nghiên cứu PHÂN LẬP NẤM MEN TỪ DỊCH NHỰA CÂY ĐOÁC *(ARENGA PINNATA)* VÀ KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA pH ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN RƯỢU ĐOÁC

isolation OF Yeast SPECIES from THE SAP OF sugar palm (Arenga pinnata) and EFFECT OF pH ON sugar palm wine fermentation

**Tóm tắt**

Rượu Đoác (Tà Vạt) được đồng bào dân tộc thuộc huyện miền núi Nam Giang - Quảng Nam sản xuất bằng lên men tự nhiên. Phương pháp này có nhược điểm lớn là chất lượng sản phẩm không ổn định và không đảm bảo an toàn do không kiểm soát được hệ vi sinh vật lên men. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập chủng nấm men từ dịch nhựa cây đoác nhằm tìm ra được chủng thuần khiết để áp dụng vào quá trình lên men dịch nhựa Đoác. Sau khi phân lập, chúng tôi đã tiến hành đánh giá hoạt lực lên men và ghi nhận được hoạt lực lên men rượu cao của chủng này. Kết quả theo dõi cho thấy sau 96 giờ lên men dịch nhựa đoác, sản phẩm tạo thành có độ cồn là 8,2% (v/v) và pH là 3,76< 4, tạo ra môi trường thuận lợi cho quá trình bảo quản. Bên cạnh đó, qua khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men rượu của chủng này, chúng tôi xác định được tại pH= 4,5, thời gian lên men 96 giờ, độ cồn thu được là cao nhất, đạt 8,2% (v/v).

**Từ khóa: cây Đoác, rượu Đoác, phân lập nấm men, lên men tự nhiên, lên men rượu**

**Abstract**

Sugar palm wine *(Arenga pinnata)* are produced by mountainous ethnic minorities in Nam Giang, Quang Nam using natural fermentation. This method has a major disadvantage that the quality of the product is unstable and the safety is not ensured. In this study, we conducted the isolation yeast form sugar palm sap in order to obtain a purified form,which is suitable for sugar palm wine production. After the isolation of yeast species, we evaluated the alcohol fermentation ability of the chosen specie and confirmed the high capacity of alcohol fermentation. The results showed that after 96 hours of fermentation, the product of fermentation had the alcohol content of 8,2% (v/v) and the pH of 3,76 (<4), creating an suitable environment for long time preservation of product. In addition, after the investigation of the effect of pH on alcohol fermenation by this specie, we determined the optimal pH for the sugar palm wine fermentation of this specie was 4,5, the highest alcohol content of product reached 8.2% (v/v) at this pH.

**Key words: Sugar palm, sugar palm wine, yeast species isolation, natural fermentation, wine fermentation**

# Đặt vấn đề

Rượu đoác hay còn gọi là rượu Tà Vạt là loại rượu đặc trưng của người dân tộc Cơ Tu và Tà Ôi thuộc huyện miền núi Nam Giang, Quảng Nam. Rượu được sản xuất như sau: dịch nhựa từ cây đoác sau khi lấy từ cuống hoa được bổ sung vỏ cây chuồn đã phơi khô và để lên men tự nhiên, sau vài ngày thu được rượu uống. Phương pháp này không kiểm soát tốt quá trình lên men và hệ vi sinh vật đóng vai trò lên men là không thuần khiết, ảnh hưởng đến chất lượng rượu cũng như thời gian sử dụng. Dịch nhựa cây đoác là môi trường đặc trưng, không phải nấm men nào cũng có thể phát triển trong dịch này, mà phải đúng chủng nấm men mới có khả năng sinh trưởng và chuyển hóa thành rượu tốt [11]. Bên cạnh đó, pH cũng là yếu tố quan trọng trong quá trình lên men rượu, ảnh hưởng đến các ion trên bề mặt màng tế bào, tác động tích cực hay tiêu cực đến khả năng thẩm thấu của màng tế bào, hiệu suất của quá trình lên men. Vì vậy, phân lập chủng nấm men có hoạt lực lên men dịch nhựa đoác tốt và khảo sát chọn pH tối ưu cho quá trình lên men là yêu cầu cần thiết nhằm tạo cơ sở cho việc phát triển công nghệ sản xuất rượu vang đoác ở quy mô lớn.

# Nguyên liệu và phương phương pháp nghiên cứu

## Nguyên liệu

Dịch nhựa cây đoác thu hoạch giữa tháng 4 dương lịch và vỏ cây chuồn được lấy từ miền núi của huyện Nam Giang - Quảng Nam.

## Phương pháp nghiên cứu

- Hàm lượng chất khô được đánh giá bằng chiết quang kế thông qua giá trị Brix (hiệu chỉnh Brix về nhiệt độ 20$℃$)[1].

- Hàm lượng đường tổng xác định bằng phương pháp Bertrand. Chuyển tất các thành phần đường trong dung dịch thành đường khử, xác định hàm lượng đường khử thông qua các phản ứng với dung dịch Fehling, sắt (III) sulfate và kali permanganate [1],[3].

- Acid tổng số xác định bằng phương pháp chuẩn độ acid-base. Dùng dung dịch NaOH 0,1N trung hòa acid có trong mẫu thử với chỉ thị phenolphthalein [10].

- Độ cồn xác định bằng phương pháp chưng cất, sau đó đo bằng cồn kế (hiệu chỉnh về nhiệt độ 20oC) [1].

- Mật độ tế bào được xác định bằng buồng đếm hồng cầu Thomas. Dùng micropipette lấy 1 giọt mẫu cần xác định cho vào buồng đếm, phủ bằng một lá kính mỏng, phẳng. Đếm số tế bào nấm men dưới kính hiển vi [1].

- Phương pháp phân lập nấm men thuần khiết: Lấy 1 ml dịch nhựa cây đoác rồi tiến hành pha loãng. Sau đó, nuôi trên đĩa petri đặc với môi trường Hansen, ở nhiệt độ 28-30oC trong 48-72 giờ. Thu nhận khuẩn lạc mọc tách rời và cấy vào ống thạch nghiêng, tiếp tục nuôi cùng nhiệt độ với thời gian như trên. Sau đó, loại bỏ các ống bị nhiễm và chọn ra các ống có chủng thuần khiết [9].

- Xử lí số liệu bằng phân tích phương sai ANOVA một yếu tố để đánh giá mức độ khác nhau có nghĩa hay không có nghĩa giữa các mẫu, sử dụng phần mềm Minitab 16.2.0.

- Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men như: mật độ tế bào $1×10^{8} $tế bào/ml và tỉ lệ giống cho vào quá trình lên men là 3%, tỉ lệ dịch chiết vỏ cây chuồn cho vào quá trình lên men là 4% (brix bằng 8), được thừa kế từ nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Hồng Thu [4].

# Kết quả và thảo luận

### **3.1. Phân lập chủng nấm men từ dịch nhựa cây đoác**

 Sau khi tiến hành phân lập thu được chủng nấm men thuần khiết. Để chắc chắn đây là chủng nấm men, chúng tôi tiến hành nhuộm màu các khuẩn lạc bằng methylen xanh và ủ 2 ngày ở 28 oC - 30 oC, kết quả được thể hiện ở hình 1.



**Hình 1:** Khuẩn lạc của nấm men phân lập từ dịch nhựa cây đoác.

Chúng tôi nhận thấy rằng, khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục, bề mặt trơn, bóng. Các khuẩn lạc này đã chuyển màu của methylen xanh sang không màu. Chứng tỏ, tất cả các khuẩn lạc này là khuẩn lạc của nấm men, vì chỉ có tế bào sống của nấm men mới có khả năng chuyển màu của methylene xanh sang không màu nhờ enzyme có khả năng chuyển màu, còn tế bào chết thì enzyme không còn hoạt động nữa, nên sẽ giữ màu của methylene xanh [1].

### **3.2. Đánh giá hoạt lực lên men của chủng nấm men mới phân lập**

Quá trình lên men rượu chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau như tốc độ tiếp giống nấm men, hàm lượng đường tổng, nhiệt độ, pH của môi trường…Tuy nhiên, chất lượng nấm men là yếu tố trọng yếu đối với tính ổn định của quá trình lên men cũng như chất lượng rượu. Bởi vậy, việc kiểm tra chính xác chất lượng nấm men sẽ cải thiện kỹ thuật xử lý nấm men và ổn định quá trình lên men. Do đó, chúng tôi tiến hành đánh giá hoạt lực lên men của chủng nấm men sau khi phân lập bằng cách lên men rượu ở nhiệt độ phòng (28–32oC, sự biến thiên khoảng nhiệt độ này không ảnh hưởng đến quá trình lên men [2]) và theo dõi các yếu tố pH, brix, đường sót, acid tổng, độ rượu sau các khoảng thời gian là 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ (vì sau 96 giờ hàm lượng đường sót bé hơn 2% thì dừng quá trình lên men [2]). Kết quả được thể hình ở hình 2 và hình 3.

Hình 2: Sự thay đổi hàm lượng chất khô (Brix), hàm lượng đường sót và độ cồn tạo thành theo thời gian.

Hình 3: Sự thay đổi độ pH và hàm lượng acid tổng theo thời gian của quá trình thử hoạt lực lên men của chủng nấm men vừa mới phân lập.

 Các kết quả phân tích cho thấy, chủng nấm men phân lập được có hoạt lực lên men khá mạnh. Hàm lượng chất khô, đường giảm liên tục trong quá trình khảo sát, trong khi hàm lượng cồn tăng liên tục và đạt 8,2% sau 96 giờ lên men. Bên cạnh đó, pH có xu hướng ổn định sau 24 giờ lên men ở giá trị 3,76, thấp hơn 4 nên đây là pH thuận lợi để hạn chế sự nhiễm vi vật gây ảnh hưởng xấu đến chất lượng của rượu [8]. Sự thay đổi acid tổng số có diễn biến tương tự như sự thay đổi của pH. Do đó, chủng nấm men chúng tôi phân lập được hoàn toàn thích hợp để sử dụng sản xuất rượu vang đoác.

## 3.3. Đánh giá ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men rượu vang Đoác bằng chủng nấm men phân lập

Nồng độ ion H+ trong canh trường có ảnh hưởng lớn đến hoạt động của nấm men. Chúng có khả năng làm thay đổi điện tích các chất của vỏ tế bào, làm tăng hay giảm mức độ thẩm thấu các chất dinh dưỡng cũng như chiều hướng của quá trình lên men. Do vậy, nó có ảnh hưởng không nhỏ tới sự sinh trưởng và sinh tổng hợp của nấm men và mỗi vi sinh vật hoạt động tốt ở một pH nhất định. Do đó, với mục đích đánh giá ảnh hưởng của pH đến quá trình lên men thì phải nắm được đường cong sinh trưởng của nấm men, từ đó mới biết được hiệu suất cồn tạo thành qua từng giai đoạn của đường cong sinh trưởng. Ngoài ra, trong điều kiện lên men rượu vang, pH tối ưu của rượu vang là 4-6. Để chọn pH tối ưu cho chủng nấm men vừa mới phân lập từ dịch nhựa cây đoác, nên chúng tôi tiến hành lên men rượu vang ở dãy pH: 4; 4,5; 5; 5,5; 6 và pH của dịch cây đoác bằng 7,93 đo từ mẫu khảo sát qua các mốc thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ. Kết quả được thể hiện ở bảng 1, 2 và hình 4, 5, 6. Trong quá trình khảo sát chúng tôi điều chỉnh pH bằng đệm natri acetate [6][13].

Hình 4: Sự thay đổi của độ Brix theo thời gian lên men ở các pH khác nhau.

***Bảng 1:*** *Sự thay đổi hàm lượng đường sót theo thời gian lên men của các dịch lên ở các pH khác nhau*

|  |  |
| --- | --- |
| **Đường sót (%)** | **THỜI GIAN ( GIỜ)** |
| **0** | **24** | **48** | **72** | **96** |
| **pH 4** | $$16,71\pm 0.01^{a}$$ | $$15,39\pm 0,01^{a}$$ | $$13,89\pm 0,01^{b}$$ | $$10,95\pm 0,01^{b}$$ | $$8,23\pm 0,01^{b}$$ |
| **pH 4,5** | $$16,71\pm 0,01^{a}$$ | $$13,62\pm 0,00^{b}$$ | $$7,12\pm 0,02^{d}$$ | $$2,21\pm 0,01^{f}$$ | $$1,02\pm 0,01^{f}$$ |
| **pH 5** | $$16,71\pm 0,00^{a}$$ | $$13,62\pm 0,01^{b}$$ | $$7,22\pm 0,01^{c}$$ | $$3,30\pm 0,02^{c}$$ | $$1,67\pm 0,01^{d}$$ |
| **pH 5,5** | $$16,71\pm 0,02^{a}$$ | $$15,42\pm 0,02^{a}$$ | $$15,39\pm 0,01^{a}$$ | $$15,23\pm 0,01^{a}$$ | $$14,41\pm 0,02^{a}$$ |
| **pH 6** | $$16,71\pm 0,02^{a}$$ | $$13,62\pm 0,02^{b}$$ | $$7,22\pm 0,02^{c}$$ | $$2,31\pm 0,01^{e}$$ | $$1,76\pm 0,02^{c}$$ |
| **pH 7,93** | $$16,71\pm 0.01^{a}$$ | $$12,95\pm 0,01^{c}$$ | $$4,59\pm 0,01^{e}$$ | $$2,74\pm 0,01^{d}$$ | $$1,41\pm 0,01^{e}$$ |

*Các giá trị có cùng kí tự trong cùng một cột thì khác nhau không có nghĩa thống kê (p>0,05).*

***Bảng 2:*** *Hàm lượng cồn tạo thành theo thời gian lên men của các dịch lên ở các pH khác nhau.*

|  |  |
| --- | --- |
| **Độ cồn (%)** | **THỜI GIAN ( GIỜ)** |
| **0** | **24**  | **48**  | **72**  | **96**  |
| **pH 4** | $$0\pm 0,00^{a}$$ | $$1,2\pm 0,10^{d}$$ | $$1,6\pm 0,06^{e}$$ | $$3,2\pm 0,06^{d}$$ | $$4,6\pm 0,10^{d}$$ |
| **pH 4,5** | $$0\pm 0,00^{a}$$ | $$3,2\pm 0,10^{a}$$ | $$6,4\pm 0,00^{d}$$ | $$7,8\pm 0,06^{a}$$ | $$8,2\pm 0,01^{a}$$ |
| **pH 5** | $$0\pm 0,00^{a}$$ | $$2,7\pm 0,06^{c}$$ | $$4,8\pm 0,10^{c}$$ | $$6,2\pm 0,10^{c}$$ | $$6,9\pm 0,06^{c}$$ |
| **pH 5,5** | $$0\pm 0,00^{a}$$ | $$1,2\pm 0,00^{d}$$ | $$1,2\pm 0,10^{f}$$ | $$1,3\pm 0,06^{f}$$ | $$1,5\pm 0,01^{e}$$ |
| **pH 6** | $$0\pm 0,00^{a}$$ | $$2,6\pm 0,10^{c}$$ | $$4,6\pm 0,10^{c}$$ | $$6,1\pm 0.06^{d}$$ | $$6,8\pm 0,06^{c}$$ |
| **pH 7,93** | $$0\pm 0,00^{a}$$ | $$2,9\pm 0,06^{b}$$ | $$5,1\pm 0,01^{b}$$ | $$6,5\pm 0,10^{b}$$ | $$7,2\pm 0,10^{b}$$ |

*Các giá trị có cùng kí tự trong cùng một cột thì khác nhau không có nghĩa thống kê (p>0,05).*

Hình 5: Sự thay đổi pH theo thời gian của dịch lên men có pH khác nhau.

Hình 6: Sự thay đổi hàm lượng acid tổng số (%) theo thời gian của dịch lên men ở các pH khác nhau.

Theo các kết quả trên, qua 96 giờ lên men, chúng tôi thu được hàm lượng cồn cao nhất là ở pH 4,5. Điều này chứng tỏ, pH này phù hợp nhất để lên men rượu đoác bằng chủng nấm men chúng tôi phân lập được từ chính dịch nhựa của nó. Kết quả này cũng phù hợp kết quả của A.Tahir và cộng sự vốn chỉ ra rằng, quá trình sản xuất ethanol đạt cực đại ở pH 4,5 [12]. Và pH này cũng nằm trong khoảng pH tối ưu cho quá trình lên men trong điều kiện yếm khí (nghĩa là ethanol tạo thành nhiều) [5]. Có lẽ ở pH này, màng tế bào có khả năng thẩm thấu chất dinh dưỡng tốt nhất và quá trình chuyển hóa đường thành cồn ít tạo ra sản phẩm phụ. Ngoài ra, pH cuối cùng của quá trình lên men thấp, đạt 3,76 thấp hơn 4 giúp rượu trở nên ổn định, ức chế được sự tăng trưởng của vi sinh vật có hại như: nấm men dại, các vi khuẩn lactic, acetic lên men không mong muốn, có thể kiểm soát được quá trình lên men malolactic gây ảnh hưởng đến chất lượng rượu và còn hạn chế được sự oxi hóa các thành phần trong rượu [8]. Như vậy, ở pH này không những đạt được hàm lượng cồn cao mà còn tạo điều kiện cho sự ổn định rượu trong quá trình bảo quản.

Đối với pH của dịch nhựa cây đoác, pH này nằm trong vùng kiềm và không phải vùng hoạt động của nấm men lên men rượu vang. Tuy nhiên, trong dịch này vốn có các chất hỗ trợ cho quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm men. Do đó, chúng vẫn diễn ra quá trình lên men với hiệu suất cồn tạo thành khá cao nhưng thấp hơn so với ở pH 4,5. Có lẽ do quá trình lên men đã tạo ra nhiều sản phẩm phụ hơn, gây tổn hao cơ chất.

Với pH 5,5, quá trình lên men diễn ra chậm và sau 96 giờ lên men hàm lượng cồn chỉ đạt được 1,5%. Điều này có thể giải thích là do ở pH này, các chất hỗ trợ cho nấm men phát triển ở trạng thái không thích hợp do tác động của pH và màng tế bào của nấm men bị giảm khả năng thẩm thấu chất dinh dưỡng, nên quá trình trao đổi chất bên trong tế bào diễn ra chậm hơn, thời gian lên men kéo dài hơn. Do vậy, sau 96 giờ lên men, hàm lượng đường sót vẫn còn cao đến 14,41%.

Trong khi đó, ở pH 4 hàm lượng đường sót còn lại sau 96 giờ lên men vẫn còn cao 8,23% và lượng cồn thu được sau 96 giờ lên men đạt 4,6%. Có thể ở pH thấp nhất này, nồng độ ion $H^{+}$ trong môi trường lên men cao so với bên trong tế bào nên tế bào bị mất cân bằng thẩm thấu. Do vậy, sự trao đổi chất của nấm men vẫn xảy ra nhưng diễn ra chậm. Do đó, sau 96 giờ lên men, hàm lượng cồn chỉ đạt 4,6%. Còn ở pH 5 và pH 6 có tốc độ sử dụng đường và cồn tạo thành xấp xỉ bằng nhau.

Như vậy, pH phù hợp nhất để chủng nấm men phân lập được đạt hiệu suất lên men cồn tốt nhất từ dịch nhựa đoác là 4,5.

# Kết luận

Qua các nghiên cứu ở trên, chúng tôi đã phân lập được chủng nấm men thuần khiết có khả năng lên men tạo độ cồn cao là 8,2% (v/v) sau 96 giờ và sản phẩm tạo thành có khả năng ổn định tốt với hàm lượng đường sót thấp, pH thấp. Bên cạnh đó, chúng tôi đã khảo sát được ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt lực lên men của chủng này, qua đó đã xác định được pH tối ưu cho quá trình lên men rượu đoác là 4,5.

**Tài liệu tham khảo**

Lê Thanh Mai và cộng sự (2009), *Các Phương Pháp Phân Tích Ngành Công Nghệ Lên Men*, NXB Khoa Học Kỹ Thuật, Hà Nội.

Lê Văn Việt Mẫn(2011), *Công nghệ sản xuất rượu vang,* NXB Đại Học Quốc Gia TP Hồ Chí Minh, tr411.

 Phan Văn Sở, Bùi Thị Như Thuận (1991), *Kiểm nghiệm lương thực, thực phẩm*, NXB Khoa Học Kỹ Thuật, Hà Nội, tr. 573-574.

Nguyễn Thị Hồng Thu (2013), *Nghiên cứu sản xuất rượu tà vạt từ dịch nhựa cây búng báng***,** Luận văn thạc sĩ kỹ thuật, Đại Học Quốc Gia TP.Hồ Chí Minh.

Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lê Doãn Diên (2004), *Hóa sinh công nghiệp*, NXB Khoa Học Kỹ Thuật, Hà Nội.

TCVN 4320-86, *Phương pháp chuẩn bị các dung dịch đệm.*

A.O.A.C. (2000), *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists*. 17th ed. Gaithersburg, Maryland, U.S.A.

Alexander J. Pandell (1999), “*The acidity of wine*”,United Kingdom*.*

John William Henry Eyre, (2009). “*A Laboratory Guide for Medical, Dental, and Technical Students*”. Published by [W.B.Saunders](https://openlibrary.org/publishers/W._B._Saunders) in [Philadelphia](https://openlibrary.org/search/subjects?q=Philadelphia), [London](https://openlibrary.org/search/subjects?q=London) Written in [English](https://openlibrary.org/languages/eng).

Sadler, G. D. and Murphy, P. A(2010), "pH and Titratable Acidity," in *Food Analysis*, 4th ed. S. S. Nielsen, Ed. USA: Springer, pp. 227-232.

Nguyen, T. M. Ngoc (2014), ”Different processing conditions affect palm (thot not) wine fermentation”, Vietnam National University HCM, University of Technology, Vietnam. *American Journal of Research Communication*.

Tahir *et al* (2010), "Effect of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *Saccharomyces cerevisiae Bio-07*." *J App Pharm.* 3(2), pp. 72-78.

Tataridis, P., Ntagas, I.Voulgaris, E.T. Nerantzis (2004), “Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation”, *Technological Educational Institution of Athens, Department of Oenology and Beverage Technology, Ag. Spyridona Street*, 12210 Aegaleo, Greece.

PHẦN LIỆT KÊ CÁC CHỈNH SỬA VÀ GIẢI TRÌNH CỦA NHÓM TÁC GIẢ

Chúng tôi trân trọng các ý kiến phản biện và đã chỉnh sửa theo yêu cầu:

1. Chất lượng của dịch đoác trước khi lên men thì nhìn vào đồ thị ở ngày 0, sẽ có kết quả là: Brix = 12,74 %; pH = 7,93; Acid tổng số = 0,125; đường tổng = 10,83%.
2. Đã biện luận thêm khi lên men ở nhiệt độ phòng.
3. Đã chỉnh sửa thống nhất đường sót, và độ cồn.
4. Đã chỉnh bảng 1 và bảng 2 vào giữa.
5. Đã thêm biện luận tại sao tác giả lại phải khảo sát pH với quá nhiều thí nghiệm qua các mốc thời gian 24h,48h,72h trong khi kết quả ở đồ thị hình 2 đã cho thấy thời gian lên men dài nhất 96 h là tốt nhất rồi.
6. Đã chỉnh lại kết luận phù hợp.