ nấm men. Hàm lượng cao nhất là 0,375% ở tỷ lệ bổ sung 0,1 g và thấp nhất là 0,176% ở tỷ lệ bổ sung 0,4 g. Điều này đúng với tính chất của acid amine trong môi trường acid [12].

Để có thêm cơ sở khoa học xác định tỷ lệ bổ sung chủng nấm men chúng tôi tiến hành đánh giá cảm quan. Kết quả đánh giá cảm quan được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá cảm quan và nồng độ rượu của sản phẩm

Tỷ lệ bổ sung nấm men (%)	Nồng độ rượu (%)	Điểm đánh giá		
		Độ trong và màu sắc	Mùi	Vị
ĐC	42,2 ^d	6,1 ^c	5,2 ^c	5,5 ^c
CT1	45,3 ^b	7,7 ^{ab}	7,4 ^b	7,9 ^{ab}
CT2	46,8 ^a	8,1 ^a	8,3 ^a	8,3 ^a
CT3	43,9 ^c	7,3 ^b	7,5 ^a	7,6 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$. CT1, CT2 và CT3 là công thức tương ứng với tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML04 tại 0,1, 0,2 và 0,4 g/kg gạo. ĐC: là mẫu đối chứng không bổ sung nấm men NML04.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy điểm cảm quan về độ trong và màu sắc của tỷ lệ bổ sung nấm men 0,2 g là cao nhất (8,1), cao hơn so với hai tỷ lệ còn lại và có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê giữa CT2 và CT3. Điểm cảm quan về mùi và vị của tỷ lệ bổ sung chủng nấm men 0,2 g (CT2) cũng cao nhất (8,3), cao hơn hai tỷ lệ còn lại và có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê giữa CT2 và CT3. Vì vậy, về mặt đánh giá cảm quan thì tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML04 0,2 g là phù hợp nhất. Nồng độ rượu cao nhất ở tỷ lệ bổ sung 0,2 g là 46,8%; ở hai tỷ lệ bổ sung còn lại, nồng độ rượu thấp hơn. Nguyên nhân là khi lượng tế bào nấm men càng cao thì quá trình phát triển sinh khối, chuyển hoá đường thành rượu của tế bào nấm men càng mạnh. Tuy nhiên, sự gia tăng này không hoàn toàn đồng biến; đến một mức giới hạn nào đó, khi hàm lượng nấm men thích hợp thì sự phát triển sinh khối của tế bào nấm men đạt cực đại. Lúc này, tế bào nấm men không còn khả năng sinh sản, bắt đầu chết từ từ và chìm xuống đáy bình lên men. Đến ngày cuối của quá trình lên men, số lượng nấm men giảm và chất dinh dưỡng còn ít dẫn đến lượng rượu sinh ra ít hơn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả của Ngô Thị Phương Dung về sản xuất và ứng dụng men thuần trong lên men rượu nếp than [13].

Từ những kết quả phân tích trong quá trình lên men, sản phẩm và cảm quan, chúng tôi quyết định chọn tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML04 là 0,2 g, thích hợp cho quá trình lên men và làm tiền đề cho quá trình nghiên cứu tiếp theo.

3.2 Ảnh hưởng của tỷ lệ bổ sung hai chủng nấm men NML04 và NML02 đến khả năng lên men rượu và chất lượng rượu thành phẩm

Dựa vào kết quả nghiên cứu ở thí nghiệm trên, chúng tôi tiến hành bổ sung kết hợp chủng nấm men NML04 cố định là 0,2 g với các tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML02 là 0,1 g (CT4), 0,2 g (CT5) và 0,4 g (CT6). Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện như ở thí nghiệm trên và chúng tôi khảo sát các chỉ tiêu để tìm ra được tỷ lệ kết hợp hai chủng thích hợp nhất.

Bảng 3. Hàm lượng đường tổng, acid tổng và acid amine sau chín ngày lên men lỏng ở các tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML04 (0,2 g) và NML02 khác nhau

Công thức	Hàm lượng đường tổng (%)	Hàm lượng acid tổng (%)	Hàm lượng acid amin (g·L ⁻¹)
ĐC	2,195 ^d	0,814 ^c	0,208 ^a
CT4	1,660 ^c	0,410 ^b	0,202 ^a
CT5	1,540 ^b	0,430 ^b	0,171 ^b
CT6	1,430 ^a	0,540 ^a	0,148 ^c

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$. CT4, CT5 và CT6 là công thức với tỷ lệ bổ sung kết hợp (0,2 g) chủng nấm men NML04 với tương ứng 0,1, 0,2 và 0,4 g/kg gạo. ĐC: là mẫu đối chứng không bổ sung nấm men NML02.

Khi tăng tỷ lệ bổ sung chủng nấm men NML02 kết hợp với chủng nấm men NML04 cố định ở 0,2 g thì hàm lượng đường giảm trong quá trình lên men. Hàm lượng đường cao nhất là 1,66% khi bổ sung 0,1 g và thấp nhất khi bổ sung 0,4 g là 1,43%. Kết quả này gần giống kết quả của Ngô Thị Phương Dung khi bổ sung 0,4% bột men *S. cerevisiae* là thích hợp cho quy trình sản xuất rượu nếp than [13]. Bên cạnh đó, khi bổ sung hai chủng nấm men thì hàm lượng acid giảm nhiều so với bổ sung một chủng (từ 0,844% chỉ còn 0,41, 0,43 và 0,54%). Hàm lượng acid trong thí nghiệm này tăng chậm, cao nhất khi bổ sung 0,4 g và thấp nhất khi bổ sung 0,1 g. Ngược lại, hàm lượng acid amine giảm chậm, hàm lượng acid amine cao nhất khi bổ sung 0,1 g và thấp nhất là khi bổ sung 0,4 g. Để có thêm cơ sở khoa học xác định khối lượng bổ sung hai chủng nấm men chúng tôi tiến hành đánh giá cảm quan rượu thành phẩm. Kết quả đánh giá cảm quan được trình bày ở Bảng 4.

Điểm cảm quan của rượu khi bổ sung hai chủng (0,2 g NML04 và 0,2 g NML02) về mùi và vị là 9, về độ trong và màu sắc là 8,2, cao hơn rất nhiều so với hai tỷ lệ còn lại. Bên cạnh đó, khi kết hợp hai chủng nấm men thì nồng độ rượu thay đổi không đáng kể so với bổ sung một chủng (46,6% so với 46,4%).

Bảng 4. Kết quả đánh giá cảm quan và nồng độ rượu của sản phẩm

Tỷ lệ bổ sung nấm men	Nồng độ rượu	Điểm đánh giá		
		Độ trong và màu sắc	Mùi rượu	Vị rượu
ĐC	46,6 ^a	7,5 ^b	7,4 ^c	7,3 ^c
CT4	45,3 ^b	7,7 ^{ab}	8,4 ^b	8,3 ^b
CT5	46,4 ^a	8,2 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a
CT6	45,5 ^b	7,6 ^b	8,3 ^b	8,3 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$.

Từ những kết quả phân tích trên kết hợp với nồng độ rượu và cảm quan chúng tôi nhận thấy công thức CT5 khi bổ sung 0,2 g nấm men NML02 và 0,2 g nấm men NML04 với tỷ lệ bánh men 8 g/kg gạo lên men trong thời gian chín ngày ở 25 °C cho ra sản phẩm rượu tốt nhất.

3.3 Kết quả phân tích hàm lượng methanol, aldehyde và furfurool

Methanol là alcohol đơn giản nhất có công thức CH_3OH [3]. Trong rượu chưng cất, methanol có nguồn gốc từ sự phân giải các đại phân tử trong quá trình lên men như hemicellulose, pectin, lignin và xylan. Bản thân methanol ít độc nhưng các chất chuyển hóa của nó lại rất độc. Khi vào cơ thể, methanol chuyển hóa thành formaldehyde (độc gấp 33 lần methanol). Hàm lượng methanol vượt quá chỉ tiêu cho phép có thể dẫn đến ngộ độc cho người sử dụng [14].

Các aldehyde sinh ra trong quá trình lên men, bay hơi trước ethanol và nằm trong dịch cất đầu của quá trình chưng cất. Sự có mặt của aldehyde trong rượu sẽ làm tăng độc tính cho sản phẩm. Khi vào cơ thể, aldehyde có khả năng gắn kết với các protein và DNA của tế bào gan gây tổn thương tế bào, làm tăng quá trình tạo xơ và dẫn tới xơ gan [14]. Aldehyde là tạp chất luôn có mặt trong các sản phẩm rượu và có thể điều chỉnh được trong quá trình chế biến.

Furfurool trong rượu hình thành từ quá trình dehydrate các pentose, chủ yếu là xylose khi lên men (xylose là sản phẩm phân hủy của hemicellulose và là sản phẩm chuyển hóa của glucose qua nhiều bước) [15]. Nhiệt độ sôi của furfurool là 161,7 °C. Furfurool là chất gây ung thư. Sự có mặt của furfurool trong rượu chưng cất có thể do dịch lên men có hàm lượng furfurool cao, quá trình chưng cất diễn ra dài, nhiệt độ chưng cất cao, v.v. [16].

Kết quả phân tích hàm lượng các chất trong rượu thành phẩm của sản phẩm người dân (ĐC), mẫu rượu công thức được tiến hành với tỷ lệ bổ sung 0,2 g nấm men NML02 và 0,2 g nấm men NML04 được trình bày ở Bảng 5.

Có thể nhận thấy tất cả các sản phẩm rượu đều không chứa methanol. Điều này phù hợp với TCVN về rượu trắng chưng cất. Theo TCVN 7043:2013 quy định hàm lượng methanol có trong một lít ethanol 100% không lớn hơn 2000 mg [17].

Bảng 5. Kết quả phân tích các chỉ tiêu rượu thành phẩm

Tên mẫu	Methanol (% V/V ethanol 100%)	Aldehyde ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ethanol 100%)	Furfurool ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ethanol 100%)
ĐC	Không phát hiện	138,65 ^b	2,09 ^b
CT	Không phát hiện	86,25 ^a	0,86 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$.

Tuy nhiên, trong rượu thành phẩm lại có mặt aldehyde và furfurool. Theo TCVN thì hàm lượng aldehyde trong rượu trắng chưng cất là tự công bố, nhưng theo rượu trắng pha chế thì hàm lượng aldehyde không được lớn hơn $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ethanol 100% tính theo acetaldehyde [17]. Trong các mẫu rượu phân tích ở trên thì hàm lượng aldehyde và furfurool trong nghiên cứu thấp hơn nhiều so với mẫu đối chứng của người dân. Điều này có thể khẳng định rằng việc bổ sung kết hợp hai chủng nấm men thuần chủng NML02 và NML04 vào giai đoạn lên men lỏng góp phần nâng cao chất lượng rượu thành phẩm.

3.4 Kết quả đánh giá cảm quan

Để đánh giá chất lượng sản phẩm, chúng tôi tiến hành thực hiện đánh giá cảm quan giữa sản phẩm thí nghiệm với sản phẩm của người dân bằng phương pháp cho điểm thị hiếu [18]. Kết quả đánh giá được trình bày ở Bảng 6.

Có thể thấy rượu thành phẩm trong nghiên cứu có điểm đánh giá cảm quan cao hơn nhiều so với sản phẩm đối chứng của người dân trên tất cả các chỉ tiêu về màu sắc và độ trong, mùi, vị và có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 6. Kết quả đánh giá cảm quan

Mẫu	Màu sắc và độ trong	Mùi	Vị
ĐC	7,5 ^b	8,1 ^b	7,8 ^b
CT	9,2 ^a	9,3 ^a	8,6 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$.

4 Kết luận

Việc bổ sung chủng nấm men NML04 vào giai đoạn lên men lỏng với tỷ lệ 0,2 g/kg gạo cho kết quả rượu thành phẩm có nồng độ rượu (46,8%) cao hơn so với ở các tỷ lệ bổ sung khác. Các chỉ tiêu cảm quan về màu sắc, độ trong và mùi vị cũng tốt hơn. Tỷ lệ bổ sung kết hợp hai chủng NML04/NML02/gạo 0,2g:0,2g:1kg cho kết quả cảm quan tốt hơn các tỷ lệ còn lại. Việc bổ sung kết hợp hai chủng nấm men không làm thay đổi nồng độ rượu. Tất cả các sản phẩm rượu đều không chứa methanol nhưng có mặt aldehyde và furfurool. Hàm lượng aldehyde và furfurool trong sản phẩm rượu thí nghiệm thấp hơn nhiều so với mẫu đối chứng của người dân. Có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ở tất cả các chỉ tiêu cảm quan giữa sản phẩm của người dân và sản phẩm thí nghiệm. Việc bổ sung kết hợp hai chủng nấm men thuần chủng NML02 và NML04 vào giai đoạn lên men lỏng góp phần nâng cao chất lượng rượu thành phẩm, từ đó có thể nghiên cứu thêm để phát triển sản phẩm và bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được Bộ Giáo dục và Đào tạo, Việt Nam, tài trợ trong đề tài mã số B2019-DHH-06.

Tài liệu tham khảo

1. Das A. J., Deka S. C, Miyaji T. (2012), Methodology of rice beer preparation and various plant materials used in starter culture preparation by some tribal communities of North-East India: A survey, *International Food Research Journal*, 101–107.
2. Vu Nguyen Thanh, Le Thuy Mai và Duong Anh Tuan (2008), Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE, *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 268–273.
3. Nguyễn Đình Thành (2010), *Cơ sở hóa học hữu cơ*, Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.
4. Nguyễn Minh Chon, Phan Thị Bích Trâm và Nguyễn Thị Thu Thủy (2005), *Giáo trình thực tập hóa sinh*, Trường Đại học Cần Thơ.
5. Nguyễn Văn Mùi (2001), *Thực hành hóa sinh*, Nxb. Đại học quốc gia Hà Nội.
6. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 4589:1988, *Đồ hộp - Phương pháp xác định hàm lượng acid tổng số và acid bay hơi*.
7. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 8009:2009, *Rượu chung cất - Xác định hàm lượng andehyt*.
8. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 8010:2009, *Rượu chung cất - Xác định hàm lượng methanol*.
9. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 7886:2009, *Rượu chung cất - Xác định hàm lượng FurFural*.
10. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 3217-79, *Rượu - Phân tích cảm quan - Phương pháp cho điểm*.
11. Đỗ Tiến Thành (2011), *Nghiên cứu cải tiến quy trình sản xuất rượu đặc sản từ nguyên liệu gạo*, Luận văn thạc sỹ khoa học công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
12. Lê Ngọc Tú, Lê Doãn Diên, Phạm Quốc Thắng và La Văn Chứ (1977), *Hóa sinh học công nghiệp*, Nxb. Đại học và THCN, Hà Nội.
13. Ngô Thị Phương Dung (2009), Sản xuất và ứng dụng men thuần trong lên men rượu nếp than, *Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 11, 392–403.
14. Phan Thị Xuân (2010), *Ngộ độc ethanol và ngộ độc methanol*, Bộ môn Hồi sức cấp cứu chống độc, Bệnh viện Chợ Rẫy.
15. Nguyễn Minh Thảo (2004), *Hóa học các hợp chất dị vòng*, Nxb. Giáo Dục.

16. Zeitsch, K.J. (2000), *The Chemistry and Technology of Furfural and its Many By-Products*, Elsevier Science B.V. 13.
17. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 7043:2013, Rượu trắng.
18. Hà Duyên Tư (2006), *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*, Nxb. Khoa học & Kỹ thuật.