

SẢN XUẤT RƯỢU VANG HUYẾT RỒNG SỬ DỤNG NẤM MỐC VÀ NẤM MEN THUẦN

Ngô Thị Phương Dung¹

ABSTRACT

*As defined inoculation starters for production of Huyet Rong rice wine, mould starter was prepared from *Amylomyces rouxii* at the level of 10^8 spores/g starter and yeast starter was made from *Saccharomyces cerevisiae* at the level of 10^9 cells/g starter. The level of mould inoculation at 1,5%(w/w) with 3 days of mould incubation and the level of yeast inoculation at 0,3%(w/w) with 5 days of yeast incubation were found as favourable conditions for the manufacture of Huyet Rong rice wine. The glucose content produced during the saccharification process could reach at 23%(w/v) and the yield of alcoholic fermentation was found at 85%. The results indicated that defined starters can be applied for controlled rice wine production from different agricultural starchy ingredients.*

Keywords: *Huyet Rong rice, wine, *Amylomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae**

Title: *Production of Huyet Rong wine using defined mould and yeast starters*

TÓM TẮT

*Như là nguồn giống chủng thuần sử dụng cho quá trình lên men rượu vang Huyết Rồng, bột mốc được sản xuất từ *Amylomyces rouxii* đạt 10^8 bào tử/g bột mốc và bột men được sản xuất từ *Saccharomyces cerevisiae* đạt 10^9 tế bào/g bột men. Tỷ lệ bột mốc 1,5%(w/w) với 3 ngày ủ mốc và tỷ lệ bột men 0,3%(w/w) với 5 ngày ủ lên men là điều kiện thích hợp cho sản xuất rượu vang Huyết Rồng. Hàm lượng glucoz được tạo ra trong quá trình đường hóa đạt đến 23%(w/v) và hiệu suất lên men rượu đạt 85%. Kết quả cho thấy men giống thuần có thể được ứng dụng trong sản xuất rượu lên men từ các nguồn nông sản khác nhau.*

Từ khóa: *gạo Huyết Rồng, rượu, *Amylomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae**

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo vùng đồng bằng sông Cửu Long rất đa dạng và phong phú về chủng loại cũng như nguồn gốc xuất xứ. Giống lúa đỏ - dân gian gọi là Huyết rồng thường được trồng ở vùng nước ngập sâu hàng năm như vùng tứ giác Long Xuyên và Đồng Tháp Mười. Để duy trì và phục tráng giống lúa đặc biệt này, vấn đề mở rộng đầu ra và nâng cao giá trị sử dụng cho hạt gạo Huyết Rồng như sản phẩm rượu vang Huyết Rồng đang được quan tâm. Những loại rượu cổ truyền là thức uống có cồn nổi tiếng từ lâu đời và đặc biệt được ưa thích. Tuy nhiên, năng suất làm ra không được ổn định và chất lượng sản phẩm rượu vẫn chưa đạt tiêu chuẩn chất lượng về hóa lý, vi sinh và an toàn thực phẩm. Chính vì thế mà sản phẩm rượu truyền thống vốn nổi tiếng từ rất lâu đời nhưng vẫn không thể mở rộng được để phục vụ rộng rãi hơn nữa cho người tiêu dùng.

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học

Nhiều nghiên cứu khoa học đã xác định hệ vi sinh vật trong men làm rượu, đặc biệt là nấm mốc và nấm men (Nwosu and Ojimekwe, 1993; Nout, and Aidoo, 2002; Nguyễn Đức Lượng, 2004), là một trong những yếu tố chủ yếu có vai trò rất quan trọng trong quá trình lên men rượu và ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng sản phẩm cuối cùng. Việc sử dụng nguồn giống vi sinh vật thuần chủng có hoạt tính cao và có tính ổn định là rất cần thiết và mang lại nhiều thuận lợi (Siebenhandl *et al.*, 2001; Holzappel, 2002). Đề tài này nghiên cứu sử dụng nấm mốc *Amylomyces rouxii* và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đã được phân lập và tuyển chọn do có hoạt tính cao trong quá trình đường hóa và rượu hóa (Dung *et al.*, 2005; Dung *et al.*, 2006) để thử nghiệm khả năng sản xuất rượu vang từ gạo huyết rồng.

Nội dung nghiên cứu bao gồm: sản xuất và xác định hoạt tính đường hóa của bột mốc thuần, sản xuất và xác định khả năng lên men rượu của bột men thuần, khảo sát tỉ lệ sử dụng bột mốc và bột men trong quá trình lên men rượu, xác định thời điểm thích hợp để chủng bột mốc và bột men.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Sản xuất bột nấm mốc *Amylomyces rouxii*

Chuẩn bị giống chủng: *Amylomyces rouxii* (20.3, CBS 111757; LU2043) (Dung *et al.*, 2007) được nuôi cấy trên môi trường MEA trong đĩa petri sau 5 ngày nuôi ủ ở 30°C. Chuẩn bị giống chủng bằng nước muối sinh lý 0,85% và Tween 80, lấy khuẩn ty nấm mốc và hút dịch chứa bào tử nấm từ các đĩa petri chuẩn bị cho vào bọc môi trường.

Sản xuất bột nấm mốc: dựa theo qui trình của Hoàng Vĩ Tài, 2006, nấm mốc được nuôi trong bọc nylon có xom lỗ trên cơ chất bấp mảnh. Trấu nhỏ được bổ sung vào với tỷ lệ 20% khối lượng cơ chất. Thành phần khoáng bổ sung dựa trên tổng khối lượng cơ chất và trấu: (NH₄)₂SO₄ 0,2%; KH₂PO₄ 0,1%; MgSO₄ 0,05%; CaSO₄ 0,02%. Điều chỉnh độ ẩm của môi trường là 50% tổng khối lượng cơ chất và trấu. Môi trường sau khi tiệt trùng được làm nguội đến 30 - 40°C và chủng vào mỗi bọc 2 đĩa petri nấm mốc đã được chuẩn bị. Trộn đều, đập bằng nút gòn và ủ ở 30°C trong 7 ngày. Sấy khô khối mốc ở 45°C. Sau cùng, khối mốc được xay nhỏ thành bột và trữ ở nhiệt độ phòng trong bọc PP, ép miệng với khối lượng mỗi bọc là 50g.

Thử hoạt tính đường hóa của bột mốc thuần sản xuất từ *Amylomyces rouxii*: cân 50g gạo huyết rồng cho vào bình tam giác, thêm vào 70ml nước cất, ngâm bốn giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi ngâm được hấp ở 100°C trong 1 giờ. Gạo đã hồ hóa được làm nguội đến 30 - 40°C. Sau đó chủng 1g bột mốc, trộn đều, ủ ở 30°C trong 3 ngày và phân tích các chỉ tiêu.

2.2 Xác định hàm lượng bột nấm mốc sử dụng cho quá trình đường hóa

Thí nghiệm có 3 mức độ và 3 lần lặp lại: A1 = 1%; A2 = 1,5%; A3 = 2%, trộn đều, ủ ở 30°C trong 3 ngày và phân tích các chỉ tiêu.

2.3 Sản xuất bột nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Chuẩn bị giống chủng: Saccharomyces cerevisiae (2.1, LU1250) (Dung *et al.*, 2007) được nuôi trong môi trường khoai tây - glucoz (PG) trong bình tam giác loại 250ml trên máy lắc trong 16 giờ.

Sản xuất bột nấm men: Sử dụng môi trường PG để nuôi sinh khối nấm men trong bình 20 lít có cánh khuấy. Tỷ lệ giống chủng là 1% so với thể tích của môi trường nuôi cấy. Bình môi trường sau khi chủng giống được khuấy trên máy khuấy trong 16 giờ. Sinh khối nấm men được thu hoạch bằng cách ly tâm 7000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, trộn với bột gạo. Tỷ lệ phối trộn giữa sinh khối nấm men và bột gạo là 1 : 1,5 theo khối lượng. Sấy khô ở 45°C. Men khô sau khi sấy được xay nhỏ thành bột và trữ ở nhiệt độ phòng trong bọc PP, ép miệng với khối lượng mỗi bọc là 50g.

Hoạt tính của bột nấm men được xác định như sau: Dịch đường hóa sau khi thu hoạch từ quá trình thử hoạt tính bột mốc được pha loãng đến 20°Brix, trong mỗi bình tam giác cho vào 100ml dịch đường hóa đã được pha loãng, tiệt trùng ở 115°C trong 10 phút, làm nguội đến 30 - 40°C rồi chủng 0,1% (w/v) bột men cần xác định hoạt tính vào mỗi bình, gắn waterlock và ủ ở 30°C trong 5 ngày. Phân tích các chỉ tiêu.

2.4 Xác định hàm lượng bột nấm men sử dụng cho quá trình lên men rượu

Chuẩn bị dịch đường hoá ở 20°Brix. Thí nghiệm có 3 mức độ và 3 lần lặp lại: B1 = 0,1%; B2 = 0,3%; B3 = 0,5%. Sau khi chủng giống, nút gòn được thay bằng waterlock và ủ ở 30°C trong 5 ngày. Phân tích các chỉ tiêu.

2.5 Xác định tỉ lệ sử dụng bột nấm mốc và bột nấm men trong quá trình lên men rượu vang Huyết rồng

Thí nghiệm có 2 nhân tố ở 3 mức độ và 3 lần lặp lại: Các tỉ lệ bột mốc: A1 = 1%; A2 = 1,5%; A3 = 2% và các tỉ lệ bột men: B1 = 0,1%; B2 = 0,3%; B3 = 0,5%. Bột mốc được chủng vào, trộn đều và ủ 3 ngày ở 30°C, sau đó chan 70ml nước vô trùng vào khối mốc, thực hiện chủng bột men, thay nút gòn bằng waterlock và ủ 5 ngày ở 30°C. Phân tích các chỉ tiêu.

2.6 Khảo sát thời điểm thích hợp để chủng bột nấm mốc và bột nấm men

Sau khi xác định tỉ lệ thích hợp ở thí nghiệm 2.5, tiến hành chủng giống theo hai cách: (1) chủng bột nấm mốc, trộn đều và ủ 3 ngày ở 30°C, sau đó chan 70ml nước vô trùng vào khối mốc, rồi chủng bột nấm men, thay nút gòn bằng waterlock và ủ 5 ngày ở 30°C; (2) chủng bột nấm mốc và bột nấm men cùng lúc, ủ trong 3 ngày ở 30°C, sau đó chan 70ml nước vô trùng vào, thay nút gòn bằng waterlock và ủ 5 ngày ở 30°C.

2.7 Phương pháp phân tích

Xác định hoạt tính đường hóa của nấm mốc và khả năng lên men rượu của nấm men: theo dõi phát triển của khuẩn ty và dịch đường, đo pH, xác định glucoz bằng kit thử glucoz oxidaz, đo thể tích dịch rỉ, sự sinh gas (đếm bọt khí trong waterlock), xác định độ cồn bằng phương pháp chưng cất. Xác định mật số vi sinh vật bằng phương pháp dùng hộp đếm hồng cầu dưới kính hiển vi. Xác định độ ẩm

của bột giống thuần bằng phương pháp sấy. Phân tích thống kê bằng chương trình StatGraphics Plus Version 5, Manugistics, Inc., Rockville, USA.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sản xuất bột nấm mốc từ nấm mốc *Amylomyces rouxii*

Nấm mốc được nuôi trong bọc nylon có xom lỗ nhằm mục đích tạo độ thoáng khí cho nấm mốc sinh trưởng trong quá trình ủ. Sau 1 ngày ủ mốc, khuẩn ty đã phát triển thành đốm trắng trong cơ chất. Hơi nước trong bọc ít, nhiệt độ không cao. Điều này chứng tỏ độ thông thoáng khi nuôi mốc trong các bọc khá tốt do đã được xom lỗ. Vì vậy, O₂ cần cho sự sinh trưởng của nấm mốc đã được cung cấp một cách thuận lợi. Nấm mốc phát triển và sự lan rộng của chúng trên môi trường bấp mảnh được ghi nhận một cách rõ rệt vào ngày thứ hai. Ngày thứ ba và thứ tư, khuẩn ty phát triển mạnh lan tỏa khắp trên bề mặt và cả bên trong khối môi trường khiến cơ chất của môi trường không còn rời rạc mà được kết dính lại thành một khối. Khuẩn ty tiếp tục sinh trưởng thuận lợi, sinh nhiều bào tử trong những ngày năm, sáu, bảy. Sau 7 ngày ủ, bột mốc được thu hoạch, sấy khô ở 45°C đến khối lượng không đổi sau 8 giờ. Sau cùng, khối mốc được xay nhỏ thành bột và trữ trong bọc PP ép miệng ở nhiệt độ môi trường xung quanh. Kết quả thử khả năng đường hóa của bột nấm mốc trong Bảng 1 cho thấy sự xuất hiện của dịch đường tăng dần theo thời gian trong quá trình ủ mốc. Dịch đường sinh ra nhiều và rất sánh. Độ Brix của dịch đường tương đối cao và hàm lượng glucoz đạt đến 22,31% (w/v) cho thấy khả năng đường hóa cao của nấm mốc *A. rouxii*. Với kết quả như trên, chất lượng bột nấm mốc này được xác định là đạt yêu cầu để sử dụng làm nguồn giống chủng.

Bảng 1: Khả năng đường hóa của bột mốc *Amylomyces rouxii*

Độ ẩm (%) w/w)	Mật số bào tử nấm mốc (bt/g bột mốc)	pH	Sự xuất hiện khuẩn ty			Sự xuất hiện dịch đường			Độ Brix	Hàm lượng glucoz (% w/v)	Thể tích dịch đườn g (ml)
			Sau ủ mốc	1 ngày	2 ngày	3 ngày	1 ngày	2 ngày			
6,75 ¹	1,04x10 ⁸	5,95	++ ²	+	+	- ³	+	++	27,3 3	22,31	37,79

¹ Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

² Mức độ xuất hiện của khuẩn ty và dịch rỉ tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

³ Không xuất hiện

3.2 Xác định tỉ lệ bột nấm mốc sử dụng cho quá trình đường hóa

Kết quả phân tích khả năng đường hóa của bột nấm mốc ở các tỉ lệ sử dụng khác nhau được trình bày trong Bảng 2. Kết quả thống kê cho thấy sự khác biệt về hoạt tính bột nấm mốc ở 3 tỉ lệ dựa trên thể tích dịch đường và hàm lượng glucoz sinh ra trong dịch đường sau giai đoạn ủ mốc có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Thể tích dịch đường và hàm lượng glucoz sinh ra trong dịch đường từ khối gạo hấp được chủng với tỉ lệ bột nấm mốc 1% là thấp nhất, có sự khác biệt về thống kê so với 2 nghiệm thức còn lại. Trong 2 tỉ lệ bột nấm mốc còn lại thì pH giảm xuống còn 5,95. Giá trị pH là một trong những chỉ tiêu đánh giá sự thành công của quá trình ủ

mốc vì nếu bị tạp nhiễm bởi các vi khuẩn (thường là vi khuẩn gây chua) thì giá trị pH thường giảm thấp có thể đến 3,0. So sánh giữa 2 nghiệm thức A2 và A3 thì nghiệm thức A2 với 1,5% bột nấm mốc có hoạt tính cao với hàm lượng glucoz sinh ra là 22,17% (w/v) trong khi thể tích dịch đường và hàm lượng glucoz sinh ra ở nghiệm thức A3 là khác biệt không ý nghĩa. Tóm lại, tỉ lệ 1,5% là hàm lượng bột mốc sử dụng phù hợp cho mục đích thu dịch đường từ gạo Huyết rồng.

Bảng 2: Khả năng đường hóa của bột mốc ở các tỉ lệ khác nhau

Tỉ lệ bột mốc %	pH		Sự xuất hiện khuẩn ty			Sự xuất hiện dịch rỉ			Độ Brix	Hàm lượng glucoz (%w/v)	Thể tích dịch rỉ (ml)
	Gạo sau ngâm	Sau ủ mốc	1 ngày	2 ngày	3 ngày	1 ngày	2 ngày	3 ngày			
1	6,06 ¹	6,22	++ ²	+	+	- ³	+	++	26,93 ^{b4}	17,06 ^b	34,00 ^b
1,5	6,06	5,97	++	+	+	-	+	++	27,27 ^a	22,17 ^a	37,00 ^a
2	6,05	5,95	++	+	+	-	+	++	27,33 ^a	22,31 ^a	37,79 ^a

¹ Giá trị trung bình của ba lần lặp lại.

² Mức độ xuất hiện của khuẩn ty và dịch rỉ tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

³ Không xuất hiện.

⁴ Các giá trị có các mẫu tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.3 Sản xuất bột nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Kết quả xác định khả năng lên men rượu của bột men được trình bày trong Bảng 3. Hàm lượng glucoz trong dịch đường hóa là 18,96% (w/v), sau 5 ngày lên men lượng glucoz trong dịch lên men vẫn còn 3,22% (w/v) nghĩa là nấm men chỉ sử dụng 15,74% (w/v) và lượng bột khí vẫn còn sinh ra liên tục chứng tỏ quá trình lên men vẫn chưa kết thúc. Như vậy, với kết quả trên hiệu suất sử dụng glucoz để lên men rượu của nấm men sau 5 ngày là 83% và độ còn đạt được 11,07% (v/v) là rất cao. Điều này chứng tỏ hoạt tính của nấm men cao và chất lượng bột nấm men này được xác định là đạt yêu cầu để sử dụng làm nguồn giống chủng.

Bảng 3: Khả năng lên men rượu của bột nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Độ ẩm (%W/W)	Mật số tế bào nấm men (TB/10 ⁶ ML)	PH		Bột khí/2 phút (ngày)					ĐỘ BRIX		Hàm lượng glucoz (%W/W)		Độ còn ở 20°C (%V/V)
		Trước lên men	Sau lên men	1	2	3	4	5	Trước lên men	Sau lên men	Trước lên men	Sau lên men	
4,95*	6,1x10 ⁶	5,22	4,77	0	9	9	4	3	20	11,33	18,96	3,22	11,07

* Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại

3.4 Xác định tỉ lệ bột nấm men sử dụng cho quá trình lên men rượu

Bảng 4 thể hiện kết quả khả năng lên men rượu của bột nấm men ở các tỉ lệ sử dụng khác nhau. Kết quả thống kê cho thấy sự khác biệt có độ tin cậy 95% về hoạt tính bột men ở ba tỉ lệ dựa trên độ còn sinh ra qui về 20°C, hàm lượng glucoz còn lại trong dịch sau lên men và hiệu suất là có ý nghĩa. Độ còn và hàm lượng glucoz còn lại trong dịch lên men khi được chủng với tỉ lệ bột men 0,1% có sự khác biệt và thấp nhất so với 2 nghiệm thức còn lại. So sánh giữa 2 nghiệm thức B2 và B3

thì nghiệm thức B2 với 0,3% bột men có hoạt tính cao với độ cồn đạt được là 12,19% (v/v) và hàm lượng glucoz còn lại là 1,68% (w/v) trong khi độ cồn và hàm lượng glucoz đo được trong dịch sau lên men ở nghiệm thức B3 là khác biệt không ý nghĩa. Quá trình lên men vẫn còn đang tiếp diễn, điều này chứng tỏ hoạt tính của nấm men cao. Vì vậy, 0,3% là hàm lượng bột men thích hợp sử dụng lên men rượu khi có dịch đường của gạo Huyết rồng.

Bảng 4: Khả năng lên men rượu của bột men ở các tỉ lệ khác nhau

Tỉ lệ bột men %	PH		PH					Bọt khí/2 phút (ngày)		ĐỘ BRIX		Hàm lượng glucoz (%W/W)
	Trước lên men	Sau lên men	1	2	3	4	5	Trước lên men	Sau lên men	Trước lên men	Sau lên men	
	0,1	5,22 ¹	4,77	0	9	9	4	3	20	11,33 ^{a2}	18,96	
0,3	5,22	4,55	0	12	7	3	1	20	9,87 ^b	18,96	1,68 ^b	12,19 ^a
0,5	5,22	4,52	0	12	7	3	1	20	9,67 ^b	18,96	1,23 ^b	12,27 ^a

¹ Giá trị trung bình của ba lần lặp lại.

² Các giá trị có các mẫu tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

3.5 Khảo sát tỉ lệ sử dụng bột nấm mốc và bột nấm men trong quá trình lên men rượu vang Huyết rồng

Kết quả phân tích quá trình đường hóa và rượu hóa ở các nghiệm thức sử dụng các tỉ lệ bột mốc và bột men khác nhau được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5: Khảo sát tỉ lệ sử dụng bột mốc và bột men trong quá trình lên men rượu

Tỉ lệ bột mốc %	Tỉ lệ bột men %	PH		xuất hiện dịch đường sau ủ mốc (ngày)				bọt khí/2 phút trong khi ủ men (ngày)				độ brix		hàm lượng glucoz (%w/w)		độ cồn ở 20°C (%v/v)
		gạo sau ngâm	rượu sau lên men	1	2	3	4	5	6	7	8	sau ủ mốc	sau ủ men	sau ủ mốc	sau ủ men	
1	0,1	6,05 ¹	5,10	- ²	+ ³	++	0	1	10	10	2	25,40	10,2	18,20 ^{b4}	1,42 ^b	12,35 ^b
1	0,3	6,09	4,92	-	+	++	0	1	15	11	6	26,13	9,33	18,16 ^b	1,72 ^b	12,19 ^c
1	0,5	6,07	4,94	-	+	++	0	1	17	14	5	26,13	8,53	18,17 ^b	2,69 ^a	12,19 ^c
1,5	0,1	6,05	4,84	-	+	++	0	1	16	15	10	26,20	9,00	22,25 ^a	2,47 ^a	12,27 ^{bc}
1,5	0,3	6,06	4,93	-	+	++	0	1	21	18	5	26,33	8,47	22,99 ^a	0,83 ^d	13,06 ^a
1,5	0,5	6,06	4,98	-	+	++	0	3	21	17	3	26,33	8,13	23,04 ^a	0,12 ^d	13,06 ^a
2	0,1	6,08	5,05	-	+	++	0	2	21	12	1	26,80	7,87	22,26 ^a	0,02 ^d	12,98 ^a
2	0,3	6,07	5,09	-	+	++	0	6	21	5	0	26,80	7,87	22,49 ^a	0,01 ^d	13,06 ^a
2	0,5	6,08	5,17	-	+	++	0	5	20	6	0	26,20	7,87	23,04 ^a	0,01 ^d	13,06 ^a

¹ Giá trị trung bình của ba lần lặp lại.

² Không xuất hiện.

³ Mức độ xuất hiện của dịch ri tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

⁴ Các giá trị có các mẫu tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Dựa vào kết quả hàm lượng glucoz được tạo ra sau thời gian 3 ngày ủ mốc, cho thấy các nghiệm thức sử dụng 1% bột mốc đều cho hàm lượng glucoz thấp nhất có ý nghĩa, trong khi đó hàm lượng glucoz đạt được ở tỉ lệ 1,5% và 2% là khác biệt

không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này phù hợp với phần khảo sát trước trong thí nghiệm sản xuất bột mốc. Kết quả hàm lượng glucoz sau lên men cho thấy các nghiệm thức sử dụng 2% bột mốc với 3 tỉ lệ bột men khác nhau thì đường hầu như đã được chuyển hóa hết thành rượu, quá trình lên men gần như kết thúc sau 4 ngày. Sau 5 ngày lên men, hàm lượng glucoz ở các nghiệm thức 1% và 1,5% bột mốc vẫn còn, bọt khí CO₂ sinh ra tiếp tục chứng tỏ quá trình lên men vẫn chưa kết thúc. Ở các nghiệm thức này, khi chủng tỉ lệ bột men 0,1% và 0,3%, hàm lượng nấm men không quá cao, tốc độ lên men không quá mạnh nên ở giai đoạn đầu lên men, hoạt tính của enzyme amylase vẫn còn được duy trì, đường vẫn tiếp tục được tạo ra đến một lượng nhất định; sau thời gian đầu hoạt hóa, nấm men sử dụng dần đường được tạo ra để chuyển hóa thành rượu.

Dựa vào kết quả độ cồn sinh ra cho thấy các nghiệm thức sử dụng tỉ lệ bột mốc 1% để lên men thì cho độ cồn thấp hơn và quá trình lên men vẫn còn đang tiếp tục, trong khi các nghiệm thức sử dụng tỉ lệ bột mốc 1,5% và 2% cho được độ cồn cao (trừ nghiệm thức A2B1: 1,5% bột mốc và 0,1% bột men). Bốn nghiệm thức cho độ cồn cao nhất đạt 13,06% (v/v) là A2B2 (1,5% bột mốc và 0,3% bột men), A2B3 (1,5% bột mốc và 0,5% bột men), A3B2 (2% bột mốc và 0,3% bột men), A3B3 (2% bột mốc và 0,5% bột men). Kết quả trên cho thấy, với một mức độ sử dụng men thấp hơn nhưng vẫn đạt được độ cồn cao tương đương nên tỉ lệ chủng 1,5% bột mốc và 0,3% bột men để lên men rượu là phù hợp nhất.

3.6 Khảo sát thời điểm thích hợp để chủng bột nấm mốc và bột nấm men

Trong quá trình lên men rượu, hai loại vi sinh vật tham gia chủ yếu là nấm mốc và nấm men có vai trò quan trọng trong việc biến đổi tinh bột thành đường và sau đó chuyển hóa thành rượu. Do đó, sự cạnh tranh hay kích thích phát triển giữa các loại vi sinh vật là có thể xảy ra. Xem xét vấn đề này, thí nghiệm khảo sát thời điểm thích hợp để chủng bột mốc và bột men thuần trên nguyên liệu gạo Huyết rồng nhằm thu được lượng rượu với hiệu suất cao nhất được tiến hành. Kết quả phân tích quá trình đường hóa và rượu hóa ở hai cách chủng giống (1) chủng bột mốc trước và sau 3 ngày ủ ở 30°C thì chủng bột men; (2) chủng bột mốc và bột men cùng lúc được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6: Khảo sát thời điểm thích hợp để chủng bột mốc và bột men

Cách chủng giống	PH		Xuất hiện dịch ri sau ủ mốc (ngày)			Bọt khí/2 phút trong khi ủ men (ngày)					Độ brix		Hàm lượng glucoz (%w/w)		Độ còn ở 20°C (%v/v)
	Gạo sau ngâm	Rượu sau lên men	1	2	3	4	5	6	7	8	sau ủ mốc	sau ủ men	sau ủ mốc	sau ủ men	
(1)	5,99 ¹	4,54	- ²	+ ³	++	0	37	12	4	1	26,13	8,07 ^{a4}	24,13 ^a	0,01 ^d	12,43 ^a
(2)	5,99	4,74	-	+	++	12	38	2	0	0	26,13	8,0 ^a	19,99 ^b	0,01 ^a	11,55 ^b

1 Giá trị trung bình của ba lần lặp lại.

2 Không xuất hiện.

3 Mức độ xuất hiện của dịch ri tăng dần từ ít (+) đến nhiều (+++).

4 Các giá trị có các mẫu tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Qua bảng phân tích cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa của các chỉ tiêu phân tích ứng với từng thời điểm chủng bột mốc và bột men thuần. Cách chủng bột mốc trước và bột men sau theo từng giai đoạn cho độ còn cao hơn đạt 12,43% (v/v)). Nấm men đã sử dụng một cách triệt để đường được tạo ra với hàm lượng glucoz cao hơn rõ rệt 24,13% (w/v) từ quá trình đường hóa cao của nấm mốc. Trong khi đó, chủng bột nấm mốc và bột nấm men thuần cùng một lúc cho độ rượu thấp hơn 11,55% (v/v). Điều đó đã cho thấy khi chủng bột mốc và bột men đồng thời, hiệu suất nấm mốc chuyển hóa tinh bột chín thành đường giảm, hàm lượng glucoz đạt được chỉ còn 19,99% (w/v). Glucoz vừa mới hình thành đã được nấm men sử dụng ngay tạo độ còn lớn hơn từ giai đoạn đầu lên men nên ức chế sự phát triển của nấm mốc và khả năng sinh enzyme đường hóa của chúng. Vì vậy, từ mối quan hệ tương hỗ ở giai đoạn đầu đã trở thành sự ức chế cho sự lên men về sau. Sau ngày thứ năm, quá trình lên men rượu hầu như kết thúc vì lượng đường cung cấp cho nấm men sử dụng chuyển hóa thành rượu đã hết. Do đó, đây chính là nguyên nhân làm cho độ còn của rượu lên men bị thấp đi.

4 KẾT LUẬN

Với bước đầu thử nghiệm sản xuất thử, đã sản xuất được bột nấm mốc từ *Amylomyces rouxii* có mật số bào tử đạt 10⁸ bào tử/g bột và sản xuất bột nấm men

từ *Saccharomyces cerevisiae* có mật số tế bào đạt 10^9 tế bào/g bột. Tỷ lệ sử dụng 1,5% bột nấm mốc và 0,3% bột nấm men là thích hợp nhất cho sản xuất rượu vang Huyết Rồng với hàm lượng cồn trong sản phẩm rượu cuối cùng đạt 13% (v/v). Sản phẩm rượu được lên men theo phương pháp chùng giống riêng biệt ở các phân đoạn ủ mốc và ủ men cho năng suất và độ cồn cao hơn so với cách chùng đồng thời bột nấm mốc và bột nấm men. Kết quả đề tài cho thấy có triển vọng trong việc ứng dụng nguồn chủng giống thuần cho sản xuất rượu vang từ gạo đặc sản Huyết Rồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2005. Development of defined mixed-culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 429-441.
- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2006. Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. *Food Microbiology* 23, 331-340.
- Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2007. Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men). *Food Science and Technology/LWT* 40, 130-135.
- Hoàng Vĩ Tài 2006. Nghiên cứu sản xuất men rượu để thuần. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học. Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ.
- Holzappel, W. H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 45, 197-212.
- Nguyễn Đức Lượng 2004. Công nghệ vi sinh vật. Tập 1. Nhà xuất bản Đại học Kỹ thuật TP. Hồ Chí Minh.
- Nout, M. J. R., and Aidoo, K. E. 2002. Asian Fungal Fermented Food. In *The Mycota. Vol. X "Industrial applications"*. Ed. H. D. Osiewacz, pp. 23-47. Berlin-Heideberg- New York: Springer-Verlag.
- Nwosu, C. D. and Ojmelukwe, P. C. 1993. Improvement of the traditional method of ogiri production and identification of the micro-organisms associated with the fermentation process. *Plant Foods for Human Nutrition* 43, 267-272.
- Siebenhandl, S., L. N., L., trimmel, D. And Berghofer, E. 2001. Studies on Tape Ketan-an Indonesian fermented rice food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52, 347-357.