

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ LÊN MEN DỊCH CHIẾT LÁ TÍA TÔ (*Perilla frutescens* (L.) BRITTON) CỦA CHỦNG NẤM MEN NM3.6

Trần Thị Thúy, Cấn Thị Nga và Phan Duệ Thanh

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Abstract. Tía tô (*Perilla frutescens* (L.) Britton) là loại cây gia vị, đồng thời cũng là vị thuốc nam phổ biến ở Việt Nam và nhiều nước khu vực Đông Á. Nước tía tô là loại đồ uống quen thuộc của người Nhật Bản. Tuy nhiên, có rất ít các nghiên cứu về lên men rượu tạo loại đồ uống có cồn từ dịch chiết lá tía tô. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng sinh trưởng và khả năng lên men của chủng nấm men NM3.6 trong dịch chiết lá tía tô nhằm tạo loại đồ uống có độ rượu thấp. Kết quả đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng nấm men NM3.6 cho thấy chủng này sinh trưởng tốt trong môi trường nhân giống là dịch chiết lá tía tô có bổ sung sucrose 70 g/L, pH5. Giá trị OD₆₁₀ đạt 18,2 sau 24 giờ nuôi cấy lắc 180 vòng/phút, ở 30 °C. Chủng này cũng có khả năng lên men tốt dịch chiết lá tía tô có bổ sung sucrose 200 g/L, pH 4,5, tiếp giống 10%. Sau 9 ngày lên men chính ở 30 °C và 14 ngày lên men phụ ở 10 °C, độ rượu đạt 3,22% (v/v), hiệu suất lên men 57,6% và điểm cảm quan 16,7. Dịch chiết lá tía tô sau khi lên men có hàm lượng flavonoid không thay đổi, hàm lượng phenol tổng số (0,235 mg/mL) cao hơn so với dịch trước khi lên men (0,196 mg/mL) đạt tiêu chuẩn về cảm quan và chất lượng đối với loại đồ uống có độ rượu thấp lên men từ dịch chiết rau, hoa quả.

Keywords: lá tía tô, lên men rượu, nấm men.

1. Mở đầu

Tía tô (*Perilla frutescens* (L.) Britton) là loại cây gia vị, đồng thời cũng là vị thuốc nam phổ biến ở Việt Nam và nhiều nước khu vực Đông Á. Hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn đã được Nakamura và cs phát hiện trong lá tía tô năm 1998 [1], được Nagatsu và cộng sự phát hiện trong hạt tía tô năm 1995 [2].

Nước tía tô là loại đồ uống quen thuộc của người Nhật Bản. Quy trình chế biến sirô tía tô đã được Công ty TNHH Thực phẩm Mashima, Nhật Bản, đăng ký sáng chế năm 2008 ở Mỹ và Châu Âu [3, 4]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về khả năng lên men dịch chiết lá tía tô chưa nhiều. Nghiên cứu của Kawee-ai và Seesuriyachan (2019) cho thấy: lên men lactic bởi vi khuẩn *Lactobacillus casei* TISTR 1500 làm tăng acid gamma-aminobutyric và các hoạt chất sinh học trong dịch chiết lá tía tô [5]. Nghiên cứu lên men rượu tạo loại đồ uống có cồn từ dịch chiết lá tía tô phối trộn dưa vàng [6] hoặc phối trộn với mận xanh [7] của nhóm nghiên cứu ở Trung Quốc đã cho thấy triển vọng của việc sử dụng nấm men trong lên men dịch chiết lá tía tô.

Chủng nấm men NM3.6 được phân lập từ dịch chiết lá tía tô lên men tự nhiên, có khả năng lên men dịch chiết lá tía tô đạt độ rượu 2,7% (v/v) ở cả pH 4,5 và 6,0 [8]. Do vậy, chủng này có triển vọng ứng dụng trong công nghệ lên men sản xuất đồ uống có độ rượu thấp, loại đồ uống

Ngày nhận bài: 15/3/2021. Ngày sửa bài: 25/3/2021. Ngày nhận đăng: 30/3/2021.

Tác giả liên hệ: Trần Thị Thúy. Địa chỉ e-mail: thuy_tt@hnue.edu.vn

được đánh giá là giữ được hương vị tự nhiên của dịch chiết rau quả tươi, đồng thời kích thích tiêu hóa thức ăn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá khả năng sinh trưởng và lên men rượu của chủng nấm men NM3.6 trong dịch chiết lá tía tô, tạo đồ uống có độ rượu thấp từ dịch chiết lá tía tô (*Perilla frutescens* (L.) Britton).

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Nguyên vật liệu

Lá tía tô (*Perilla frutescens*) thu mua tại thôn Du Nghệ, thị trấn Quốc Oai, Hà Nội. Chủng nấm men NM3.6 được phân lập từ dịch chiết lá tía tô lên men tự nhiên [8].

Các hóa chất: glucose (Công ty Dược Hà Nội, Việt Nam), peptone (Scharlau, Tây Ban Nha), KH_2PO_4 (Xilong Scientific Co., Trung Quốc), thạch (Việt Nam), KCl (Merck, Đức), $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Đức), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Xilong Scientific Co., Trung Quốc), CH_3COOK (Merck, Đức), quecertin (Merck, Đức), acid gallic (Sigma, Mỹ), Na_2SO_3 (Merck, Đức), $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Merck, Đức), acid dinitrosalicylic (Merck, Đức), Na_2CO_3 (Xilong Scientific Co., Trung Quốc), acid citric (Úc), HCl (Merck, Đức), methanol (Merck, Đức), ethanol (Merck, Đức).

Môi trường giữ giống và nghiên cứu hình thái nấm men NM3.6 (môi trường Hansen) có thành phần (g/L): glucose, 50; KH_2PO_4 , 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; peptone, 10; thạch, 20; pH 5. Môi trường Hansen dịch thể không bổ sung thạch.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

*** Chuẩn bị dịch chiết lá tía tô**

Cây tía tô (loại bánh tẻ, chưa ra hoa) được loại bỏ gốc và cành già, rửa sạch bằng nước, để ráo trước khi cân. Bổ sung 300 mL nước vào 100 g lá tía tô và đun sôi 10 phút, loại bỏ cành, lá tía tô để thu được dịch chiết lá tía tô. Bổ sung sucrose và acid citric (nếu cần) để chuẩn bị dịch lên men.

*** Quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào chủng nấm men NM3.6**

Chủng nấm men NM3.6 hoạt hóa trong môi trường Hansen dịch thể, được cấy chuyển sang môi trường Hansen đặc trên đĩa Petri ở 30 °C trong 24 - 48 giờ để quan sát hình thái khuẩn lạc. Tiêu bản nấm men nghiên cứu được quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi điện tử quét SEM (Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương) để xác định hình thái và kích thước tế bào.

*** Xác định độ đục và mật độ tế bào nấm men trong dịch lên men**

Mật độ tế bào được xác định theo hai phương pháp: Đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm kết hợp với xác định giá trị độ đục OD (optical density - mật độ quang) ở bước sóng 610 nm để xây dựng mối tương quan giữa mật độ tế bào và giá trị OD_{610} [9]. Đồ thị đường chuẩn $Y = 51,098X - 5,5507$ thể hiện mối tương quan giữa số lượng tế bào/mL (Y) và giá trị OD_{610} (X) xây dựng nhờ phần mềm Microsoft Excel, có giá trị $r^2 = 0,9886$, được dùng để xác định mật độ tế bào nấm men trong dịch lên men ban đầu.

Độ đục (OD_{610}) cũng được dùng để đánh giá sinh trưởng của nấm men trong dịch chiết lá tía tô khi so sánh với môi trường dịch chiết lá tía tô ban đầu.

*** Xác định khả năng lên men rượu của chủng nấm men NM3.6**

Khả năng lên men rượu của chủng nấm men NM3.6 được đánh giá theo 2 tiêu chí: (1) lượng CO_2 tạo thành sau 9 ngày lên men chính; (2) độ rượu tạo ra sau 9 ngày lên men chính và 14 ngày lên men phụ.

Chủng nấm men NM3.6 được nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30 °C trong môi trường Hansen dịch thể. Sau 24 giờ, dịch nuôi này được đưa vào bình thủy tinh vô trùng chứa 50 mL môi

trường dịch chiết lá tía tô có bổ sung 70 g/L sucrose, pH 5 cho đạt mật độ 10^6 tế bào/mL và nuôi lắc 180 vòng/phút để nhân giống nấm men. Bổ sung 10% giống vào bình lên men (bình thủy tinh có thiết kế thêm bộ phận thoát khí CO₂ ra ngoài để không khí không thổi ngược vào bên trong bình). Bình lên men được nuôi tĩnh trong tủ ổn nhiệt ở các điều kiện về nhiệt độ, pH và hàm lượng sucrose ban đầu khác nhau. Khối lượng bình lên men được xác định vào các thời điểm khác nhau từ 1 - 15 ngày lên men chính (m_t) so với trước lên men (m_0) để xác định lượng CO₂ thoát ra ($m_0 - m_t$) (g/100 mL). Các bình lên men chính tiếp tục được giữ ở 10 °C trong 14 ngày để nấm men lắng xuống trong lên men phụ. Hàm lượng đường, giá trị pH và lượng rượu chung cất được từ dịch lên men sau 14 ngày được xác định bằng thiết bị đo độ Brix cầm tay, máy đo pH và cồn kế, sau đó được hiệu chỉnh về 20 °C [10].

*** Xác định hàm lượng đường sót trong dịch lên men**

Đường sót trong dịch lên men lá tía tô được xác định bằng chiết quang kế cầm tay LH-T32, (Total Meter LTD, Đài Loan). Dựa vào chỉ số đo trên chiết quang kế để biết tỉ lệ phần trăm chất khô hoà tan trong dịch. Kết quả được hiệu chỉnh và quy đổi từ độ Brix (°Bx) về phần trăm đường có trong dung dịch dựa vào bảng phụ lục °Bx được xác định ở nhiệt độ 20 °C [10].

*** Chung cất, xác định độ rượu trong dịch lên men và hiệu suất lên men**

Chung cất 100 mL dịch lên men (V_1) thu được lượng rượu (V_2). Xác định độ rượu tạo ra trong V_2 bằng cồn kế thu được giá trị a. Từ đó tính được độ rượu tạo ra (b) theo tỉ lệ % (v/v) theo công thức: $b = (a \times V_2)/V_1$.

Hiệu suất lên men được tính theo công thức: $H (\%) = (m_{TT} - m_{LT}) \times 100$. Trong đó, H là hiệu suất lên men; m_{TT} là khối lượng rượu thực tế (g); m_{LT} là khối lượng rượu lí thuyết (g).

*** Xác định hàm lượng anthocyanin và phenol tổng số**

Hàm lượng anthocyanin tổng số được xác định theo phương pháp của Giusti và Wirolstad (2001), bằng cách đo mức hấp phụ của anthocyanin ở các pH khác nhau. Độ hấp thụ của mẫu pha loãng được đo ở bước sóng 535 và 700nm [11]. Độ hấp thụ của mẫu pha loãng (A) được tính là hiệu số của ($A_{535} - A_{700}$) ở pH 1,0 và ($A_{535} - A_{700}$) ở pH 4,5. Nồng độ sắc tố anthocyanin đơn phân (mg/L) trong mẫu ban đầu được tính bằng công thức: $(A \times MW \times DF \times 1000)/(\epsilon \times 1)$. Trong đó: $M_w = 449,2$; DF là hệ số pha loãng ($= V_{\text{pha loãng}}/V_{\text{ban đầu}}$), $\epsilon = 26,900$.

Hàm lượng các hợp chất có vòng phenol tổng số được xác định theo phương pháp của Waterhouse và cs (2002), sử dụng thuốc thử Folin - Ciocalteu và chất chuẩn là acid gallic [12]. Acid gallic được chuẩn bị với dãy nồng độ: 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 và 0,1 mg/mL. Mẫu được chuẩn bị ở nồng độ 0,1 g/1,5 mL với dung môi là methanol 80% tuyệt đối. Dựa vào đồ thị chuẩn tương quan giữa hàm lượng acid galic tổng số với độ hấp phụ quang ở bước sóng 765nm để xác định hàm lượng các hợp chất có vòng phenol tổng số theo công thức: $P (\text{mg GAE/g mẫu}) = C.V/m$. Trong đó: P là hàm lượng các hợp chất có vòng phenol tổng số, C là nồng độ các hợp chất có vòng phenol có trong dịch chiết, V là thể tích dịch chiết, m là khối lượng cao chiết sử dụng để pha dịch chiết.

*** Đánh giá cảm quan dịch chiết lá tía tô lên men**

Đánh giá cảm quan về màu, mùi và vị theo thang điểm 20 của Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3215 - 79 đối với đồ uống có cồn [13].

*** Phân tích các kết quả thí nghiệm**

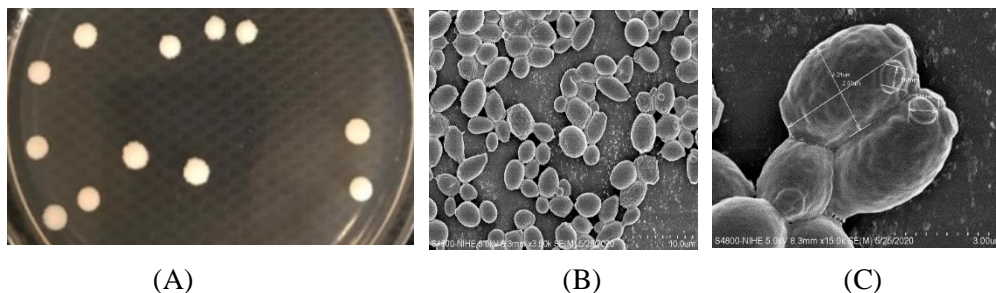
Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần, kết quả thí nghiệm được tính giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn.

2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Một số đặc điểm sinh học cơ bản của chủng nấm men NM3.6

* Hình thái khuẩn lạc và tế bào

Sau 24 - 48 giờ nuôi cấy trong môi trường Hansen đặc, khuẩn lạc của chủng nấm men NM3.6 có hình tròn, màu trắng đục, có chóp, bề mặt sần sùi, viền răng cưa, đường kính khuẩn lạc 3 - 4 mm (Hình 1A). Khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử, tế bào chủng nấm men NM3.6 có hình ovan, kích thước trung bình $(1,69 - 2,55) \times (3,55 - 4,21) \mu\text{m}$, sinh sản theo phương thức nảy chồi đa cực (Hình 1B và 1C).

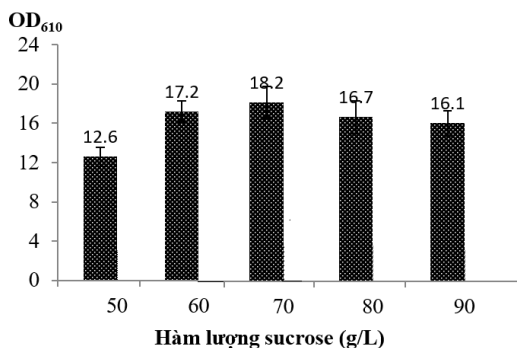


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (A) và tế bào chủng nấm men NM3.6 dưới kính hiển vi điện tử (B và C)

2.2.2. Khả năng sinh trưởng của chủng nấm men NM3.6 trong dịch chiết lá tía tô

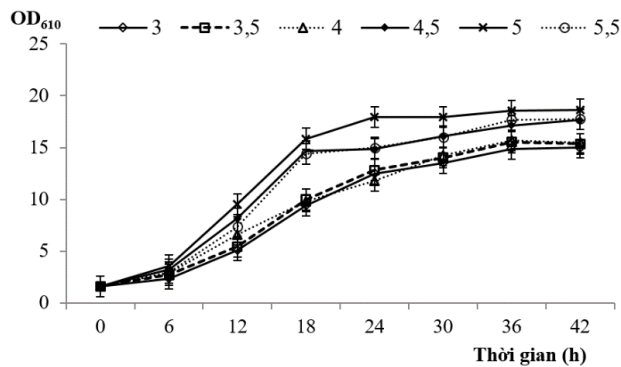
Sinh trưởng trong môi trường dịch chiết lá tía tô là điều kiện tiên quyết đối với các chủng nấm men dùng trong lên men dịch chiết lá tía tô vì chúng cần đạt sinh khối cao trong dịch chiết lá tía tô dùng làm men giống. Môi trường nhân giống này được bổ sung sucrose và điều chỉnh pH bằng acid citric để đạt pH thích hợp [8]. Do vậy, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của 02 yếu tố này và thời gian đến khả năng sinh trưởng của chủng nấm men NM3.6 trong dịch chiết lá tía tô.

Trong điều kiện nuôi cấy lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ ở 30 °C, độ đục của dịch nuôi cấy tăng nhanh trong khoảng 12 - 18 giờ và cao nhất ở hàm lượng sucrose 70 g/L ở 24 giờ (OD_{610} đạt 18,2) (Hình 2). Khi hàm lượng sucrose lớn hơn hoặc nhỏ hơn 70 g/L, độ đục của dịch nuôi cấy giảm xuống, chứng tỏ hàm lượng sucrose 70 g/L là phù hợp cho sinh trưởng của nấm men NM3.6 và sinh trưởng của chủng có thể bị ức chế ở hàm lượng đường cao. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Văn Quyên và cộng sự (2016) đối với chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* MS42 lên men tạo độ rượu cao từ đại mạch và ngô [14]. Hàm lượng sucrose 70g/L và chế độ nuôi lắc 180 vòng/phút được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi về ảnh hưởng của một số yếu tố đến sinh trưởng của nấm men trong dịch chiết lá tía tô.



Hình 2. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose đến sinh trưởng của chủng nấm men NM3.6

Hình 3 cho thấy ở các giá trị pH ban đầu từ 3 đến 5,5, mật độ tế bào tăng nhanh trong khoảng từ 6 - 18 giờ và đạt giá trị lớn nhất ở 24 - 36 giờ sau đó tương đối ổn định. Sinh trưởng của chủng nấm men gần như không có sự khác biệt nhiều trong môi trường nuôi cấy có giá trị pH từ 3 - 4 và kém hơn so với môi trường có pH trong khoảng từ 4,5 - 5,5. Ở môi trường nuôi cấy có pH ban đầu là 5, mật độ tế bào đều cao hơn so với ở môi trường nuôi cấy có các giá trị pH khác, khác biệt rõ ràng được thấy ở các mẫu lấy từ 12 - 42 giờ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Arroyo - López (2009), theo nghiên cứu này thì *S. cerevisiae* sinh trưởng tốt nhất ở pH 4,6 [15]. Theo Moreno-Arribas (2009) pha cân bằng của nấm men kéo dài 2 - 3 ngày sau khi đạt mật độ tế bào lớn nhất [16]. Do đó, chúng tôi chọn môi trường dịch chiết lá tía tô có bổ sung sucrose 70 g/L, pH 5, nuôi lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ ở 30 °C để làm môi trường nhân giống trước khi tiếp giống vào môi trường lên men.



Hình 3. Ảnh hưởng của pH và thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng của chủng nấm men NM3.6

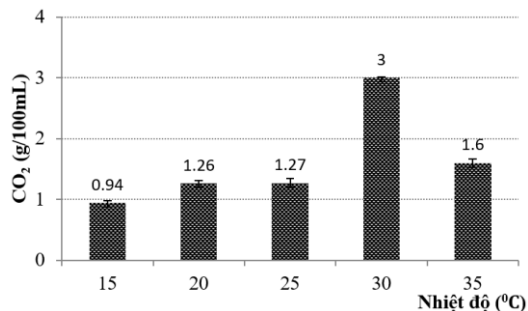
2.2.3. Khả năng lên men rượu của chủng nấm men NM3.6 trong dịch chiết lá tía tô

* Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men chính

Nhiệt độ lên men ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình trao đổi chất thông qua tác động đến các phản ứng sinh hóa nội bào của nấm men. Theo Herrero và cs (2006), khi tăng nhiệt độ, tốc độ lên men tạo rượu tăng đồng thời hàm lượng các ester, ethyl acetate, rượu bậc cao tạo ra ở cuối quá trình lên men giảm; ngược lại, nhiệt độ thấp làm quá trình lên men diễn ra chậm lại nên thời gian lên men kéo dài và độ rượu thu được thấp [17]. Nhiệt độ không chỉ ảnh hưởng trực tiếp tới tốc độ lên men, nồng độ rượu đạt được và hiệu suất lên men mà còn gián tiếp ảnh hưởng tới cảm quan về hương và màu sắc của sản phẩm. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến lên men của chủng NM3.6 được thể hiện qua lượng CO₂ thoát ra trong 100 mL dịch lên men sau 9 ngày lên men chính (Hình 4), độ rượu tạo thành, hiệu suất lên men và cảm quan sản phẩm sau 9 ngày lên men chính và 14 ngày lên men phụ ở 10 °C (Bảng 1).

Sau 9 ngày lên men chính hàm lượng CO₂ thoát ra thấp nhất ở 15 °C (0,94 g/100 mL), tăng dần từ 15 °C đến 30 °C và cao nhất ở nhiệt độ 30 °C (3,0 g/100 mL). Điều này cho thấy lượng đường nấm men tiêu thụ cho sinh trưởng và lên men ít nhất ở 15°C, lớn nhất ở nhiệt độ 30 °C và giảm khi nhiệt độ lớn hơn 30 °C (Hình 4).

Sau 9 ngày lên men chính ở nhiệt độ từ 15 - 35 °C, bổ sung thêm 14 ngày lên men phụ ở 10 °C, lượng rượu tạo ra đạt từ 1,3 đến 3,2% (v/v) và cao nhất ở 30 °C, hiệu suất lên men tạo rượu tăng dần từ thí nghiệm ở 15 °C (38,1%) đến 30 °C (63%) và giảm xuống 38% ở 35 °C; tương ứng với tỉ lệ đường sót giảm dần từ thí nghiệm ở 15 °C (150 g/L) đến 30 °C (126 g/L) và tăng lên ở 35 °C (146 g/L). Khi tăng nhiệt độ từ 15 - 35 °C điểm cảm quan về hương và màu sắc của sản phẩm giảm dần nhưng cảm quan về vị tăng dần. Ở nhiệt độ 30 °C, sản phẩm có sự hài hòa giữa hương và vị, đạt điểm cảm quan cao nhất 16,8 điểm (Bảng 2). Do vậy, nhiệt độ 30 °C được chúng tôi chọn để tiến hành lên men dịch chiết lá tía tô.



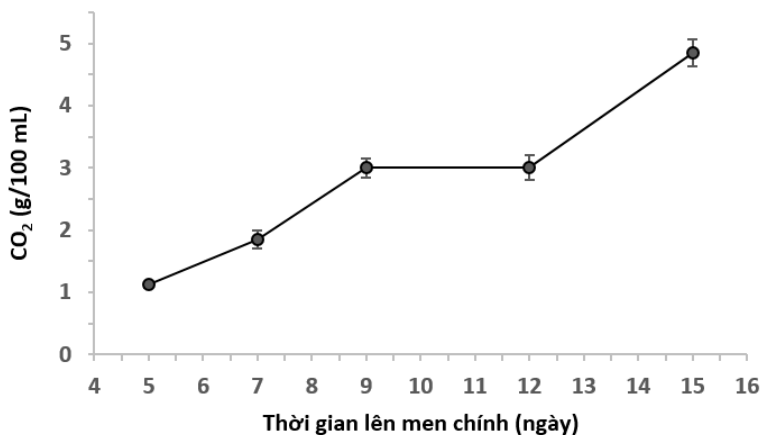
Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng lên men rượu của chủng NM3.6 sau 9 ngày lên men chính

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men tới một số chỉ tiêu của dịch lên men sau 9 ngày lên men chính và 14 ngày lên men phụ ở 10 °C

Nhiệt độ lên men chính (°C)	Chỉ tiêu phân tích			
	Độ rượu % (v/v)	Đường sót (g/L)	Hiệu suất (%)	Cảm quan (điểm)
15 ± 2	1,3 ± 0,3	150 ± 1,7	38,1 ± 1,1	12,96
22,5	1,8 ± 0,3	142 ± 2	45,5 ± 2,3	13,44
25 ± 1	1,85 ± 0,3	139 ± 3	44,5 ± 1,3	14,04
30 ± 1	3,1 ± 0,14	126 ± 1	63 ± 1,3	16,8
35 ± 1	1,4 ± 0,14	146 ± 1,7	38,0 ± 2,8	12,28

*** Ảnh hưởng của thời gian lên men chính**

Thời gian lên men chính ảnh hưởng đến khả năng tạo rượu của chủng nấm men, hương và vị của sản phẩm lên men. Ngoài ra, thời gian cũng đóng vai trò quyết định đến giá thành kinh tế của sản phẩm lên men. Ảnh hưởng của thời gian đến lên men chính dịch chiết lá tía tô của chủng nấm men NM3.6 được thể hiện qua lượng CO₂ thoát ra trong 100 mL dịch lên men ở 30 °C (Hình 5), độ rượu, lượng đường sót, hiệu suất lên men và cảm quan sản phẩm được xác định sau thời gian lên men chính và 14 ngày lên men phụ ở 10 °C (Bảng 2).



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian lên men chính đến khả năng lên men rượu của chủng NM3.6 ở 30 °C

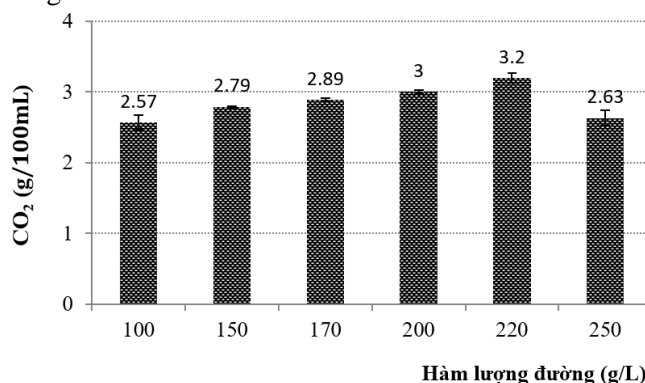
Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian lên men tới một số chỉ tiêu của dịch lên men

Thời gian lên men chính (ngày)	Chỉ tiêu phân tích			
	Độ rượu % (v/v)	Đường sót (g/L)	Hiệu suất (%)	Cảm quan (điểm)
5	0,18 ± 0,07	152 ± 5	5,4 ± 0,19	11,68
7	2,3 ± 0,3	133 ± 4	50,2 ± 1,0	14,92
9	3,1 ± 0,14	126 ± 1	61,55 ± 1,3	16,8
12	3,6 ± 0,3	112 ± 5	60 ± 0,48	13,08
15	4,3 ± 0,3	92 ± 8	58,4 ± 2,5	12,7

Kết quả thể hiện trong Hình 5 cho thấy khi tăng thời gian lên men chính tăng từ 5 - 15 ngày lượng CO₂ thoát ra tăng tương ứng 1,12 - 4,55 g/100 mL; hàm lượng rượu tạo thành tăng dần từ 0,18% (v/v) và đạt cao nhất ở 15 ngày là 4,3% (v/v). Như vậy, chủng nấm men NM3.6 có khả năng tạo rượu chậm, trong thời gian dài. Mặc dù hàm lượng rượu tạo ra nhiều ở thời điểm 12 và 15 ngày lên men chính nhưng rượu tạo ra nhiều đã át hương tự nhiên của tía tô; lượng đường sót còn lại ít (112 và 92 g/L) cũng làm mất đi sự hài hòa giữa hương, vị của sản phẩm. Chính vì vậy, dù độ rượu tạo ra ở 12 và 15 ngày cao hơn 9 ngày nhưng cảm quan dịch lên men ở thời điểm 9 ngày là tốt nhất (16,8 điểm). Thời điểm 9 ngày lên men chính ở 30 °C được chúng tôi lựa chọn cho giai đoạn lên men chính dịch chiết lá tía tô.

*** Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose ban đầu**

Đường là cơ chất chủ yếu của nấm men trong quá trình lên men, qua đó sẽ ảnh hưởng tới khả năng tạo rượu và hiệu suất lên men; xác định hàm lượng đường lên men phù hợp cũng có ý nghĩa rất lớn đến chất lượng và giá thành kinh tế của sản phẩm. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose ban đầu đến lên men dịch chiết lá tía tô của chủng nấm men NM3.6 được thể hiện qua lượng CO₂ thoát ra trong 100 mL dịch lên men sau 9 ngày lên men chính ở 30 °C (Hình 6). Một số chỉ tiêu của dịch lên men sau 9 ngày lên men chính ở 30 °C và 14 ngày lên men phụ ở 10 °C, được thể hiện trong Bảng 3.



Hình 6. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose ban đầu đến khả năng lên men rượu của chủng NM3.6 ở 30 °C

Kết quả thể hiện trong Hình 6 cho thấy khi tăng hàm sucrose ban đầu từ 100 đến 220 g/L, lượng CO₂ sinh ra tăng dần (từ 2,57 đến 3,2 g/100 mL) và giảm chậm ở hàm lượng sucrose 250 g/L. Lượng CO₂ thoát ra không có sự khác nhau nhiều trong các mẫu dịch lên men có hàm lượng sucrose ban đầu từ 170 - 220 g/L.

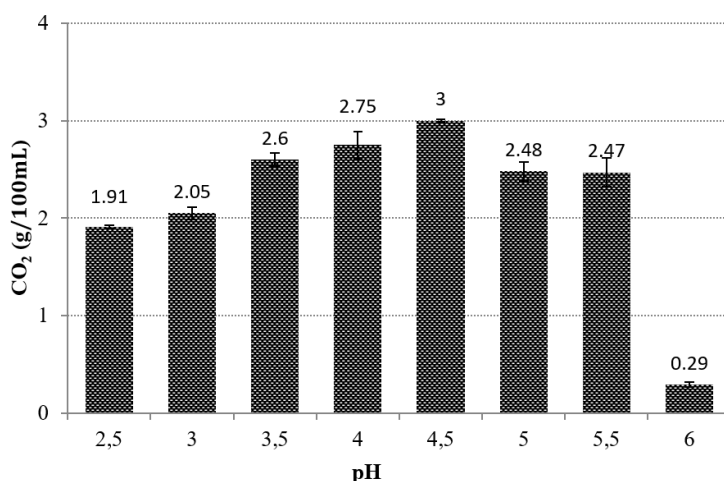
Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose ban đầu tới một số chỉ tiêu của dịch lên men sau 14 ngày lên men phụ ở 10 °C

Hàm lượng sucrose (g/L)	Chỉ tiêu phân tích			
	Độ rượu % (v/v)	Đường sót (g/L)	Hiệu suất (%)	Cảm quan (điểm)
100	2,3 ± 0,3	32 ± 4	49,5 ± 2	12,04
150	2,5 ± 0,3	78 ± 4	51 ± 6	15,56
170	2,65 ± 0,14	108 ± 2	62,6 ± 2,9	16,32
200	3,1 ± 0,14	126 ± 1	61,45 ± 1,3	16,8
220	3,6 ± 0,14	145 ± 3	70,3 ± 1,7	17
250	2,6 ± 0,38	169 ± 1	47,1 ± 1,9	16,6

Kết quả chỉ ra trong Bảng 4 cũng cho thấy hàm lượng sucrose ban đầu tăng từ 100 - 220 g/L thì lượng rượu tạo ra và hiệu suất lên men tăng chậm, tương ứng 2,3 - 3,6% (v/v) và 49,5 - 70,3%. Khi tăng lượng sucrose lên 250 g/L, hàm lượng rượu giảm và hiệu suất lên men giảm tương ứng là 2,6% (v/v) và 47,1%. Ở 220 g/L lượng CO₂ thoát ra nhiều nhất (3,2 g/100 mL) tuy nhiên lượng rượu thu được sau khi kết thúc 14 ngày lên men phụ ở 10 °C là nhiều nhất (3,6% (v/v)). Kết quả này cũng cho thấy sản phẩm lên men ở hàm lượng sucrose ban đầu từ 170 - 250 g/L có điểm cảm quan sản phẩm không có sự khác biệt lớn. Để giảm chi phí đối với lượng đường sử dụng, chúng tôi lựa chọn môi trường có hàm lượng sucrose ban đầu 200 g/L cho quá trình lên men dịch chiết lá tía tô.

*** Ảnh hưởng của pH ban đầu**

Cùng với nhiệt độ, pH ban đầu cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới khả năng lên men của chủng nấm men, ảnh hưởng tới tốc độ tiêu thụ đường thông qua đó ảnh hưởng đến hiệu suất lên men và hàm lượng rượu tạo ra. Hàm lượng CO₂ thoát ra sau 9 ngày lên men chính ở 30 °C trong các môi trường có các giá trị pH ban đầu khác nhau được thể hiện trong Hình 7. Kết quả về các chỉ tiêu như độ rượu, hiệu suất lên men, đường sót và cảm quan được đánh giá sau 9 ngày lên men chính ở 30 °C và 14 ngày lên men phụ ở 10 °C (Bảng 4).



Hình 7. Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng lên men rượu của chủng NM3.6 ở 30 °C

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH ban đầu tới một số chỉ tiêu của dịch lên men sau 14 ngày lên men phụ ở 10 °C

pH ban đầu	Chỉ tiêu phân tích			
	Độ rượu % (v/v)	Đường sót (g/L)	Hiệu suất (%)	Cảm quan (điểm)
2,5	1,35 ± 0,14	145 ± 1	36 ± 2,8	14,6
3	2,0 ± 0,14	140 ± 2	48,9 ± 2,2	15,1
3,5	2,55 ± 0,14	129 ± 6	52,7 ± 3,4	16,4
4	2,8 ± 0,38	128 ± 8	57,1 ± 5,1	16,4
4,5	3,1 ± 0,14	126 ± 1	61,6 ± 1,3	16,8
5	2,6 ± 0,38	132 ± 6	55,9 ± 2,9	13,3
5,5	2,3 ± 0,14	140 ± 2	56,2 ± 2,5	12,8
6	0	162 ± 5	0	9,9

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của pH ban đầu đến quá trình lên men của chủng nấm men NM3.6 cho thấy: trong dải pH ban đầu 2,5 - 6,0, bước nhảy 0,5, lượng CO₂ thoát ra sau 9 ngày lên men chính ở 30 °C không có khác biệt lớn. Lượng CO₂ thoát ra tăng dần (1,91 - 3,0 g/100 mL) ở pH ban đầu 2,5 - 4,5; khi pH ban đầu 5 - 6, lượng CO₂ thoát ra giảm dần và thấp nhất (0,29 g/100 mL) ở pH 6 (Hình 7).

Số liệu Bảng 4 cho thấy trong khoảng pH ban đầu 2,5 - 4,5, độ rượu tăng nhẹ và đạt cao nhất ở pH 4,5 là 3,1% (v/v) tương ứng với hiệu suất lên men tăng dần và đạt cao nhất ở pH 4,5 là 61,6% và lượng đường sót giảm dần từ 140 g/L xuống còn 126 g/L. Trong khoảng pH ban đầu 5 - 6, độ rượu giảm dần tương ứng với hiệu suất lên men giảm và lượng đường sót tăng lên. Khoảng pH 4 - 5 cũng được xem là giới hạn điều khiển quá trình lên men của chủng *Saccharomyces cerevisiae* BY4742; theo Lin và cộng sự (2012) thì pH > 5 dẫn đến hiệu suất lên men tạo rượu của chủng này giảm [18]. Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy, trong khoảng pH 2,5 - 4,5 dịch lên men đều cho điểm cảm quan từ 14,6 - 16,8 điểm, ở pH 5 - 6 điểm cảm quan thấp từ 9,9 - 13,3 điểm. Do vậy, chúng tôi chọn môi trường có pH 4,5 để lên men dịch chiết lá tía tô.

Tiến hành lên men thử chủng nấm men NM3.6 trong 1,8 lít dịch chiết lá tía tô có bổ sung sucrose 200 g/L, pH 4,5, tiếp giống 10%, ở 30 °C trong 9 ngày lên men chính và 14 ngày lên men phụ ở 10 °C, chúng tôi thu được kết quả khả quan: độ rượu đạt 3,22% (v/v), đường sót còn 118 g/L, hiệu suất lên men đạt 57,6% và điểm cảm quan đạt 16,7. Một số hợp chất có tính chất được lí trong dịch chiết lá tía tô như phenol và flavonoid cũng được đánh giá trong dịch chiết lá tía tô trước và sau khi lên men. Kết quả cho thấy: hàm lượng flavonoid không thay đổi nhiều trong dịch chiết lá tía tô trước và sau lên men; hàm lượng tổng số các chất có vòng phenol trong dịch chiết lá tía tô sau lên men (0,235 mg/mL) cao hơn so với dịch trước khi lên men (0,196 mg/mL) chứng tỏ các hoạt chất này không những không mất đi mà còn có thể tăng lên trong dịch chiết lá tía tô sau lên men.

3. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được điều kiện nhân giống phù hợp đối với chủng nấm men NM3.6 trong dịch chiết lá tía tô bổ sung sucrose 70 g/L, pH 5, lắc 180 vòng/phút ở 30 °C trong 24 giờ. Điều kiện lên men phù hợp đối với chủng nấm men này trong dịch chiết lá tía tô là bổ sung sucrose 200 g/L, pH 4,5, tiếp giống 10%, ở 30 °C trong 9 ngày lên men chính và 10 °C

trong 14 ngày lên men phụ. Ở điều kiện đó, dịch lên men có độ rượu đạt 3,22% (v/v), hàm lượng flavonoid không thay đổi, hàm lượng phenol tổng số đạt 0,235 mg/mL, hiệu suất lên men đạt 57,6% và điểm cảm quan là 16,7.

Lời cảm ơn: Các kết quả trong nghiên cứu này được sự tài trợ của đề tài trọng điểm cấp Trường Đại học Sư phạm Hà Nội mã số: SPHN20-01TĐ. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nakamura Y., Ohto Y., Murakami A. and Ohigashi, H., 1998. Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* f. *viridis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (11), pp. 4545-4550.
- [2] Nagatsu A., Tenmaru K., Matsuura H., Murakami N., Kobayashi T., Okuyama H. and Sakakibara J., 1995. Novel antioxidants from roasted perilla seed. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43 (5), pp. 887-889.
- [3] Baba K., Ishikawa T. and Takei T., 2008. *Method of preparing Perilla frutescens var. crispa f. purpurea syrup*. EU patent EP2116138A4.
- [4] Baba K., Ishikawa T. and Takei T., 2012. *Method for preparing syrup from red shiso*. US patent US8304007B2.
- [5] Kawee-ai A. and Seesuriyachan P., 2019. Optimization of fermented *Perilla frutescens* seeds for enhancement of gamma-aminobutyric acid and bioactive compounds by *Lactobacillus casei* TISTR 1500. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49 (10), pp. 997-1009.
- [6] Ren W., Wang W. and Huang M., 2010. Research and development of *Perilla frutescens*-Hami cantaloupe wine. *China Brewing*, 11, pp. 66.
- [7] Ren W., Bai W. D., Huang G. Y. and Mai M. Q., 2009. Research on the development of *Perilla frutescens* green plum fruit wine. *Liquor-Making Science & Technology*, pp. 10.
- [8] Cán Thị Nga, Trần Thị Thúy và Phan Duệ Thanh, 2020. Phân lập và tuyển chọn nấm men có khả năng lên men dịch chiết lá tía tô (*Perilla frutescens* (L.) Britton). Báo cáo Khoa học về Nghiên cứu và Giảng dạy Sinh học lần thứ 4, pp. 848-855. DOI:10.15625/vap.2020.000105.
- [9] Mai Thị Hằng, Đinh Thị Kim Nhung và Vương Trọng Hào, 2011. *Thực hành Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại học Sư phạm, tr. 12-45.
- [10] Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng và Lê Thị Lan Chi, 2006. *Các phương pháp phân tích ngành Công nghệ lên men*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, tr. 107-128, 212-231.
- [11] Giusti M.M. and Wrolstad R.E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy in current protocols. *Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13.
- [12] Waterhouse, A. L., 2002. Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 21-36. DOI:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x.
- [13] Bộ Khoa học và công nghệ, 1979. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3217:1979 về rượu - Phân tích cảm quan - Phương pháp cho điểm, tr. 3-5.
- [14] Nguyễn Văn Quyên, Nguyễn Quang Thảo và Nguyễn Thành Đạt, 2016. Phân lập và tuyển chọn chủng nấm men phù hợp ứng dụng trong sản xuất rượu dòng whisky từ ngô và malt đại mạch. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*, Vol. 61, No. 4, tr. 122-129.
- [15] Arroyo-López F.N., Orlic S., Querol A. and Barrio E., 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii*

and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131 (2-3), pp. 120-127.

- [16] Moreno-Arribas M.V. and Polo M.C., 2009. Wine chemistry and biochemistry. New York: Springer, pp. 3-26.
- [17] Herrero M., García L.A. and Díaz M., 2006. Volatile compounds in cider: Inoculation time and fermentation temperature effects. *Journal of the Institute of Brewing*, 112 (3), pp. 210-214.
- [18] Lin Y., Zhang W., Li C., Sakakibara K., Tanaka S. and Kong H., 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, pp. 395-401.

ABSTRACT

Study on ability of growth and alcoholic fermentation of yeast strain NM3.6 in leaves extract of *Perilla frutescens* (L.) Britton

Tran Thi Thuy, Can Thi Nga and Phan Due Thanh
Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

Perilla frutescens (L.) Britton is well known as an herb and also a medicinal plant in Vietnam and many East Asian countries. Perilla juice (Shiso) is a familiar drink of the Japanese; however, there are very few studies on the alcoholic fermentation of perilla juice to produce alcoholic beverages. In this study, we investigated the growth and fermentation ability of yeast strain NM3.6 in perilla leaf extract to produce a low alcoholic beverage. The results showed that this strain grew well in perilla leaf extract supplemented with sucrose 70 g/L, pH 5. The OD₆₁₀ value of 18.2 was obtained after 24 hours of cultivation at 30 °C and 180 rpm. This strain also performed a good fermentation ability of perilla leaf extract supplemented with 200 g/L of sucrose, pH 4.5, and 10% of seed culture. After 9 days of the main fermentation at 30 °C and 14 days of the secondary fermentation at 10 °C, alcoholic content reached 3.22% (v/v) and fermentation efficiency reached 57.6%, sensory scored 16.7 points. The fermented perilla leaf extract had unchanged flavonoid content, total phenolic content (0.235 mg/mL) was higher compared to that of the original leaf extract (0.196 mg/mL). This alcoholic fermentation juice met a standard of sensory and quality for low alcoholic drinks fermented from fruit and vegetable extracts.

Keywords: alcoholic fermentation, *Perilla frutescens* (L.) Britton, yeast.