

OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS IN WINE PRODUCTION FROM SOURSOP (*Annona muricata* L.) USING *Saccharomyces cerevisiae* FBY015

Huynh Xuan Phong^{1*}, Huynh Van Kiet¹, Le Tan Hung², Tran Kha Ai¹, Luu Minh Chau¹,
Nguyen Ngoc Thanh¹, Tran Hoang Hiep³, Le Tri An³, Doan Thi Kieu Tien³

¹Can Tho University

²Phuong Nam Biology Company, Ltd., Long An province

³Can Tho University of Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 19/02/2021</p> <p>Revised: 16/3/2021</p> <p>Published: 06/4/2021</p>	<p>Soursop (<i>Annona muricata</i> L.) is a fruit that tastes delicious and contains many nutrients but is easy to spoil and difficult to preserve. This study attempted to determine the optimal conditions for the soursop wine production process. Therefore, it is possible to take advantage of these raw materials to contribute to the enrichment of fruit wines in the market and to improve farmers' incomes. Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FBY015 isolated from soursop was applied to study the effects of factors on fermentation of soursop juice such as fermentation temperatures (28 - 32°C, 30°C), fermentation times of 7; 9; 11 and 13 days, Brix at 20; 23 and 26°Brix, pH at 4; 5 and 6, and yeast density of 10⁵; 10⁶ and 10⁷ cells/mL. The results showed that the ethanol content of soursop wine reached 12.46% v/v after 11 days of fermentation with the appropriate conditions including the fruit juice at 24°Brix, pH 5 and yeast density of 10⁶ cells/mL.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p><i>Annona muricata</i></p> <p>Ethanol fermentation</p> <p>Soursop</p> <p>Wine</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN LÊN MEN RƯỢU VANG MĂNG CẦU XIÊM (*Annona muricata* L.) SỬ DỤNG NẤM MEN *Saccharomyces cerevisiae* FBY015

Huỳnh Xuân Phong^{1*}, Huỳnh Văn Kiệt¹, Lê Tấn Hưng², Trần Khả Ái¹, Lưu Minh Châu¹,
Nguyễn Ngọc Thanh¹, Trần Hoàng Hiệp³, Lê Trí Ân³, Đoàn Thị Kiều Tiên³

¹Trường Đại học Cần Thơ

²Công ty TNHH Sinh học Phương Nam, tỉnh Long An

³Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 19/02/2021</p> <p>Ngày hoàn thiện: 16/3/2021</p> <p>Ngày đăng: 06/4/2021</p>	<p>Mãng cầu xiêm (<i>Annona muricata</i> L.) là một loại trái cây có hương vị thơm ngon và chứa nhiều dinh dưỡng nhưng lại rất dễ hư hỏng và khó bảo quản. Nghiên cứu này được thực hiện để xác định các điều kiện tối ưu cho quá trình sản xuất rượu vang măng cầu xiêm. Từ đó, có thể tận dụng nguồn nguyên liệu này nhằm góp phần làm phong phú các loại rượu vang trái cây trên thị trường và nâng cao thu nhập cho nông dân. Chủng nấm men <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FBY015 phân lập từ măng cầu xiêm được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của các nhân tố đến quá trình lên men dịch quả măng cầu xiêm ở nhiệt độ lên men 28 - 32°C và 30°C, thời gian lên men là 7; 9; 11 và 13 ngày, độ Brix là 20; 23 và 26°Brix, pH là 4; 5 và 6 và mật độ nấm men là 10⁵; 10⁶ và 10⁷ tế bào/mL. Kết quả cho thấy hàm lượng ethanol của rượu vang măng cầu xiêm đạt 12,46% (v/v) khi lên men 11 ngày ở các điều kiện thích hợp được xác định là dịch quả ở 24°Brix, pH 5 và mật độ nấm men đạt 10⁶ tế bào/mL.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p><i>Annona muricata</i></p> <p>Lên men rượu</p> <p>Mãng cầu xiêm</p> <p>Rượu vang</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	

* Corresponding author. Email: hxphong@ctu.edu.vn

1. Giới thiệu

Từ khoảng 5.000 năm trước, nấm men đã xuất hiện trong bánh mì, bia và rượu cũng như những mặt hàng thực phẩm và đồ uống khác. Vào đầu những năm 1900, nấm men được xem như một nhóm vi sinh vật độc đáo có vai trò chính trong sản xuất thực phẩm và đồ uống. Ngày nay, nấm men cũng đóng vai trò rất quan trọng. Trong công nghiệp, người ta quan tâm đến việc sử dụng chủng nấm men tuyển chọn có độ tin cậy về an toàn, khả năng lên men tốt, góp phần ổn định chất lượng của sản phẩm tạo ra [1]. Rượu vang là loại nước uống được lên men từ các loại trái cây, có độ cồn nhẹ và hương thơm tự nhiên, lại tốt cho sức khỏe nên rượu vang đang rất được ưa chuộng và cũng đem lại nhiều giá trị kinh tế trong ngành chế biến rượu [2].

Việt Nam là nước có khí hậu nhiệt đới gió mùa thích hợp cho việc trồng nhiều loại cây ăn quả; đặc biệt là ở khu vực Đồng bằng Sông Cửu Long, không chỉ có nguồn trái cây đa dạng mà còn có sản lượng dồi dào. Một số loại trái cây như thanh long, vú sữa, măng cầu, xoài, chuối, nhãn,... được xuất khẩu ra thị trường như Hoa Kỳ, Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc với số lượng lớn; nhưng do những loại trái cây theo mùa rất khó bảo quản nên có giá thành thấp gây nhiều bất lợi cho người nông dân. Trong đó, măng cầu xiêm là loại quả giàu dinh dưỡng, chứa nhiều chất xơ, khoáng và vitamin C, B₁ và B₂ [3] và tốt cho sức khỏe với các đặc tính có lợi như chống ung thư và chống đái tháo đường do có hàm lượng polyphenol cao [4]. Tuy nhiên, măng cầu xiêm thì dễ hư hỏng, dập nát và thời gian bảo quản sau thu hoạch ngắn [3]. Măng cầu xiêm cũng được chế biến để tạo ra các sản phẩm khác nhau nhưng vẫn giữ được giá trị dinh dưỡng và cung cấp năng lượng cho con người như mứt, trái cây sấy khô, kem, siro và sản xuất rượu vang cũng là cách giúp sử dụng hiệu quả nguồn nguyên liệu này. Do đó, nghiên cứu điều kiện lên men rượu vang măng cầu xiêm giúp đa dạng hóa sản phẩm, tạo ra sản phẩm mới bổ dưỡng, có ích đối với sức khỏe từ việc tận dụng nguồn nguyên liệu khó bảo quản, đồng thời nâng cao thu nhập cho nông dân. Hơn nữa, nghiên cứu cũng nhằm phát triển sản phẩm rượu vang đặc trưng của đồng bằng sông Cửu Long từ trái măng cầu xiêm là rượu vang măng cầu xiêm bên cạnh một số sản phẩm rượu vang trái cây đã được nghiên cứu thành công như rượu vang xoài [5], thốt nốt [6], dưa hấu [7], khóm [8],...

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

Măng cầu xiêm được thu mua tại vườn thuộc xã Thới Hưng, huyện Cờ Đỏ, thành phố Cần Thơ sử dụng làm nguyên liệu sản xuất rượu vang. Măng cầu xiêm được gọt vỏ, bóc hạt, cắt nhỏ và xay nhuyễn. Dịch măng cầu xiêm được pha loãng với nước theo tỉ lệ 1:1 [9]. Xử lý dịch quả với nồng độ enzyme pectinase 0,3% và ủ trong 1 giờ. Chủng nấm men *S. cerevisiae* FBY015 được phân lập từ măng cầu xiêm và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ [10]. Môi trường YPD (yeast extract 0,5%; peptone 0,5%; D-glucose 2,0%) và môi trường YPD agar (môi trường YPD bổ sung 1,5 g/L agar) [11], tetracyclin, agar, đường tinh khiết, đường glucose, NaHSO₃, chất điều chỉnh pH gồm Na₂CO₃, acid citric là các sản phẩm thương mại của Merck (Đức) và HiMedia (Ấn Độ).

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ lên men đến quá trình lên men rượu vang măng cầu xiêm

Mục đích nhằm khảo sát thời gian và nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men rượu vang măng cầu xiêm. Nấm men được chuẩn bị trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường YPD lỏng và ủ lactic ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ (10⁸ tế bào/mL). Điều chỉnh dịch quả về pH 4 và 25°Brix. Dịch quả được thanh trùng bằng NaHSO₃ 140 mg/L trong 2 giờ. Bổ sung 1 mL dịch nấm men vào 99 mL dịch quả trong bình tam giác, ủ ở 30°C và nhiệt độ môi trường ở 28 - 32°C. Chưng cất rượu vào các mốc thời gian sau 7; 9; 11 và 13 ngày lên men để xác định hàm lượng ethanol sinh ra.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật độ nấm men đến quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm

Mục đích nhằm khảo sát các điều kiện thích hợp cho quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm. Nấm men được chuẩn bị trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường YPD lỏng và ủ lắ ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ (10^8 tế bào/mL). Dịch quả được thanh trùng bằng NaHSO_3 140 mg/L trong 2 giờ. Bổ sung 1 mL dịch nấm men vào 99 mL dịch quả chứa trong bình tam giác đã được điều chỉnh độ Brix lần lượt là 20; 23 và 26°Brix và pH lần lượt là 4; 5 và 6 để đạt mật độ 10^5 ; 10^6 và 10^7 tế bào/mL. Ủ lên men ở nhiệt độ và thời gian đã được xác định ở mục 2.2. Khi kết thúc lên men, chưng cất rượu để xác định hàm lượng ethanol.

2.4. Xác nhận điều kiện tối ưu cho quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm

Thử nghiệm lên men được xác nhận ở 1 lít dịch quả theo các thông số ở 2.2 và 2.3. Dịch lên men được chưng cất để xác định hàm lượng ethanol bằng cồn kế ở nhiệt độ 20°C [12] và đánh giá cảm quan theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3217:79 [13].

2.5. Phân tích và xử lý kết quả

Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Hoa Kỳ). Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Hoa Kỳ).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ lên men đến quá trình lên men rượu vang

Chủng nấm men được phân lập và tuyển chọn từ quả mãng cầu xiêm *S. cerevisiae* FBY015 được sử dụng trong thí nghiệm này để khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ đến quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm. Kết quả được trình bày trong Bảng 1 cho thấy, không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê về hàm lượng ethanol sinh ra khi lên men ở nhiệt độ môi trường và 30°C. Nhiệt độ là một trong những thông số quan trọng nhất đối với quá trình lên men rượu vì nó có thể ảnh hưởng đến cả quá trình về thời gian và tốc độ lên men cũng như sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp [14]. Cũng theo Lương Đức Phẩm), hầu hết nấm men đều có thể phát triển và lên men tốt trong khoảng nhiệt độ 28 - 32°C [15]. Nhiệt độ lên men không có sự khác biệt rõ giữa các nghiệm thức, cụ thể là ở ngày thứ 7, hàm lượng ethanol ghi nhận ở nhiệt độ thường đạt 5,79% (v/v) và ở nhiệt độ 30°C đạt 5,03% (v/v). Cho đến ngày thứ 13 của quá trình lên men, hàm lượng ethanol cũng không có sự khác biệt đáng kể khi ở nhiệt độ môi trường (12,27% (v/v)) và ở nhiệt độ 30°C (12,24% (v/v)). Do đó, khi lên men ở nhiệt độ môi trường sẽ tiết kiệm được chi phí điều nhiệt và thuận lợi cho việc lên men rượu vang mãng cầu xiêm ở quy mô sản xuất thực tiễn.

Bảng 1. Hàm lượng ethanol, Brix, pH theo thời gian và nhiệt độ lên men

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (ngày)	pH	Brix	Hàm lượng ethanol (% v/v)
28 - 32	7	3,97	12,67 ^d	5,79 ^d
28 - 32	9	4,15	11,12 ^c	10,70 ^b
28 - 32	11	4,37	9,8 ^{ab}	11,62 ^{ab}
28 - 32	13	4,22	9,33 ^a	12,27 ^a
30	7	3,98	14,50 ^e	5,03 ^d
30	9	4,11	13,12 ^d	9,31 ^c
30	11	4,33	10,67 ^{bc}	10,93 ^{ab}
30	13	4,23	10,00 ^{ab}	12,24 ^a

*Ghi chú: Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% ($P < 0,05$)

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy hàm lượng ethanol sinh ra tăng lên theo các ngày lên men. Từ 5,79% đến 12,27% (v/v) ở nhiệt độ môi trường và từ 5,03% đến 12,24% (v/v) ở nhiệt độ 30°C.

Trong đó, ở ngày thứ 11 và 13 thì hàm lượng ethanol có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các ngày còn lại. Tuy nhiên giữa ngày 11 và ngày 13 thì hàm lượng ethanol khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%. Theo Tahir và cộng sự, 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 [16]. Bên cạnh đó, thời gian lên men càng nhiều, lượng este tạo ra càng thấp sẽ ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm [17]. Do đó, thời gian lên men 11 ngày sẽ được chọn nhằm tiết kiệm được thời gian và chi phí khi áp dụng trong sản xuất thực tiễn.

3.2. Ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật độ nấm men đến quá trình lên men rượu vang

Chủng nấm men *S. cerevisiae* FBY015 được sử dụng cho thử nghiệm các điều kiện lên men rượu vang mãng cầu xiêm với 3 nhân tố bao gồm Brix (20; 23 và 26), pH (4; 5 và 6) và mật độ nấm men (10^5 ; 10^6 và 10^7 tế bào/mL). Kết quả các chỉ tiêu theo dõi quá trình lên men được trình bày ở Bảng 2.

Đường là nguồn cơ chất để nấm men thực hiện quá trình lên men tạo thành rượu nên hàm lượng ethanol sinh ra cao hay thấp sẽ phụ thuộc vào hàm lượng đường sử dụng trong dịch lên men. Do đó, độ Brix ban đầu phải phù hợp để đủ cơ chất cho sự hoạt động của nấm men. Kết quả thực nghiệm cho thấy khi lên men trong cùng điều kiện pH và mật độ, như trong trường hợp của các nghiệm thức 1 (pH 4 - 20°Brix - 10^5 tế bào/mL), nghiệm thức 4 (pH 4 - 23°Brix - 10^5 tế bào/mL) và nghiệm thức 7 (pH 4 - 26°Brix - 10^5 tế bào/mL), hàm lượng ethanol đạt lần lượt là 9,75%; 9,53% và 8,03% (v/v). Điều này có thể giải thích rằng, khi hàm lượng đường thấp, nấm men sẽ bị thiếu nguồn carbon cho quá trình tăng sinh khối, dẫn đến phải cạnh tranh dinh dưỡng lẫn nhau và cuối cùng là lượng ethanol sinh ra thấp. Tuy nhiên, nếu tăng hàm lượng đường quá cao, nồng độ ethanol cũng bị giảm vì hàm lượng đường quá cao sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu, mất cân bằng trạng thái sinh lý và quá trình trao đổi chất của tế bào của nấm men [18]. Kết quả cũng tương tự ở các nghiệm thức còn lại khi thay đổi độ Brix. Có thể thấy, sau khi lên men, độ Brix của sản phẩm giảm so với độ Brix được điều chỉnh ban đầu. Điều đó đã chứng minh một lượng đường lớn đã được sử dụng trong quá trình lên men và 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 [19].

Bên cạnh nguồn đường thì mật độ nấm men cũng là yếu tố ảnh hưởng đến sự lên men. Mật độ nấm men thấp khi vào môi trường mới cần có thời gian thích nghi để phát triển đến mật độ thích hợp và thực hiện quá trình lên men. Bảng 2 cho thấy, khi lên men trong cùng điều kiện pH và độ Brix, ở các nghiệm thức có mật độ nấm men là 10^5 tế bào/mL cho hàm lượng ethanol thấp hơn so với các nghiệm thức có mật độ nấm men 10^6 và 10^7 tế bào/mL. Cụ thể là, ở nghiệm thức 7 (pH 4 - 26°Brix - 10^5 tế bào/mL), hàm lượng ethanol đạt 8,03% (v/v) so với nghiệm thức 8 (pH 4 - 26°Brix - 10^6 tế bào/mL) (9,04% v/v) và nghiệm thức 9 (pH 4 - 26°Brix - 10^7 tế bào/mL) (8,73% v/v). Tương tự ở nghiệm thức 16; 17; 18 cũng đạt hàm lượng ethanol lần lượt là 11,17%; 12,09% và 11,78% (v/v). Có thể thấy, mật độ nấm men tăng lên và nồng độ ethanol bắt đầu tăng. Tuy nhiên, thống kê giá trị trung bình của nồng độ ethanol trong 3 lần lặp lại ở mật độ nấm men 10^7 tế bào/mL lại thấp hơn ở mật độ nấm men 10^6 tế bào/mL ở hầu hết các nghiệm thức. Có thể giải thích rằng, mật độ nấm men càng cao thì tốc độ tạo ethanol càng nhanh do quá trình chuyển hóa đường thành rượu được thực hiện nhanh chóng, nhưng với lượng nấm men ban đầu quá cao cũng làm tổn thất nguồn carbon, dẫn đến hàm lượng ethanol không những không tăng mà còn giảm [16].

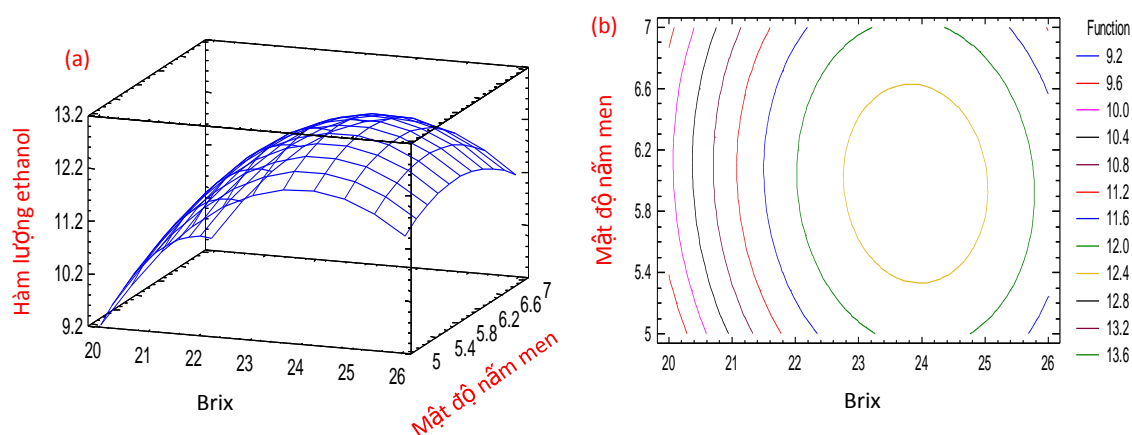
Theo Pampulha và cộng sự, pH ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của nấm men, có khả năng làm thay đổi điện tích các chất của vỏ tế bào, làm tăng hoặc giảm mức độ thẩm thấu các chất dinh dưỡng và chiều hướng lên men [20]. pH thích hợp cho nấm men hoạt động trong quá trình sản xuất rượu vang là từ 4 đến 6 và quá trình lên men ethanol diễn ra bình thường. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy giá trị pH của các nghiệm thức sau quá trình lên men đều giảm so với pH ban đầu do sự hình thành CO_2 và các loại acid hữu cơ.

Bảng 2. Khả năng lên men ethanol của *S. cerevisiae* FBY015 ở các điều kiện tối ưu hóa

Nghiem thức	pH - Brix ban đầu - Mật độ nấm men	Chỉ tiêu sau lên men		
		pH	Brix	Hàm lượng ethanol (% v/v)
1	4-20-10 ⁵	4,16	6,67	9,75 ⁱ
2	4-20-10 ⁶	4,18	6,67	9,76 ⁱ
3	4-20-10 ⁷	4,19	6,67	9,67 ⁱ
4	4-23-10 ⁵	4,60	8,00	9,53 ^{ij}
5	4-23-10 ⁶	4,50	8,67	9,75 ⁱ
6	4-23-10 ⁷	4,70	8,00	9,06 ^{jk}
7	4-26-10 ⁵	4,65	8,67	8,03 ^l
8	4-26-10 ⁶	4,37	10,00	9,04 ^{jk}
9	4-26-10 ⁷	4,39	10,00	8,73 ^k
10	5-20-10 ⁵	4,23	7,67	12,35 ^{ab}
11	5-20-10 ⁶	4,26	8,00	12,53 ^{ab}
12	5-20-10 ⁷	4,21	9,00	11,78 ^{cd}
13	5-23-10 ⁵	4,48	9,33	12,40 ^{ab}
14	5-23-10 ⁶	4,51	8,6	12,72 ^a
15	5-23-10 ⁷	4,54	9,00	11,82 ^{cd}
16	5-26-10 ⁵	4,56	9,67	11,17 ^{ef}
17	5-26-10 ⁶	4,55	8,67	12,09 ^{bc}
18	5-26-10 ⁷	4,55	9,33	11,78 ^{cd}
19	6-20-10 ⁵	4,17	11,67	11,82 ^{cd}
20	6-20-10 ⁶	4,17	12,67	12,06 ^{bc}
21	6-20-10 ⁷	4,19	12,00	11,23 ^{ef}
22	6-23-10 ⁵	4,57	15,67	11,50 ^{de}
23	6-23-10 ⁶	4,47	15,00	11,51 ^{de}
24	6-23-10 ⁷	4,59	15,33	11,07 ^{ef}
25	6-26-10 ⁵	4,70	15,33	10,56 ^{gh}
26	6-26-10 ⁶	4,67	16,00	10,80 ^{fg}
27	6-26-10 ⁷	4,58	16,00	10,25 ^h

*Ghi chú: Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% ($P < 0,05$).

Kết quả cho thấy, nghiệm thức 14 (pH 5 - 23°Brix - 10⁶ tế bào/mL) cho hàm lượng ethanol cao nhất, đạt 12,72% v/v và nghiệm thức 7 (pH 4 - 26°Brix - 10⁵ tế bào/mL) cho hàm lượng ethanol thấp nhất (8,03% v/v), khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVI được sử dụng xử lý số liệu thực nghiệm để thiết lập phương trình hồi quy qua đó xác định nghiệm thức tối ưu cho quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm sử dụng chủng nấm men *S. cerevisiae* FBY015. Đồ thị bề mặt đáp ứng và đồ thị đường mức thể hiện sự tương quan giữa độ Brix và mật độ nấm men đến hàm lượng ethanol của rượu vang mãng cầu xiêm được thể hiện ở Hình 1. Đồ thị bề mặt đáp ứng cho thấy hàm lượng ethanol tăng khi Brix tăng từ 20°Brix đến khoảng 24-25°Brix thì đạt giá trị cực đại và sau đó giảm khi Brix tiếp tục tăng đến 26°Brix (Hình 1a). Tương tự, hàm lượng ethanol cũng tăng khi mật độ tế bào nấm men tăng và đạt giá trị cực đại ở mật độ khoảng 5,8-6,2 log tế bào/mL, sau đó lại giảm khi mật độ tế bào nấm men tăng đến 7 log tế bào/mL. Kết quả cho thấy đã xác định được giá trị hàm lượng ethanol tối ưu cho quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm trong khoảng Brix (20 - 26°Brix) và mật độ nấm men (5 - 7 log tế bào/mL) theo bố trí thông qua đồ thị đường mức có tâm (Hình 1b).



Hình 1. Đồ thị mặt đáp ứng (a) và đường mức (b) thể hiện sự tác động của mật độ nấm men và độ Brix ban đầu lên khả năng sinh ethanol của *S. cerevisiae* FBY015

Số liệu của thí nghiệm được ghi nhận và phân tích bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVI thu được phương trình: $E = -99,08 + 8,26x + 3,55y - 1,37z - 0,18x^2 - 0,56y^2 - 0,41z^2 + 0,06xy + 0,12xz + 0,82yz - 0,02xyz$. Trong đó: x là độ Brix (20 - 26) và y là log mật độ nấm men (5 - 7 log tế bào/mL), z là pH (4 - 7). Từ phương trình hồi quy, lấy đạo hàm theo từng biến số x (Brix) và y (mật độ nấm men), xác định được x = 24 và y = 5,98 tương ứng 24°Brix, mật độ nấm men khoảng 10^6 tế bào/mL và pH = 5 (z) là điều kiện tối ưu, ethanol đạt 12,63% (v/v).

Như vậy, các điều kiện thích hợp cho quy trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm được xác định với dòng nấm men *S. cerevisiae* FBY015 là 24°Brix, pH 5 và mật độ nấm men là 10^6 tế bào/mL.

3.3. Xác nhận điều kiện tối ưu cho quá trình lên men rượu vang mãng cầu xiêm

Thử nghiệm được thực hiện với các thông số tối ưu được đề xuất sau khi dữ liệu thí nghiệm được phân tích bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI. Dịch quả mãng cầu xiêm được điều chỉnh để tiến hành thực nghiệm kiểm chứng theo Bảng 3. Kết quả cho thấy hàm lượng ethanol thực tế (12,46% v/v) gần bằng với hàm lượng ethanol được đề xuất bởi phần mềm (12,63% v/v). Điều kiện tối ưu khi lên men rượu vang mãng cầu xiêm được xác định 24°Brix, pH 5 và mật độ nấm men 10^6 tế bào/mL. Rượu vang tạo thành ở điều kiện tối ưu có hàm lượng ethanol đạt 12,46% v/v. Kết quả thấp hơn so với nghiên cứu của Ho và cộng sự [21] khi sử dụng kết hợp 2 loại nấm *Pleurotus pulmonarius* và *S. cerevisiae* đã tối ưu hóa bốn yếu tố pH, nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ nuôi cấy với các giá trị lần lượt là pH 4,99; 28,29 °C; 131 giờ và tỷ lệ nuôi cấy 0,42 (42:58 *P. pulmonarius mycelia* và *S. cerevisiae*) với nồng độ ethanol đạt 22,29% (v/v). Năm 2011, Thủy và cộng sự tiến hành lên men dịch thốt nốt có số lượng tế bào nấm men 10^3 CFU/mL, hàm lượng chất khô hoà tan 24°Brix và pH 4, hàm lượng ethanol thu được đạt 13,67% (v/v) sau 12 ngày lên men [22].

Bảng 3. Kết quả kiểm tra thực nghiệm được đề xuất bởi phần mềm

Chỉ tiêu	Giá trị lý thuyết đề xuất	Giá trị thực tế
Brix ban đầu (°Brix)	24	24
pH	5	5
Mật độ nấm men (tb/mL)	106	106
Hàm lượng ethanol (% v/v)	12,63	12,46

Ngoài ra, độ Brix ban đầu trong dịch mĂNG cầu được đề xuất là 24 hoàn toàn phù hợp cho sự hoạt động của nấm men. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu khảo sát quy trình lên men rượu cà na từ dòng nấm men R2B của Tâm và cộng sự [23]. Sau khi tối ưu điều kiện mật độ nấm men là 10^7 tế bào/mL, dịch lên men được bổ sung đường saccharose 24,01°Brix, pH 3,88 và lên men ở 30°C trong thời gian 12 ngày thì sản phẩm rượu thu được có hàm lượng ethanol đạt 11,29% v/v.

Trong quá trình lên men, nếu giá trị pH cao thì lượng ethanol sẽ giảm do các vi khuẩn có hại phát triển gây sự cạnh tranh đồng thời ức chế sự sinh trưởng và phát triển nấm men. Dịch quả có pH thích hợp cải thiện được độ ổn định của rượu, ức chế được sự phát triển của vi khuẩn và cũng tạo điều kiện tốt cho quá trình lên men đường [24]. Từ đó cho thấy pH được đề xuất cũng tương tự với pH trong nghiên cứu lên men ethanol từ xoài (pH 5) [25]. Tóm lại, quá trình tối ưu hoá rượu vang mĂNG cầu xiêm ở thí nghiệm này là có hiệu quả.

* *Kết quả đánh giá cảm quan sản phẩm rượu vang mĂNG cầu xiêm*

Rượu vang mĂNG cầu xiêm được lên men từ mô hình tối ưu hóa các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men. Hàm lượng ethanol của rượu vang đạt 12,46% v/v. Rượu vang được đánh giá cảm quan bởi 12 thành viên dựa theo TCVN 3217:79. Về độ trong và màu sắc, rượu đạt 90% (4,5/5,0 điểm), mùi đạt 90% (4,5/5,0 điểm), vị đạt 84% (4,2/5,0 điểm). So với sản phẩm rượu vang mít lá bàng của Nguyễn Phú Hơn (độ trong và màu sắc đạt 4,4/5,0; mùi đạt 4,2/5,0 và vị ở mức 4,0/5,0) [26] thì sản phẩm rượu vang trong nghiên cứu cho kết quả đánh giá cảm quan tốt hơn về tất cả các chỉ tiêu. Nhìn chung, có thể thấy rượu vang mĂNG cầu xiêm đạt tiêu chuẩn về yêu cầu của rượu vang (TCVN 7045:2013) [27], không có mùi lạ, trong suốt, có màu vàng sáng, vị hòa hợp, giữ được mùi mĂNG cầu xiêm đặc trưng cho sản phẩm (Hình 2).



Hình 2. Sản phẩm rượu vang mĂNG cầu xiêm

Bảng 4. Kết quả đánh giá cảm quan rượu vang theo TCVN 3217:79

Chỉ tiêu	Kết quả đánh giá		Yêu cầu rượu vang
	Điểm trung bình	Nhận xét	
Độ trong và màu sắc	4,5/5,0	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	4,5/5,0	Hòa hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.	Hòa hợp, thơm dịu, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.
Vị	4,2/5,0	Hòa hợp, êm dịu, hậu tốt, đặc trưng cho sản phẩm.	Hòa hợp, êm dịu, hậu tốt, hoàn toàn đặc trưng cho sản phẩm.

4. Kết luận

Nấm men phân lập từ mĂNG cầu xiêm *S. cerevisiae* FBY015 cho thấy tiềm năng ứng dụng trong lên men rượu vang mĂNG cầu xiêm. Dựa trên các số liệu thực nghiệm và phương trình hồi quy tuyến tính được thiết lập, các thông số tối ưu cho quá trình lên men rượu vang mĂNG cầu xiêm với dịch quả có hàm lượng chất khô hòa tan là 24°Brix, pH 5 và mật độ nấm men 10^6 tb/mL

cho sản phẩm có hàm lượng ethanol đạt 12,32% v/v và đáp ứng được các tiêu chuẩn của rượu vang theo TCVN 7045:2009.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. Fleet, "The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production," in *Yeasts in Food and Beverages*, A. Querol and G. Fleet, eds. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006, pp. 1-12.
- [2] H. Kelebek, S. Selli, and A. Canbas, "HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine," *Microchemical Journal*, vol. 91, pp. 20-24, 2013.
- [3] M. A. Coêlho de Lima and R. E. Alves, "Soursop (*Annona muricata* L.)," in *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, Elsevier, 2011, pp. 363-392e.
- [4] R. Bhat and G. Paliyath, "Fruits of tropical climates: dietary importance and health benefits," in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, eds. Oxford: Academic Press, 2016, pp. 144-149.
- [5] N. N. M. Phuong, C. V. Hoang, L. N. Binh, and C. T. D. Ai, "Effect of pectinase enzyme treatment to juice yield and fermentation conditions to the quality of mango wine (*Mangifera indica*)," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science*, vol. 20A, pp. 127-136, 2011.
- [6] N. M. Thuy, N. T. M. Tuyen, N. P. Cuong, D. K. Thanh, L. V. Boi, L. T. Truong, H. T. Chinh, and P. T. Nhan, "Effect of isolated yeast cell number, total soluble solid and pH value to palm wine quality," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science*, vol. 19B, pp. 209-218, 2011.
- [7] N. T. P. Dung, L. H. L. Huong, and H. X. Phong, "Study on watermelon wine processing," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science*, vol. 18B, pp. 137-146, 2011.
- [8] H. X. Phong, D. M. Loi, N. N. Thanh, L. P. D. Qui, B. H. D. Long, P. Thanonkeo, M. Yamada, and N. T. P. Dung, "Selection of thermotolerant yeasts and study on fermentation conditions for pineapple wine production," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science*, vol. 51B, pp. 7-15, 2017.
- [9] S. Yusof, and N. Ibrahim, "Quality of soursop juice after pectinase enzyme treatment," *Food Chemistry*, vol. 51, no. 1, pp. 83-88, 1994.
- [10] T. N. Nguyen, K. V. Huynh, T. T. Le, C. M. Luu, T. K. T. Doan, and P. X. Huynh, "Isolation and selection of fermentative yeasts for wine production from soursop (*Annona muricata* L.)," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science (accepted)*, 2021.
- [11] S. Limtong, C. Sringiew, and W. Yongmanitchai, "Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*," *Bioresources Technology*, vol. 98, no. 17, pp. 3367-3374, 2007.
- [12] N. D. Thuong and N. T. Hang, *Ethanol Production Technology and Evaluation*. Science and Technology Publishing House, (in Vietnamese), Hanoi, 2005.
- [13] TCVN 3217:79, Sensory analysis - Methodology test by means of marking. State Committee of Science and Technology, (in Vietnamese), 1979.
- [14] M. Torija, G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, J. Guillamon, A. Mas, and N. Rozès, "Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 85, no. 1-2, pp. 127-136, 2003.
- [15] P. D. Luong, *Industrial Yeasts*. Science and Technology Publishing House, (in Vietnamese), Hanoi, 2006.
- [16] A. Tahir, M. Aftab, and T. Farasat, "Effect of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *Saccharomyces cerevisiae* bio-07," *Journal of Applied Pharmaceutical*, vol. 3, no. 2, pp. 72-78, 2010.
- [17] D. I. Tzeng, Y. C. Chia, C. Y. T. Andi, and S. M. Ou, "Investigation of chemical quality of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Food Quality*, vol. 33, no. 2, pp. 131-267, 2010.
- [18] B. L. Attri, "Effect of initial sugar concentration on the physico-chemical characteristics and sensory qualities of cashew apple wine," *Natural Product Radiance*, vol. 8, no. 4, pp. 374-379, 2009.
- [19] J. P. Larpent, *Biotechnologie des levures*. Masson éditeur, 1991.
- [20] M. E. Pampulha and M. C. Loureiro-Dias, "Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 31, no. 5, pp. 547-550, 1989.
- [21] C. W. Ho, A. Lazim, S. Fazry, U. K. H. Zaki, H. Massa, and S. J. Lim, "Alcoholic fermentation of soursop (*Annona muricata*) juice via an alternative fermentation technique," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 100, no. 3, pp. 1012-1021, 2019.

- [22] T. M. Nguyen, T. M. T. Nguyen, C. P. Nguyen, T. K. Duong, B. V. Le, T. T. Le, C. T. Huynh, and N. T. Phan, "Effect of isolated yeast cell number, total soluble solid and pH value to palm wine quality," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science*, vol. 19b, pp. 209-218, 2011.
- [23] T. T. N. Huynh, D. D. Nguyen, N. T. Nguyen, and T. M. T. Nguyen, "Isolation, selection of yeasts and determination of factors affecting *Canarium album* wine fermentation," (in Vietnamese), *HUAF Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 2, no. 2, pp. 741-750, 2018.
- [24] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, and A. Lonvaud, *Handbook of Enology*, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications (Volume 1, 2), Great Britain by Antony Rowe Ltd, Chippennham, Wiltshire, 2006.
- [25] L. Reddy and V. S. Obulam, "Production of ethanol from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice fermentation," *Research Journal of Microbiology*, vol. 2, pp. 763-769, 2007.
- [26] H. P. Nguyen, "Isolation and selection of yeast for *Artocarpus heterophyllus* wine fermentation in An Giang province," Master thesis, Can Tho University, 2017.
- [27] TCVN 7045:2009, Wine - Specification. Directorate for Standards, Metrology and Quality (STAMEQ), Ministry of Science and Technology, 2013.