



DOI:10.22144/ctujos.2024.372

KHẢO SÁT CHẤT LƯỢNG VÀ PHÂN LẬP NẤM MEN, NẤM MỐC TỪ CƠM RƯỢU ĐƯỢC SẢN XUẤT Ở THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Hoàng Tuấn Thanh^{1,2}, Huỳnh Quốc Huy¹, Nguyễn Thị Ngọc Anh³, Lưu Minh Châu⁴, Nguyễn Ngọc Thạnh⁴, Bùi Hoàng Đăng Long⁴ và Huỳnh Xuân Phong^{4*}

¹Học viên cao học ngành Công nghệ Sinh học Khóa 29, Trường Đại học Cần Thơ

²Trường THPT Nguyễn Văn Nguyễn, huyện Thới Bình, tỉnh Cà Mau

³Sinh viên ngành Công nghệ Sinh học Khóa 45, Trường Đại học Cần Thơ

⁴Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): hxphong@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 01/06/2024

Sửa bài (Revised): 3/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 31/08/2024

Title: Evaluation of quality and isolation of yeast and mold strains from fermented glutinous rice in Can Tho city

Author(s): Hoang Tuan Thanh^{1,2}, Huynh Quoc Huy², Nguyen Thi Ngoc Anh³, Luu Minh Chau⁴, Nguyen Ngoc Thanh⁴, Bui Hoang Dang Long⁴ and Huynh Xuan Phong^{4*}

Affiliation(s): ^{1,3,4} Can Tho University; ²Nguyen Van Nguyen High School, Thoi Binh, Ca Mau

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá chất lượng của cơm rượu được sản xuất ở Thành phố Cần Thơ thông qua một số chỉ tiêu hóa lý (độ ẩm, độ Brix, hàm lượng ethanol, hàm lượng acid, pH) và vi sinh (tổng số nấm men và nấm mốc, tổng số vi sinh vật hiếu khí, tổng số vi khuẩn lactic, định lượng Coliforms tổng số và *Escherichia coli*). Kết quả cho thấy độ ẩm của cơm rượu trong khoảng 30,57-40,48% w/w và hàm lượng ethanol ở mức 8,7-12,7% v/v. Tổng số nấm men và nấm mốc dao động ở mức $3,1 \times 10^6$ đến $2,0 \times 10^7$ CFU/g. Ngoài ra, nghiên cứu cũng phân lập được 5 chủng nấm mốc và 15 chủng nấm men có trong viên men và cơm rượu trên môi trường thạch PD (Potato Dextrose) và YPD (Yeast extract Peptone Dextrose), từ đó làm nguồn nguyên liệu để tuyển chọn các dòng nấm men, nấm mốc có hoạt tính cao để ứng dụng sản xuất cơm rượu đạt chất lượng ổn định, góp phần duy trì làng nghề và nhằm lưu trữ nguồn gen quý bản địa.

Từ khóa: Cơm rượu, lên men ethanol, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn lactic

ABSTRACT

The research aims to evaluate the quality of sweet fermented glutinous rice collected in Can Tho City through some physicochemical indicators (moisture, Brix degree, ethanol content, total acid content, pH) and microbiological indicators (total yeast and mold count, total aerobic count, total lactic acid bacteria, and quantification of total Coliforms and *Escherichia coli*). The analysis showed that the sweet fermented glutinous rice moisture content was 30,57-40,48% w/w and ethanol concentration ranged from 8,7-12,7% v/v. The total yeast and mould count was determined from $3,1 \times 10^6$ to $2,0 \times 10^7$ CFU/g. In addition, the study also isolated 5 strains of mold and 15 strains of yeast present in starter and sweet fermented glutinous rice on PD (Potato Dextrose) and YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) media. The isolated yeast and mold strains with high activity will be used as the resources for the manufacture of sweet fermented glutinous rice to maintain the traditional craft village and preserve valuable local genetic resources

Keywords: Sweet fermented glutinous rice, ethanol fermentation, yeast, mold, yeast, lactic acid bacteria

1. GIỚI THIỆU

Từ xưa, quá trình sản xuất com rượu hoàn toàn nhờ vào hệ vi sinh vật tự nhiên được “roi” vào khối ủ. Tuy nhiên, cách làm này thường cho kết quả không ổn định và bằng nhiều kinh nghiệm, người ta đã chọn khối ủ tốt nhất để lại một phần cho sản xuất mẻ sau. Phương pháp này tuy tốt hơn cách làm phụ thuộc vào hệ vi sinh vật tự nhiên nhưng nguồn giống sẽ không thể bảo quản được lâu. Do đó, bánh men đã được tạo ra từ những mẻ ủ tốt nhất bằng cách tạo hình chúng với cơ chất, sấy khô và bảo quản để dùng dần. Bằng cách này, nhà sản xuất đã hoàn toàn chủ động hơn trong quá trình sản xuất và chất lượng sản phẩm dần được cải thiện. Các loại bánh men được sản xuất theo phương pháp truyền thống về nguyên tắc là giống nhau, nhưng tùy theo đặc điểm khí hậu, nguyên liệu và sở thích của từng địa phương mà người ta có thể bổ sung vào bánh men một số thành phần khác (Lee & Fujio, 1999; Dung et al., 2007).

Com rượu là một loại thực phẩm lên men truyền thống ở Việt Nam, có cồn với nguyên liệu chính là gạo nếp được nấu chín, sau đó để nguội và ủ với men rượu trong 2-3 ngày cho lên men. Thành phẩm thu được là com rượu hơi ướt so với ban đầu, khi ăn có vị cay nồng, ngọt và mùi thơm đặc trưng. Nguyên liệu để làm com rượu có thể thay đổi tùy vùng miền nhưng chủ yếu vẫn cần có gạo nếp và viên men. Diễn biến chính trong quá trình lên men com rượu ở trạng thái rắn gồm 2 giai đoạn: Thứ nhất là là giai đoạn đường hóa chủ yếu bởi nấm mốc, và giai đoạn rượu hóa chủ yếu bởi nấm men. Hai giai đoạn này diễn ra đồng thời trong khối com nếp. Ngoài ra, còn có quá trình lên men acid lactic (Lượng, 1998). Thành phần vi sinh chủ yếu được tìm thấy trong men com rượu được chia thành 3 nhóm gồm nấm mốc (điển hình như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*), nấm men (chủ yếu là *Saccharomyces cerevisiae*) và vi khuẩn (với hai nhóm chính là vi khuẩn acid lactic và acetic) (Hesseltine et al., 1988; Lee & Fujio, 1999; Dung et al., 2007). Các loài vi khuẩn này góp phần tạo độ chua cho sản phẩm có vị hài hòa hơn. Mặt khác, khi vi sinh vật phát triển quá mức có thể ảnh hưởng đến sản phẩm cuối cùng. Ngoài hai vi khuẩn này còn một số vi khuẩn tạp nhiễm khác chưa xác định được, nhưng lượng vi sinh vật có hại trong viên men lại rất ít so với các vi sinh có lợi (Lượng, 1998). Nhìn chung, các nhóm sinh vật trong men để làm com rượu gần như tương tự với men làm rượu. Tuy nhiên, viên men làm com rượu là loại men ngọt hay men ngọt thuộc bậc bởi vì nó quyết định đến các đặc điểm đặc trưng của từng loại sản phẩm, như com rượu phải vị ngọt và chứa một lượng cồn khá thấp.

Mặc dù com rượu đã được lên men và sử dụng trong cuộc sống của con người từ lâu nhưng các công bố khoa học liên quan đến com rượu vẫn còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này bước đầu đánh giá chất lượng của com rượu và tiến hành phân lập các dòng nấm mốc và nấm men, từ đó làm cơ sở để tuyển chọn các dòng vi sinh vật có khả năng ứng dụng để kiểm soát và cải thiện chất lượng com rượu, cũng như lưu trữ nguồn gen của bản địa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

– Các mẫu com rượu và men com rượu được thu thập tại quận Ninh Kiều và quận Cái Răng, thành phố Cần Thơ. Các cơ sở thu mẫu bao gồm: Cơ sở Cô Ba (CB, chợ bệnh viện Da Liễu, đường 3/2), cơ sở Bà Năm (BN, chợ An Lạc, đường Nguyễn Thị Minh Khai), cơ sở Chị Hai (CH, chợ Hưng Lợi, đường Nguyễn Văn Linh), cơ sở Bà Duyên (BD, chợ Cái Răng, đường Trần Hưng Đạo), cơ sở Cô Tám (CT, chợ An Bình, đường tỉnh 923).

– Hóa chất: $K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 (Xilong Scientific, Trung Quốc), Tri-butyl phosphate (TBP) (Merck, Đức), NaOH 0,1N (Cemaco, Việt Nam). Môi trường sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Môi trường OGYE (Oxytetracycline Glucose Yeast Extract), môi trường PCA (Plate Count Agar), môi trường MRS (Mann Rogosa Sharpe), môi trường Nutrient, môi trường LS (Lauryl Sulphate), môi trường BGBL (Brilliant Green Bile Lactose), môi trường Tryptone, môi trường YPD (Yeast extract Peptone Dextrose), môi trường PD (Potato Dextrose). Các môi trường tổng hợp của hãng Himedia (Ấn Độ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá các chỉ tiêu cơ bản của sản phẩm com rượu

Các mẫu com rượu sau khi thu nhận từ các cơ sở được thực hiện phân tích độ ẩm (%), độ Brix, xác định hàm lượng ethanol (% v/v), hàm lượng acid (g/L) và giá trị pH.

2.2.2. Xác định mật số vi sinh vật có trong sản phẩm com rượu

Các mẫu com rượu được đồng hóa bằng cách cân 10 g sản phẩm cho vào túi stomacher chứa sẵn 90 mL dung dịch NaCl 0,85%, mẫu được nghiền trong 1 phút ở tốc độ 260 vòng/phút. Các mẫu com rượu được pha loãng đến nồng độ thích hợp.

– Xác định tổng số nấm men và nấm mốc: 0,1 mL dịch pha loãng của mẫu com rượu ở các nồng độ pha loãng kế tiếp được trải trên đĩa chứa môi

trường OGYA và ủ ở 30°C trong khoảng 24-48 giờ (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2010).

– Xác định tổng số vi khuẩn lactic và tổng số vi sinh vật hiếu khí: 1 mL dịch pha loãng của mẫu cơm rượu ở các nồng độ pha loãng kế tiếp được cho vào đĩa petri và 15-20 mL môi trường MRS/PCA ở nhiệt độ khoảng 45-50°C (tương ứng với vi sinh vật hiếu khí và vi khuẩn lactic), sau đó được rót vào đĩa rồi lắc đều theo hình số 8. Ủ ở 30°C trong khoảng 24-48 giờ (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2008 & 2015).

Đếm số khuẩn lạc đã phát triển trên đĩa thạch và tính kết quả như sau:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n1 + 0,1n2)d}$$

Trong đó, N là số khuẩn lạc có trong 1 g mẫu hay 1 mL mẫu (CFU/g hay CFU/mL), ΣC là số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa petri, d là nồng độ pha loãng mẫu mà ở đó đĩa petri đầu tiên được chọn để đếm có số khuẩn lạc thỏa điều kiện $30 < x < 300$, n1 là số đĩa chọn đếm các khuẩn lạc ở nồng độ đầu tiên (n1 = 1 hoặc n1 = 2) và n2 là số đĩa chọn đếm các khuẩn lạc ở nồng độ kế tiếp (n2 = 1 hoặc n2 = 2).

– Định lượng Coliforms tổng số và *E. coli*: 1 mL dịch pha loãng của mẫu cơm rượu ở các nồng độ pha loãng kế tiếp được cho vào các ống nghiệm chứa 9 mL môi trường LSB có chứa chuồng Durham (hệ thống 9 ống theo phương pháp MPN, Most probable number). Các ống nghiệm được ủ ở 37°C trong 48 giờ. Ghi nhận và chuyển 1 mL các ống có sinh hơi sang các ống nghiệm có chứa 9 mL BGBL có chứa chuồng Durham. Ủ ở 37°C để xác định Coliforms tổng số và 44,5°C để xác định *E. coli* trong 24-48 giờ. Tiếp tục ghi nhận và chuyển 1 mL các ống có sinh hơi sang các ống nghiệm có chứa 5 mL môi trường Tryptone và ủ ở 44,5°C. Sau 24 giờ, thuốc thử Kovac's được cho vào các ống nghiệm. Quan sát những ống nghiệm có sinh hơi ở 44,5°C (Coliforms chịu nhiệt) và Indol dương tính, tra bảng MPN tính số lượng *E. coli* có trong 1 g cơm rượu (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2015).

2.2.3. Phân lập và xác định hình thái của các dòng nấm men từ cơm rượu

Năm gram mẫu cơm rượu được tăng sinh trong bình tam giác có chứa 95 mL môi trường YPD. Ủ lắc ở nhiệt độ phòng (28-32°C) trong 24-48 giờ.

Dịch tăng sinh được pha loãng đến nồng độ thích hợp. Sau đó, 0,1 mL dịch pha loãng được trải trên môi trường thạch YPD và ủ ở 30°C trong 24-48 giờ. Thực hiện cấy chuyển nhiều lần đến khi thu được các chủng nấm men thuần, ghi nhận đặc điểm của khuẩn lạc và tế bào của các dòng nấm men được phân lập.

2.2.4. Phân lập và xác định hình thái của các dòng nấm mốc từ cơm rượu

Năm gram mẫu cơm rượu được tăng sinh trong bình tam giác có chứa 95 mL môi trường YPD. Ủ lắc ở nhiệt độ phòng (28-32°C) trong 24-48 giờ. Dịch tăng sinh được pha loãng đến nồng độ thích hợp. Sau đó, 0,1 mL dịch pha loãng được trải trên môi trường thạch PD và ủ ở 30°C trong 24-48 giờ. Thực hiện cấy chuyển nhiều lần đến khi thu được các chủng nấm mốc thuần. Ghi nhận đặc điểm của khuẩn lạc, khuẩn ty và bào tử của các dòng nấm mốc được phân lập.

2.2.5. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

– Xác định pH bằng máy đo pH Horiba (pH1100, Nhật Bản) và °Brix được xác định bằng khúc xạ kế Atago (Master-2 α , Nhật Bản).

– Hàm lượng acid tổng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ (Nguyen & Hwang, 2016).

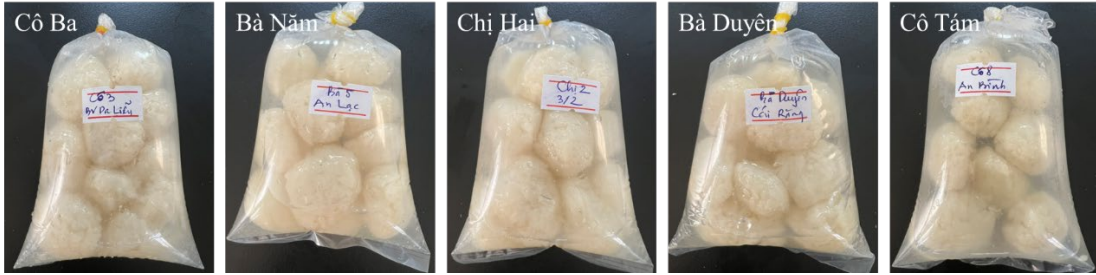
– Hàm lượng ethanol được xác định dựa trên phản ứng với tri-n-butyl phosphate và kali chromate (Sriariyanun et al., 2019).

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

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các chỉ tiêu cơ bản của sản phẩm cơm rượu

Cơm rượu là một loại thực phẩm lên men truyền thống ở Việt Nam với nguyên liệu chính là gạo nếp được nấu chín, sau đó để nguội và ủ với men rượu trong 2-3 ngày. Thành phẩm thu được là cơm rượu ướt so với ban đầu, khi ăn có vị cay nồng, ngọt và mùi thơm đặc trưng. Các mẫu cơm rượu thu thập từ 5 cơ sở (Cò Ba, Bà Năm, Chì Hai, Bà Duyên, Cò Tám) (Hình 1) được phân tích một số chỉ tiêu cơ bản như độ ẩm, độ Brix, hàm lượng ethanol, hàm lượng acid tổng, pH. Kết quả được ghi nhận trong Bảng 1.



Hình 1. Hình ảnh các mẫu men cơm rượu và cơm rượu thành phẩm tại các cơ sở

Bảng 1. Kết quả xác định các chỉ tiêu cơ bản của sản phẩm cơm rượu

Chỉ tiêu	Mẫu cơm rượu				
	Cô Ba (CB)	Bà Năm (BN)	Chị Hai (CH)	Bà Duyên (BD)	Cô Tám (CT)
Độ ẩm (% w/w)	34,15 ^c ±0,96	30,57 ^d ±1,74	34,50 ^c ±0,39	40,48 ^a ±1,06	38,53 ^b ±0,52
Độ Brix (°Brix)	26,00 ^c ±0,44	25,00 ^d ±0,20	26,00 ^c ±0,20	36,00 ^a ±0,44	32,50 ^b ±0,44
Hàm lượng ethanol (% v/v)	10,56 ^b ±0,25	12,13 ^{ab} ±0,12	11,54 ^{ab} ±0,76	11,89 ^{ab} ±1,73	12,66 ^a ±0,80
Hàm lượng acid tổng (g/L)	4,50 ^b ±0,23	4,05 ^c ±0,00	4,95 ^a ±0,00	3,60 ^d ±0,00	2,48 ^e ±0,23
pH	3,92 ^c ±0,01	4,11 ^c ±0,01	3,99 ^d ±0,01	4,22 ^b ±0,01	4,54 ^a ±0,01

Ghi chú: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình trong cùng một hàng theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% ($p < 0,05$).

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy độ ẩm của các mẫu cơm rượu dao động trong khoảng 30,57-40,48% w/w. Trong đó, mẫu tại cơ sở BN có độ ẩm thấp nhất với 30,57%, ở mẫu cơm rượu CB và CH có độ ẩm tương đối gần nhau và khác biệt không có ý nghĩa thống kê (34,15% và 34,5% w/w) và mẫu cơm rượu có độ ẩm cao nhất được ghi nhận tại cơ sở BD với 40,48%, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mẫu tại các cơ sở khác. Giá trị độ ẩm của thực phẩm phản ánh tỷ lệ giữa lượng nước chứa trong thực phẩm và tổng trọng lượng của nó. Theo đó, độ ẩm của một sản phẩm thực phẩm có thể ảnh hưởng đến chất lượng, độ bền và thời hạn sử dụng của nó. Nhìn chung, sản phẩm lên cơm rượu chiếm tỉ lệ nước dưới 50%, nhỏ hơn so với độ ẩm của cơm rượu trong nghiên cứu của Surojanametakul et al. (2019) khi chỉ dao động từ 50,76-53,04%.

Từ Bảng 1 có thể thấy hàm lượng chất khô hòa tan của cơm rượu thành phẩm tại các cơ sở khảo sát dao động trong khoảng 25,0-36,0 Brix. Trong quá trình lên men thì sự hoạt động của vi sinh vật đã tạo các enzyme có khả năng biến đổi tinh bột trong gạo thành đường, cồn và acid (Lượng, 1998; Phạm, 2006). Ở giai đoạn đầu, nấm mốc đóng vai trò quan trọng trong việc tiết ra enzyme để phá hủy các liên kết glycoside của hạt tinh bột thành các sản phẩm hòa tan và sản xuất các loại đường khác nhau, chẳng hạn như oligosaccharide, disacaride và monosaccharide, vì vậy mà lượng đường có thể được tăng

lên. Tuy nhiên, sau quá trình lên men thì tổng chất khô hòa tan lại có xu hướng giảm xuống, nguyên nhân là do nấm men cùng các vi sinh vật có mặt trong viên men đã sử dụng nguồn đường này. Theo ghi nhận của Xu et al. (2021), khi sản xuất Jiu Niang (một sản phẩm truyền thống của Trung Quốc tương tự cơm rượu của Việt Nam) từ gạo nếp đen cũng cho thấy hàm lượng đường giảm dần theo thời gian lên men.

Bên cạnh đó, hàm lượng ethanol của cơm rượu cũng được xác định bằng phương pháp quang phổ, kết quả cho thấy cơm rượu CB có hàm lượng ethanol thấp nhất là 10,56% v/v và cơm rượu CT có hàm lượng ethanol cao nhất là 12,7% v/v. Các mẫu còn lại thì dao động trong khoảng 11,54-12,13% v/v và có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Sau quá trình đường hóa bởi nấm mốc thì quá trình lên men xảy ra, trong đó đường glucose được chuyển thành ethanol do hoạt động của nấm men có trong men khởi đầu (Dung et al., 2007). Hơn nữa, một lượng nhỏ ethanol có thể được sản xuất thông qua quá trình lên men của vi khuẩn acid lactic với sự có mặt của maltose, đặc biệt khi nhiệt độ lên men cao hơn 30°C (Akerberg et al., 1998). Tuy nhiên, khi so sánh với các nghiên cứu trước đây thì hàm lượng ethanol trong các mẫu cơm rượu khảo sát là khá cao. Cụ thể, trong báo cáo của Surojanametakul et al. (2019) thì hàm lượng ethanol của Khao-mak (một sản phẩm truyền thống của Thái Lan tương tự cơm

rượu của Việt Nam) sau 3 ngày lên men là 2,15-2,58% v/v. Theo nghiên cứu của Wongsa et al. (2018), mức độ cồn được tạo ra bởi quá trình lên men từ các loại gạo khác nhau đều nhỏ hơn 0,5% v/v sau 3 ngày lên men và có xu hướng tiếp tục tăng đến 1-2% v/v ở ngày thứ 7. Nguyên nhân có thể dẫn đến sự khác biệt này có thể là do nguồn nguyên liệu, giống men khởi động hay thời gian lên men.

Ngoài ra, khi xác định hàm lượng acid tổng của các mẫu cơm rượu đều cho thấy giá trị trong khoảng 2,48-4,95 g/L. Mẫu BD và CT có hàm lượng acid thấp với mức tương ứng là 3,60 và 2,48 g/L. Trong đó, cơm rượu từ cơ sở CH có hàm lượng acid cao nhất trong 5 mẫu khảo sát với hàm lượng là 4,95 g/L. Kết quả này cũng có sự tương đồng với kết quả báo cáo của Surojanametukul et al. (2019) khi lên men Khao-mak, hàm lượng acid tổng sau 3 ngày lên men đạt từ 3,1-5,0 g/L. Ngoài ra, theo kết quả của Xu et al. (2019) cho thấy trong Jiu Niang rất giàu acid hữu cơ, trong đó acid lactic chiếm hàm lượng cao nhất, còn lại là các chất khác như acid malic, fumaric, acetic, tartaric, citric và succinic,... với tổng hàm lượng acid hữu cơ tăng dần theo thời gian và giảm nhẹ sau 60 giờ lên men. Điều này được cho là có liên quan đến quá trình chuyển hóa lên men phức tạp của hệ vi sinh vật có trong nguồn “men khởi động” bao gồm nấm mốc, nấm men và vi khuẩn hay từ những vi sinh vật tạp nhiễm trong quá trình sản xuất. Hơn nữa, trong quá trình lên men, sự hình thành và tích tụ của ethanol đã ức chế việc sản xuất acid lactic ở một mức độ nhất định, chính vì vậy, độ acid của thành phẩm có thể được kiểm soát trong một phạm

vi nhất định để ngăn chặn sự ôi thiu của gạo nếp (Zhao et al., 2020).

Tương ứng với hàm lượng acid thì các giá trị pH cũng được ghi nhận và nằm trong khoảng 3,92-4,54. Kết quả này cũng phù hợp bởi mối tương quan giữa lượng acid và độ pH được xác định bởi cường độ ion của acid. Khi ghi nhận sự thay đổi độ pH của Khao-mak được sản xuất từ gạo đen, độ pH của Khao-mak từ 6,00 giảm xuống còn 4,00-4,27 sau 3 ngày của quá trình lên men. Bởi vì nấm men và nấm mốc có thể đóng một vai trò quan trọng trong quá trình lên men đường thành ethanol và acid (Manosroi et al., 2011), do đó độ pH bị giảm cùng với độ acid cao đã mang lại tác dụng kháng một số vi sinh vật gây bệnh và giúp đảm bảo thực phẩm lên men an toàn khi tiêu dùng (Dung et al., 2007). Nhìn chung, đặc tính chất lượng sản phẩm cơm rượu có thể thay đổi tùy theo từng nơi và phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm giống khởi đầu, phương pháp truyền thống, điều kiện môi trường và thời gian lên men.

3.2. Một số vi sinh vật có mặt trong sản phẩm cơm rượu

Bên cạnh các chỉ tiêu hóa lí, các chỉ tiêu về vi sinh vật trong các mẫu cơm rượu cũng được phân tích (không quá 7 ngày từ khi thu mẫu), bao gồm các chỉ tiêu xác định tổng số nấm men và nấm mốc, xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí, xác định tổng số vi khuẩn lactic và định lượng Coliforms tổng số và *E. Coli*, qua đó có cái nhìn tổng quan về vi sinh vật hiện diện trong sản phẩm cơm rượu truyền thống được bán trên thị trường. Kết quả phân tích mật số vi sinh vật được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích xác định mật số vi sinh vật trên các mẫu cơm rượu

Vi sinh vật	Mẫu cơm rượu				
	CB	BN	CH	BD	CT
Tổng số nấm men và nấm mốc (logCFU/g)	7,30 ^a ±0,03	6,48 ^c ±0,02	6,97 ^c ±0,01	7,14 ^b ±0,02	6,54 ^d ±0,01
Tổng số vi sinh vật hiếu khí (logCFU/g)	9,30 ^b ±0,02	8,69 ^c ±0,00	8,61 ^d ±0,01	8,46 ^e ±0,01	9,46 ^a ±0,01
Tổng số vi khuẩn lactic (logCFU/g)	9,43 ^a ±0,01	9,38 ^b ±0,01	8,52 ^c ±0,02	8,59 ^c ±0,00	8,57 ^d ±0,01
Tổng số vi khuẩn <i>Bacillus</i> (logCFU/g)	1,88 ^b ±0,02	1,00 ^d ±0,05	1,70 ^c ±0,06	1,98 ^a ±0,02	1,81 ^b ±0,02
Coliforms tổng số (MPN/g)	<3	<3	<3	<3	<3
<i>E. coli</i> (MPN/g)	<3	<3	<3	<3	<3

Ghi chú: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trung bình trong cùng một hàng theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% ($p < 0,05$).

Kết quả phân tích ở Bảng 2 cho thấy mẫu cơm rượu CB có tổng số nấm men và nấm mốc cao nhất

là 7,30 logCFU/g, thấp nhất là mẫu cơm rượu BN với tổng số nấm men và nấm mốc là 6,48 logCFU/g.

Điều này đã chứng tỏ rằng trong cơm rượu đều có chứa các dòng nấm mốc và nấm men. Đây là hai loại vi sinh vật đóng vai trò và hoạt tính chủ yếu trong quá trình đường hóa và lên men rượu (Hesseltine et al., 1988; Nwosu & Ojmelukwe, 1993). Tuy nhiên, ở giai đoạn phân tích mật số vi sinh này chưa thể có kết luận gì về hoạt tính của tất cả các dòng nấm mốc và nấm men có lợi cho quá trình lên men cơm rượu, cũng như chưa phân biệt được các dòng vi sinh vật nào là cần thiết cho quá trình lên men rượu sau này, hoặc các dòng nào là bị nhiễm có thể làm giảm hiệu suất lên men sau này. Trong báo cáo kết quả lên men Khao-mak của Surojanametakul et al. (2019) cũng cho thấy sự tương đồng khi kết thúc thời gian lên men (ngày thứ 3), tổng số nấm mốc, nấm men đếm được ở sản phẩm lần lượt là $7,00 \times 10^2$ CFU/g và $5,40 \times 10^5$ CFU/g (Surojanametakul et al., 2019).

Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy sự hiện diện của mật số vi sinh vật hiếu khí giữa các mẫu có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê, trong đó cao nhất là mẫu CT với tổng lượng vi sinh vật hiếu khí là 9,46 logCFU/g, kế đến mẫu CB với tổng số vi sinh vật hiếu khí là 9,30 logCFU/g và thấp nhất là mẫu BD với 8,46 logCFU/g. Việc xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí trong mẫu sẽ hiển thị mức độ an toàn về sinh của thực phẩm; đánh giá chất lượng của mẫu về vi sinh vật; nguy cơ hư hỏng của thực phẩm; giới hạn về thời gian, hạn sử dụng - bảo quản của sản phẩm; mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến và bảo quản thực phẩm. Tổng số vi khuẩn lactic cũng được tìm thấy trong tất cả mẫu cơm rượu, mật số vi khuẩn lactic dao động từ 9,52-9,43 logCFU/g, tương ứng với là mẫu CH và mẫu CB. Vi khuẩn lactic có mặt khắp nơi trong các loại thực phẩm lên men tự nhiên vì chúng có thể chịu được độ pH thấp và nó còn được xem là vi sinh vật chức năng, đóng vai trò quan trọng trong quá trình lên men thực phẩm (Abriouel et al., 2006). Bên cạnh nấm mốc, một số vi khuẩn có khả năng tạo ra các enzyme giúp thủy phân tinh bột trong nguyên liệu thô để tạo ra đường mà nấm men có thể sử dụng để sản xuất rượu (Hong et al., 2021). Ngoài ra, nấm mốc, nấm men và vi khuẩn lactic có thể tạo ra nhiều loại enzyme cần thiết cho quá trình chuyển hóa tế bào tạo ra các phân tử nhỏ đa dạng, góp phần tạo nên hương vị và mùi thơm của sản phẩm cuối cùng (Jiang et al., 2020). Chính vì vậy mà Yusmarini et al. (2019) đã nghiên cứu sản xuất Tapai (một sản phẩm truyền thống của Indonesia tương tự cơm rượu của Việt Nam) bằng cách bổ sung chủng *Lactobacillus plantarum* cùng với men làm giống khởi động. Kết quả cho thấy Tapai được lên men có chứa chủng *L. plantarum* có

các đặc tính hơi khác so với Tapai truyền thống và nhận được sự ưa thích của các cảm quan viên.

Ngoài ra, nhóm vi khuẩn *Bacillus* cũng được tìm thấy trong các mẫu cơm rượu. Đây là nhóm vi khuẩn thường được tìm thấy trong một số sản phẩm lên men bởi nhóm này được biết đến với khả năng sinh các loại enzyme ngoài bào (protease và amylase) với nồng độ cao. Từ kết quả ghi nhận ở Bảng 2 cho thấy mật số vi khuẩn *Bacillus* trong các mẫu chao dao động từ 1,00-1,98 logCFU/g. Đây có thể là nhóm vi sinh vật tạp nhiễm trong quá trình lên men cơm rượu. Theo kết quả phân tích trong nghiên cứu của Zou et al. (2023) thì chi *Bacillus* có liên quan đến mùi vị của sản phẩm trong việc hình thành các hợp chất dễ bay hơi như rượu, acid, aldehyde và ester.

Coliforms là những vi khuẩn gram âm kỵ khí, hình que, không có bào tử, có khả năng lên men đường lactose kèm theo sinh hơi, acid và aldehyde trong vòng 24-48 giờ. Sự hiện diện của Coliforms trong thực phẩm được xem là nhóm vi sinh vật chỉ thị khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác. Kết quả trong Bảng 2 thể hiện các mật số Coliforms trong các mẫu sản phẩm cơm rượu đều nhỏ hơn 3 MPN/g. Tương tự với *E. coli* thì kết quả cũng cho thấy các mẫu sản phẩm cơm rượu đều có mật số thấp hơn 3 MPN/g. Nguyên nhân có thể là do đây là 1 loại sản phẩm có chứa một lượng cồn và acid nhất định nên đã ức chế sự phát triển của nhóm sinh vật này.

3.3. Kết quả phân lập và xác định hình thái của các dòng nấm mốc từ cơm rượu

Hiện nay, các nghiên cứu về vi sinh vật từ men cơm rượu hay cơm rượu vẫn chưa được quan tâm nhiều và rất ít công bố khoa học rộng rãi. Nghiên cứu của Thư (2015) đã phân lập, tuyển chọn nấm men, nấm mốc từ men cơm rượu được thu thập từ các cơ sở sản xuất tại 5 tỉnh là An Giang, Kiên Giang, Tiền Giang, Cà Mau và Bến Tre. Kết quả đã phân lập thu được 21 dòng nấm men và 11 dòng nấm mốc, trong đó dòng nấm men Y3TG được tuyển chọn làm nguồn men giống do có khả năng lên men rượu cao nhất được chọn sản xuất bột men thuần, dòng nấm mốc M1AG được tuyển chọn làm nguồn mốc giống vì có hoạt tính đường hóa cao nhất được thử nghiệm sản xuất bột mốc.




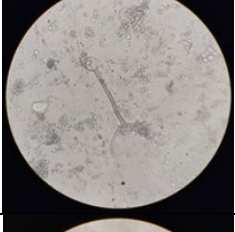
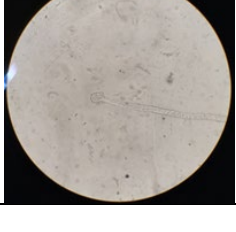
Nghiên cứu này đã tiến hành phân lập các dòng nấm mốc từ sản phẩm cơm rượu và viên men cơm rượu ở 5 cơ sở sản xuất cơm rượu truyền thống, kết quả đã phân lập được 5 dòng nấm mốc và trung bình thu được 1 dòng nấm mốc ở mỗi cơ sở. Bảng 3 trình

bày đặc điểm của các dòng nấm mốc phân lập được từ các mẫu cơm rượu.

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy các chủng nấm mốc được phân lập từ cùng cơ sở có thể có đặc điểm hình thái khác nhau, tuy nhiên một số chủng nấm mốc được phân lập từ các cơ sở khác nhau lại có thể có đặc điểm tương đối giống nhau. Điều này có thể cho thấy có một số dòng nấm mốc thuộc một vài chi nấm chiếm ưu thế trong sản phẩm lên men cơm rượu. Kết

quả có sự tương đồng với kết quả của Thuận và ctv. (2021) đã phân lập được 17 dòng nấm mốc khác nhau từ các mẫu bánh men rượu thu được từ các địa điểm khác nhau thuộc huyện Nga Sơn, tỉnh Thanh Hóa. Ngoài ra, nghiên cứu của Tuấn và ctv. (2017) đã phân lập được 4 dòng nấm mốc từ bánh men lá tại Hà Giang có khả năng phân giải tinh bột và cellulose cao thuộc 2 chi *Aspergillus* và *Mucor* (Tuấn và ctv., 2017).

Bảng 3. Đặc điểm của các dòng nấm mốc được phân lập từ men cơm rượu và cơm rượu

Mẫu cơm rượu	Dòng nấm mốc	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm khuẩn ty và bào tử	Hình ảnh khuẩn ty và bào tử nấm mốc (ở vật kính 40X)
Cô Ba	MCB	Khuẩn ty rất phát triển sau 24 giờ, sau 48 giờ khuẩn ty phát triển mạnh mọc thành chòm, lan rộng mặt đĩa. Khuẩn ty có màu trắng. Mặt của khuẩn lạc có dạng sợi nằm ngang.	Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Bào tử chứa trong túi bào tử được mang bởi cuống bào tử.	
Bà Năm	MBN	Khuẩn ty rất phát triển sau 24 giờ, sau 72 giờ khuẩn ty phát triển mạnh mọc thành chòm, lan rộng mặt đĩa và bắt đầu xuất hiện bào tử. Khuẩn ty có màu trắng, bào tử có dạng hình tròn nhỏ li ti có màu vàng cam. Mặt của khuẩn lạc có dạng sợi nằm ngang.	Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Bào tử đỉnh, không có túi bao bọc.	
Chị Hai	MCH	Khuẩn ty rất phát triển sau 24 giờ, sau 48 giờ khuẩn ty phát triển mạnh mọc thành chòm, lan rộng mặt đĩa và bắt đầu xuất hiện bào tử. Bào tử có dạng hình tròn nhỏ li ti có màu đen. Mặt của khuẩn lạc có dạng sợi nằm ngang.	Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Bào tử chứa trong túi bào tử được mang bởi cuống bào tử.	
Bà Duyên	MBD	Khuẩn ty rất phát triển sau 24 giờ, sau 48 giờ khuẩn ty phát triển mạnh mọc thành chòm, lan rộng mặt đĩa và bắt đầu xuất hiện bào tử. Bào tử có dạng hình tròn nhỏ li ti có màu đen. Mặt của khuẩn lạc có dạng sợi nằm ngang.	Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Bào tử đỉnh, không có túi bao bọc.	
Cô Tâm	MCT	Khuẩn ty rất phát triển sau 24 giờ, sau 48 giờ khuẩn ty phát triển mạnh mọc thành chòm, lan rộng mặt đĩa và bắt đầu xuất hiện bào tử. Bào tử có dạng hình tròn nhỏ li ti có màu đen. Mặt của khuẩn lạc có dạng sợi nằm ngang.	Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn. Bào tử chứa trong túi bào tử được mang bởi cuống bào tử.	

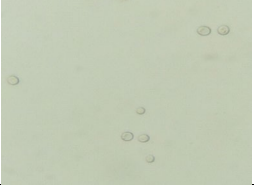
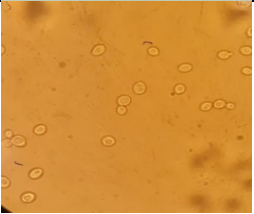
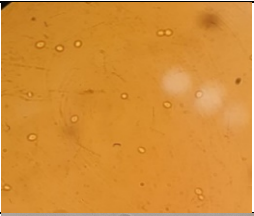
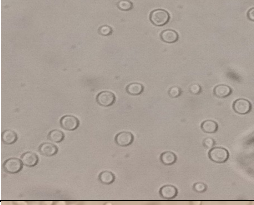
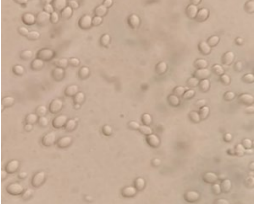
Ở các nước Đông Nam Á, các chủng nấm men và nấm mốc từ các loại “men khởi động” dùng để sản xuất sản phẩm tương tự như cơm rượu của Việt Nam đã được nghiên cứu thông qua việc phân lập và tuyển chọn. Từ 21 mẫu khảo-mak, Daroonpant et al. (2016) đã phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc có đặc tính tốt để lên men khảo-mak thuộc loài *Amylomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. và *Penicillium* sp. Tại Indonesia, “men khởi động” để sản xuất Tapai được gọi là Ragi tapai. Nó thường có hình tròn, khô, màu trắng, có độ dày khoảng 2,5 cm và có chứa hỗn hợp vi sinh vật, bột gạo cũng như các loại gia vị như tiêu, tỏi, quế, ớt (Azmi et al., 2010). Trong đó, nhóm nấm mốc chịu trách nhiệm

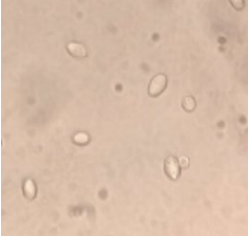

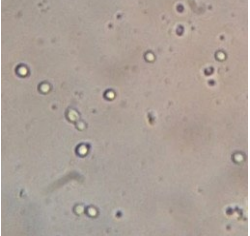

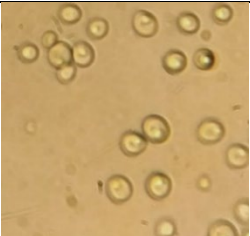
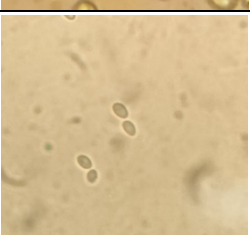
chuyển tinh bột thành đường glucose là *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, *Endomycopsis burtonii*, *Mucor* spp,... cho thấy mức độ đa dạng của các chủng nấm mốc hiện diện trong “men khởi động” của các khu vực có sự khác nhau (Dung et al., 2007).

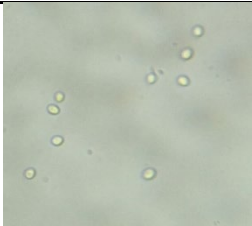
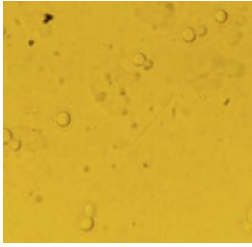
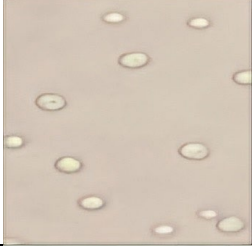
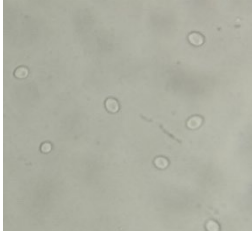
3.4. Kết quả phân lập và xác định hình thái của các dòng nấm men từ cơm rượu

Trong các sản phẩm có chứa cồn thì nấm men đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa đường thành ethanol. Từ các mẫu men cơm rượu và cơm rượu khác nhau, các dòng nấm men đã được phân lập và kết quả một số đặc điểm hình thái được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Đặc điểm của các dòng nấm men được phân lập từ men cơm rượu và cơm rượu

Mẫu cơm rượu	Chủng nấm men	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào	Hình ảnh tế bào nấm men (ở vật kính 40X)
Cô 3	CB1	Tròn, nhô, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Cầu nhỏ, nảy chồi một hướng.	
	CB2	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Oval lớn, nảy chồi một hướng.	
	CB3	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt ướt, bìa nguyên.	Oval nhỏ, nảy chồi một hướng.	
Bà 5	BN1	Tròn, nhô, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Cầu lớn, nảy chồi một hướng.	
	BN2	Tròn, nhô, màu trắng đục, bề mặt ướt, bìa nguyên.	Oval lớn, nảy chồi một hướng.	

Mẫu com rượu	Chủng nấm men	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào	Hình ảnh tế bào nấm men (ở vật kính 40X)
	BN3	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Oval nhỏ, nảy chồi một hướng.	
	CH1	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Cầu lớn, nảy chồi một hướng.	
Chị 2	CH2	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Cầu nhỏ, nảy chồi một hướng.	
	CH3	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Oval lớn, nảy chồi một hướng.	
	BD1	Tròn, màu trắng đục, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Cầu lớn, nảy chồi một hướng.	
Bà Duyên	BD2	Tròn, nhô, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Oval lớn, nảy chồi một hướng.	

Mẫu com rượu	Chủng nấm men	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào	Hình ảnh tế bào nấm men (ở vật kính 40X)
	BD3	Tròn, nhô, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Oval lớn, nảy chồi một hướng.	
	CT1	Tròn, nhô, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Cầu nhỏ, nảy chồi một hướng.	
Cô 8	CT2	Tròn, màu trắng đục, bề mặt trơn láng, bìa nguyên.	Oval lớn, nảy chồi một hướng.	
	CT3	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt ướt, bìa nguyên.	Oval nhỏ, nảy chồi một hướng.	

Kết quả từ Bảng 4 cho thấy 15 dòng nấm men thuần đã được phân lập với 5 nhóm hình dạng tế bào khác nhau bao gồm hình cầu lớn, cầu nhỏ, oval lớn, oval nhỏ. Theo Phạm (2006), tế bào nấm men có hình dạng phổ biến như hình cầu, hình oval, hình elip, hình trụ hoặc đôi khi kéo dài thành hình sợi. Nấm men có thể thay đổi hình dạng và kích thước trong các giai đoạn phát triển và điều kiện môi trường xung quanh, từ đó cho thấy sự đa dạng về hình dạng tế bào của các dòng nấm men phân lập từ com rượu. Theo nghiên cứu của Bình và ctv. (2015) thì các dòng nấm men được phân lập trong các loại men rượu truyền thống được sử dụng phổ biến trên thị trường cũng khá đa dạng về hình dạng. Về hình dạng khuẩn lạc nấm men khi phân lập trên môi trường YPD đều có các đặc điểm chung là tròn đều, bề mặt trơn láng hay xù xì, bìa nguyên hay bìa rặng của với màu sắc chủ yếu là trắng sữa hoặc trắng trong. Khi quan sát dưới kính hiển vi về hình thức

nảy chồi của tế bào nấm men cho thấy tất cả các dòng nấm men này đều nảy chồi một hướng.

Các dòng nấm men hiện diện trong Look-pang (men khởi động) để thực hiện quá trình lên men Binubudan (một sản phẩm truyền thống của Philippine tương tự com rượu của Việt Nam) đã được tìm thấy là *Saccharomycopsis fibuligera* và *Saccharomycopsis capsularis* chịu trách nhiệm cho quá trình đường hóa của tinh bột gạo, trong khi các dòng *Saccharomyces cerevisiae* chịu trách nhiệm lên men sản xuất ethanol. Ngoài ra, một số dòng nấm men khác cũng được tìm thấy trong look-pang (men khởi động của Khao-mak) như *Saccharomycopsis fibuligera*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Wickerhamomyces anomalus* và *Meyerozyma guilliermondii* (Daroonpant et al., 2016). Hay nhóm nấm men chính chuyển glucose thành ethanol

là *Candida useis* và *Saccharomyces cerevisiae* được phân lập từ Ragi tapai (Azmi et al., 2010).

Nhìn chung, việc phân lập các dòng nấm mốc và nấm men trong men cơm rượu và cơm rượu cho thấy sự đa dạng về vi sinh vật và sẽ là tiền đề trong việc chọn lọc những dòng vi sinh có các đặc tính tốt để định hướng sản xuất men thương mại cho hiệu quả sản xuất cao.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá sơ bộ các chỉ tiêu hóa lí và vi sinh của các mẫu cơm rượu từ 5 cơ sở sản xuất tại thành phố Cần Thơ. Các mẫu cơm rượu đều có

hàm lượng ethanol trên 8,7% v/v, hàm lượng acid tổng dao động trong khoảng 3,6-4,5 g/L và mật số Coliforms cũng như *E. coli* trong các mẫu sản phẩm cơm rượu đều thấp hơn 3 MPN/g. Bên cạnh đó, 5 dòng nấm mốc và 15 dòng nấm men đã được phân lập, cho thấy sự đa dạng của hệ vi sinh vật cũng như làm nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về cơ sở vật chất và kinh phí thực hiện của Trường Đại học Cần Thơ và Sở Khoa học và Công nghệ TP. Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M. Á. F., Pérez-Pulido, R., & Gálvez, A. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, 32(2), 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.006>
- Åkerberg, C., Hofvendahl, K., Zacchi, G., & Hahn-Hägerdal, B. (1998). Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied microbiology and biotechnology*, 49, 682-690.
- Azmi, A. S., Ngoh, G. C., Mel, M., & Hasan, M. (2010). Ragi tapai and *Saccharomyces cerevisiae* as potential coculture in viscous fermentation medium for ethanol production. *African Journal of Biotechnology*, 9(42), 7122-7127.
- Bình, L. N., Khánh, T. V., Thảo, H. P., Thành, N. V. (2015). Phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt lực cao từ men rượu. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 39(B), 18-28.
- Bộ Khoa học và Công nghệ. (2008). TCVN 7906:2008. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng vi khuẩn acid lactic ưa nhiệt trung bình - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.
- Bộ Khoa học và Công nghệ. (2010). TCVN 8275-1:2010. Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc - Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95.
- Bộ Khoa học và Công nghệ. (2015). TCVN 11039-1:2015. Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật - Phần 1: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa.
- Bộ Khoa học và Công nghệ. (2015). TCVN 11039-3:2015. Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật - Phần 3: Phát hiện và định lượng Coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (phương pháp chuẩn).
- Daroonpant, R., Tanasupawat, S., & Keeratipibul, S. (2016). Characterization and amylolytic activity of yeast and mold strains from Thai sweet rice. *Malaysian Journal of Microbiology*, 121-131.
- Dung, N. T. P., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2007). Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men). *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.08.004>
- Hesseltine, C. W., Rogers, R., & Winarno, F. G. (1988). Microbiological studies on amylolytic oriental fermentation starters. *Mycopathologia*, 101, 141-155.
- Hong, L., Fu, G., Liu, T., Chen, Y., Wu, S., Cai, W., ... & Wan, Y. (2021). Functional microbial agents enhance ethanol contents and regulate the volatile compounds in Chinese Baijiu. *Food Bioscience*, 44, 101411. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101411>
- Jiang, L., Su, W., Mu, Y., & Mu, Y. (2020). Major metabolites and microbial community of fermented black glutinous rice wine with different starters. *Frontiers in Microbiology*, 11, 523789. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00593>
- Lee, A. C. & Fujio, Y. (1999). Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 51-55. <https://doi.org/10.1023/A:1008897909680>
- Lượng, N. Đ. (1998). *Công nghệ vi sinh vật* (Tập 3- Thực phẩm lên men truyền thống). NXB Đại học Khoa học Kỹ thuật Thành phố Hồ Chí Minh.
- Manosroi, A., Ruksiriwanich, W., Kietthanakorn, B. O., Manosroi, W., & Manosroi, J. (2011). Relationship between biological activities and bioactive compounds in the fermented rice sap. *Food Research International*, 44(9), 2757-2765. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.010>

- Nguyen, L., & Hwang, E. S. (2016). Quality characteristics and antioxidant activity of yogurt supplemented with aronia (*Aronia melanocarpa*) juice. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(4), 330. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.330>
- Nwosu, C. D., & Ojmelukwe, P. C. (1993). Improvement of the traditional method of ogiri production and identification of the microorganisms associated with the fermentation process. *Plant Foods for Human Nutrition*, 43, 267-272. <https://doi.org/10.1007/BF01886229>
- Phẩm, L. Đ. (2006). *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật TP. Hồ Chí Minh.
- Sriariyanun, M., Mutrakulcharoen, P., Tapaamordech, S., Cheenkachorn, K., & Rattanaporn, K. (2019). A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of ethanol in fermentation products. *Oriental Journal of Chemistry*, 35(2), 744-750. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/350234>
- Surojanametakul, V., Panthavee, W., Satmalee, P., Phomkaivon, N., & Yoshihashi, T. (2019). Effect of traditional dried starter culture on morphological, chemical and physicochemical properties of sweet fermented glutinous rice products. *Journal of Agricultural Science*, 11(6), 43-51. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n6p43>
- Thư, N. T. M. (2015). *Phân lập, tuyển chọn nấm men, nấm mốc và sản xuất thử nghiệm bột men com rượu* (Luận văn Thạc sĩ). Trường Đại học Cần Thơ.
- Thuần, N. H., Hạnh, L. T., Khánh, T. Đ., Giang, N. V. (2017). Đặc điểm sinh học của một số chủng nấm mốc phân lập từ bánh men rượu Thanh Hoá. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(3), 322-330.
- Tuần, P. A., Đạt, H. V., Anh, H. T. (2017). Tuyển chọn chủng nấm men, nấm mốc từ bánh men lá ứng dụng trong nâng cao chất lượng rượu làng nghề tại Hà Giang. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6(79), 73-79.
- Wongsa, J., Rungsardthong, V., & Yasutomo, T. (2018). Production and analysis of volatile flavor compounds in sweet fermented rice (Khao Mak). In *MATEC Web of Conferences*, 192, 03044. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201819203044>
- Xu, Y., Jin, Y., Su, J., Yang, N., Xu, X., Jin, Z., ... & Wu, F. (2021). Changes in the nutritional value, flavor, and antioxidant activity of brown glutinous rice during fermentation. *Food Bioscience*, 43, 101273. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101273>
- Yusmarini, Y., Johan, V. S., Fitriani, S., Rahmayuni, R., Artanti, V. F., & Pato, U. (2019). Characteristics of probiotic tapai made by the addition of *Lactobacillus plantarum* 1. *International Journal of Agricultural Technology*, 15(1), 195-206
- Zhao, C., Su, W., Mu, Y., Jiang, L., & Mu, Y. (2020). Correlations between microbiota with physicochemical properties and volatile flavor components in black glutinous rice wine fermentation. *Food Research International*, 138, 109800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109800>
- Zou, J., Chen, X., Wang, C., Liu, Y., Li, M., Pan, X., & Chang, X. (2023). Microbial communities and correlation between microbiota and volatile compounds in fermentation starters of Chinese sweet rice wine from different regions. *Foods*, 12(15), 2932. <https://doi.org/10.3390/foods12152932>