

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN NẤM MEN VÀ XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN RƯỢU CÀ NA (*CANARIUM ALBUM*)

Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Nguyễn Thị Niềm,
Nguyễn Thị Minh Trâm, Nguyễn Đức Độ

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Liên hệ email: hnttam@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Cà na (*Canarium album*) là loại cây trồng phổ biến ở vùng nhiệt đới châu Phi và Nam Á. Tại Việt Nam, cà na được trồng ở nhiều địa phương, quả có vị chua chát và hương thơm đặc trưng. Việc phân lập và tuyển chọn các dòng nấm tốt, đồng thời nghiên cứu lên men rượu cà na góp phần làm đa dạng các sản phẩm lên men từ trái cây và nâng cao giá trị kinh tế của quả cà na. Từ nguồn quả cà na ban đầu của các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Hậu Giang, Sóc Trăng (Việt Nam) và Kandal (Campuchia), có 50 dòng nấm men đã được phân lập, chia thành 6 nhóm dựa vào hình dạng tế bào và đặc tính sinh hóa. Kết quả phân lập cho thấy dòng nấm men R2B có khả năng lên men mạnh, sản phẩm rượu có độ cồn cao. Nghiên cứu khảo sát quy trình lên men rượu cà na từ dòng nấm men R2B (được định danh bằng phương pháp giải trình tự là *Lachancea fermentati*) được thực hiện dựa trên các chỉ tiêu về pH, độ Brix, mật số nấm men và thời gian lên men. Kết quả cho thấy sản phẩm rượu thu được có độ cồn cao (11,29% v/v) và đạt TCVN 7045:2009 trong điều kiện mật số nấm men là 10^7 TB/mL, dịch lên men được bổ sung đường saccharose đạt 24,01°Brix, pH = 3,88 và lên men rượu ở 30°C trong thời gian 12 ngày.

Từ khóa: cà na (*Canarium album*), lên men, nấm men, rượu cà na.

Nhận bài: 18/04/2018 Hoàn thành phân biện: 20/05/2018

Chấp nhận bài: 30/05/2018

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, rượu vang trái cây đã trở thành sản phẩm được ưa chuộng trong các buổi lễ hội và các buổi tiệc gia đình, do đó, việc phân lập nấm men nội sinh trong trái cây và lên men rượu vang được ứng dụng ngày càng rộng rãi. Nguyễn Văn Thành và cs. (2013) đã phân lập được dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* VK1 từ dịch khóm và tiến hành lên men rượu vang khóm, sản phẩm cho độ cồn cao nhất đạt 15,34% v/v. Ngô Thị Phương Dung và cs. (2011) đã phân lập được 6 dòng nấm men thuần từ dịch quả dưa hấu thuộc hai giống *Saccharomyces* và *Schizosaccharomyces*, tiến hành lên men rượu vang dưa hấu, sản phẩm cho độ rượu cao nhất đạt 15,83% v/v.

Cà na là loại cây gỗ đặc trưng của nhiều địa phương ở Việt Nam. Các bộ phận của cây cà na có nhiều công dụng trong cuộc sống hằng ngày. Rễ, quả và lá được dùng làm thuốc có tác dụng thanh nhiệt, giải độc. Vỏ cây có tinh dầu và tanin được sử dụng như dược liệu chống dị ứng và bảo vệ da. Quả cà na được dùng làm mứt, muối dưa, ô mai (Võ Văn Chi, 2003). Tuy nhiên những giá trị kinh tế của quả cà na không cao, các sản phẩm từ quả cà na còn khá ít nên dẫn đến việc lãng phí nguồn nguyên liệu giàu dinh dưỡng này. Nghiên cứu hoàn thiện quá trình lên men rượu cà na không những góp phần đa dạng hóa các sản phẩm lên men từ trái cây mà còn làm tăng giá trị kinh tế cho quả cà na. Ngoài ra, việc phân lập

những dòng nấm men nội sinh trong quả cà na có khả năng lên men ethanol cao cũng đem lại những lợi ích nhất định khi ứng dụng sản xuất cồn công nghiệp, góp phần tăng thu nhập cho người dân từ cây cà na.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Quả cà na được thu từ các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Hậu Giang, Sóc Trăng (Việt Nam) và Kandal (Campuchia). Môi trường YPDA (Yeast-Peptone-D-glucose-Agar) được dùng để phân lập nấm men. Môi trường YPD (Yeast-Peptone-D-glucose) dùng để tăng sinh khối nấm men. Thành phần của môi trường YPD và YPDA bao gồm peptone, yeast extract, D – glucose có xuất xứ từ Ấn Độ. Agar tinh khiết và các hóa chất khác như C_2H_5OH (cồn), HCl, NaOH và hóa chất thanh trùng ($NaHSO_3$) được mua từ công ty hóa chất Miền Nam (Quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm men từ dịch quả cà na

- Tiến hành thu mẫu

Quả cà na được thu tại các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Hậu Giang, Sóc Trăng (Việt Nam) và Kandal (Campuchia). Mỗi địa điểm thu khoảng 200 g cà na. Mẫu được bảo quản bằng cách ướp đá trong thùng xốp trong suốt quá trình vận chuyển đến phòng thí nghiệm.

- Phân lập những dòng nấm men từ quả cà na

Tại mỗi địa điểm cho từ 2 đến 3 quả cà na đã được loại bỏ hạt và để nguyên không nghiền vào bình tam giác 100 mL có môi trường YPD để tiến hành tăng sinh mật số nấm men. Sau đó, đem đi lãc ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Sau 24 giờ, tiến hành pha loãng dung dịch tăng sinh bằng cách lãc đều bình tam giác để nấm men phân bố đều trong môi trường, dùng pipet hút 1 mL dung dịch tăng sinh cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 9 mL nước cất đã khử trùng, thu được dung dịch có nồng độ pha loãng 10^{-1} lần, thực hiện các bước tương tự để thu được dung dịch với các nồng độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} lần. Ở mỗi nồng độ pha loãng, dùng pipet hút 100 μ L dung dịch cho vào đĩa petri chứa môi trường YPDA và dùng que trải thủy tinh vô trùng để tiến hành trải đều mẫu. Sau đó, để mẫu khô và ủ ở 30°C trong 24 – 48 giờ. Sau khi nấm men phát triển trên môi trường YPDA, quan sát khuẩn lạc nấm men và đánh dấu những khuẩn lạc khác nhau về kích thước, màu sắc, độ nổi, dạng bìa. Tiếp tục cách chuyển nhiều lần cho đến khi độ thuần của nấm men được xác định.

- Kiểm tra hình thái khuẩn lạc đặc trưng của các dòng nấm men

Đặc điểm khuẩn lạc nấm men rất đa dạng gồm: hình dạng (tròn và không đều), độ nổi (mô và lãi), màu sắc (trắng đục và trắng trong), dạng bìa (bìa nguyên và bìa gợn sóng), kích thước. Khuẩn lạc phân lập phải nằm trên đường cấy và không lẫn với những khuẩn lạc có hình thái và màu sắc khác. Sau khi được tách rỗng, những dòng phân lập sẽ được kiểm tra hình thái và quan sát độ thuần dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40X và 100X. Sau đó tiến hành định danh sơ bộ các dòng nấm men này bằng phương pháp hình thái học dựa vào khóa phân loại nấm men của Kurtzman và Fell (1998), Lương Đức Phẩm (2006) và Nguyễn Đức Lượng (2006) kết hợp với phương pháp sinh hóa (khả năng lên men đường glucose và saccharose, khả năng phân giải urea).

2.2.2. So sánh khả năng lên men của các dòng nấm men

Lên men dịch quả cà na trong bình tam giác có gắn waterlock để xác định khả năng lên men dựa vào độ cồn của sản phẩm sau lên men. Tiến hành lên men với các dòng nấm men đã được phân lập nhằm chọn ra dòng nấm men thích hợp nhất để lên men rượu cà na.

Phối chế dịch quả cà na (nước ép cà na điều chỉnh pH = 3,5 và 20°Brix) sau đó thanh trùng trong 2 giờ với NaHSO₃ nồng độ 140 mg/L. Tăng sinh nấm men đến khi đạt 10⁶ TB/mL, cho nấm men vào bình tam giác (1 mL dịch nấm men + 99 mL dịch quả phối chế). Sau 10 ngày lên men, tiến hành đo độ cồn bằng phương pháp chưng cất.

Dòng nấm men có khả năng lên men cho độ cồn cao nhất sẽ được định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 28S rRNA. Mẫu khuẩn lạc được gửi đến công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa (Quận Cái Răng, Thành phố Cần Thơ) để định danh đến tên loài của dòng nấm men. Đoạn mồi được sử dụng là ITS1-ITS4 630 pb.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật số nấm men đến quá trình lên men rượu cà na

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu thừa số gồm 3 nhân tố và 2 lần lặp lại. Nhân tố A (độ Brix) khảo sát ở 3 độ Brix khác nhau là 20, 25 và 30. Nhân tố B (pH) khảo sát ở 3 giá trị pH là pH = 3,5; pH = 4 và pH = 4,5. Nhân tố C (mật số nấm men) cũng tiến hành khảo sát ở 3 mật số nấm men khác nhau 10³ TB/mL, 10⁵ TB/mL và 10⁷ TB/mL.

Chuẩn bị dịch nấm men, kiểm tra mật số tế bào nấm men bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu. Cho vào mỗi bình tam giác 99 mL dịch quả cà na thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L trong 2 giờ), sau đó điều chỉnh nồng độ Brix và pH theo bố trí thí nghiệm và sau cùng chủng mật số nấm men vào một cách ngẫu nhiên. Dịch chủng được lên men trong thời gian 10 ngày ở nhiệt độ 30°C. Sau khi lên men, tiến hành chưng cất để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được bằng cồn kế, quy về nồng độ ethanol ở 20°C.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men rượu cà na

Thí nghiệm được tiến hành để xác định được thời gian lên men tối ưu trong quá trình lên men rượu cà na. Thí nghiệm 1 nhân tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên ở các thời gian lên men khác nhau (6 ngày, 8 ngày, 10 ngày, 12 ngày và 14 ngày) và được thực hiện với 3 lần lặp lại.

Tiến hành thu dịch quả cà na, thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L trong 2 giờ) và điều chỉnh các yếu tố pH, độ Brix và mật số nấm men theo kết quả tối ưu thu được ở thí nghiệm 2.2.3 “Khảo sát ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật số nấm men đến quá trình lên men rượu cà na”. Cho 99 mL dịch quả cà na và 1 mL dung dịch nấm men vào bình tam giác. Sau đó, ủ ở nhiệt độ phòng và tiến hành chưng cất rượu vào các mốc thời gian: 6 ngày, 8 ngày, 10 ngày, 12 ngày và 14 ngày. Sau quá trình chưng cất, đo nồng độ ethanol thu được và quy về nồng độ ethanol ở 20°C.

2.2.5. Khảo sát khả năng lên men rượu cà na ở thể tích 1 lít

Thí nghiệm được tiến hành lên men rượu cà na ở thể tích 1 lít nhằm mục đích phân tích các chỉ tiêu sinh hóa của sản phẩm rượu cà na theo TCVN 7045:2009 và đánh giá cảm quan sản phẩm theo TCVN 3217-79.

Cho vào 3 bình tam giác, mỗi bình 1000 mL dịch quả cà na đã thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L trong 2 giờ). Điều chỉnh pH, độ Brix và mật số nấm men như kết quả

của thí nghiệm 2.2.3 “Khảo sát ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật số nấm men đến quá trình lên men rượu cà na” và lên men ở thời gian tối ưu theo kết quả của thí nghiệm 2.2.4 “Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men rượu cà na”. Phối trộn 3 bình tam giác thành sản phẩm rượu cà na cuối cùng. Sau đó, tiến hành đo pH và độ Brix của sản phẩm sau khi phối trộn. Chung cất và đo nồng độ ethanol thu được. Đồng thời, gửi mẫu phân tích các chỉ tiêu sản phẩm theo TCVN 7045:2009 và tiến hành đánh giá cảm quan.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Microsof Exel 2010 được sử dụng để xử lý số liệu thô, tính các số liệu thống kê như số trung bình, hệ số biến thiên (CV%), độ lệch chuẩn (SD). Phần mềm SPSS 22.0 được dùng để phân tích phương sai và kiểm định LSD các trung bình nghiệm thức. Phần mềm Statgraphics Centurion XV.I được dùng để xác định điều kiện lên men tối ưu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm men từ dịch quả cà na

Kết quả phân lập được 50 dòng nấm men từ nguồn quả cà na ban đầu. Dựa vào hình dạng và đặc điểm sinh hóa của nấm men, 50 dòng nấm men phân lập có thể được xếp thành 6 nhóm. Hình dạng tế bào của 6 dòng nấm men tiêu biểu cho 6 nhóm (ở vật kính 40X) được thể hiện trong Hình 1.

Kết quả phân lập dựa vào hình dạng, tính chất sinh hóa của nấm men và căn cứ vào khóa phân loại nấm men của Kurtzman and Fell (1998), Lương Đức Phẩm (2006) và Nguyễn Đức Lương (2006): 50 dòng nấm men phân lập từ nguồn quả cà na ban đầu được xếp thành 6 nhóm và định danh sơ bộ gồm 3 giống *Hanseniaspora*, *Pichia* và *Saccharomyces*. Kết quả đạt được từ nghiên cứu tương tự với kết quả của Nguyễn Minh Thủy và cs. (2013), Nguyễn Văn Thành và cs. (2013) cũng định danh sơ bộ 3 giống nấm men này.



Hình 1. Hình dạng tế bào của 6 dòng nấm men tiêu biểu của 6 nhóm.

(a). Tế bào hình cầu (AG1A) (b). Tế bào hình cầu nhỏ (HG1A) (c). Tế bào hình elip nhọn (DT2B) (d). Tế bào hình oval (CT2A) (e). Tế bào hình oval nhỏ (CT1B) (f). Tế bào hình elip (CPC4)

3.2. Khả năng lên men của các dòng nấm men

Khả năng lên men được khảo sát với mật số nấm men là 10^6 TB/mL, thời gian ủ 10 ngày ở 30°C ; pH = 3,5 và độ Brix điều chỉnh 20° Brix. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Kết quả thu được cho thấy rằng đa số các dòng nấm men được sử dụng cho độ cồn sau lên men có giá trị thấp. Tuy nhiên, dòng nấm men R2B có khả năng lên men nhanh và cho sản phẩm có độ cồn cao (7,51% v/v), độ Brix biểu kiến đo bằng khúc xạ kế giảm ($10,67^\circ$ Brix). Dòng nấm men đối chứng lên men nhanh và có độ cồn (7,2% v/v) và độ Brix biểu kiến đo bằng khúc xạ kế ($11,33^\circ$ Brix). Kết quả độ cồn sau lên men của dòng nấm men R2B khác biệt có ý nghĩa thống kê với những dòng nấm men còn lại ở độ tin cậy 95%. Sản phẩm rượu thu được từ dòng nấm men này có độ cồn cao, mùi thơm đặc trưng và màu sắc đẹp. Do đó, dòng nấm men R2B được chọn định danh bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 28S rRNA. Kết quả này thấp hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Thành và cs. (2013) khi lên men dịch quả khóm bằng dòng nấm men VK1, sản phẩm sau lên men cho độ cồn là

13,26% v/v và kết quả nghiên cứu của Ngô Thị Phương Dung và cs. (2011) khi lên men dựa hầu bằng dòng nấm men Y04, sản phẩm có độ cồn cao nhất là 12% v/v.

Bảng 1. Các chỉ tiêu pH, độ Brix và độ cồn sau lên men của 37 dòng nấm men

STT	Dòng nấm men	pH	Độ Brix	Độ cồn 20°C (% v/v)	STT	Dòng nấm men	pH	Độ Brix	Độ cồn 20°C (% v/v)
1	AG1A	3,19	14,67 ^{CDE}	4,15 ^{hijkl}	20	HG1C	3,10	14,33 ^{CDE}	2,50 ^a
2	AG1B	3,09	14,33 ^{CDE}	4,42 ^{ijklm}	21	HG1D	3,18	14,00 ^{CD}	3,12 ^{abcd}
3	AG1C	3,04	14,00 ^{CD}	3,91 ^{defghij}	22	HG2A	3,21	14,67 ^{CDE}	4,99 ^{mno}
4	AG1D	3,10	14,33 ^{CDE}	4,02 ^{fghij}	23	HG2B	3,12	16,67 ^F	3,02 ^{abc}
5	AG2A	3,08	12,00 ^{AB}	5,26 ^{nop}	24	HG2C	3,12	14,33 ^{CDE}	4,61 ^{klmn}
6	AG2B	3,09	14,33 ^{CDE}	3,39 ^{bcdefgh}	25	HG2D	3,11	14,00 ^{CD}	3,83 ^{cdefghij}
7	AG2C	3,10	13,67 ^{CD}	4,14 ^{hijkl}	26	R1A	3,08	11,00 ^A	4,84 ^{klmn}
8	AG2D	3,13	15,00 ^{CDEF}	3,96 ^{efghij}	27	R1B	3,08	14,00 ^{CD}	5,85 ^{pq}
9	CPC2	3,10	16,00 ^{EF}	3,76 ^{cdefghi}	28	R2A	3,16	14,00 ^{CD}	4,89 ^{lmn}
10	CT1A	4,21	11,33 ^A	3,45 ^{bcdefgh}	29	R2B	3,08	10,67 ^A	7,51 ^r
11	CT1B	3,15	15,00 ^{CDEF}	3,58 ^{bcdefgh}	30	R3A	3,15	14,00 ^{CD}	5,12 ^{mnop}
12	CT1C	3,19	16,00 ^{EF}	4,61 ^{klmn}	31	R3B	3,04	11,00 ^A	5,72 ^{opq}
13	CT1D	3,13	14,67 ^{CDE}	3,69 ^{bcdefghi}	32	ST1A	3,13	14,67 ^{CDE}	2,93 ^{ab}
14	CT2A	3,16	14,33 ^{CDE}	4,43 ^{ijklm}	33	ST1B	3,11	14,33 ^{CDE}	4,07 ^{ghijk}
15	CT2B	3,15	14,00 ^{CD}	4,04 ^{fghij}	34	ST2A	3,11	15,00 ^{CDEF}	2,90 ^{ab}
16	CT2C	3,15	15,33 ^{DEF}	3,23 ^{abcdef}	35	ST2B	3,16	14,33 ^{CDE}	3,27 ^{abcdefg}
17	CT2D	3,10	15,33 ^{DEF}	6,40 ^q	36	ST2D	3,12	13,33 ^{BC}	3,30 ^{bcdefg}
18	HG1A	3,10	14,67 ^{CDE}	5,02 ^{mno}	37	ĐC	3,08	11,33 ^A	7,20 ^f
19	HG1B	3,14	16,00 ^{EF}	3,18 ^{abcde}		CV (%)		6,5	9,8

Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ số mang các chữ cái khác nhau trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$) theo kiểm định LSD.

Tiến hành giải trình tự đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men R2B. Kết quả cho thấy dòng nấm men này có độ tương đồng đến 99%, độ phủ 99% so với trình tự gen 28S rRNA của *Lachancea fermentati* (So sánh với ngân hàng gen trên NCBI bằng phần mềm BLASTN).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) [Selected](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Lachancea fermentati culture CBS:797 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1170	1170	99%	0.0	99%	KY103954.1
Lachancea fermentati strain CNRMA8.216 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	1168	1168	99%	0.0	99%	KP132381.1

Hình 2. So sánh trình tự gen của R2B tương đồng với *Lachancea fermentati* 99% với số đăng kí KY103954.1 trên NCBI.

Dòng nấm men R2B được sử dụng cho các thí nghiệm xác định điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu cà na.

3.3. Ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật số nấm men đến quá trình lên men rượu cà na

Theo Lương Đức Phẩm (2006), môi trường thuận lợi cho lên men rượu vang có nồng độ đường trong khoảng 18 - 25%. Khi nồng độ đường lớn hơn 25% thì quá trình lên men xảy ra chậm và quá trình lên men sẽ ngừng lại khi nồng độ đường vượt quá 30%. Đối với các loại nấm men để sản xuất rượu vang, pH thích hợp để chúng hoạt động là từ 4 đến 6. Tuy nhiên, khi lên men dịch quả có vị chua thì pH từ 2,8 đến 3,8 nấm men vẫn có thể hoạt

động được. Thời gian lên men rượu vang dao động từ 7 đến 12 ngày, tùy theo loại quả và điều kiện lên men.

Sau 10 ngày lên men rượu vang cà na với dòng nấm men R2B, kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật số nấm men đến khả năng lên men rượu cà na được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Giá trị pH, độ Brix và độ cồn trung bình sau lên men của dòng nấm men R2B

Nghiệm thức	pH-°Brix-Mật số	pH sau lên men	°Brix sau lên men	Độ cồn (% v/v)
1	3,5-20-10 ³	3,47	10,00 ^A	5,00 ^a
2	3,5-20-10 ⁵	3,48	10,50 ^{AB}	6,50 ^{bcd}
3	3,5-20-10 ⁷	3,44	10,00 ^A	9,00 ^g
4	3,5-25-10 ³	3,48	18,00 ^G	7,00 ^{cde}
5	3,5-25-10 ⁵	3,48	15,00 ^D	7,00 ^{cde}
6	3,5-25-10 ⁷	3,48	16,50 ^{EF}	7,00 ^{cde}
7	3,5-30-10 ³	3,48	24,00 ^J	6,00 ^{abc}
8	3,5-30-10 ⁵	3,45	24,50 ^J	8,50 ^{fg}
9	3,5-30-10 ⁷	3,46	24,50 ^J	8,00 ^{efg}
10	4,0-20-10 ³	3,71	12,00 ^C	5,50 ^{ab}
11	4,0-20-10 ⁵	3,74	11,50 ^{BC}	7,00 ^{cde}
12	4,0-20-10 ⁷	3,76	11,00 ^{ABC}	7,50 ^{def}
13	4,0-25-10 ³	3,74	18,00 ^G	7,00 ^{cde}
14	4,0-25-10 ⁵	3,70	17,00 ^{FG}	8,00 ^{efg}
15	4,0-25-10 ⁷	3,73	17,00 ^{FG}	8,50 ^{fg}
16	4,0-30-10 ³	3,78	23,50 ^{IJ}	8,00 ^{efg}
17	4,0-30-10 ⁵	3,78	22,50 ^{HI}	7,50 ^{def}
18	4,0-30-10 ⁷	3,63	23,50 ^{IJ}	8,00 ^{efg}
19	4,5-20-10 ³	3,92	11,50 ^{BC}	5,50 ^{ab}
20	4,5-20-10 ⁵	3,83	11,00 ^{ABC}	7,50 ^{def}
21	4,5-20-10 ⁷	3,94	11,00 ^{ABC}	8,00 ^{efg}
22	4,5-25-10 ³	4,15	16,50 ^{EF}	7,00 ^{cde}
23	4,5-25-10 ⁵	4,10	16,00 ^{DEF}	8,00 ^{efg}
24	4,5-25-10 ⁷	4,08	15,50 ^{DE}	8,00 ^{efg}
25	4,5-30-10 ³	3,91	22,50 ^{HI}	7,50 ^{def}
26	4,5-30-10 ⁵	3,87	22,00 ^H	7,50 ^{def}
27	4,5-30-10 ⁷	3,94	21,50 ^H	7,50 ^{def}

Số liệu là trung bình của 2 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$) theo kiểm định LSD

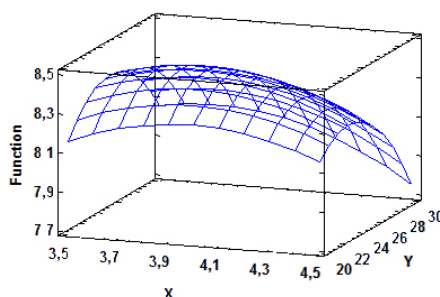
Sau quá trình lên men, pH của tất cả các mẫu đều giảm so với pH ban đầu do CO₂ và acid tạo thành trong quá trình lên men. Sự chênh lệch pH giữa các nghiệm thức là do sự chênh lệch pH được điều chỉnh trước khi lên men (Nguyễn Văn Thành và cs., 2013).

Độ Brix sau khi lên men của sản phẩm giảm so với độ Brix được điều chỉnh ban đầu. Điều đó cho thấy một lượng đường lớn đã được sử dụng trong quá trình lên men rượu cà na, có thể được giải thích là có khoảng 10% glucose được sử dụng để nấm men tăng sinh khối và phần còn lại được chuyển hóa thành rượu và một số sản phẩm phụ khác (Larpent, 1991).

Khi lên men trong cùng điều kiện pH và độ Brix, ở các nghiệm thức có mật số nấm men là 10³ TB/mL cho độ cồn khá thấp. Cụ thể là, ở nghiệm thức 1 là 5,00% v/v, nghiệm thức 10 là 5,50% v/v và nghiệm thức 19 là 5,50% v/v. Khác biệt này có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Trong khi đó, các nghiệm với mật số nấm men 10⁷ TB/mL cho sản phẩm tạo thành có độ cồn cao, dao động từ 8 - 9% v/v, khác biệt có

ý nghĩa thống kê so với mật số nấm men là 10^5 TB/mL và 10^7 TB/mL ở cùng điều kiện pH và độ Brix. Điều này cho thấy nếu hàm lượng nấm men ban đầu quá thấp sẽ dẫn đến nguồn carbon được sử dụng nhiều để tăng sinh khối nên lượng rượu sẽ tạo ra thấp.

Mô hình tương quan giữa pH, độ Brix, mật số nấm men và độ cồn của sản phẩm lên men rượu cà na:



Hình 3. Sự tương quan giữa nồng độ đường và pH lên men đến quá trình lên men dịch quả cà na

Với mong muốn xác định được điều kiện lên men tối ưu từ các thông số pH, độ Brix và mật số nấm men, kết quả thí nghiệm được phân tích bằng chương trình Statgraphics Centurion XV.I và cho phương trình hồi quy như sau (với độ tin cậy 95%):

$$\text{Ethanol} = -14,1925 + 2,84851 \cdot \text{pH} + 0,35709 \cdot \text{Brix} + 1,36906 \cdot \text{Matso} - 0,547778 \cdot \text{pH} \cdot \text{pH} + 0,128396 \cdot \text{pH} \cdot \text{Brix} + 0,302604 \cdot \text{pH} \cdot \text{Matso} - 0,0103778 \cdot \text{Brix} \cdot \text{Brix} + 0,0366042 \cdot \text{Brix} \cdot \text{Matso} - 0,0807986 \cdot \text{Matso} \cdot \text{Matso} - 0,0225625 \cdot \text{pH} \cdot \text{Brix} \cdot \text{Matso}$$

$$H = -14,1925 + 2,84851 \cdot X + 0,35709 \cdot Y + 1,36906 \cdot Z - 0,547778 \cdot X \cdot X + 0,128396 \cdot X \cdot Y + 0,302604 \cdot X \cdot Z - 0,0103778 \cdot Y \cdot Y + 0,0366042 \cdot Y \cdot Z - 0,0807986 \cdot Z \cdot Z - 0,0225625 \cdot X \cdot Y \cdot Z$$

(H: ethanol; X: pH; Y: Brix; Z: mật số nấm men)

Trong thí nghiệm này, với mục đích tạo ra được sản phẩm có nồng độ ethanol cao nên tiến hành cố định mật số nấm men là 10^7 TB/mL. Vì mật số quá lớn nên chọn $\log 10^7 = 7$. Thay $Z = 7$, được phương trình hồi quy như sau:

$$H = -14,1925 + 2,84851 \cdot X + 0,35709 \cdot Y + 1,36906 \cdot Z - 0,547778 \cdot X \cdot X + 0,128396 \cdot X \cdot Y + 0,302604 \cdot X \cdot Z - 0,0103778 \cdot Y \cdot Y + 0,0366042 \cdot Y \cdot Z - 0,0807986 \cdot Z \cdot Z - 0,0225625 \cdot X \cdot Y \cdot Z$$

$$H = -14,1925 + 2,84851 \cdot X + 0,35709 \cdot Y + 1,36906 \cdot 7 - 0,547778 \cdot X \cdot X + 0,128396 \cdot X \cdot Y + 0,302604 \cdot X \cdot 7 - 0,0103778 \cdot Y \cdot Y + 0,0366042 \cdot Y \cdot 7 - 0,0807986 \cdot 7 \cdot 7 - 0,0225625 \cdot X \cdot Y \cdot 7$$

Từ phương trình hồi quy, tính đạo hàm theo từng biến số:

$$H(X') = -1,095556X - 0,0295415Y + 4,966738;$$

$$H(Y') = -0,0295415X - 0,0207556Y + 0,6133194.$$

Giải hệ phương trình $H(X') = 0$ và $H(Y') = 0$, xác định được $X = 3,88$; $Y = 24,01$.

Thay các giá trị $X = 3,88$; $Y = 24,01$; $Z = 7$ vào phương trình H ban đầu xác định được $H = 8,44$.

Như vậy, độ cồn tối đa có thể đạt được vào khoảng 8,44% v/v khi lên men rượu cà na với dòng nấm men R2B, dịch lên men có pH = 3,88, °Brix = 24,01 và mật số nấm men là 10^7 TB/mL.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian lên men

Từ kết quả thí nghiệm được trình bày ở phần 3.1 “Ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật số nấm men đến quá trình lên men rượu cà na” của chủng nấm men R2B, sử dụng các thông số tối ưu gồm pH = 3,38, Brix = 24,01, mật số nấm men là 10^7 TB/mL, thực hiện khảo sát thời gian lên men tối ưu trong 6 ngày, 8 ngày, 10 ngày, 12 ngày và 14 ngày. Kết quả pH, độ Brix và độ cồn sau lên men được ghi nhận ở Bảng 3.

Bảng 3. Giá trị pH, độ Brix, độ cồn trung bình và thời gian sau lên men của dòng nấm men R2B

Thời gian (ngày)	pH sau lên men	°Brix sau lên men	Độ cồn (% v/v)
6	3,22	13,67 ^A	6,05 ^a
8	3,22	13,33 ^A	7,09 ^b
10	3,23	11,67 ^A	8,98 ^c
12	3,23	11,33 ^B	9,04 ^c
14	3,34	11,67 ^B	8,92 ^c

Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$) theo kiểm định LSD.

Kết quả cho thấy pH và độ Brix sau lên men giảm và có sự tạo thành rượu vì nấm men đã sử dụng đường trong dịch quả cà na và lượng đường bổ sung chuyển hóa thành rượu, đồng thời sinh ra một số acid hữu cơ làm giảm pH của môi trường. Khi lên men ở thời gian 6 ngày và 8 ngày, độ cồn thấp hơn so với lên men ở thời gian 10, 12, 14 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Thời gian lên men thích hợp nhất là 12 ngày (độ rượu đạt giá trị cao nhất 9,04% v/v), khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với thời gian lên men 14 ngày nhưng tiết kiệm được thời gian và chi phí khi đưa vào sản xuất. Theo Tahir và cs. (2010), việc kéo dài thời gian lên men sẽ làm ảnh hưởng đến tiến độ, tổn chi phí, thời gian và làm giảm hiệu suất lên men do sự cạnh tranh chất dinh dưỡng của nấm men.

3.5. Kết quả phân tích các chỉ tiêu hóa học của sản phẩm rượu cà na

Sản phẩm lên men rượu cà na được phân tích các chỉ tiêu hóa học theo TCVN 7045:2009. Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 4 cho thấy sản phẩm lên men rượu cà na đạt các yêu cầu của một sản phẩm rượu vang lên men.

Bảng 4. Kết quả phân tích các chỉ tiêu sản phẩm rượu cà na theo TCVN 7045:2009

Chỉ tiêu	Kết quả rượu cà na	Tiêu chuẩn TCVN 7045:2009
Đường khử	83700 mg/L	Nhà sản xuất công bố
SO ₂	19,5 mg/L	< 350 mg/L
Acid acetic	0,011%	Nhà sản xuất công bố
Aldehyde	1936,9 mg/L	Nhà sản xuất công bố (TCVN 7045:2013)
Ester	150 mg/L	Nhà sản xuất công bố
Methanol	Không phát hiện MDL=0,5	0,05 mg/L

Ghi chú: Kết quả phân tích từ Sở Khoa Học Và Công Nghệ Tp.HCM chi nhánh Cần Thơ – Trung Tâm Dịch Vụ Phân Tích Thí Nghiệm Tp.HCM

Kết quả phân tích ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng ethanol tạo thành khá cao (11,29% v/v) giúp cho hương vị của rượu thêm phần đậm đà. Ngoài ra, do thời gian lên men kéo dài đã tạo điều kiện cho nấm men sử dụng gần hết lượng đường để lên men nên hàm lượng đường còn lại trong sản phẩm khá thấp (83.700 mg/L), tăng hiệu suất cho quá trình lên men (Lương Đức Phẩm, 2006). Hàm lượng ester sinh ra khá cao (150 mg/L). Các ester này được tạo thành trong quá trình lên men do enzyme esterase và có vai trò quan trọng trong hình

thành hương vị rượu vang (Lương Đức Phẩm, 2006). Kết quả cũng cho thấy hàm lượng acid acetic bay hơi của rượu cà na sau khi lên men thấp (0,011% v/v) vì con đường hình thành ethanol chiếm ưu thế hơn con đường hình thành acid. Hàm lượng aldehyde tạo ra trong sản phẩm đạt 1.936,9 mg/L và không phát hiện methanol trong sản phẩm. Kết quả phân tích các chỉ tiêu sản phẩm rượu cà na đạt TCVN quy định.

3.6. Đánh giá cảm quan sản phẩm lên men

Bên cạnh những chỉ tiêu về hóa học, rượu cà na cũng cần phải đạt yêu cầu về đánh giá cảm quan theo TCVN 3217-79 (Thang điểm từ 1 - 5). Hội đồng đánh giá cảm quan phải có khả năng đánh giá khách quan, có kiến thức chuyên môn và có kinh nghiệm cảm quan. Kết quả đánh giá cảm quan được thể hiện ở Bảng 5. Kết quả cho thấy rượu cà na trong suốt, có màu, mùi và vị đặc trưng cho sản phẩm.

Bảng 5. Kết quả đánh giá cảm quan rượu cà na

Chi tiêu	Kết quả đánh giá cảm quan rượu cà na		Yêu cầu rượu vang (TCVN 3217-79)
	Điểm trung bình	Nhận xét	
Độ trong và màu sắc	4,8	Chất lỏng trong suốt, không vẩn đục và vật thể lạ. Màu hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.	Chất lỏng trong suốt, không vẩn đục và vật thể lạ. Màu hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
Mùi	4,6	Hòa hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.	Hòa hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
Vị	4,3	Hòa hợp, êm dịu, hậu tốt, đặc trưng cho sản phẩm.	Hòa hợp, êm dịu, hậu tốt, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
Yêu thích đối với mẫu thử	4,5	Rất thích.	Rất thích.

So với sản phẩm rượu vang mít lá bàng của Nguyễn Phú Hôn (2017) (độ trong và màu sắc - 4,4/5; mùi - 4,2/5; vị - 4,0/5 và ý thích - 4,1/5) thì sản phẩm rượu cà na trong nghiên cứu cho kết quả đánh giá cảm quan tốt hơn về tất cả các chỉ tiêu. Ngoài ra, kết quả đánh giá cảm quan này tương đồng với kết quả đánh giá cảm quan với rượu vang khóm của Nguyễn Văn Thành và cs (2013) về độ trong và màu sắc (4,5/5) và mùi (4,0/5). Tuy nhiên vị của rượu vang cà na (4,5/5) được đánh giá cao hơn vị của rượu vang khóm (2,7/5) vì theo Lương Đức Phẩm (2006), hương vị của khóm sẽ bị giảm đáng kể sau quá trình lên men.

4. KẾT LUẬN

Dòng nấm men R2B (được định danh là *Lachancea fermentati*) phân lập từ quả cà na được sử dụng hiệu quả tốt nhất cho quá trình lên men rượu cà na ở quy mô phòng thí nghiệm. Kết quả đạt được về các thông số cho điều kiện lên men tối ưu là: pH = 3,88; Brix = 24,01; mật số nấm men là 10^7 TB/mL; với thời gian lên men rượu thích hợp là 12 ngày. Sản phẩm rượu cà na sau khi lên men với điều kiện tối ưu có độ cồn cao (11,29% v/v), các chỉ tiêu kiểm tra đều đạt TCVN quy định về sản phẩm rượu vang (TCVN 7045:2009) và có giá trị cảm quan tốt. Bên cạnh đó, những kết quả khả quan này có tiềm năng ứng dụng rất cao vào quy trình sản xuất bioethanol cho những nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Lương Đức Phẩm. (2006). *Nấm men công nghiệp*. Hà Nội: NXB khoa học và Kỹ thuật.

Nguyễn Đức Lượng. (2006). *Thí nghiệm công nghệ sinh học* (Vol. Tập 2). NXB Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh.

- Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành, & Phạm Thị Ngọc Ánh. (2013). Phân lập và tuyển chọn nấm men từ sim rừng ở Phú Quốc (Kiên Giang) và Măng Đen (Kon Tum). *Kỷ yếu Hội thảo Công nghệ sinh học vùng Đồng bằng sông Cửu Long 2013*, 1, pp. 47-53.
- Nguyễn Phú Hôn. (2017). Phân Lập và tuyển chọn nấm men lên men rượu vang mít lá bàng tại tỉnh An Giang (*Artocarpus heterophyllus*). *Đề tài luận văn Thạc sĩ khoa học, chuyên ngành Công nghệ Sinh học*. Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Minh Thủy, Trần Thị Quế, & Nguyễn Thị Mỹ Tuyền. (2013). Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang khóm. *Tạp chí khoa học – trường Đại học Cần Thơ*, 25, 27-35.
- Võ Văn Chi. (2003). *Từ điển thực vật thông dụng* (Vol. 1). NXB khoa học và Kỹ thuật.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (1998). *The Yeast: A Taxonomic study*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Larpen J. P. (1991). *Biotechnologie des levures*. Masson éditeur.
- Tahir, A., M. Aftab, & T. Farasat. (2010). Effect of cultural conditions on athanol production by locally isolated *Sacharomyces cerevisiae* bio-07. *Journal of Applied Pharmaceutical*, 3(2).

ISOLATION, SELECTION OF YEASTS AND DETERMINATION OF FACTORS AFFECTING *CANARIUM ALBUM* WINE FERMENTATION

Huynh Ngoc Thanh Tam, Nguyen Thi Niem,
Nguyen Thi Minh Tram, Nguyen Duc Do

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

Contact email: hnttam@ctu.edu.vn

ABSTRACT

Canarium album is a popular plant in tropical countries of South Asia and Africa, including Vietnam. Apart from contributing to the diversity of fermented fruit products, the producing products from *Canarium album* could increase the commercial value of this plant. The objective of this study is to isolate and select healthy yeast strains, study the suitable conditions to make wine from *Canarium album* fermentation. Fifty yeast strains isolated from the samples were divided into 6 groups, basing on the shape of cell and biochemical characteristics. The isolation shows that the yeast strain R2B (identified by sequencing as *Lachancea fermentati*) has the strong fermented activity, offering high volume of alcohol. Next, the study about *Canarium album* wine processing from the yeast strain R2B was conducted basing on various factors, consisting of pH value, Brix, yeast cell density and fermentation time. The findings illustrate that the canarium album wine processing by employing the yeast strain R2B could provide wine products, reaching a high volume of alcohol (11,29% v/v) and matching the the Vietnam standard 7045:2009, in the suitable conditions including the yeast levels of 10^7 cells/ml, the added saccharose concentration at 24.01°Brix, pH = 3.88 and the fermentation time for 12 days, at 30°C.

Key words: *Canarium album*, *Canarium album* wine, fermentation, yeast

Received: 18th April 2018

Reviewed: 20th May 2018

Accepted: 30th May 2018