



KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA, KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT LÁ VÀ ỨNG DỤNG SẢN XUẤT BÁNH MEN TRONG SẢN XUẤT RƯỢU MEN LÁ

Nguyễn Văn Huế*, Nguyễn Thị Vân Anh, Huỳnh Thị Kim

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Huế <nguyenvanhue@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 7-1-2021; Ngày chấp nhận đăng: 26-2-2021)

Tóm tắt. Các loại lá để làm bánh men rượu được thu thập ở bản Đá Bàn, xã Ba Nang, huyện Dakrong, tỉnh Quảng Trị. Dịch chiết lá sử dụng để làm bánh men rượu có khả năng kháng oxy hóa ở dạng đơn lẻ hoặc ở dạng hỗn hợp. Trong mười một loại lá khảo sát, dịch chiết lá *ngàn ngành* có khả năng kháng oxy hóa cao nhất với tỷ lệ bắt gốc tự do là 82,32% ở nồng độ 0,2 mg·mL⁻¹, thấp nhất là dịch chiết lá *thuốc lá* (16,17% ở nồng độ 0,2 mg·mL⁻¹). Mẫu hỗn hợp dịch chiết lá có khả năng kháng cao nhất ở cùng nồng độ khảo sát (83,75%). Trong khi đó, chỉ có sáu loại dịch chiết lá trong mười một loại lá khảo sát có khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella*. Bánh men rượu có tỷ trọng khả năng lên men (khả năng sinh CO₂) và nồng độ etanol của rượu sản xuất từ bánh men sản xuất tại phòng thí nghiệm tương đương bánh men thu mua từ người dân xã Đá Bàn.

Từ khóa: bánh men lá, rượu men lá, chất lượng rượu, kháng oxy hóa

Leaf extracts: antioxidant and antibacterial capability and applications in leaf yeast production

Nguyen Van Hue*, Nguyen Thi Van Anh, Huynh Thi Kim

University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

*Correspondence to Nguyen Van Hue <nguyenvanhue@hueuni.edu.vn>

(Submitted: January 7, 2020; Accepted: February 26, 2021)

Abstract. The leaves for making starters were collected from Da Ban village, Ba Nang commune, Dakrong district, Quang Tri province. The leaves extract used to make wine yeast exhibits antioxidant activity individual or in a mixture. Among eleven types of studied extracts, the *ngan ngành* shows the highest resistance to oxidation with a free-radical scavenging rate of 82.32% at a concentration of 0.2 mg·mL⁻¹, while the lowest is the *tobacco* extract (16.17% at a concentration of 0.2 mg·mL⁻¹). The mixed extracts are the most resistant at the same investigated concentration (83.75%). Meanwhile, six of the eleven types of leaves were

resistant to *E. coli* and *Salmonella*. The wine made from the yeast has a density, fermentation capacity (CO₂ production) and its ethanol concentration equivalent to that obtained from people in Da Ban commune.

Keywords: wine yeast, leaf extract, leaf yeast, antioxidant

1 Đặt vấn đề

Bánh men, một dạng của men rượu, là một hỗn hợp bao gồm các vi sinh vật có khả năng thủy phân tinh bột thành đường và lên men dịch đường thành rượu. Các vi sinh vật này có thể là nấm mốc, nấm men và vi khuẩn. Bánh men dùng trong nấu rượu truyền thống được cho là bắt nguồn từ Trung Quốc rồi lan rộng dần sang các nước châu Á. Bánh men ở các quốc gia khác nhau có những tên gọi khác nhau: *chu* ở Trung Quốc, *koji* ở Nhật Bản, *nuruk* ở Hàn Quốc, *murcha* ở Ấn Độ, *ragi* ở Indonesia, *ragi tapai* ở Malaysia và *bubod* ở Philippine [16]. Ở Việt Nam, bánh men cổ truyền được truyền lại từ đời này qua đời khác. Sản xuất bánh men là một bí quyết riêng của mỗi địa phương. Mỗi vùng miền có những loại bánh men riêng của vùng đó. Vùng đồng bằng sông Cửu Long có bánh men thuốc bắc; ở các vùng núi cao như Lạng Sơn có bánh men lá – một sự kết hợp các loại lá và củ quả rừng; rượu Làng Vân, Bắc Giang, nổi tiếng do được nấu từ gạo nếp kết hợp với các vị thuốc quý, v.v.

Chất lượng bánh men được đánh giá thông qua tỷ trọng, khả năng sinh CO₂, nồng độ rượu thu được và chất lượng rượu thành phẩm. Quá trình sản xuất bánh men là lên men yếm khí. Ngoài sự tạo ra nấm men cho quá trình sản xuất rượu còn có sự tham gia của nấm mốc và một số vi sinh vật khác. Từng địa phương có những kỹ thuật làm bánh men khác nhau với những công thức đặc trưng. Nhìn chung, thành phần chính của bánh men là bột gạo hoặc bột nếp. Các địa phương có thể sử dụng những thành phần khác như thuốc bắc hay các loại lá hay quả rừng. Những thành phần này tạo nên hương vị rượu đặc trưng.

Thanh và cs. nghiên cứu 52 mẫu bánh men thu thập ở Việt Nam và phát hiện ra sự có mặt của 13 chủng nấm (kể cả nấm men) và 23 chủng vi sinh vật khác. Đối với bánh men lá thì đến nay có một số nghiên cứu về các loài thảo dược được sử dụng trong bánh men lá cũng như các thông số công nghệ trong quy trình sản xuất rượu men lá đã và đang được thực hiện. Các loài thảo dược khi thêm vào bánh men thường có hoạt tính chống oxy hóa hoặc kháng khuẩn hoặc có cả hai đặc tính nhằm ức chế sự phát triển của các chủng vi sinh vật không hữu ích cho quá trình lên men [24].

Đỗ Tất Lợi đã liệt kê nhiều loài thảo dược thường được sử dụng trong sản xuất bánh men như hạt nhục đậu khấu, thân cây bạch truật và vỏ quế. Nhóm nghiên cứu và ứng dụng tài nguyên thực vật Việt Nam đã nghiên cứu tri thức bản địa trong việc sử dụng các loài cây tạo men rượu của đồng bào các dân tộc Sơn La. Kết quả nghiên cứu cho thấy có đến 22 loài thảo mộc được người dân sử dụng trong việc sản xuất men rượu lá truyền thống [3]. Hợp và cs. đã khảo sát các

loài thảo dược được cộng đồng người Chơ Ro, Đồng Nai, sử dụng làm men rượu và cho thấy 65 loài thực vật được sử dụng, trong đó 24 loài bắt buộc phải có trong bánh men lá [2]. Dung đã nghiên cứu sự ảnh hưởng của 10 loài thảo dược tới sự sinh trưởng của nấm mốc và nấm men trong bánh men rượu [22]. Vương và cs. làm men riêng để lên men rượu từ riêng thu thập tại Ba Đồn, Quảng Bình. Rượu sản phẩm rượu không gây đau đầu. Sản lượng đạt khoảng năm lít rượu thành phẩm từ 8 kg gạo nguyên liệu [13].

Các loại rượu men lá thường êm dịu, thơm nồng và là nét văn hóa riêng của từng cộng đồng dân tộc. Tuy nhiên, những hoạt tính sinh học của các loại lá được dùng làm men lá cũng như ảnh hưởng của dịch chiết lá đến chất lượng bánh men lá ở Ba Nang, Quảng Trị, vẫn chưa được công bố. Việc sử dụng thảo dược trong sản xuất rượu có thể được thực hiện theo hai cách: (1) chiết xuất dịch chiết từ thảo dược và bổ sung vào hỗn hợp trong quá trình lên men; (2) bổ sung vào bánh men [18–20]. Cả hai phương thức này đều nhằm diệt khuẩn và tăng hương vị cho sản phẩm rượu hoặc nâng cao tác dụng của rượu đến sức khỏe người tiêu dùng. Cả hai hình thức này đều rất phổ biến ở các nước châu Á (Ấn Độ, Trung Quốc, Thái Lan, Việt Nam, Philipines, Cambodia, v.v.) và Nam Mỹ (Mexico, Argentina, v.v.). Bánh men được cho là một trong những yếu tố quan trọng quyết định đến chất lượng của rượu. Tuy nhiên, men lá lại mang tính vùng miền rõ rệt do đặc tính địa phương của nguồn nguyên liệu thảo dược trong bánh men nên sản phẩm rượu men lá là rất đa dạng. Một số thảo dược phổ biến ở Thái Lan để lên men rượu là những loài hết sức gần gũi với con người trong cuộc sống hàng ngày như riềng nếp, tỏi, ớt dài, cam thảo, tiêu đen. Chaijamus và cs. đã ứng dụng loại bánh men thảo dược sản xuất từ nếp, riềng, tỏi, ớt, cam thảo và tiêu đen với tỷ lệ 0,5:8:1:4:1 và ứng dụng trong lên men phế phẩm của quá trình này mầm. Kết quả cho thấy khả năng lên men của bánh men tăng lên và tỷ lệ bánh men/lúa này mầm ở mức 150 g/700 g tạo ra etanol trong thành phẩm ở mức cao nhất là 4,08 g rượu/kg [23]. Ảnh hưởng của một số loại nấm mốc trong bánh men đến khả năng lên men rượu gạo Hàn Quốc cũng đã được công bố như bánh men “millet” của Ấn Độ và bánh men Barley [15, 18]. Các kết quả này đều cho thấy hiện tượng ức chế đến hơn 43% enzyme chuyển hóa rượu làm cho nồng độ và chất lượng rượu tăng lên đáng kể sau quá trình lên men. Tsuyoshi và cs. đã phân tích các chủng nấm men trong bánh men marcha (vùng Sikkim, Ấn Độ) và chia thành bốn nhóm: (1) *Saccharomyces bayanus*, (2) *Candida glabrata*, (3) *Pichia anomala*; (4) *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis capsularis* và *Pichia burtonii*. Trong đó, nhóm 1, 2 và 3 thúc đẩy quá trình lên men rượu, nhưng nhóm 4 lại có hoạt động chính là phân giải tinh bột [21].

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Mười một loại lá để làm bánh men rượu, bánh men lá và rượu men lá đã được thu thập từ đồng bào Vân Kiều ở bản Đá Bàn, xã Ba Nang, huyện Dakrong, tỉnh Quảng Trị. Nguyên liệu gạo Khang Dân sử dụng được trồng tại xã Phú Mỹ, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.



Lá Cà Lê Bà Nang



Lá thuốc lá



Lá ngàn ngành



Lá rơ nghiêng



Lá Bông chua



Lá Tần tiêu



Lá Mắt kuông



Lá Py ây



Lá Cờ sọt à luộc

2.2 Phương pháp

Xác định khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết bằng phương pháp DPPH

Cân 2 g từng mẫu lá cho vào bình tam giác, thêm 20 mL etanol 70% và lắc đều trong 48 giờ bằng máy lắc ở nhiệt độ phòng. Sau đó, lọc qua giấy lọc để lấy dịch chiết. Dùng pipet lấy 250 μ L DPPH cho vào các lọ giếng. Lần lượt thêm các mẫu ở nồng độ khác nhau vào lọ giếng với thể tích ở các nồng độ lần lượt là 0,25, 2,5, 25 và 50 μ L. Ủ trong bóng tối 30 phút. Đo độ hấp thụ quang của DPPH tại bước sóng 517 nm. Nồng độ của dịch chiết mẫu là 0,001, 0,01, 0,1 và 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [16].

Tỷ lệ phần trăm hoạt tính chống oxy hóa được xác định theo công thức (1)

$$\% \text{ bất gốc tự do DPPH} = \frac{\text{OD}_c - \text{OD}_m}{\text{OD}_c} \times 100 \quad (1)$$

trong đó OD_c là giá trị mật độ quang của mẫu trắng; OD_m là giá trị mật độ quang của mẫu thử.

Từ tỷ lệ phần trăm hoạt tính bất gốc tự do DPPH, xây dựng phương trình tương quan tuyến tính và xác định giá trị IC_{50} . IC_{50} là lượng chất chống oxy hóa cần thiết để giảm độ hấp thụ của DPPH xuống 50% so với độ hấp thụ ban đầu.

Xác định tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Tính kháng khuẩn của dịch chiết các loại thảo dược được tiến hành theo phương pháp đục lỗ trên đĩa thạch đã được Bauer và cs. mô tả cụ thể như sau [14, 15].

Vi khuẩn *E. coli* và *Samonella sp.* phát triển tốt trong môi trường Lysogeny Broth (LB) nên môi trường này được sử dụng để nuôi hai chủng vi khuẩn và thực hiện thí nghiệm xác định khả năng kháng khuẩn của dịch chiết. Môi trường LB gồm 2% pepton, 1% cao nấm men, 2% NaCl và 2% agar trong nước cất.

Sau khi pha môi trường, tiến hành hấp tiệt trùng tại 121 $^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút, sau đó đổ vào đĩa Petri với thể tích 12 mL cho một đĩa và để nguội.

Sử dụng micropipet hút 100 μ L dung dịch vi khuẩn nhỏ lên bề mặt đĩa thạch sau đó dùng que trải dàn đều. Tiếp theo, sử dụng dụng cụ đục lỗ tạo thành các giếng chứa mẫu trên bề mặt thạch. Sau đó, lấy 300 μ L dịch chiết lá cho vào giếng đã đục. Cho mẫu vào tủ ấm (37 $^{\circ}\text{C}$) và ủ trong 24 giờ rồi tiến hành quan sát sự phát triển của vi sinh vật. Nếu xuất hiện vòng kháng khuẩn thì vi sinh vật đã bị dịch chiết lá ức chế.

Làm bánh men

Bánh men được làm theo phương pháp của đồng bào sở tại. Dựa vào kết quả nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa và kháng khuẩn của dịch chiết các loại lá từ nội dung 1 và 2, chúng tôi

tiến hành ngâm nếp trong năm giờ, sau đó xay thành bột. Cân các mẫu lá theo thành phần nhất định như sau.

– **Công thức 1 (CT1):** ngàn ngành: 0,7 g, mắt kluong: 0,5 g, tần tiêu: 0,2 g, rơ nghiêng: 0,2 g, py ây: 0,2 g, cà lè bà nàng: 0,2 g, thuốc lá: 0,2 g, pliêm cang đan: 0,2 g, bông chua: 0,2 g, riềng 0,2 g, cò sọt à luộc: 0,2 g và ót 0,1 g.

– **Công thức 2 (CT2):** tần tiêu: 0,8 g, pliêm cang đan: 0,3 g, bông chua 0,2 g, mắt kluong: 0,2 g, rơ nghiêng: 0,2 g, ngàn ngành: 0,2 g, cò sọt à luộc: 0,2 g, py ây: 0,2 g, cà lè bà nàng: 0,2 g, thuốc lá: 0,2 g, riềng: 0,1 g, sà: 0,1 g và ót: 0,1 g.

Sau đó, giã nhuyễn từng hỗn hợp lá đã chuẩn bị ở trên trộn với 100 g bột gạo đã xay và vắt thành bánh. Xếp các bánh đã vắt vào thùng kín và ủ trong điều kiện yếm khí. Sau 3–4 ngày lấy bánh men ra và sấy ở 30 °C đến khối lượng không đổi. Bánh men lá được thu nhận từ xã Ba Nang được sử dụng làm mẫu đối chứng (CTM).

Xác định tỷ trọng bánh men

Cho đầy hạt cải dầu vào cốc đong 100 mL và xác định khối lượng. Xác định khối lượng bánh men. Cho bánh men vào cốc và xác định khối lượng cải dầu + cốc + bánh men. Sau đó, lấy bánh men ra và xác định khối lượng cốc + cải dầu còn lại. Từ đó, có thể tính được độ rỗng, khối lượng riêng và tỷ trọng d của bánh men [17].

Khối lượng riêng của hạt cải dầu:

$$\rho_{\text{hạt cải}} = \frac{w}{V} \quad (2)$$

trong đó w là hiệu giữa khối lượng cốc có chứa hạt cải và khối lượng cốc ban đầu (không chứa hạt cải dầu (g); V là thể tích của cốc chứa (mL).

Khối lượng riêng của bánh men:

$$\rho_{\text{bánh men}} = \frac{m}{V} \quad (3)$$

trong đó m là khối lượng của bánh men (g); V là thể tích của hạt cải (mL).

Tỷ trọng của bánh men được tính theo công thức

$$\rho = \frac{\rho_{\text{bánh men}}}{\rho_{\text{hạt cải}}} \quad (4)$$

Khả năng lên men (khả năng sinh CO₂) của bánh men

Giã mịn mẫu men và cho 5 g vào ống Smith, cho nước cất vào ống và nghiêng ống cho đến khi nước đầy nhánh trái để đảm bảo đuổi toàn bộ khí trong nhánh trái. Lắc cho nước thấm đều

và bịt kín nhánh hở bằng bông không thấm nước hoặc tấm parafilm có đột lỗ nhỏ. Cuối cùng, đặt ống lên giá và để vào tủ ấm. Sau 4, 8, 12, 16, 20, 24 và 48 giờ thì đọc thể tích CO₂ sinh ra (Hình 1).

Hàm lượng aldehyde

Hàm lượng aldehyde được xác định bằng phương pháp so màu. Cho phân mẫu thử tác dụng với thuốc thử fucin sulfit và rượu có hàm lượng aldehyde chuẩn. So màu của dung dịch thu được với màu của dung dịch chuẩn [11].

Hàm lượng etanol

Hàm lượng etanol trong rượu được xác định bằng cồn kế.

Hàm lượng metanol

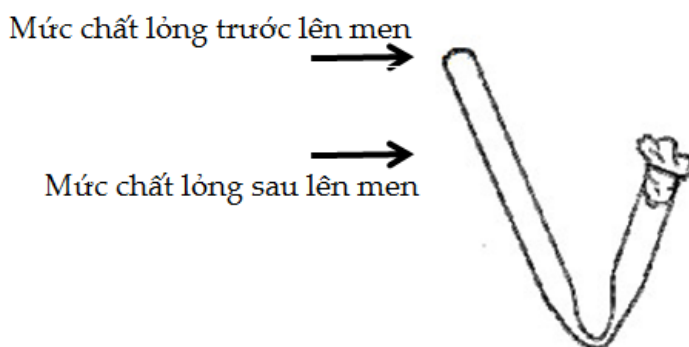
Hàm lượng metanol được xác định bằng phương pháp sắc ký khí và phương pháp so màu [12].

Hàm lượng furfural

Hàm lượng furfural được xác định bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước và đo mật độ quang [10].

Phương pháp cảm quan

Sử dụng phương pháp phép thử cho điểm thị hiếu [7].



Hình 1. Bố trí thí nghiệm khả năng sinh CO₂ (ống lên men Smith) [27]

Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm Excel. Phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (One-way ANOVA) và so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp Tukey (Tukey method) với mức ý nghĩa 95% trên phần mềm thống kê Minitab, phiên bản 18.0.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết mẫu lá

Khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết của 11 loại lá đơn lẻ và hỗn hợp của chúng được biểu thị thông qua phần trăm bắt gốc tự do DPPH (Bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ phần trăm bắt gốc tự do của các dịch chiết ở các nồng độ khác nhau

Tên lá	Phần trăm bắt gốc tự do DPPH (%) theo nồng độ dịch chiết (mg·mL ⁻¹)			
	0,2	0,1	0,01	0,001
Bông chua	59,56 ± 0,51 ^c	47,57 ± 0,44 ^b	4,73 ± 0,25 ^a	4,22 ± 0,19 ^a
Cờ sọt à luộc	17,49 ± 0,25 ^c	11,48 ± 0,34 ^b	0,17 ± 0,02 ^a	0,0753 ± 0,02 ^a
Cà lê bà nàng	25,45 ± 0,60 ^d	16,65 ± 0,34 ^c	3,15 ± 0,2 ^b	0,74 ± 0,03 ^a
Pliem cang đan	45,70 ± 2,02 ^c	25,85 ± 0,26 ^b	9,27 ± 0,32 ^a	7,54 ± 0,32 ^a
Ro nghiêng	47,31 ± 0,29 ^d	32,63 ± 0,05 ^c	17,22 ± 0,27 ^b	2,40 ± 0,36 ^a
Thuốc lá	16,17 ± 0,25 ^d	5,67 ± 0,30 ^c	1,44 ± 0,01 ^b	0,91 ± 0,08 ^a
Riêng	24,70 ± 0,16 ^d	10,57 ± 0,33 ^c	0,49 ± 0,03 ^b	0,016 ± 0,001 ^a
Ngàn ngành	82,32 ± 0,27^d	63,41 ± 0,36^c	22,57 ± 0,10^b	13,55 ± 0,20^a
Mắt kluong	65,3 ± 0,11 ^d	42,66 ± 0,21 ^c	13,34 ± 0,36 ^b	2,72 ± 0,08 ^a
Tần tiêu	16,78 ± 0,17 ^d	12,20 ± 0,32 ^c	3,18 ± 0,10 ^b	0,028 ± 0,02 ^a
Py ây	51,57 ± 0,05 ^d	21,58 ± 0,08 ^c	9,50 ± 0,22 ^b	2,85 ± 0,03 ^a
Hỗn dịch chiết lá	83,75 ± 0,17^d	71,55 ± 0,18^c	33,64 ± 0,17^b	25,83 ± 0,02^a
Vitamin C	98,84 ± 0,17 ^d	82,63 ± 0,14 ^c	60,97 ± 0,29 ^b	43,75 ± 0,29 ^a

Chú ý: Các chữ cái a, b, c, d theo hàng cho biết sự sai khác thống kê ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Bảng 2. Hoạt tính kháng oxy hóa IC₅₀ của mẫu dịch chiết và vitamin C

Mẫu	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)
Bông chua	149
Cờ sọt à luộc	535
Cà lê bà nàng	386
Pliêm cang dan	230
Rơ nghiêng	204
Thuốc lá	675
Riêng	408
Ngàn ngành	91
Mắt kluong	141
Tần tiêu	591
Py ây	203
Hỗn hợp chiết lá	65,7
Vitamin C	6,95

Kết quả Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy khả năng kháng oxy hóa của các dịch chiết tỷ lệ thuận với nồng độ ở tất cả các mẫu và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nồng độ khảo sát. Khả năng kháng oxy hóa giữa các loại dịch chiết có sự khác nhau khá lớn. Trong đó, dịch chiết lá ngàn ngành có khả năng kháng oxy hóa cao nhất với tỷ lệ bắt gốc tự do 82,32% ở nồng độ 0,2 mg·mL⁻¹. Mẫu hỗn hợp dịch chiết lá có khả năng kháng cao nhất ở cùng nồng độ khảo sát. Khả năng kháng oxy hóa của hỗn hợp dịch chiết lá thấp hơn khả năng kháng oxy hóa của vitamin C 13,09 lần. Khả năng kháng oxy hóa phụ thuộc vào một số hợp chất như glutathione, polyphenol, bioflavonoid, carotenoids, hydroxycinnamate cũng như một số vitamin trong thực vật. Nalanda và cs. cũng đã nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết lá *Plumbago zeylanica*, *Thelypteris clarkei* C. F. Reed, *Clerodendrum D. Don*, *Leucas lavandulaefolia* và *Scoparia dulcis* dùng để làm bánh men “wanti” (Ấn Độ). Các tác giả đã sử dụng khả năng bắt gốc tự do DPPH của dịch chiết để đánh giá khả năng kháng oxy hóa. Kết quả cho thấy dịch chiết *L. lavandulaefolia* có khả năng bắt gốc tự do cao nhất ở mức 98,51 ± 0,08% (IC₅₀ = 125,17 µg·mL⁻¹) [20].

3.2 Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết lá

Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết của 11 loại lá đơn lẻ và hỗn hợp được trình bày ở Bảng 3. Mức độ kháng khuẩn của các mẫu dịch chiết lá được xác định dựa trên khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn thể hiện qua đường kính vòng kháng khuẩn trên đĩa Petri. Đường kính của vòng kháng khuẩn càng lớn thì khả năng kháng khuẩn càng cao. Một số dịch chiết lá có khả năng kháng *E. coli* và *Salmonella sp.* Ví dụ, lá cà lê bà nàng có khả năng kháng hai loại vi khuẩn

Bảng 3. Đường kính vòng kháng khuẩn của dịch chiết đối với vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella sp.*

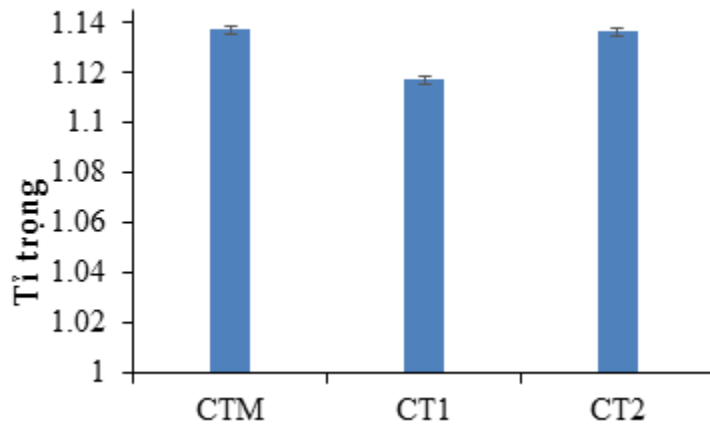
Dịch chiết lá	<i>Escherichia coli</i> (mm)	<i>Salmonella sp.</i> (mm)
Bông chua	–	–
Cò sọt à luộc	–	–
Cà lè bà nàng	6,3	5,4
Pliem cang dang	3,2	2,4
Ro nghiêng	2,4	–
Thuốc lá	–	–
Riềng	–	–
Ngàn ngành	5,4	3,5
Mất kluong	4,3	3,1
Tần tiêu	4,7	3,6
Py ây	–	–
Hỗn hợp dịch lá	13,2	11,4
Etanol	–	–

Chú thích: “–” không quan sát thấy vòng kháng khuẩn.

này cao nhất. Các mẫu dịch chiết khác nhau có khả năng kháng khuẩn khác nhau đối với từng dòng vi khuẩn. Có thể là trong lá có một số hoạt chất có khả năng phá vỡ màng tế bào của vi sinh vật hoặc gây ức chế vi sinh vật. Nalanda và cs. cũng đã nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của dịch chiết lá làm men và kết luận rằng dịch chiết từ lá *S. dulcis* có vòng kháng khuẩn lớn nhất ở mức $41,10 \pm 0,96$ mm và kháng lại *S. aureus* [20]. Das và cs. đã thống kê một số loại lá được dùng làm bánh men ở vùng đông bắc Ấn Độ và kết luận rằng chất lượng của loại bia truyền thống lên men từ gạo phụ thuộc vào loại lá sử dụng. Các loại lá không chỉ mang lại sự khác nhau về màu sắc và mùi vị cho bia mà còn tạo ra sự khác nhau về dược chất có trong bia. Một số loại lá có khả năng ức chế sự phát triển, nhưng một số loại khác lại cung cấp chất dinh dưỡng cho vi sinh vật trong bánh men phát triển [16]. Căn cứ vào kết quả nghiên cứu này và những nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã điều chỉnh tỷ lệ một số loại lá theo hướng tăng tỷ lệ lá có khả năng kháng khuẩn và kháng oxy hóa cao nhưng vẫn duy trì đầy đủ các loại lá trong thành phần (gạo và 11 loại lá) so với phương pháp truyền thống của người dân bản địa để lưu giữ hương vị truyền thống.

3.3 Ảnh hưởng của loại bánh men đến tỷ trọng bánh men

Với thể tích cốc đong là 100 mL và khối lượng của cốc là 53,54 g, khối lượng riêng của hạt cải dầu tính được là $0,715 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tỷ trọng các loại bánh men lá được trình bày trên Hình 2. Có thể thấy không có sự sai khác về mặt tỷ trọng giữa các loại bánh men trong nghiên cứu này. Các giá trị của tỉ trọng lần lượt là 1,13, 1,11 và 1,13 tương ứng với bánh men CTM, CT1 và CT2.

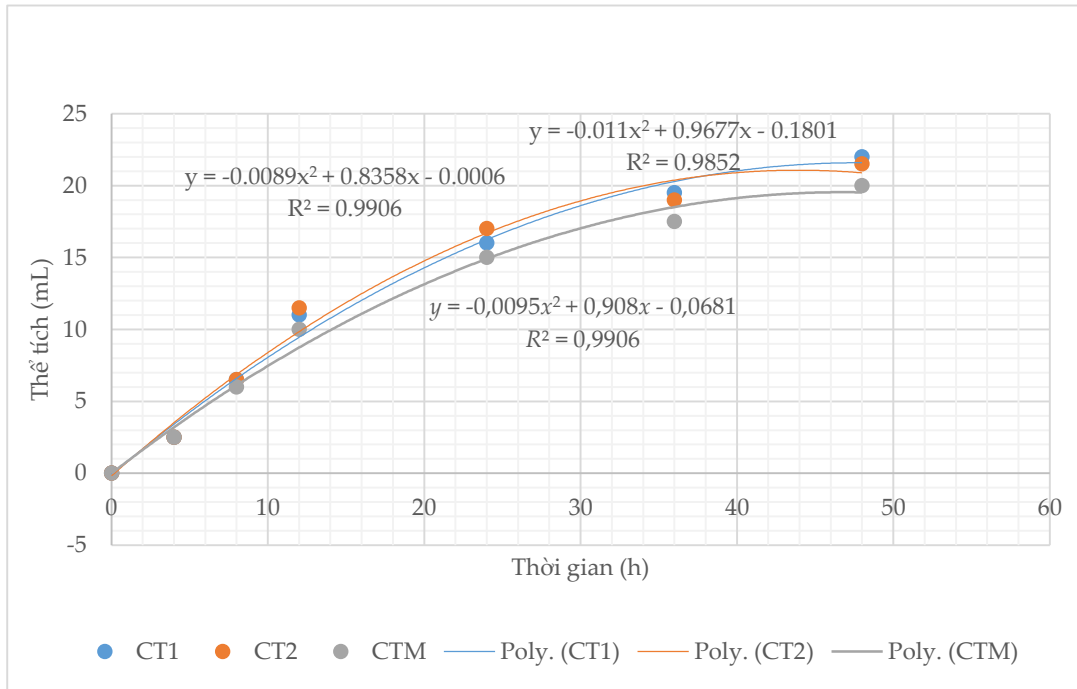


Hình 2. Tỷ trọng các loại bánh men lá

3.4 Ảnh hưởng của loại bánh men đến hàm lượng CO₂ sinh ra

Khả năng lên men của vi sinh vật trong bánh men được thể hiện thông qua khả năng sinh CO₂ trong quá trình lên men. Khả năng sinh CO₂ của bánh men làm theo công thức CT1 và CT2 và bánh men lá thu được từ người dân bản Đá Bàn được trình bày trên Hình 3.

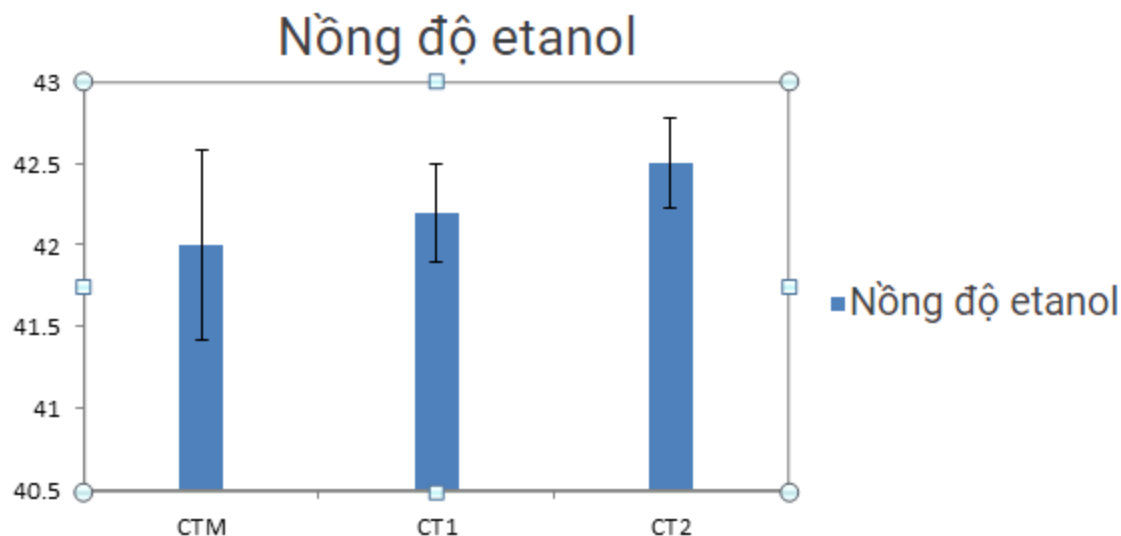
Thể tích CO₂ sinh ra tăng theo thời gian lên men. Giữa các công thức khác nhau, thể tích CO₂ sinh ra sau 48 giờ là tương đương nhau. Như vậy, có thể kết luận rằng khả năng lên men của các loại bánh men nghiên cứu là tương đương nhau.



Hình 3. Khả năng sinh CO₂ của bánh men

3.5 Ảnh hưởng của loại bánh men đến nồng độ etanol

Bánh men từ bản Đá Bàn và bánh men sản xuất ở phòng thí nghiệm (CT1 và CT2) được sử dụng để sản xuất rượu thử nghiệm. Tám gam bánh men được trộn với 2 kg gạo đã nấu chín (com) rồi ủ trong chín ngày và đem chưng cất thành rượu. Sau đó, xác định nồng độ etanol. Kết quả cho thấy rằng nồng độ etanol của hai mẫu rượu chưng cất theo công thức phòng thí nghiệm tương đương với nồng độ etanol trong mẫu rượu sản xuất từ bánh men của người dân bản Đá Bàn (CTM: 42%, CT1: 42,2%, CT2: 42,5%).



Hình 4. Nồng độ etanol của các công thức bánh men khác nhau

3.6 Kết quả phân tích hàm lượng metanol, aldehyde và furfurol

Metanol là alcohol đơn giản nhất với công thức CH_3OH [6]. Trong rượu chưng cất, metanol có nguồn gốc từ sự phân giải các đại phân tử trong quá trình lên men như hemicellulose, pectin, lignin và xylan. Bản thân metanol ít độc, nhưng các chất chuyển hóa của nó lại rất độc. Khi vào cơ thể, metanol bị ADH chuyển hóa, tạo ra formaldehyde (độc gấp 33 lần metanol). Hàm lượng metanol vượt quá chỉ tiêu cho phép có thể dẫn đến ngộ độc cho người sử dụng [8].

Các aldehyde sinh ra trong quá trình lên men bay hơi trước etanol và nằm trong dịch cất đầu của quá trình chưng cất. Sự có mặt của aldehyde trong rượu sẽ làm tăng độc tính cho sản phẩm. Khi vào cơ thể, aldehyde có khả năng gắn kết với các protein và DNA của tế bào gan gây tổn thương tế bào, làm tăng quá trình tạo xơ và dẫn tới xơ gan [8]. Aldehyde là tạp chất luôn có mặt trong các sản phẩm rượu và có thể điều chỉnh được trong quá trình chế biến.

Furfurol trong rượu hình thành từ quá trình dehydrate hóa các pentose, chủ yếu là xylose khi lên men (xylose là sản phẩm phân hủy của hemicellulose và là sản phẩm chuyển hóa của glucose qua nhiều bước) [5]. Nhiệt độ sôi của furfurol là $161,7^\circ\text{C}$. Furfurol là chất gây ung thư. Sự có mặt của furfurol trong rượu chưng cất có thể do dịch lên men có hàm lượng furfurol cao, quá trình chưng cất diễn ra dài, nhiệt độ chưng cất cao, v.v. [25].

Kết quả phân tích hàm lượng các chất trong rượu thành phẩm của sản phẩm người dân, mẫu rượu CT1 và CT2 được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích các chỉ tiêu rượu thành phẩm

Tên mẫu	Metanol (%V/V etanol 100%)	Aldehyde (mg·L ⁻¹ etanol 100%)	Furfurol (mg·L ⁻¹ etanol 100%)
CTM	Không phát hiện	141,57 ^b	1,77 ^a
CT1	Không phát hiện	100,00 ^c	2,54 ^b
CT2	Không phát hiện	240,47 ^A	4,39 ^c

Ghi chú: Các chữ cái A, B, C, D cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$. Các chữ cái a, b, c, d cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 4 cho thấy metanol không xuất hiện trong tất cả các sản phẩm rượu. Theo TCVN 7043:2013, hàm lượng metanol trong một lít etanol 100% không được vượt quá 2000 mg [9]. Tuy nhiên, aldehyde và furfurol tồn tại trong các sản phẩm rượu. Theo TCVN thì hàm lượng aldehyde trong rượu trắng chưng cất là tự công bố, nhưng theo rượu trắng pha chế thì hàm lượng aldehyde không được lớn hơn 5 mg·L⁻¹ etanol 100% tính theo acetaldehyde [9]. Trong các mẫu rượu phân tích ở trên thì hàm lượng aldehyde đều vượt quá mức cho phép so với rượu trắng pha chế. Furfurol là hóa chất không được phép tồn tại trong rượu trắng pha chế, còn trong rượu trắng chưng cất thì không được nhắc đến [9]. Các mẫu rượu ở trên đều chứa furfurol và đều ở hàm lượng khá cao. Mẫu rượu của người dân có hàm lượng furfurol thấp nhất. Tiếp đến là mẫu CT1 và mẫu CT2. Aldehyde và furfurol khi vào cơ thể đều là chất độc, do đó cần tiến hành nghiên cứu để loại bỏ các chất này để có thể phát triển sản phẩm và bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

3.7 Kết quả đánh giá cảm quan

Để đánh giá chất lượng sản phẩm, chúng tôi tiến hành thực hiện đánh giá cảm quan giữa sản phẩm thí nghiệm với sản phẩm của người dân bằng phương pháp cho điểm thị hiếu [7] để so sánh về các chỉ tiêu và đánh giá xem người dùng ưa thích sản phẩm nào hơn. Kết quả đánh giá được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5 cho thấy giữa sản phẩm của người dân và sản phẩm thí nghiệm không có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ở chỉ tiêu màu sắc và độ trong. Còn ở chỉ tiêu mùi, vị thì sản

Bảng 5. Kết quả đánh giá cảm quan

Mẫu	Màu sắc và độ trong	Mùi	Vị
CTM	7,7a	8,4b	8,3b
CT1	8,2a	9,0a	9,0a
CT2	7,8a	8,3b	8,3b

Ghi chú: Các chữ cái a, b trong cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$.

phẩm thí nghiệm CT1 có chất lượng mùi, vị cao hơn và có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,05$ so với hai mẫu còn lại.

4 Kết luận

Dịch chiết lá sử dụng để làm bánh men lá có khả năng kháng oxy hóa và kháng khuẩn. Trong đó, lá ngàn ngành có khả năng bắt gốc tự do DPPH cao nhất (82,32% ở nồng độ 0,2 mg·mL⁻¹). Dịch chiết lá *cà lè bà nằng* có khả năng kháng khuẩn cao nhất (6,3 mm đối với *E. coli* và 5,4 mm đối với *Salmonella sp.*). Bánh men sản xuất từ các loại lá thu nhận được từ bản Đá Bàn có tỷ trọng và khả năng lên men tương đương với bánh men do người dân sản xuất. Nồng độ etanol của rượu sản xuất từ bánh men tại phòng thí nghiệm tương đương với nồng độ etanol của rượu sản xuất từ bánh men thu mua từ người dân và đạt nồng độ etanol khoảng 42%. Tất cả các sản phẩm rượu đều không chứa metanol nhưng chứa aldehyde và furfural. Không có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê về chỉ tiêu màu sắc và độ trong giữa sản phẩm của người dân và sản phẩm thí nghiệm. Sản phẩm thí nghiệm CT1 có chất lượng mùi, vị cao nhất.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ của đề tài cấp Bộ mã số B2019-DHH-06.

Tài liệu tham khảo

1. Lê Phan Thùy Hạnh, Trần Quyết Thắng, Lê Trung Thiên (2017), So sánh hàm lượng và hoạt tính kháng oxy hóa riêng của polyphenol trích ly từ 4 loại hạt trái cây, *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm*, 11, 44–51.
2. Nguyễn Văn Hợp, Nguyễn Thị Lương và Đoàn Thị Thảo (2017), *Tri thức bản địa về sử dụng thực vật làm men rượu của cộng đồng Chơ Ro tại khu bảo tồn thiên nhiên - văn hóa Đông Nai, Tỉnh Đồng Nai*, Hội nghị Khoa học toàn Quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 7.
3. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Thời đại.
4. Trần Như Khuyên, Hoàng Xuân Anh (2007), *Giáo trình Công nghệ bảo quản và chế biến lương thực*, Nxb. Hà Nội.
5. Nguyễn Minh Thảo (2004), *Hóa học các hợp chất dị vòng*, Nxb. Giáo dục.
6. Nguyễn Đình Thành (2010), *Cơ sở hóa học hữu cơ*, Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.
7. Hà Duyên Tư (2006), *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*, Nxb. Khoa học & Kỹ thuật.
8. Phan Thị Xuân (2010), *Ngộ độc ethanol và ngộ độc methanol*, Bộ môn Hồi sức cấp cứu chống độc, Bệnh viện Chợ Rẫy, T.P. Hồ Chí Minh.
9. TCVN 7043:2013, "Rượu trắng".

10. TCVN 7886:2009, "Rượu chưng cất - Xác định hàm lượng Furfural".
11. TCVN 8009:2009, "Rượu chưng cất - Xác định hàm lượng andehyt".
12. TCVN 8010:2009, "Rượu chưng cất - Xác định hàm lượng methanol".
13. Nguyễn Đức Vương, Phạm Nam Giang, Trần Thanh Hằng, Trần Hữu Trung, Nguyễn Thị Mỹ Hằng và Đinh Thị Hồng (2015), Làm men Riêng lên men rượu từ Riêng tại phường Quảng Long, thị xã Ba Đồn, tỉnh Quảng Bình, *Tạp chí thông tin và khoa học Quảng Bình*, 4, 43–45.
14. Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. & Turck M. (1966), Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American journal of clinical pathology*, 45(4), 494–496.
15. Brand Williams W., Cuvelier M. E. & Berset. (1995), Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
16. Das A. J., Deka S. C, Miyaji T. (2012), Methodology of rice beer preparation and various plant materials used in starter culture preparation by some tribal communities of North-East India: A survey, *International Food Research Journal*, 19(1), 101–107.
17. Fabienne Rabier, Michae Temmerman, Thorsten Bo, Hans Hartmannb, Peter Daugbjerg Jensen, Josef Rathbauer, Juan Carrasco, Miguel Fernandez (2006), Particle density determination of pellets and briquettes, *Biomass and Bioenergy*, 30, 954–963.
18. Jovanovic S. V., Steenken S., Hara Y., & Simic M. G. (1996), Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity, *Journal of the Chemical Society*, 11, 2655–2657.
19. Mooha Lee, Meron Regu, Semeneh Seleshe. (2015), Uniqueness of Ethiopian traditional alcoholic beverage of plant origin, tella, *Journal of Ethnic Food*, 2(3), 110–114.
20. Nalanda Bala Murugan, Birendra Kumar Mishra and Biswajit Paul (2018), Antioxidant and antibacterial evaluation of medicinal plants used in the starter culture (Wanti) of fermented rice beverage in West Garo hills, Meghalaya, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 1669–1674.
21. Naoko Tsuyoshi, Ryosuke Fudou, Shigeru Yamanaka, Michio Kozaki, Namrata Tamang, Saroj Thapa, Jyoti P. Tamang (2005), Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amyolytic fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 99(2), 135–146.
22. Ngo Thi Phuong Dung (2004), Defined fungal starter granules for purple glutinous rice wine, *Wageningen University, The Netherlands*.
23. Sirilux Chaijamrus, Buncha Mouthung (2011), Selection of Thai starter components for ethanol production utilizing malted rice from waste paddy, *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 33(2), 163–170.

24. Vu Nguyen Thanh, Le Thuy Mai và Duong Anh Tuan (2008), Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE, *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 268–273.
25. Zeitsch K. J. (2000), *The Chemistry and Technology of Furfural and its Many By-Products*, Elsevier Science B. V., 13.
26. Zhang H. Y. & Ji H. F. (2006), How vitamin E scavenges DPPH radicals in polar protic media, *New journal of chemistry*, 30, 503–504.
27. Egorov N.X. (1983), *Thực tập Vi sinh vật*, Nxb. Mir, Maxcova. Nguyễn Lâm Dũng dịch, Nxb. ĐH&THCN, Hà Nội.