

TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG NẤM MEN ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ NƯỚC THỐT NỐT

Nguyễn Minh Thủy¹, Nguyễn Văn Thành² và Bùi Thị Thúy Ngân³

ABSTRACT

*In order to determine the capacity of wine yeasts isolated from palm juice to be used effectively for the wine production process, experiments were performed including (i) propagation of isolated yeast, (ii) selection appropriate fermentation parameters to survey the activity of yeast fermentation of pure breeds and also (iii) comparison to palm wine quality produced by using of commercial strain (*saccharomyces cerevisiae*).*

The results showed that the yeast strain isolated from palm juice in the morning, treated by sodium metabisulfite, selected from 21 yeast strain had the best fermenting activity with outstanding features such as fastest fermentation (2 hours) by Durham test, the highest ethanol content (13,2% v/v) and the less reducing sugars (1,65%) remained.

Keywords: Selection, yeast, multiplication, vitality, fermentation

Title: Selection of high activity yeast strains isolated from palm juice harvested at Tỉnh Bien, An Giang

TÓM TẮT

*Với mục đích tuyển chọn các dòng nấm men có hoạt lực cao sử dụng hiệu quả cho quá trình sản xuất rượu vang thốt nốt, thí nghiệm được thực hiện các hoạt động (i) nhân giống nấm men phân lập, (ii) chọn lựa các thông số kỹ thuật thích hợp cho quá trình lên men rượu từ giống nấm men thuần chủng và (iii) so sánh với chất lượng rượu vang thốt nốt được sản xuất từ nguồn nấm men hiện có trên thị trường (*saccharomyces cerevisiae*).*

Kết quả nghiên cứu cho thấy dòng nấm men phân lập được từ nước thốt nốt thu hoạch vào buổi sáng (xử lý metabisulfite sodium) được tuyển chọn từ 21 dòng nấm men phân lập được từ nước thốt nốt đã thể hiện hoạt lực lên men rượu tốt nhất, với các ưu điểm vượt trội như thời gian kết thúc chiều cao cột khí CO₂ sớm nhất (2 giờ), hàm lượng ethanol cao nhất (13,7% v/v) và hàm lượng đường sót thấp nhất (1,65%).

Từ khóa: Tuyển chọn, nấm men, nhân giống, hoạt lực, lên men

1 GIỚI THIỆU

Sản xuất rượu vang dựa trên cơ sở các quá trình hóa sinh xảy ra trong quá trình lên men các loại quả dưới tác dụng của enzyme nấm men. Hiện nay có hai phương pháp lên men rượu vang cơ bản là lên men tự nhiên và lên men nhờ chủng nấm men thuần khiết. Phương pháp sản xuất rượu vang từ chủng thuần khiết có rất nhiều triển vọng do thời gian lên men nhanh, quá trình lên men không dừng lại giữa chừng, hàm lượng đường trong dịch quả được lên men triệt để, nồng độ cồn thu được trong vang cao hơn lên men tự nhiên là 0,1–1° cồn, vang sáng màu hơn, có thể cho hương vị thanh khiết hơn (Lương Đức Phẩm, 2006). Tuy nhiên, các chủng nấm men thuần khiết, có sự khác nhau về tốc độ sinh trưởng, khoảng nhiệt

¹ Bộ môn CNTP, Khoa NN&SHUD, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện NC&PT Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

³ CNTP&ĐU K15

độ thích hợp để lên men, khả năng tạo cồn và chịu cồn, khả năng chịu được pH thấp cũng như khả năng kết lắng (tạo thành dạng bông hoặc dạng bụi). Những yêu cầu đối với nấm men rượu vang thường là phải có hoạt lực lên men cao đối với nước quả, sử dụng đường cho lên men gần như hoàn toàn, kết lắng tốt, làm trong dịch rượu nhanh, chịu được độ rượu cao và độ acid của môi trường cũng như các chất sát trùng và tạo cho rượu hương vị thơm ngon tinh khiết (Luong Đức Phẩm, 2006).

Trên cơ sở đó, mục tiêu nghiên cứu là tuyển chọn các dòng nấm men có hoạt lực cao trong số các dòng nấm men phân lập được từ nước thốt nốt nhằm mục đích sử dụng hiệu quả cho quá trình sản xuất rượu vang thốt nốt chất lượng cao. Hoạt động này cũng góp phần đa dạng hóa sản phẩm, nâng cao giá trị của nguồn đặc sản hiện có ở tỉnh An Giang và phần nào đáp ứng nhu cầu sử dụng thực phẩm đa dạng hiện nay.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Địa điểm thực hiện nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học và phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

Thiết bị và dụng cụ

- Bồn cấy vô trùng (TELSTRAR, Spain)
- Tủ ủ (SANYO, Japan)
- Tủ ủ lắc (HEIDOLPH, Japan)
- Kính hiển vi chụp hình (Olympus DP12, Japan)
- Nồi khử trùng nhiệt ướt 19L (PBI, Italia)
- Tủ lạnh (SANYO, Japan)
- Máy chuẩn độ pH tự động (TITROLINE, USA)
- Chiết quang kế (C20 CP LAUDA) Edition 2000)
- Trắc vi thị kính (1 vạch = 1,7 μ m ở vật kính 40)
- Bồn đếm Thoma, lam kính, lame
- Cồn kế 0 – 30 $^{\circ}$ (Merck, Germany)

Hóa chất và môi trường sử dụng

- Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Lesaffre 59703 Marcq, France)
- Khoai tây (Đà Lạt, Việt Nam)
- Agar (Rau câu Duy Mai, Công ty Cổ phần Thương mại Duy Mai, Việt Nam)
- Saccharose (Merck, Germany)
- Yeast Extract Powder (Himedia Laboratories pvt. Ltd., Germany)
- Malt Extract Agar (OXOID LTD, Basing Stoke, Hampshire, England)
- Sabouraud (Merck KGaA, Germany)
- Phosphate monopotassique (KH₂PO₄) (Cooperation pharmaceutique Francaise)

- D-glucose, Amonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), Sodium hydroxide (NaOH), Sodium sulfate anhydrous (Na₂SO₄), Hydrochloric acid (HCl), Citric acid monohydrate, Sodium hydrogen sulfite (NaHSO₃), Metabisulfite sodium (Na₂S₂O₅), Fehling A, Fehling B, Malachite green, Safranin, Phenol red, Urea (Guangzhou Jinhua Chemical Reagent Co., Ltd, China)

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm 1: Khảo sát hoạt tính lên men của nấm men phân lập và thuần chủng

a. *Mục đích*: tuyển chọn các dòng nấm men có hoạt lực cao nhất, chọn thời gian nhân giống thích hợp nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

b. *Bố trí thí nghiệm*: thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố và lặp lại 3 lần.

Nhân tố A: Các dòng nấm men đã được phân lập và thuần chủng (21 dòng).

c. *Phương pháp thực hiện*:

- Nuôi cấy nhân giống nấm men: thực hiện trong môi trường nước thốt nốt có pH 4,5 - 4,8, °Brix 12-14, được thanh trùng ở nhiệt độ (121°C, 15 phút), nuôi cấy ở nhiệt độ 30 - 32°C. Kiểm soát chất lượng nấm men trong quá trình lên men rượu, số lượng tế bào Saccharomyces ≈ 12÷16 x 10⁶ tế bào/ml dịch men giống. Ngoài ra chất lượng nấm men còn được kiểm soát thông qua kiểm tra số lượng tế bào nảy chồi: 10÷15%, lượng tế bào chết không quá 2÷4%. Lấy mẫu phân tích sau thời gian nuôi cấy 3 ngày (mỗi ngày một lần). Từ đó chọn được thời gian nhân giống thích hợp cho các thí nghiệm về sau.

- Lên men khảo sát hoạt tính nấm men: nước thốt nốt lên men có pH 4,5, °Brix 23, thanh trùng bằng NaHSO₃ (120 mg/lít) trong thời gian 2 giờ, bổ sung men giống với mật số tế bào nấm men 10⁶/ml, lên men ở nhiệt độ 30°C. Phân tích mẫu sau thời gian kết thúc lên men chính. Từ đó chọn được dòng nấm men có hoạt tính cao nhất, tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

d. *Chỉ tiêu theo dõi*:

- Tế bào nấm men/ ml mẫu giống nấm men, pH dịch lên men, hàm lượng đường sót (%), chiều cao cột khí CO₂ (cm), độ rượu tạo thành (% v/v).

Thí nghiệm 2. Khảo sát khả năng lên men rượu thốt nốt của nấm men phân lập và so sánh chất lượng với rượu vang lên men từ nấm men hiện có trên thị trường.

a. *Mục đích*: so sánh khả năng lên men rượu nước thốt nốt của nấm men phân lập có hoạt tính cao nhất từ thí nghiệm 1 và nấm men Saccharomyces cerevisiae (mua ở thị trường).

b. *Bố trí thí nghiệm*:

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 4 nhân tố và lặp lại 3 lần.

Nhân tố B: Nấm men: Nấm men phân lập, Nấm men S. cerevisiae

Nhân tố C: °Brix: 20, 22, 24

Nhân tố D: pH dịch lên men: 4,0; 4,5; 5,0

Nhân tố E: Mật độ nấm men (CFU/ml): 10⁵, 10⁶, 10⁷

c. Phương pháp thực hiện

Phối chế nước thốt nốt ở °Brix và các giá trị pH bố trí, thanh trùng NaHSO₃ 120 mg/l trong 2 giờ, bổ sung nấm men với các mật độ được bố trí cho thí nghiệm và lên men ở 30°C. Phân tích mẫu sau khi thời gian kết thúc lên men chính.

d. Chỉ tiêu theo dõi

- Hàm lượng đường sót (%)
- Độ rượu tạo thành (% v/v)

2.3 Phân tích dữ liệu thu thập

Số liệu thu thập được phân tích thống bằng phần mềm thống kê Statgraphics Plus 4.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hoạt tính lên men của nấm men thuần chủng

3.1.1 Nhân giống các dòng nấm men phân lập

Kết quả nhân giống 21 dòng nấm men phân lập trong nước thốt nốt được thể hiện ở bảng 1 (ký hiệu viết tắt được trình bày ở phần phụ lục).

Bảng 1: Mật số tế bào nấm men/ml của 21 dòng nấm men nhân giống trong nước thốt nốt

Dòng nấm men	Thời gian nhân giống (ngày)		
	1	2	3
SK1	5,1.10 ⁷	5,7.10 ⁷	6,8.10 ⁷
SK2	6,8. 10 ⁷	9,2.10 ⁷	8,8.10 ⁷
SS1	4,5.10 ⁷	6,1.10 ⁷	6,9.10 ⁷
SS2	5,9.10 ⁷	9.10 ⁷	8,5.10 ⁷
SM1	5.10 ⁷	6,1.10 ⁷	7.10 ⁷
SM2	6,4.10 ⁷	1.10 ⁸	1.10 ⁸
CK1	4,9.10 ⁷	8,3.10 ⁷	7,8.10 ⁷
CK2	1.10 ⁸	1,8.10 ⁸	9,3.10 ⁷
CK3	5.10 ⁷	9.10 ⁷	9.10 ⁷
CK4	5.10 ⁷	5,5.10 ⁷	6.10 ⁷
CK5	9.10 ⁷	4,5.10 ⁸	4.10 ⁸
CS1	6,5.10 ⁷	7,6.10 ⁷	5,2.10 ⁷
CS2	9,6.10 ⁷	1,9.10 ⁸	1.10 ⁸
CS3	5,5.10 ⁷	9,2.10 ⁷	9.10 ⁷
CS4	4,9.10 ⁷	5,9.10 ⁷	6,5.10
CS5	8,9.10 ⁷	3,8.10 ⁸	3.10 ⁸
CM1	5,1.10 ⁷	8,9.10 ⁷	7,4.10 ⁷
CM2	8,7.10 ⁷	2.10 ⁸	1,6.10 ⁸
CM3	4,9.10 ⁷	1.10 ⁸	1.10 ⁸
CM4	5,7.10 ⁷	5,9.10 ⁷	6,7.10 ⁷
CM5	4,3.10 ⁸	5,5.10 ⁸	4.10 ⁸

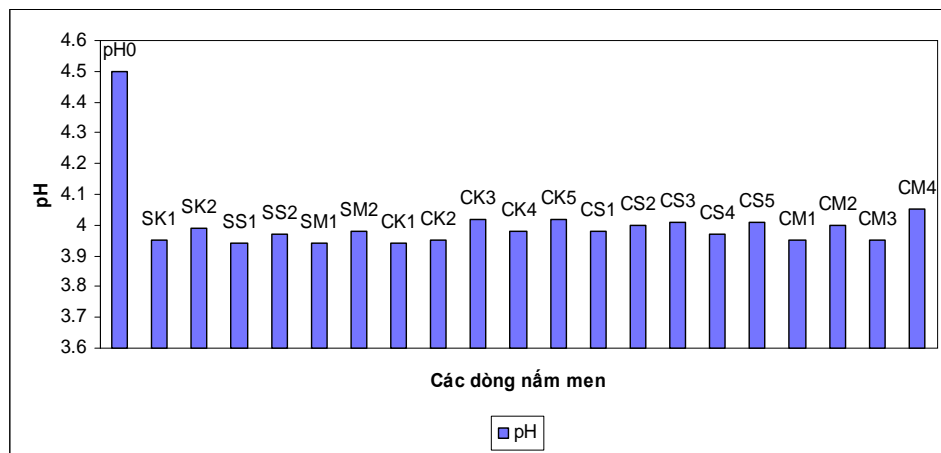
Kết quả nhân giống cho thấy tất cả các dòng nấm men qua 1 ngày nhân giống đều đạt mật số tế bào 10⁷ CFU/ml, trừ các dòng nấm men CM5, CK2 đạt mật số 10⁸/ml CFU/ml. Sau 2 ngày nhân giống nấm men đều tăng mật số lên khoảng từ 1–5 lần và sau 3 ngày nuôi cấy mật số tế bào nấm men giảm khoảng 1 lần, hoặc

giữ nguyên mật số, hoặc tăng không đáng kể. Như vậy có thể chọn thời gian hoạt hóa nhân giống nấm men trong bình tam giác sau 1 ngày hoặc 2 ngày ủ ở 30°C, lắc trên tủ ủ lắc 140 vòng/phút trước khi chủng giống nấm men cho lên men. Sau thời gian hoạt hóa dịch nhân giống đạt tế bào nảy chồi 10–40% và tế bào chết không quá 4% (kết quả thí nghiệm thăm dò), mật số tế bào 10^7 /ml. Kết quả này phù hợp với tài liệu Nguyễn Đức Lương và cộng sự (2003), yêu cầu dịch men giống tế bào nảy chồi đạt 10–15%, tế bào chết không quá 4% và số tế bào trong 1 ml là 12–14 triệu.

3.1.2 Hoạt tính lên men của nấm men phân lập

Kết quả đo giá trị pH trung bình của 21 dòng nấm men phân lập sau thời gian lên men rượu thốt nốt trong 11 ngày được thể hiện ở hình 1.

Kết quả cho thấy sau quá trình lên men rượu thốt nốt, giá trị pH sản phẩm rượu thốt nốt của 21 dòng nấm men đều giảm so với pH 4,5 của dịch lên men phối chế ban đầu. Hiện tượng giảm pH do sự hoạt động của nấm men trong quá trình lên men kỵ khí sinh ra CO₂ và một số acid hữu cơ cũng làm giảm pH của dịch lên men (Lương Đức Phẩm, 2006).



Hình 1: pH cuối của dịch lên men ứng với các dòng nấm men sau thời gian lên men rượu 11 ngày so với pH ban đầu (pH0) 4,5

Ghi chú: Ký hiệu viết tắt được trình bày ở phần phụ lục

Với phương pháp ống Durham, chiều cao cột khí CO₂ của 21 dòng nấm men trong lên men rượu thốt nốt được đo thể hiện ở bảng 2. Trong quá trình lên men rượu có hai sản phẩm chính là rượu ethylic và CO₂, và để xác định hoạt lực của nấm men có thể dựa trên khả năng thoát khí CO₂ trong quá trình lên men (Nguyễn Đức Lương *et al.*, 2003). Kết quả khảo sát cho thấy giống nấm men *Saccharomyces* dòng SM2 phân lập từ nước thốt nốt với thời gian thu hoạch buổi sáng, xử lý metabisulfite sodium, có thời gian đầy ống Durham sớm nhất (2 giờ) so với các dòng nấm men khác. Vì vậy, có thể dựa vào thời gian đầy hết ống durham ngắn nhất, để xác định dòng nấm men SM2 là dòng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất. Tuy nhiên, do thời gian thử lên men trong ống Durham quá ngắn (7 giờ), trong khi quá trình lên men rượu có thời gian dài hơn (11 ngày), vì vậy phương

pháp đo chiều cao cột khí CO₂ bằng ống Durham chỉ là cơ sở ban đầu để xác định dòng nấm men có hoạt tính cao nhất.

Bảng 2: Chiều cao cột khí CO₂ (cm) của 21 dòng nấm men lên men rượu thốt nốt

Dòng nấm men	Thời gian lên men (giờ)						
	1	2	3	4	5	6	7
SK1	0,80	2,13	2,60	2,80	3,30	3,60	4,20
SK2	1,70	3,77	4,20	-	-	-	-
SS1	0,83	2,20	2,63	2,80	3,30	3,60	4,20
SS2	1,80	3,70	4,20	-	-	-	-
SM1	0,90	2,30	2,73	3,00	3,60	4,00	4,20
SM2	2,00	4,20	-	-	-	-	-
CK1	0,90	2,20	2,50	2,90	3,40	3,70	4,20
CK2	1,40	3,20	3,70	4,20	-	-	-
CK3	1,80	3,53	4,20	-	-	-	-
CK4	0,90	2,17	2,60	2,90	3,40	3,60	4,20
CK5	0,90	2,17	2,80	3,70	4,20	-	-
CS1	0,90	2,00	2,30	2,77	3,20	3,60	4,20
CS2	1,00	2,57	3,50	4,20	-	-	-
CS3	1,80	3,50	4,20	-	-	-	-
CS4	0,80	2,00	2,50	2,80	3,33	3,67	4,20
CS5	0,90	2,10	2,80	3,80	4,20	-	-
CM1	1,00	2,10	2,50	2,93	3,40	3,90	4,20
CM2	1,80	3,43	4,00	4,20	-	-	-
CM3	1,80	3,70	4,20	-	-	-	-
CM4	0,90	2,23	2,67	2,80	3,50	3,80	4,20
CM5	1,00	2,30	3,00	4,20	-	-	-

(Ghi chú - : chiều cao cột khí CO₂ không thay đổi)

Ghi chú: Ký hiệu viết tắt được trình bày ở phần phụ lục

Độ cồn của dịch lên men ứng với 21 dòng nấm men sau thời gian lên men rượu thốt nốt 11 ngày thể hiện ở bảng 3.

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu rượu thốt nốt của 6 dòng nấm men cho độ rượu cao, không khác biệt ý nghĩa theo kết quả thống kê là dòng nấm men SK2 (12,73% v/v), SS2 (12,73% v/v), CM3 (12,77% v/v), dòng nấm men CK3 (12,70% v/v), CS3 (12,73% v/v) và CM3 (12,77% v/v). Tuy nhiên, rượu thốt nốt lên men từ giống *Saccharomyces* dòng SM2 phân lập từ nước thốt nốt có thời gian thu hoạch buổi sáng, xử lý metabisulfite sodium cho độ cồn với giá trị cao nhất 13,2% (v/v).

Ngoài ra, hàm lượng đường sót trong rượu thốt nốt của dòng nấm men SM2 thấp nhất 1,65%, có khác biệt ý nghĩa theo kết quả thống kê, so với hàm lượng đường sót trong rượu của các dòng nấm men khác. Sau quá trình lên men rượu, hàm lượng đường sót còn lại nhiều sẽ làm ảnh hưởng đến mùi vị sản phẩm, vì đường sót sẽ được vi khuẩn lactic sử dụng để tạo thành acid lactic, làm chua dịch lên men (Trần Minh Tâm, 2000). Như vậy dòng nấm men SM2 là dòng nấm men có độ rượu cao và hàm lượng đường sót thấp, tối ưu nhất so với các dòng nấm men phân lập khác.

Bảng 3: Độ cồn và hàm lượng đường sót trung bình của 21 dòng nấm men lên men rượu thốt nốt

Dòng nấm men	Trung bình nghiệm thức	
	Độ rượu (% v/v)	Hàm lượng đường sót (%)
SK1	10,33 ^{abc}	2,74 ^C
SK2	12,73 ^{de}	2,19 ^B
SS1	10,23 ^{abc}	2,82 ^C
SS2	12,73 ^{de}	2,21 ^B
SM1	10,30 ^{abc}	2,80 ^C
SM2	13,20^e	1,65^A
CK1	10,00 ^a	2,97 ^C
CK2	11,33 ^{bc}	2,55 ^{BC}
CK3	12,70 ^{de}	2,19 ^B
CK4	10,17 ^{ab}	2,93 ^C
CK5	11,00 ^{abc}	2,61 ^{BC}
CS1	10,33 ^{abc}	2,83 ^C
CS2	11,33 ^{bc}	2,52 ^{BC}
CS3	12,73 ^{de}	2,18 ^B
CS4	10,20 ^{ab}	2,87 ^C
CS5	11,00 ^{abc}	2,61 ^{BC}
CM1	10,30 ^{abc}	2,80 ^C
CM2	11,50 ^{cd}	2,63 ^{BC}
CM3	12,77 ^{de}	2,16 ^B
CM4	10,50 ^{abc}	2,80 ^C
CM5	11,00 ^{abc}	2,59 ^{BC}

Ghi chú: các số liệu trong bảng là trung bình của ba lần lặp lại, trong cùng một cột các số có mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$)

Ghi chú: Ký hiệu viết tắt được trình bày ở phần phụ lục

Trong quá trình lên men rượu, nấm men sử dụng đường trong điều kiện kỵ khí lên men tạo thành rượu ethylic, nồng độ rượu càng cao và hàm lượng đường sót thấp sau quá trình lên men rượu, điều này thể hiện năng lực chuyển hóa đường thành rượu và hiệu suất lên men rượu của nấm men cao. Vì vậy, nấm men có hoạt lực cao sẽ lên men rượu tạo độ cồn cao đồng thời chịu được độ cồn, và có hàm lượng đường sót sau lên men thấp nhất. Như vậy dòng nấm men SM2, có thời gian thu hoạch buổi sáng, xử lý metabisulfite sodium là dòng nấm men được tuyển chọn từ 21 dòng nấm men phân lập và thể hiện hoạt lực cao nhất với các ưu điểm có thời gian kết thúc cột khí CO₂ sớm nhất, cho độ rượu cao nhất và hàm lượng đường sót thấp nhất, được chọn lựa để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Khả năng lên men rượu thốt nốt của nấm men phân lập và so sánh chất lượng với nấm men hiện có trên thị trường (*Saccharomyces cerevisiae*)

So sánh khả năng lên men rượu thốt nốt của nấm men phân lập và nấm men hiện có ngoài thị trường có thể dựa vào độ cồn và hàm lượng đường sót của các mẫu rượu thốt nốt có cùng điều kiện dịch phối chế ban đầu ở các mức độ khác nhau về °Brix, pH và mật số tế bào nấm men của dòng nấm men phân lập SM2 có hoạt lực tối ưu thuộc giống *Saccharomyces* và nấm men thị trường *Saccharomyces cerevisiae*. Độ cồn và hàm lượng đường sót của dòng nấm men phân lập SM2 và

nấm men thị trường *Saccharomyces cerevisiae* (với các thay đổi °Brix, pH và mật số nấm men) được cho ở bảng 4.

Bảng 4: Độ cồn (%) và hàm lượng đường sót (%) trung bình rượu thốt nốt của dòng SM2 thuộc giống nấm men phân lập *Saccharomyces* và nấm men thị trường *Saccharomyces cerevisiae* sau 11 ngày lên men

Nghiem thức	Dịch phối chế ban đầu			Trung bình nghiệm thức	
	Độ Brix	pH	Mật số nấm men/ml	Độ cồn (% v/v)	Hàm lượng đường sót (%)
1	20	4,0	10 ⁵	12,10 ^{cdefghk}	0,66 ^{ABC}
2	20	4,0	10 ⁶	12,17 ^{cdefgh}	0,52 ^{AB}
3	20	4,0	10 ⁷	11,73 ^{fghklm}	0,57 ^{AB}
4	20	4,5	10 ⁵	12,5 ^{cde}	0,53 ^{AB}
5	20	4,5	10⁶	12,67^{bcd}	0,42^A
6	20	4,5	10 ⁷	12,23 ^{cdefg}	0,42 ^A
7	20	5,0	10 ⁵	12,00 ^{defghkl}	0,65 ^{ABC}
8	20	5,0	10 ⁶	11,90 ^{efghkl}	0,62 ^{ABC}
9	20	5,0	10 ⁷	11,60 ^{ghklmn}	0,58 ^{AB}
10	22	4,0	10 ⁵	12,70 ^{bcd}	1,47 ^{DEFG}
11	22	4,0	10 ⁶	12,67 ^{bcd}	1,33 ^{DEFG}
12	22	4,0	10 ⁷	12,30 ^{cdefg}	1,42 ^{DEFG}
13	22	4,5	10⁵	13,67^a	1,02^{ABCD}
14	22	4,5	10 ⁶	13,33 ^{ab}	0,99 ^{ABCD}
15	22	4,5	10 ⁷	12,77 ^{bc}	1,08 ^{BCDE}
16	22	5,0	10 ⁵	12,77 ^{bc}	1,33 ^{DEFG}
17	22	5,0	10 ⁶	12,67 ^{bcd}	1,24 ^{CDEF}
18	22	5,0	10 ⁷	12,50 ^{cde}	1,11 ^{BCDE}
19	24	4,0	10 ⁵	12,50 ^{cde}	2,82 ^{MNOPQ}
20	24	4,0	10 ⁶	12,40 ^{cdef}	2,89 ^{NOPQ}
21	24	4,0	10 ⁷	12,17 ^{cdefgh}	3,13 ^{QG}
22	24	4,5	10 ⁵	12,67 ^{bcd}	2,26 ^{HKLM}
23	24	4,5	10 ⁶	12,67 ^{bcd}	2,38 ^{KLMNOP}
24	24	4,5	10 ⁷	12,33 ^{cdef}	2,85 ^{MNOPQ}
25	24	5,0	10 ⁵	12,33 ^{cdef}	2,95 ^{OPQ}
26	24	5,0	10 ⁶	12,50 ^{cde}	2,62 ^{MNOPQ}
27	24	5,0	10 ⁷	12,00 ^{defghkl}	2,98 ^{PQ}
28	20	4,0	10 ⁵	10,17 st	1,81 ^{FGHK}
29	20	4,0	10 ⁶	10,67 ^{pqrst}	1,52 ^{DEFG}
30	20	4,0	10 ⁷	10,43 ^{rst}	1,63 ^{EFGH}
31	20	4,5	10 ⁵	10,67 ^{pqrst}	1,47 ^{DEFG}
32	20	4,5	10 ⁶	11 ^{nopqr}	1,29 ^{DEFG}
33	20	4,5	10⁷	11,1^{mnoqr}	1,23^{CDEF}
34	20	5,0	10 ⁵	10,1 ^t	1,87 ^{GHKL}
35	20	5,0	10 ⁶	10,5 ^{qrst}	1,49 ^{DEFG}
36	20	5,0	10 ⁷	10,67 ^{pqrst}	1,84 ^{FGHKL}
37	22	4,0	10 ⁵	10,78 ^{opqrs}	2,65 ^{MNOPQ}
38	22	4,0	10 ⁶	11,17 ^{mnoqr}	2,5 ^{MNOP}
39	22	4,0	10 ⁷	11,17 ^{mnoqr}	2,42 ^{KLMNOP}
40	22	4,5	10 ⁵	11 ^{nopqr}	2,58 ^{MNOPQ}
41	22	4,5	10 ⁶	11,33 ^{lmnop}	2,31 ^{KLMN}
42	22	4,5	10 ⁷	11,33 ^{lmnop}	2,3 ^{KLMN}

43	22	5,0	10 ⁵	11,33 ^{lmnop}	2,35 ^{KLMNO}
44	22	5,0	10 ⁶	11,3 ^{lmnop}	2,45 ^{LMNOP}
45	22	5,0	10 ⁷	11,33 ^{lmnop}	2,4 ^{KLMNOP}
46	24	4,0	10 ⁵	11,4 ^{klmno}	4,32 ^{TU}
47	24	4,0	10 ⁶	11,43 ^{klmno}	4,49 ^U
48	24	4,0	10 ⁷	11,43 ^{defghkl}	4,24 ^{STU}
49	24	4,5	10 ⁵	12,0 ^{cdef}	4,09 ^{STU}
50	24	4,5	10⁶	12,33^{cdef}	3,77ST
51	24	4,5	10⁷	12,33^{cdef}	3,66^{RS}
52	24	5,0	10 ⁵	11,5 ^{hklmno}	4,43 ^U
53	24	5,0	10 ⁶	11,4 ^{klmno}	4,46 ^U
54	24	5,0	10 ⁷	11,5 ^{hklmno}	4,2 ^{STU}

Ghi chú: các số liệu trong bảng là trung bình của ba lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$).

(Nghiệm thức 1–27: các điều kiện phối chế của dòng nấm men phân lập SM2; nghiệm thức 28–54: các điều kiện phối chế của dòng nấm men thị trường *Saccharomyces cerevisiae*)

Độ cồn: kết quả khảo sát và đánh giá độ cồn các mẫu rượu thốt nốt của dòng nấm men SM2 và *Saccharomyces* cho thấy độ cồn ứng với nấm men phân lập SM2 và nấm men phân lập có khoảng biến động từ 10,1–13,67% (v/v). Nhìn chung, đa số các nghiệm thức của dòng SM2 cho độ cồn cao hơn các nghiệm thức của dòng nấm men thị trường.

Trong các nghiệm thức ứng với dòng nấm men phân lập, nghiệm thức 13 (22°Brix; pH 4,5; 10⁵ CFU/ml) cho giá trị độ cồn cao nhất (13,67% v/v). Trong khi đó, nghiệm thức 50 (24°Brix; 4,5; 10⁶ CFU/ml) và nghiệm thức 51 (22 °Brix; pH 4,5; 10⁷ CFU/ml) cho giá trị độ cồn cao nhất của dòng nấm men thị trường là 12,33% v/v. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa của hai nghiệm thức này.

Hàm lượng đường sót: kết quả phân tích trên các mẫu rượu thốt nốt ứng với dòng SM2 và dòng nấm men *Saccharomyces* cho thấy hàm lượng đường sót của mẫu sử dụng nấm men phân lập SM2 nhìn chung thấp hơn hàm lượng đường sót của mẫu sử dụng dòng nấm men *Saccharomyces* tương ứng với từng mức độ °Brix của dịch phối chế ban đầu.

Dòng nấm men phân lập sử dụng ở nghiệm thức 5 (20°Brix; pH 4,5; 10⁶ CFU/ml) và nghiệm thức 6 (20°Brix; 4,5; 10⁷) cho hàm lượng đường sót thấp nhất (0,42%). Trong khi đó, với dòng nấm men thị trường được sử dụng thì nghiệm thức 33 (20°Brix; pH 4,5; 10⁷ CFU/ml) cũng cho hàm lượng đường sót thấp nhất của là 1,23% và thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai nghiệm thức này.

Như vậy, nghiệm thức 5 (20°Brix; pH 4,5; 10⁶ CFU/ml), nghiệm thức 6 (20°Brix; pH 4,5; 10⁷ CFU/ml) cho hàm lượng đường sót thấp (0,42%) và nghiệm thức 13 (22°Brix; pH 4,5; 10⁵ CFU/ml) cho độ cồn cao (13,67%) (sử dụng dòng nấm men phân lập SM2) đạt giá trị tối ưu hơn so với nghiệm thức 33 cho hàm lượng đường sót thấp (1,23%) và nghiệm thức 50, 51 cho độ cồn cao nhất (12,33%) và hàm lượng đường sót còn lại nhiều (3,77% và 3,66%, tương ứng) (dòng nấm men thị trường *Saccharomyces cerevisiae*).

Ngoài ra, kết quả còn cho thấy rõ nghiệm thức 13 (22°Brix; pH 4,5; 10⁵ CFU/ml) cho mẫu rượu tốt nhất (dòng nấm men phân lập), vì mẫu rượu này đạt giá trị tối ưu

về độ cồn cao nhất (13,67%) và có hàm lượng đường sót thấp nhất (1,02%). Đánh giá cảm quan sơ bộ, rượu thốt nốt lên men từ nấm men phân lập SM2 có hương vị hài hòa đặc trưng, màu sắc sáng đẹp hơn rượu thốt nốt lên men từ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

4 KẾT LUẬN

Dòng nấm men SM2 giống *Saccharomyces* phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi sáng, có xử lý metabisulfite được tuyển chọn từ 21 dòng nấm men phân lập là dòng nấm men có hoạt lực lên men tốt hơn so với các dòng nấm men khác, với các ưu điểm có thời gian kết thúc cột khí CO₂ sớm nhất (2 giờ), độ cồn cao (13,2% v/v) và hàm lượng đường sót thấp (1,65%).

Khả năng lên men rượu thốt nốt của nấm men phân lập dòng SM2 giống *Saccharomyces* tốt hơn nấm men ở thị trường *Saccharomyces cerevisiae* với các ưu điểm độ cồn, hàm lượng đường sót thấp, mùi vị thơm hài hòa, màu sắc sáng đẹp. Rượu thốt nốt lên men từ dòng nấm men SM2 của nấm men phân lập, với dịch lên men phối chế có 22°Brix, pH 4,5, mật số tế bào nấm men 10⁵/ml, lên men ở 30°C, cho hàm lượng ethanol 13,67% v/v và hàm lượng đường sót 1,02%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lương Đức Phẩm (2006), Nấm men công nghiệp, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Nguyễn Đức Lương, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết (2003), Thí nghiệm công nghệ sinh học tập II Thí nghiệm vi sinh vật học, Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia TP.HCM.
- Trần Minh Tâm (2000), Công nghệ vi sinh ứng dụng, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

PHỤ LỤC

SK1: Dòng nấm men hình elip nhọn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi sáng không xử lý, **SK2:** Dòng nấm men hình tròn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi sáng không xử lý, **SS1:** Dòng nấm men hình elip nhọn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi sáng xử lý gỗ sến, **SS2:** Dòng nấm men hình tròn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi sáng xử lý gỗ sến, **SM1:** Dòng nấm men hình elip nhọn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi sáng xử lý metabisulfite sodium, **SM2:** Dòng nấm men hình tròn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi sáng xử lý metabisulfite sodium, **CK1:** Dòng nấm men hình elip dài phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều không xử lý, **CK2:** Dòng nấm men hình ovan phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều không xử lý, **CK3:** Dòng nấm men hình tròn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều không xử lý, **CK4:** Dòng nấm men hình elip dài phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều không xử lý, **CK5:** Dòng nấm men hình ovan (nhỏ) phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều không xử lý, **CS1:** Dòng nấm men hình elip dài phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý gỗ sến, **CS2:** Dòng nấm men hình ovan phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý gỗ sến, **CS3:** Dòng nấm men hình tròn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý gỗ sến, **CS4:** Dòng nấm men hình elip dài phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý gỗ sến, **CS5:** Dòng nấm men hình ovan (nhỏ) phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý gỗ sến, **CM1:** Dòng nấm men hình elip dài phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý metabisulfite sodium, **CM2:** Dòng nấm men hình ovan phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý metabisulfite sodium, **CM3:** Dòng nấm men hình tròn phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý metabisulfite sodium, **CM4:** Dòng nấm men hình elip dài phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý metabisulfite sodium, **CM5:** Dòng nấm men hình ovan (nhỏ) phân lập từ nước thốt nốt thu hoạch buổi chiều xử lý metabisulfite sodium.