

NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA VI NẤM TRONG QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT RƯỢU GẠO

Nguyễn Ngọc Hòa, Đặng Xuân Nghiêm*

Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

*Email: dxnghiem@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 07.03.2012

Ngày chấp nhận: 17.05.2012

TÓM TẮT

Nghiên cứu vai trò của vi nấm trong quá trình sản xuất rượu gạo truyền thống đã được tiến hành với 4 chủng vi nấm mới được chọn từ 21 chủng phân lập từ men rượu và mốc tương. 4 chủng vi nấm đã sơ bộ được định loại và đặt tên tương ứng là M3 (*Rhizopus* spp.), M10 (*Rhizopus* spp.), M16 (*Aspergillus oryzae*) và M18 (*Endomycopsis fibuliger*). Chủng M10, M16 và M18 có hoạt tính 3 loại enzyme ngoại bào, amylase, protease và cellulase mạnh. Ngược lại, chủng M3 không có hoạt tính amylase ngoại bào và có hoạt tính protease và cellulase ngoại bào rất yếu. Khi 4 loại vi nấm được thêm với lượng lớn vào các công thức lên men rượu truyền thống cũng không làm tăng năng suất rượu. Có mối tương quan khá mạnh giữa pH của dịch lên men và năng suất rượu tạo thành, pH dịch lên men càng thấp thì năng suất rượu cũng càng thấp. Cả 4 chủng vi nấm không làm thay đổi hàm lượng aldehyde, methanol và rượu bậc cao trong rượu thành phẩm.

Từ khóa: Bánh men rượu, đường hóa, lên men rượu, rượu gạo, vi nấm.

Functional Role of Mould Strains in Production of Rice Wine

ABSTRACT

This investigation on the possible role of mould in production of traditional rice wine was carried out with the 4 candidate mould strains which were selected from 21 mould strains isolated from traditional rice wine starters and traditional soysauce starters. The 4 mould strains were preliminarily identified and named as M3 (*Rhizopus* spp.), M10 (*Rhizopus* spp.), M16 (*Aspergillus oryzae*), and M18 (*Endomycopsis fibuliger*). M10, M16 and M18 strains expressed very strong extracellular enzyme activities (amylase, protease, cellulase), while M3 strain had weak extracellular protease and cellulase activity and no extracellular amylase. Noteably, the yield of rice wine of the traditional alcoholic fermentation was not increased when large amounts of the biomass of the 4 isolated mould strains were added. There was a strong correlation between the pH of fermentation liquid and the final yield of wine. The lower the pH of fermentation liquid was, the lower the yield of wine. Moreover, all 4 mould strains were determined to have no role in the formation of aldehyde, methanol and higher alcohol in rice wine products.

Keywords: Ethanol fermentation, mould, rice wine, rice wine starter, saccharification.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong sản xuất rượu truyền thống ở Việt Nam cũng như nhiều nước châu Á khác, men rượu đóng vai trò quan trọng và quyết định đến chất lượng và hương vị đặc trưng của rượu. Theo một số ít những nghiên cứu, thành phần hệ vi sinh vật

trong men rượu gồm nấm mốc, nấm men, giả nấm men và vi khuẩn. Tuy vai trò mang tính giả thuyết của từng loại vi sinh vật này đã được đề cập, nhưng chưa có những nghiên cứu đủ tin cậy để chứng minh vai trò của từng loại vi sinh vật, ngoài nấm men, trong men rượu. Mới chỉ có những nghiên cứu về nấm mốc và khả năng

đường hóa của chúng trong nhiều loại men rượu đặc sản của Việt Nam (Nguyen và cs., 2006). Tuy nhiên, trong những nghiên cứu này vai trò của *Endomycopsis fibuliger* - một vi sinh vật trong men rượu vừa có khả năng đường hóa vừa có khả năng rượu hóa mạnh lại không được đề cập đến.

Nếu thực sự nấm mốc có vai trò quan trọng trong men rượu truyền thống thì vai trò này được hiện thực hóa qua hoạt động của hệ enzyme của chúng. Nhưng những kiến thức về mối liên hệ giữa thành phần hệ vi sinh vật hiện diện trong bánh men làm rượu và sự hoạt động của chúng, trong đó nấm mốc và nấm men có vai trò chủ yếu, vẫn chưa được hiểu biết nhiều (Nguyen và cs., 2006). Hơn nữa, một câu hỏi vẫn chưa có lời giải đáp là hàm lượng aldehyde, methanol, rượu bậc cao, ester và acid hữu cơ trong rượu thành phẩm có tương quan như thế nào tới thành phần và hàm lượng vi sinh vật của men rượu (Huỳnh Xuân Phong và cs., 2007).

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi nấm được phân lập từ các mẫu bánh men rượu truyền thống, men rượu công nghiệp trong nước và mốc tương (Bảng 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập, bảo quản và giữ giống

Các chủng vi nấm được phân lập theo phương pháp cấy trải trên môi trường PDA đặc theo phương pháp Koch (Êgôrôv, 1983), cấy chuyển nhiều lần để làm thuần. Các chủng vi nấm được lưu giữ trong môi trường thạch nghiêng cho việc sử dụng ngắn hạn và giữ giống lâu dài trong glycerol 40% ở -80°C.

2.2.2. Phương pháp định danh sơ bộ bằng quan sát đặc tính hình thái các chủng nấm

Vi nấm được cấy chấm điểm tạo khuẩn lạc trên đĩa petri, ủ ở 30°C trong 5 ngày, sau đó được quan sát và mô tả đặc điểm khuẩn lạc, bao gồm kích thước, màu sắc, hình dạng khuẩn lạc, và đặc điểm sợi nấm. Đặc điểm của sợi khí sinh, cuống đính bào tử và bào tử (màu sắc, hình dạng) được quan sát dưới kính hiển vi có độ phóng đại 1000 lần.

2.2.3. Phương pháp tách chiết enzyme ngoại bào

Enzyme ngoại bào được tách chiết từ vi nấm nuôi trên môi trường xốp (gạo nấu chín đã được hấp khử trùng) bằng cách thêm 30 ml nước cất vô trùng vào 10g cơm mốc rồi vortex sau đó ly tâm 4000 vòng/phút trong 30 phút để thu dịch canh trường. Enzyme ngoại bào tổng số được cô đặc bằng đông khô hoặc bằng muối amonisulfate và được bảo quản ở -20°C trong đệm phosphate 0,1M, pH 7,2 với 50% glycerol.

Bảng 1. Kí hiệu và nguồn gốc các chủng vi nấm trong nghiên cứu

Nguồn gốc	Địa điểm lấy mẫu	Thời gian lấy mẫu	Kí hiệu
Men rượu truyền thống dạng bánh	Nam Định	01/2011	M3
Men rượu truyền thống dạng bánh	Thái Bình	01/2011	M10
Mốc tương	Hưng Yên	01/2011	M16
Men rượu công nghiệp dạng bột	Nam Định	01/2011	M18

2.2.4. Khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

50μl dịch chiết cần được khảo sát hoạt tính amylase được nhỏ vào giếng đục trên đĩa thạch với 2% agarose trong đệm phosphate 0,1M, pH= 5,8, cơ chất 1% tinh bột. Đĩa thạch đã được nhỏ dịch chiết được ủ ở 30°C, qua đêm, sau đó vòng phân giải cơ chất được thể hiện bằng nhuộm lugol.

Tương tự, với cellulase việc khảo sát chỉ khác cơ chất là 0,3% cellulose, còn với protease thì cơ chất là 0,1% gelatin và thuốc nhuộm là amido đen 10B 0,1% trong dung dịch methanol, acetic acid, nước cất theo tỷ lệ 3: 1: 6 trong 1 giờ, tẩy bằng dung dịch pha amido đen.

Hoạt tính của enzyme được xác định qua kích thước vòng phân giải: $D - d$ (cm). Trong đó: D là đường kính vòng phân giải (cm), d là đường kính lỗ thạch (cm). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.2.5. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme

Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của enzyme được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với đệm phosphate 0,1M pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (chuẩn pH bằng acetic acid và NaOH).

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của enzyme được khảo sát tương tự với dịch enzyme được xử lý ở các nhiệt độ: 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90 °C trong 1 giờ.

2.2.6. Khảo sát thành phần protein- enzyme ngoại bào tổng số bằng SDS - PAGE

Khảo sát thành phần protein- enzyme ngoại bào tổng số được thực hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide) 3 lớp (4, 10 và 16,5%) theo Schägger và von Jagow (1987). Enzyme được rửa bằng ethanol 70% được sử dụng để làm mẫu chạy điện di.

2.2.7. Khảo sát sự chuyển hóa nguyên liệu trong quá trình lên men rượu

Mỗi dịch lên men gồm: 500g cơm gạo nếp, vi nấm (nuôi trong môi trường xốp khoảng 4-6 ngày, đem sấy ở 35°C, nghiền nhỏ và bảo quản ở nhiệt độ phòng), nấm men (2 chủng nấm men, đã được khảo sát là có khả năng lên men rượu mạnh phân lập từ men rượu từ Cao Bằng và Thái Bình, được nuôi lỏng trên môi trường dịch chiết quả đu đủ để thu sinh khối (Báo cáo tốt nghiệp: “Nghiên cứu tính chống chịu và khả năng lên men rượu của một số chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*)” của Đinh Thị Phương, 2011-kết quả chưa công bố). Các quá trình lên men được thực hiện trong tủ ổn nhiệt ở 30°C. Việc ủ khô (lên men xốp/ẩm) kéo dài trong 3 ngày trước khi nước được đổ thêm vào (lên men lỏng) với tỷ lệ 1 gạo (đem nấu cơm) 3 nước cất. Các mẻ lên men được đậy kín và tiếp tục ủ trong thời gian nghiên cứu. Hàm lượng đường khử của các dung dịch trong các công thức lên men giai đoạn lỏng được xác định bằng phương pháp Bernfeld (1955). pH dịch lên được đo bằng máy đo pH bàn Meter S20 của hãng Mettler toledo - Thụy Sĩ. Rượu được chưng cất bằng máy Water stiller. Rượu sau khi chưng cất được làm mát đến 25°C để đo độ rượu bằng cồn kế (đơn vị là ° hay %). Năng suất rượu (g rượu/kg gạo) được xác định bằng công thức:

$$E (\%) \times m1 (g)$$

$$100 \times m2 (kg)$$

Trong đó E là độ cồn của rượu sản phẩm, $m1$ là khối lượng rượu thành phẩm và $m2$ là khối lượng của gạo nguyên liệu

2.2.8. Phương pháp xác định hàm lượng aldehyde, methanol và cồn bậc cao (Iso- amylacohol, Iso- propanol)

Hàm lượng aldehyde (tính theo acetaldehyde) được thực hiện bằng phương

pháp so màu theo tiêu chuẩn TCVN8009 - 2009. Hàm lượng methanol và rượu bậc cao được xác định bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng máy sắc ký khí (GC) HP Aligent 6890 theo tiêu chuẩn TCPTN - GC. Các chỉ tiêu này được xác định tại Trung tâm phân tích và giám định thực phẩm quốc gia - Viện Công nghiệp thực phẩm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi nấm và sơ bộ định danh

Với 13 mẫu bánh men rượu và 1 mẫu mốc tương thu thập trong nước, 21 chủng vi nấm đã được phân lập. Dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch PDA, 4 chủng vi nấm được tuyển chọn, sơ bộ được định loại và kí hiệu tương ứng là M3, M10, M16, M18 để tiến hành thí nghiệm.

Nghiên cứu đặc điểm hình thái và đặc điểm phân loại của các chủng nấm đã phân lập được dựa trên các đặc điểm hình thái, kích thước khuẩn lạc, cuống sinh bào tử, bào tử, v.v và so sánh với khóa phân loại của Schipper và Stalpers (1984); Kurtzman và Fell (1998); Barnett và cs. (2000); Klich (2002) để sơ bộ định loại đến chi hoặc đến loài cho các chủng nấm.

Chủng M3: trên môi trường PDA, khuẩn lạc phát triển rất nhanh tại 30°C, khuẩn lạc tròn, màu đen nhạt, mép khuẩn lạc có quầng trắng nhạt, sợi nấm mọc tỏa tròn, sợi khí sinh ngắn, có rễ giả, cuống bào tử nhẵn, không có vách ngăn, mọc đơn lẻ hoặc tạo chùm từ thân bò, sinh sản bằng cách hình thành những cuống sinh bào tử và túi bào tử. Bào tử không có roi, gần như tròn, đồng nhất, nằm trong túi bào tử. So sánh với khóa phân loại của Schipper và Stalpers (1984), chủng vi nấm này được sơ bộ xác định thuộc chi *Rhizopus* spp. (Hình 1a).

Chủng M10: trên môi trường PDA, khuẩn lạc phát triển rất nhanh tại 30°C. Ban đầu khi còn non, hệ sợi có màu trắng, sợi nấm dài, bông xốp, sau chuyển dần thành màu nâu xám, có rễ giả, sợi khí sinh dài hơn M3, cuống bào tử nhỏ hơn M3, nhẵn, không có vách ngăn, mọc đơn lẻ hoặc tạo chùm từ thân bò. Lõi bào tử có hình cầu hoặc hình ovan. Bào tử có hình cầu hoặc hình ovan. Lõi bào tử đến độ tuổi nào đó thường bị sụp xuống để tạo thành hình chiếc ô. So sánh các đặc điểm của M10 với khóa phân loại của Schipper và Stalpers (1984), chủng nấm mốc này được sơ bộ xác định thuộc chi *Rhizopus* spp. (Hình 1b).



Hình 1a. M3 - hình thái cuống sinh bào tử, bào tử. 1b: M10 - hình thái thân bò, cuống sinh bào tử, bào tử. 1c: M16 - hình thái bào tử, cuống phát sinh bào tử, bông bào tử, thể bình. 1d: M18 - hình thái hệ sợi đang hình thành bào tử

Chủng M16: khuẩn lạc bông xốp, phát triển khá nhanh, kích thước khuẩn lạc sau 96 h nuôi cấy là 4,7 cm. Khuẩn lạc tròn, mặt trước khuẩn lạc lúc đầu có màu trắng, sợi mịn như nhung, về sau chuyển dần sang màu vàng hoa cau rồi sang màu xanh rêu đậm, mép khuẩn lạc có dạng hình tia, sợi nấm mọc tỏa tròn. Sợi nấm có vách ngăn, phân nhánh; cuống sinh bào tử không phân nhánh, có bong hình cầu, lớn. Thể bình 1 tầng; bào tử trần, hình cầu nhẵn, màu vàng. So sánh đặc điểm của M16 với khóa phân loại của Klich (2002), M16 được sơ bộ xác định là *Aspergillus oryzae* (Hình 1c).

Chủng M18: khuẩn lạc có màu trắng, bột, dạng sợi. Trên môi trường PDA, khuẩn lạc có đường kính khoảng 2,3 cm, trên môi trường MEA khuẩn lạc có đường kính khoảng 1,7cm. Sợi nấm thấp, có thể thưa thớt hoặc khá dày, có khi mọc thành núp ở giữa. Hình thành hệ sợi nấm và các tế bào như tế bào nấm men. Hệ sợi nấm có vách ngăn ngang, có khả năng hình thành bào tử chồi. Các bào tử chồi có nhiều hình dạng như hình tròn, hình elip, hình bầu dục, hình ovan, và có khả năng hình thành chồi để tạo ra các bào tử chồi khác. So sánh đặc điểm hình thái M18 với khóa phân loại của Kurtzman và Fell (1998); Barnett và cs. (2000), M18 được sơ bộ xác định là *Endomycopsis fibuliger* (*Saccharomycopsis fibuliger*) thuộc chi *Endomycopsis* (lớp: *Saccharomycetes*, bộ: *Saccharomycetales*, họ: *Saccharomycetaceae*) (hình 1d).

3.2. Xác định hoạt tính và hoạt độ tương đối của amylase, protease, cellulase ngoại bào của các chủng vi nấm

Các enzyme ngoại bào của vi nấm có khả năng phân giải tinh bột, protein và cellulose - các chất có trong nguyên liệu lên men rượu giúp cho quá trình đường hóa trong lên men

rượu, hoặc tạo ra dinh dưỡng cung cấp cho nấm men, nấm mốc phát triển.

Kết quả khảo sát sơ bộ (Hình 2, 3) cho thấy, các chủng M10, M16, M18 đều có hoạt tính amylase, protease, cellulase. M10 có hoạt độ amylase, cellulase mạnh nhất. M16 có hoạt độ enzyme protease mạnh nhất. M3 không có hoạt tính amylase và hoạt độ protease và cellulase yếu nhất. Lương Đức Phẩm và cs. (2000) đã nghiên cứu một số chủng vi sinh vật từ các sản phẩm lên men truyền thống. Trong đó, chủng *Aspergillus awamori* được phân lập từ bánh men rượu truyền thống có hoạt tính cũng gần tương tự với chủng M10 và M16, và cũng có một chủng nấm không có khả năng phân giải tinh bột. Nguyen và cs. (2006) cũng đã sử dụng *Amylomyces rouxii*, *Amylomyces* aff. *rouxii*, *Rhizopus oligosporus* và *Rhizopus oryzae* để lên men rượu nếp than bởi chúng đều có khả năng thủy phân tinh bột trong môi trường thạch tinh bột gạo. Mặc dù M3 không có hoạt tính amylase nhưng chúng tôi vẫn sử dụng nó để làm đối chứng âm. Qua đó xem xét mối tương quan giữa hoạt tính enzyme đến năng suất rượu cho các thí nghiệm sau này.

3.3. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng hoạt động, độ bền của enzyme ngoại bào của vi nấm

3.3.1. Ảnh hưởng của pH

Trong quá trình sản xuất rượu, pH của dịch lên men rượu thường thay đổi, sự thay đổi này có thể sẽ ảnh hưởng tới khả năng đường hóa của các chủng vi nấm.

Kết quả thể hiện ở hình 4 cho thấy, pH thích hợp cho hoạt động của enzyme amylase nằm trong khoảng từ 4 - 7 và đặc biệt ở pH 6. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Li và cs.(2007). Khi giá trị pH cao hơn 9 và thấp hơn 3, hoạt tính của enzyme giảm. pH thích hợp cho protease

của 4 chủng vi nấm hoạt động nằm trong khoảng pH 8, 9, 10 đặc biệt ở pH 8 và 9. Protease của các chủng nấm này có thể thuộc nhóm protease kiềm. Hầu hết cellulase của các chủng nấm đều hoạt động ở khoảng pH khá rộng từ 3 đến 10 và hoạt động thích hợp nhất trong khoảng pH từ 5 đến 7. Kết quả khoảng pH hoạt động của cellulase phù hợp với nghiên cứu của Zhang và Chi (2007), và Murashima và cs.(2002).

Căn cứ vào các kết quả này, pH thích hợp cho hoạt động của enzyme amylase và cellulase của cả 4 chủng vi nấm được chọn là pH 5,8 và protease là pH 8,5 để thực hiện thí nghiệm xác độ bền nhiệt của enzyme.

3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến độ bền của enzyme, nhiệt độ quá cao sẽ làm enzyme mất hoạt tính.

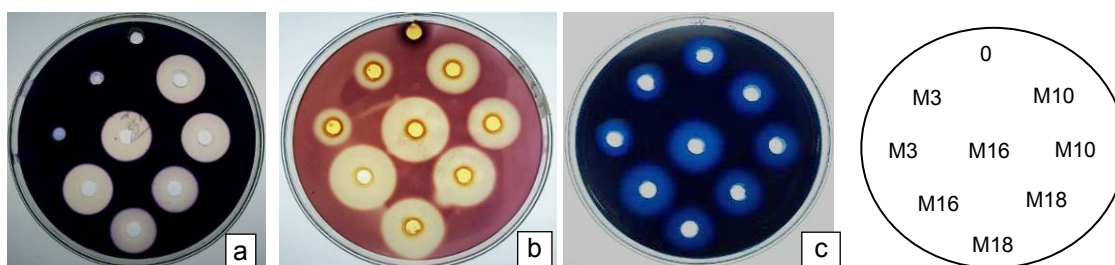
Kết quả cho thấy, hầu hết các loại enzyme vẫn hoạt động mạnh khi đã được xử lý nhiệt độ dưới 50°C; khi ở 60°C, hoạt độ enzyme bắt đầu giảm khá mạnh và khi nhiệt độ lớn hơn 70°C thì hoạt độ enzyme giảm mạnh và mất hoạt tính ở 90°. Riêng protease của M3 khi xử lý ở 60°C vẫn có hoạt tính mạnh nhất. Sau khi xử lý ở nhiệt độ 90°C, protease và cellulase của M16 vẫn còn có hoạt tính, tuy khá yếu (Hình 5). Nhiệt độ cao đã làm biến tính các loại enzyme.

Căn cứ vào các kết quả này, chúng tôi đã chọn 30°C là nhiệt độ thích hợp cho sự

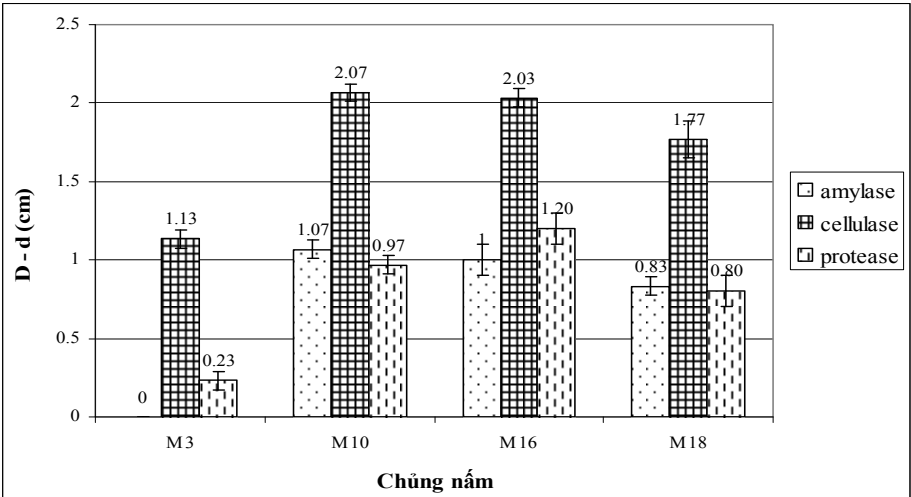
hoạt động của các loại enzyme của 4 chủng vi nấm để tiến hành các thí nghiệm sau.

3.4. Thành phần protein- enzyme ngoại bào vi nấm nuôi trên môi trường xốp

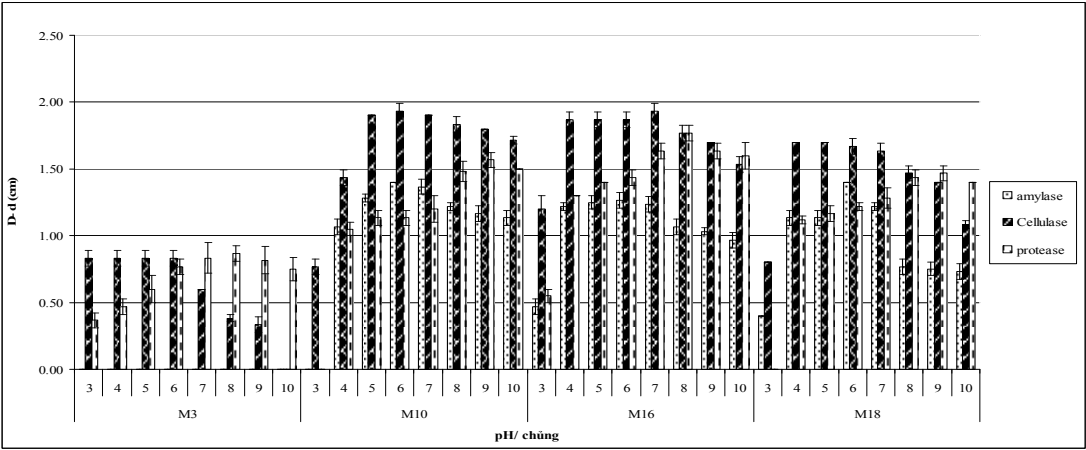
Nhằm khảo sát thành phần enzyme ngoại bào của các chủng vi nấm được nghiên cứu, phương pháp điện di biến tính protein đã được sử dụng. Kết quả điện di SDS- PAGE (Hình 6) cho thấy enzyme ngoại bào của các chủng vi nấm khá phong phú với kích thước phân tử khá khác nhau (so với dịch cơm đối chứng không thấy có băng protein). Điều này dễ giải thích vì vi nấm có nhiều loại enzyme ngoại bào như amylase, protease, cellulase, pectinase, invertase, catalase, lipase, v.v. Với kết quả điện di của giếng 6, 7 là GFP (green fluorescent protein) và BSA (bovine serum albumin) (đã biết khối lượng phân tử) bước đầu xác định hệ protein - enzyme ngoại bào của các chủng nấm có kích thước phổ protein - enzyme khá rộng. Kết quả điện di hệ protein - enzyme ngoại bào của các vi nấm tạo cơ sở cho việc thiết kế các thí nghiệm tinh sạch enzyme bằng sắc ký sau này. Phổ protein - enzyme có tương quan tới hoạt tính và hoạt độ của các loại enzyme. Chủng M3 có hoạt tính các loại enzyme khảo sát yếu nhất, hoặc không có so với các chủng khác thì có ít băng hơn, và băng protein thu được cũng mờ hơn so với các chủng khác. Và M16 có 2 loại enzyme khảo sát có hoạt tính mạnh nhất có băng rất đậm.



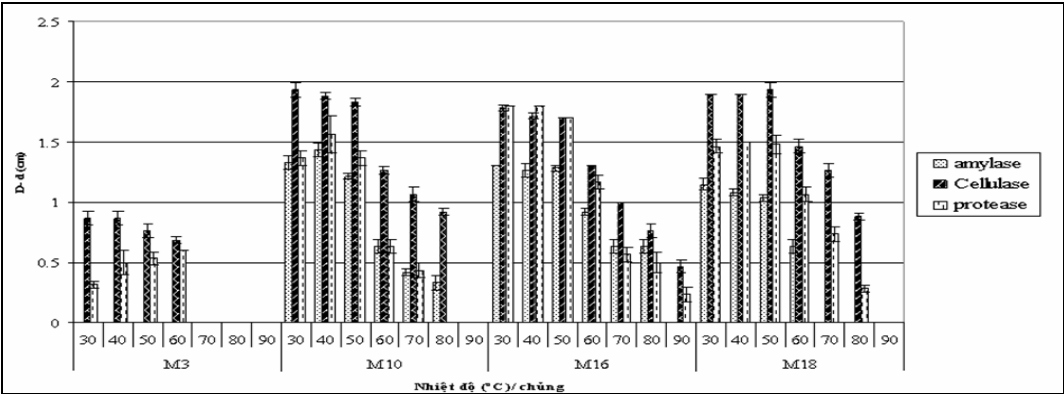
Hình 2. Hoạt tính amylase (a), cellulase (b), protease (c) ngoại bào của các chủng nấm mốc



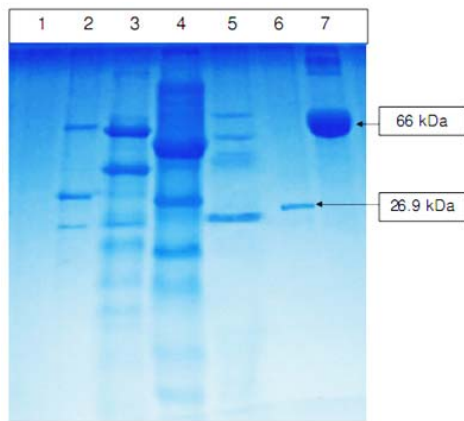
Hình 3. Hoạt độ tương đối của amylase, cellulase, protease ngoại bào



Hình 4. Hoạt tính amylase, cellulase, protease ngoại bào ở các pH khác nhau



Hình 5. Hoạt tính amylase, cellulase, protease ngoại bào ở các nhiệt độ khác nhau



Hình 6. Điện di SDS-PAGE. 1. ĐC (gạo), 2. M3, 3. M10, 4. M16, 5. M18, 6. GFP, 7. BSA

3.5. Khảo sát sự chuyển hóa nguyên liệu trong lên men rượu

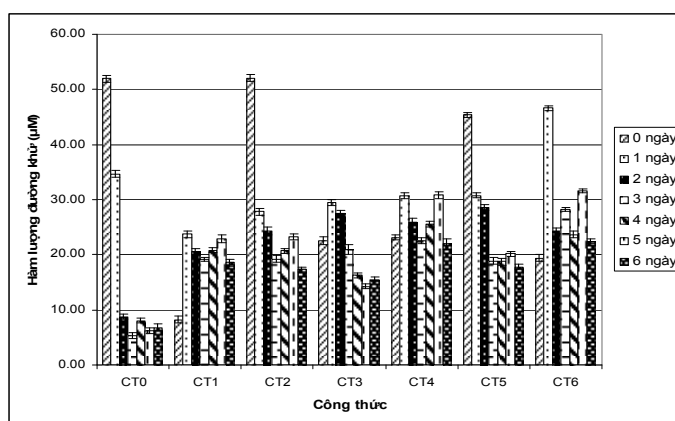
Tiếp theo, vai trò cụ thể của các chủng vi nấm đến sự lên men rượu được nghiên cứu thông qua việc khảo sát quá trình chuyển hóa các chất trong quá trình lên men rượu có thành phần nấm mốc khác nhau. Công thức lên men rượu chung gồm: gạo nếp, yếu tố cố định là nấm men, và khác nhau ở các chủng vi nấm thêm vào, riêng công thức đối chứng (CTĐC/ CT0) sử dụng men rượu truyền thống Gia Lâm, Hà Nội, CT1 - Nấm men + M3, CT2 - Nấm men + M10, CT3 - Nấm men + M16, CT4 -

Nấm men + M18, CT5 - Nấm men + M10, M16, M18, CT6 chỉ có M18, không có nấm mốc và nấm men.

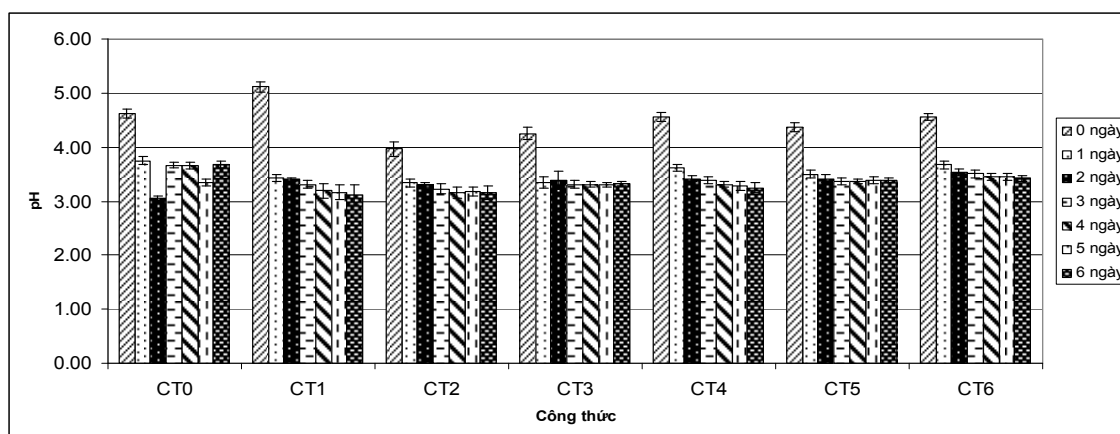
3.5.1. Hàm lượng đường khử của các công thức rượu trong giai đoạn lên men lỏng

Hàm lượng đường khử (μM) trong dịch lên men thể hiện hoạt động đường hóa của các chủng vi nấm. Khả năng lên men của nấm men cũng được thể hiện qua sự thay đổi hàm lượng đường khử qua các ngày lên men lỏng. Sự thay đổi hàm lượng đường khử của các CT qua các ngày trong giai đoạn lên men lỏng (đã trải qua 3 ngày lên men ẩm/xốp) được thể hiện trong hình 7.

Tốc độ tiêu thụ đường khử do vi nấm tạo ra khá ổn định từ ngày thứ hai trở đi. Đường khử liên tục được tạo ra và sử dụng trong quá trình lên men rượu. Cụ thể, lượng đường khử được tạo ra được lên men rượu bởi nấm men hoặc do chính nấm mốc sử dụng làm dinh dưỡng. Sau ngày thứ 2 hàm lượng đường khử tăng giảm chênh lệch không lớn (đặc biệt ở công thức đối chứng - CT0). Ở CTĐC CT0, lượng đường khử còn lại là ít nhất, có thể nhận định quá trình lên men ở đây cho hiệu suất cao nhất, và do hệ vi sinh vật ở CTĐC đầy đủ hơn trong khi đó các công thức còn lại chỉ có nấm men và nấm mốc mà không có vi khuẩn.



Hình 7. Hàm lượng đường khử (μM) của các công thức



Hình 8. Sự biến động pH của các công thức lên men

3.5.2. pH của các dịch lên men trong giai đoạn lên men lỏng

Sự giảm pH quá nhanh trong quá trình lên men có thể dẫn đến tỷ lệ chết của nấm men tăng mạnh (Phạm Thu Hà và cs., 2010), pH ảnh hưởng tới sự hoạt động của các enzyme (quá trình đường hóa) trong dịch lên men. Do đó, chúng tôi tiến hành thí nghiệm và thu được kết quả thể hiện ở hình 8.

Nhìn chung, pH giảm mạnh trong ngày đầu của quá trình lên men lỏng, từ khoảng 3,9 - 5,2 xuống khoảng 3,0 - 3,7 và sau đó ổn định đến cuối quá trình lên men (Hình 8). Theo Joosten và Peeters (2010), quá trình lên men rượu (từ đường và lên men chỉ với nấm men *Saccharomyces cerevisiae*) có thể xảy ra trong khoảng pH từ 2,8 đến 8,3, nhưng pH tối ưu cho quá trình này từ 4,8 đến 6,0. Nếu pH quá thấp (< 2,8) hoặc quá cao (> 8,3) sẽ cho năng suất rượu rất thấp. Sự giảm pH được giải thích là do sự hình thành CO_2 và một lượng lớn các axit hữu cơ trong quá trình lên men *Aspergillus oryzae* có khả năng tạo ra các acid hữu cơ như citric acid và acetic acid (Kammoun và cs., 2008), nhiều loài nấm thuộc chi

Rhizopus có thể sản xuất lactic acid (Zhan và cs., 2007), các loài thuộc *Endomycopsis* cũng có thể sinh ra gluconic acid (Milsom và Meers, 1985). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Nguyen (2004).

3.5.3. Năng suất rượu

Sau 7 ngày lên men lỏng, các công thức lên men được chưng cất và xác định năng suất rượu bằng cồn kế. Rượu sau khi cất ở tất cả các công thức trong suốt, không màu, không mùi lạ.

Với thành phần nấm men như nhau, vì nấm khác nhau, công thức 3 có năng suất rượu mạnh nhất 156,33 g/kg gạo (Bảng 2). CT5 cũng có năng suất rượu gần bằng với CT3, cả 2 công thức này đều có chung chủng M16, có hoạt tính amylase, cellulase mạnh. CT1 có chủng M3 có hoạt tính amylase yếu gần như không có, có năng suất rượu thấp nhất. Sản lượng rượu ở các công thức này đều thấp hơn đối chứng và có liên quan đến hoạt tính các loại enzyme của các chủng nấm đường hóa - đặc biệt là hoạt tính amylase (Bảng 2). Ngoài ra, ở CT6, thành phần chỉ có M18 - thuộc loài nấm men - cho năng suất rượu tương đối cao.

Vậy, M18 vừa có khả năng đường hóa vừa có khả năng rượu hóa khá mạnh. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Limtong và cs. (2002). Riêng CT0 (CTĐC) cho năng suất rượu cao nhất như đã được nhận định ở trên, khi khảo sát hàm lượng đường khử còn lại ở ngày cuối giai đoạn lên men lỏng.

Như vậy, có mối liên hệ tỷ lệ thuận giữa khả năng đường hóa (hoạt độ enzyme ngoại bào) của nấm mốc trong men với năng suất rượu. Để khảo sát xem việc lượng lớn các chủng nấm mốc vào men có ảnh hưởng đến thời gian và năng suất rượu như thế nào, chúng tôi đã làm các thí nghiệm tương tự nhưng thay các yếu tố cố định là nấm men như trong bảng 2 bằng 10 g men

rượu truyền thống (MRTT) từ Gia Lâm Hà Nội như trong bảng 3 và bảng 4. Các công thức cũng khác nhau về chủng vi nấm nghiên cứu được thêm vào nhưng với lượng nhiều hơn thí nghiệm trước (40g mỗi chủng).

Hàm lượng đường khử (μM) và pH của tất cả công thức thí nghiệm cả các công thức đều giảm sau 6 ngày lên men lỏng. Hàm lượng đường khử ở CT0-2 (ĐC) giảm mạnh nhất còn các công thức còn lại cũng giảm mạnh nhưng không bằng CT0-2. Ban đầu hàm lượng đường khử của các công thức thí nghiệm cũng thấp hơn công thức đối chứng (Bảng 3). Bước đầu có thể dự đoán tăng lượng vi nấm đường hóa trong men rượu không giúp tăng năng suất rượu.

Bảng 2. Năng suất rượu (g/kg gạo) của các công thức lên men

Công thức	Thành phần công thức	Năng suất rượu (g /kg gạo)
CT0	Men rượu truyền thống Gia Lâm, Hà Nội	215,00 $\pm$ 5,57
CT1	Nấm men + M3	53,67 $\pm$ 5,51
CT2	Nấm men + M10	72,33 $\pm$ 5,51
CT3	Nấm men + M16	156,33 $\pm$ 6,51
CT4	Nấm men + M18	77,67 $\pm$ 4,51
CT5	Nấm men + M10 + M16 + M18	150,33 $\pm$ 6,51
CT6	M18	121,67 $\pm$ 6,66

Bảng 3. Hàm lượng đường khử (μM) và pH các dịch lên men đầu và cuối giai đoạn lên men lỏng

Công thức	Thành phần	Hàm lượng đường khử (μM)		pH	
		Bắt đầu lên men lỏng	Trước khi cất rượu	Bắt đầu lên men lỏng	Trước khi cất rượu
CT0-2	MRTT	32,86 $\pm$ 0,68	5,17 $\pm$ 0,12	3,62 $\pm$ 0,09	3,45 $\pm$ 0,07
CT1-2	MRTT + M3	26,69 $\pm$ 0,78	7,55 $\pm$ 0,14	3,72 $\pm$ 0,09	3,33 $\pm$ 0,07
CT2-2	MRTT + M10	30,51 $\pm$ 0,12	12,12 $\pm$ 0,12	3,72 $\pm$ 0,08	3,22 $\pm$ 0,06
CT3-2	MRTT + M16	23,82 $\pm$ 0,65	9,01 $\pm$ 0,16	4,02 $\pm$ 0,12	3,45 $\pm$ 0,06
CT4-2	MRTT + M18	27,05 $\pm$ 0,22	14,23 $\pm$ 0,32	3,76 $\pm$ 0,07	3,10 $\pm$ 0,09

Bảng 4. Năng suất rượu (g/kg gạo) của các công thức lên men có cùng thành phần men rượu truyền thống

Công thức	Thành phần	Năng suất rượu (g rượu/kg gạo)
CT0-2 (ĐC)	MRTT	209,33 ± 6,03
CT1-2	MRTT + M3	192,33 ± 5,51
CT2-2	MRTT + M10	151,00 ± 6,56
CT3-2	MRTT + M16	204,67 ± 6,03
CT4-2	MRTT + M18	173,67 ± 5,51

Sản lượng rượu thu được ở thí nghiệm thứ 2 giảm với mức độ khác nhau khi cho các loại vi nấm khác nhau (Bảng 4). Từ đó, có thể chứng minh nhận định trên. Kết quả năng suất rượu ở thí nghiệm này đã phủ nhận vai trò tích cực của việc tăng tỷ lệ vi nấm trong lên men rượu mặc dù các chủng có hoạt tính amylase mạnh cũng không tăng sản lượng rượu. Có thể do trong quá trình lên men rượu nấm mốc và nấm men sử dụng cơ chất là tinh bột và đường để sinh trưởng và sinh sản và đồng thời có thể tạo ra các chất khác như acid, v.v., làm giảm năng suất rượu. Giá trị pH thấp còn có thể ức chế lên hoạt động của nấm men, kết quả làm giảm hiệu suất lên men.

Qua cả 2 thí nghiệm lên men rượu gạo trên, ta thấy chủng M16 - *Aspergillus oryzae* có khả năng đường hóa tốt nhất và cho năng suất rượu (cùng với nấm men) cao nhất, mặc dù nguồn phân lập của nó là từ mốc tương.

3.5.4. Môi trường quan giữa pH, hàm lượng đường khử trước khi cất và năng suất rượu

Giữa pH, hàm lượng đường khử trước khi cất và năng suất rượu của các công thức có thể có mối tương quan với nhau. Mối tương quan giữa các đại lượng ở cả 2 thí nghiệm trên được tiếp tục xác định bằng cách sử dụng hàm correlation trong excel.

Hệ số tương quan giữa pH trước khi cất và năng suất rượu ở cả 2 lần thí nghiệm là 0,82 và 0,81 (>0,75) thể hiện mối tương quan khá mạnh giữa pH và sản lượng rượu tạo ra. pH của dịch lên men càng thấp thì sản lượng rượu càng thấp. pH của dịch càng thấp thì có nhiều sản phẩm phụ của quá trình lên men như các acid hữu cơ làm giảm năng suất rượu thu được. Mối tương quan này rất có ý nghĩa trong thực tế khi mở rộng quy mô sản xuất, khi cần so sánh chất lượng của các công thức lên men ta có thể dễ dàng thông qua việc đo pH.

3.5.5. Xác định hàm lượng aldehyde, methanol và cồn bậc cao (Iso-amylacohol, Iso-propanol)

Sản xuất rượu có thể tạo ra một số sản phẩm phụ như aldehyde, ester, acid hữu cơ, methanol, rượu bậc cao. Chúng gây ra nhiều tác hại đến chất lượng rượu và sức khỏe người sử dụng. Các mẫu rượu đã được kiểm định một số thành phần trên. Mẫu 1: Rượu thành phẩm sử dụng men truyền thống. Mẫu 2: Rượu thành phẩm sử dụng M18 và nấm men. Mẫu 3: Rượu thành phẩm sử dụng M10, M16, M18 và nấm men. Bánh men rượu truyền thống Gia Lâm, Hà Nội và các chủng nấm men, vi nấm đường hóa của mẫu 1, 2, 3 cho rượu thành phẩm đều có chứa hàm lượng aldehyde quá mức cho phép (Bảng 7).

Bảng 5. Mối tương quan giữa pH, hàm lượng đường khử trước khi cất và năng suất rượu của các công thức ở thí nghiệm lên men rượu có thành phần cố định là nấm men

	pH	Hàm lượng đường khử trước khi cất rượu
pH	1	
Hàm lượng đường khử	-0,65	1
Năng suất rượu	0,82 ± 0,02	-0,50

Bảng 6. Mối tương quan giữa pH, hàm lượng đường khử trước khi cất và năng suất rượu của các công thức ở thí nghiệm lên men rượu có thành phần cố định là men rượu truyền thống

	pH	Hàm lượng đường khử trước khi cất rượu
pH	1	
Hàm lượng đường khử	-0,89	1
Năng suất rượu	0,81 ± 0,03	-0,78

Bảng 7. Hàm lượng aldehyde, methanol và cồn bậc cao (iso- amylacohol, iso- propanol) của một số mẫu rượu thành phẩm

Tên chỉ tiêu	Mẫu	Đơn vị tính	Kết quả	Mức chỉ tiêu quy định (QCVN 6 - 3: 2010/BYT)
Hàm lượng Aldehyde (tính theo acetaldehyde)	1	mg/l	27,10 ± 0,30	Không lớn hơn 5.0 mg acetaldehyde/l cồn 100°
	2		30,92 ± 0,21	
	3		30,95 ± 0,19	
Hàm lượng Methanol	3	°V	KPH (< 0,01)	Không lớn hơn 300 mg/l cồn 100°
Hàm lượng cồn bậc cao (Iso - amylacohol, Iso - propanol)	3	mg/l	KPH (< 0,1)	Không lớn hơn 5.0 mg methyl 2-propanol/l cồn 100°

KPH: Không phát hiện

Mẫu rượu thành phẩm 2 chỉ có nấm men (giả nấm men - M18 và nấm men) nhưng lượng andehyde vẫn cao và tương đương với mẫu 3 (bao gồm nấm mốc và nấm men). Kết quả này chứng tỏ vi nấm không có vai trò nhiều trong việc tạo thành aldehyde, methanol và cồn bậc cao trong rượu thành phẩm.

4. KẾT LUẬN

Với các kết quả nghiên cứu ở trên, chúng tôi sơ bộ đi đến những kết luận sau:

4 chủng vi nấm mới đã được tuyển chọn từ 21 chủng nấm phân lập được, đã sơ bộ được định danh và đặt tên tương ứng là M3, M10 thuộc chi *Rhizopus*; M16 là *Aspergillus oryzae* và M18 là *Endomycopsis fibuliger* - giả nấm men.

Điện di SDS- PAGE thấy enzyme ngoại bào của các chủng vi nấm khá phong phú với kích thước phân tử rất khác nhau. Các chủng có hoạt tính enzyme ngoại bào yếu có ít protein ngoại bào hơn.

Hoạt độ tương đối của enzyme amylase của các chủng vi nấm trong men có ảnh hưởng tới sản lượng rượu tạo thành. Khi tăng tỷ lệ 4 loại vi nấm với lượng nhiều vào men rượu truyền thống không làm tăng năng suất rượu. Ngược lại năng suất rượu lại giảm so với đối chứng không thêm vi nấm. Giữa pH của dịch lên men trước khi cất và năng suất rượu tạo thành có mối tương quan tỷ lệ thuận, pH dịch lên men càng thấp thì năng suất rượu cũng càng thấp.

Vi nấm không có vai trò nhiều trong việc tạo thành aldehyde, methanol và cồn bậc cao trong rượu thành phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được hoàn thành nhờ một phần kinh phí của đề tài trọng điểm cấp trường, Đại học Nông nghiệp Hà Nội, mã số T2011-12-7TĐ, do TS. Đặng Xuân Nghiêm chủ trì.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd edn. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Bernfeld (1955). Amylase alpha and beta. *Methods Enzymol.* 1:149-158.

Êgôrôv, N. X (1983). *Thực tập vi sinh vật học*. Nhà xuất bản "MIR" Maxcova (Nguyễn Lân Dũng dịch).

Phạm Thu Hà, Mauvais, G., Vergoignan, C., Cachon, R. Feron, Gilles (2010). Ảnh hưởng của việc thay đổi môi trường oxy hóa khử bằng sức khí đến tiêu thụ đường ở nấm men bia *Saccharomyces cerevisiae*. *Tạp chí khoa học và phát triển* Tập 8, số 2: 319 - 326. Trường đại học Nông nghiệp Hà Nội.

Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S (2008). Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alphaamylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour Technol.* 99, 5602-5609.

Klich, M.A (2002). *Identification of Common Aspergillus Species*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W (1998). *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn. Amsterdam: Elsevier.

Joosten, M. and Peeters, M (2010). Yeast and fermentation: the optimal pH level. Philips van Horne sg. Weert, The Netherlands.

Li, H.F., Chi, Z.M., Wang, X.H., Duan, X.H., Ma, L.Y., Gao, L.M (2007). Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme Microb Technol.* 40: 1006 - 12.

Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P. and Lotong, N. (2002). Yeast diversity in Thai traditional alcoholic starter. *Kasetsart Journal of Natural Sciences.* 36: 149 - 158

Milsom, P.E., Meers, J.L (1985). Gluconic acids and itaconic acids. *Compr. Biotechnol.* 3: 681-700.

Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga, J., Moriya, T., Sumida, N. 2002. Purification and characterization of new endo - 1,4 - β - D - glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Micro Technol.* 30: 319 - 26.

Nguyen .T.P.D., Romboutsb, F.M., Nout, M.J.R (2006). Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. *Food Microbiology.* 23(4): 331-340.

Nguyen.T.P.D (2004). *Defined fungal stater granules for purple glutinous rice wine*. Ph.D. thesis Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.

Lương Đức Phẩm, Nguyễn Thế Trang, Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Văn Hiếu (2000). Tuyển chọn các chủng vi sinh vật từ các sản phẩm lên men truyền thống. *Báo cáo khoa học Hội nghị Sinh học Quốc gia*. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội. 139-142.

Huỳnh Xuân Phong, Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Hà Thanh Toàn, Ngô Thị Phương Dung (2007). Khảo sát chất lượng men làm rượu và rượu Xuân Thạnh, Trà Vinh. *Tạp chí Khoa học.* 7: 121-129.

Schägger and von Jagow (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry.* 166: 368-379

Schipper, M.A.A. and Stalpers, J.A (1984). A revision of the genus *Rhizopus*. 2. The Rh. microsporus-group. *Stud. Mycol. Baarn.* 25: 20-34.

Zhan, Y.Z., Bo, J (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal.* 35 (3): 251-263.

Zhang, L., Chi, Z.M (2007). Screening and identification of a cellulase producing marine yeast and optimization of medium and cultivation conditions for cellulase production. *J Ocean Univer China.* 37: 101 - 8.