

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEASTS FROM MAPRANG (*Bouea macrophylla* Griffith) IN CAN THO AND VINH LONG

Le Tri An*, Dang Thi Dieu Thu, Nguyen Thi Ngoc Yen, Tran Thi Thanh Van,
 Nguyen Phuc Huy, Doan Thi Kieu Tien, Le Vu Lan Phuong
 Can Tho University of Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/5/2023 Revised: 13/6/2023 Published: 13/6/2023	The study was performed to isolate and select yeast strains which show strong fermentation activity from maprang fruits. The following experiments were included: (i) isolation of yeasts from maprang fruits; (ii) determination of physiological and biochemical features of isolated yeast strains; (iii) fermentation test for selection of a yeast strain which has the best fermentation activity; (iv) molecular biological identification of the selected yeast strain. As a result, 17 yeast strains were isolated from 7 samples of maprang fruits growing in Vinh Long and Can Tho. Three genera of yeasts were identified on the basis of physiological and biochemical features including <i>Saccharomyces</i> (5 strains), <i>Pichia</i> (7 strains) and <i>Hanseniaspora</i> (5 strains). In the fermentation experiment with initial parameters including 24°Bx, pH of 4.5, yeast number of 10 ⁶ cell/mL, 30 ± 2°C for 11 days, the strain named CT1.4 (<i>Saccharomyces</i>) gave highest ethanol level (12% v/v) and lowest final Brix (7°Bx). Molecular identification using Sanger sequencing method showed that CT1.4 belonged to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (99.91%).
KEYWORDS Yeast Isolation Ethanol <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Maprang	

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN NẤM MEN TỪ QUẢ THANH TRÀ TẠI CẦN THƠ VÀ VĨNH LONG

Lê Trí Ân*, Đặng Thị Diệu Thu, Nguyễn Thị Ngọc Yến, Trần Thị Thanh Vân,
 Nguyễn Phúc Huy, Đoàn Thị Kiều Tiên, Lê Vũ Lan Phương
 Trường Đại học Kỹ thuật – Công nghệ Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/5/2023 Ngày hoàn thiện: 13/6/2023 Ngày đăng: 13/6/2023	Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn dòng nấm men thuần chủng có hoạt tính lên men tốt từ quả thanh trà. Các nội dung được tiến hành như sau: (i) phân lập các dòng nấm men từ quả thanh trà; (ii) khảo sát các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các dòng nấm men phân lập được; (iii) thử nghiệm lên men rượu để xác định dòng nấm men có khả năng lên men tốt nhất; (iv) định danh bằng phương pháp sinh học phân tử với dòng nấm men có hoạt lực lên men cao nhất. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 17 dòng nấm men từ 7 mẫu thanh trà (từ tỉnh Vĩnh Long và thành phố Cần Thơ). Dựa vào khóa phân loại nấm men, các dòng nấm men đã phân lập được định danh sơ bộ thuộc 3 chi: <i>Saccharomyces</i> (5 dòng), <i>Pichia</i> (7 dòng) và <i>Hanseniaspora</i> (5 dòng). Trong đó, dòng nấm men CT1.4 thuộc chi <i>Saccharomyces</i> khi lên men với các thông số kỹ thuật 24°Bx, pH 4,5, mật độ nấm men 10 ⁶ tế bào/mL, thời gian lên men là 11 ngày ở nhiệt độ 30 ± 2°C trong điều kiện kỵ khí cho kết quả hàm lượng ethanol cao nhất (12% v/v), độ Bx giảm thấp nhất (7°Bx). Kết quả định danh dòng nấm men CT1.4 bằng phương pháp giải trình tự Sanger đã xác định được dòng CT1.4 tương đồng với <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (99,91%).
TỪ KHÓA Nấm men Phân lập Rượu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Thanh trà	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7905>

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

1. Giới thiệu

Cây thanh trà (*Bouea macrophylla* Griffith) là một loài cây ăn trái nhiệt đới cùng họ với cây xoài (*Anacardiaceae*) [1]. Ở các quốc gia Đông Nam Á, những bộ phận khác nhau của cây thanh trà (thân, lá, quả và cả hạt) được sử dụng như thảo dược để điều trị đau đầu, tiểu đường, kháng khuẩn...[2]. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy các hợp chất polyphenol và tannin có trong quả thanh trà mang hoạt tính chống oxy hóa, chống ung thư, chống tăng đường huyết, chống lão hóa và kháng khuẩn [3], [4]. Tại Việt Nam, thanh trà được trồng chủ yếu ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long, trong đó phổ biến nhất là ở huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Tuy nhiên, do đặc điểm chỉ có một mùa trong năm (khoảng tháng hai đến tháng tư hàng năm), hơn nữa quả thanh trà khá nhanh hư hỏng nên người tiêu dùng không thể sử dụng thường xuyên.

Quả thanh trà đã được nghiên cứu chế biến thành dạng mứt đông bổ sung vào sữa chua [5] và nghiên cứu lên men rượu vang thanh trà sử dụng chủng nấm men tự nhiên phân lập từ chính quả thanh trà [6]. Điều kiện lên men đã được tối ưu hóa bằng phương pháp bề mặt đáp ứng và cho thấy với mật số nấm men chủng 5.5A là 10^5 tế bào/mL, dịch lên men được điều chỉnh đến pH = 4,0, hàm lượng chất khô hòa tan tổng số là 24°Bx, sản phẩm thu được có độ cồn là 13,52% (v/v) và đạt tiêu chuẩn chất lượng quốc gia TCVN 7045: 2013 [7]. Kết quả từ các nghiên cứu trên tạo nền tảng cho việc phân lập, tuyển chọn nấm men từ quả thanh trà và ứng dụng vào lên men rượu vang thanh trà. Tuy nhiên, các tác giả chủ yếu dùng nguồn nguyên liệu thanh trà từ Vĩnh Long, chưa đa dạng nguồn nguyên liệu thanh trà ở các địa phương khác, điển hình như Cần Thơ. Do đó, nhằm khảo sát sự đa dạng nguồn vi sinh vật được phân lập từ quả thanh trà, nghiên cứu “Phân lập và tuyển chọn nấm men từ quả thanh trà tại Cần Thơ và Vĩnh Long” đã được thực hiện, làm cơ sở để ứng dụng các nấm men tự nhiên này vào sản phẩm thực phẩm và đồ uống.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương tiện nghiên cứu

Quả thanh trà được thu mua tại 3 vườn ở tỉnh Vĩnh Long và 4 vườn ở thành phố Cần Thơ, lựa chọn những quả chín vỏ có màu vàng tươi hoặc cam, quả căng tròn, mọng nước, thịt quả có màu vàng da cam và mùi vị thơm đặc trưng, không dập nát hoặc hư hỏng. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV002 (Trung Quốc) được mua từ Công ty TNHH thương mại và dịch vụ xuất nhập khẩu Thành Mỹ (Cần Thơ).

2.2. Phân lập nấm men từ thanh trà

Khoảng 2 – 3 g vỏ quả thanh trà được cho vào bình tam giác có chứa 100 mL môi trường YPD (D – glucose 2%, peptone 2%, yeast extract 1%, tetracycline 10% dung dịch) để tiến hành tăng sinh ở nhiệt độ phòng với vận tốc máy lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ. Dịch tăng sinh được pha loãng và cấy trải trên môi trường YPD bổ sung agar 2%, sau đó được tách rời và làm thuần, kiểm tra độ thuần, cấy vào ống thạch nghiêng và bảo quản ở 4°C [8].

2.2.1. Khảo sát đặc điểm hình thái và đặc điểm nảy chồi của các dòng nấm men phân lập

Đặc điểm hình thái và đặc điểm nảy chồi của các dòng nấm men đã phân lập được quan sát bằng tiêu bản giọt ép dưới kính hiển vi quang học vật kính X100.

2.2.2. Khảo sát khả năng lên men glucose và saccharose của các dòng nấm men phân lập

Các dòng nấm men đã phân lập và dòng nấm men đối chứng RV002 được tăng sinh trong bình tam giác có chứa 100 mL môi trường YPD ở nhiệt độ phòng với vận tốc máy lắc 150 vòng/phút trong 48 giờ, đến khi mật độ tế bào nấm men đạt 10^8 tế bào/mL. Sau đó, 1 mL dịch nấm men đã tăng sinh được cho vào các ống nghiệm chứa 9 mL dung dịch glucose 2% hoặc saccharose 2% cùng với chuông Durham đã được khử trùng ở 115°C/1 atm trong 15 phút. Các ống nghiệm được cho lên men ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 48 giờ. Chiều cao cột khí CO₂ sinh ra

trong chuồng Durham được bắt đầu đo sau 4 giờ kể từ khi bắt đầu thí nghiệm và sau đó mỗi lần đo cách nhau 4 giờ.

2.2.3. Khảo sát khả năng phân giải urea của các dòng nấm men phân lập

Các dòng nấm men đã phân lập được tăng sinh trong môi trường YPD trên máy lắc ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ đến khi mật độ tế bào nấm men là 10^8 tế bào/mL. Sau đó 0,5 mL dịch tăng sinh được bổ sung vào ống nghiệm chứa 4,5 mL môi trường Christensen Urea Broth (nước cất 1000 mL, urea 20 g, Na_2HPO_4 9,5 g, K_2HPO_4 9,1 g, yeast extract 0,1 g, phenol red 0,01 g và điều chỉnh pH $6,7 \pm 0,2$ [9], khử trùng ở $115^\circ\text{C}/1$ atm trong 15 phút), các ống nghiệm được ủ ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 1 tuần. Kết quả dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ sẫm [10].

2.3. Thử nghiệm lên men rượu quả thanh trà bằng dòng nấm men được tuyển chọn

Các dòng nấm men phân lập có hoạt tính lên men tốt nhất được chọn để thử nghiệm lên men rượu vang thanh trà, so sánh với dòng nấm men thương mại (RV002). Để tiến hành lên men, 1 mL dịch nấm men (mật độ 10^8 tế bào/mL) được bổ sung vào 99 mL dịch quả với các thông số kỹ thuật: tỷ lệ pha loãng 1:1, 24°Bx , pH 4,5. Hỗn hợp được lên men ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ với điều kiện kỵ khí, đến khi kết thúc quá trình lên men. Sản phẩm sau lên men được phân tích độ pH, độ Bx và độ rượu (% v/v).

2.4. Định danh dòng nấm men có hoạt lực lên men cao

Dòng nấm men có khả năng lên men tốt nhất được chọn để giải trình tự đoạn gene đặc thù bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGGG-3') và ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATAGC-3') [11]. Mức độ tương đồng của trình tự được giải được so sánh với trình tự của dòng nấm men trên cơ sở dữ liệu NCBI sử dụng chương trình Nucleotide Blast.

2.5. Các chỉ tiêu phân tích và xử lý thống kê

Độ pH được xác định bằng pH kế (Đức), độ Bx được xác định bằng khúc xạ kế (Nhật Bản), hàm lượng ethanol sinh ra được xác định bằng hệ thống chưng cất và hiệu chỉnh về 20°C [12]. Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và phần mềm thống kê Minitab 16.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm hình thái và đặc điểm nảy chồi của các dòng nấm men đã phân lập

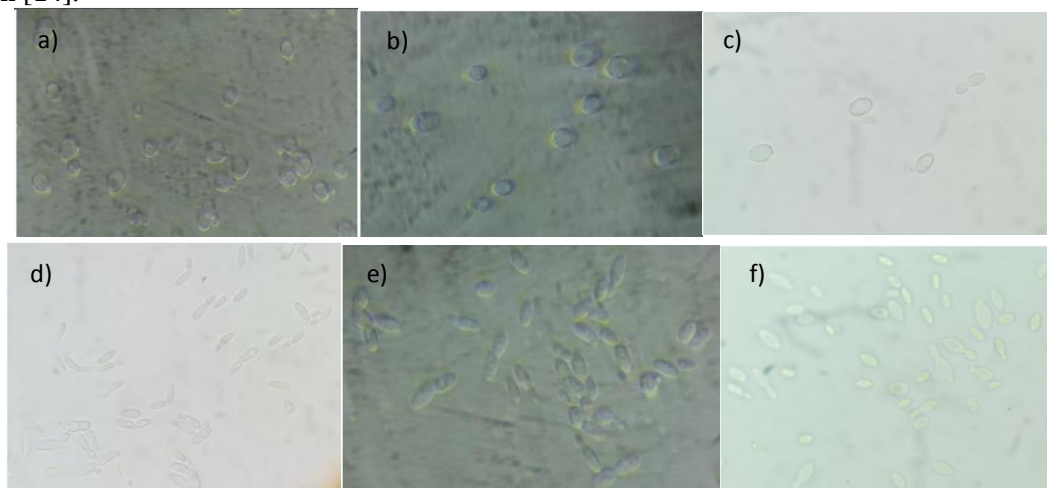
Thanh trà được thu mua ở 7 địa điểm khác nhau ở tỉnh Vĩnh Long và thành phố Cần Thơ, được xếp thành 6 nhóm hình dạng tiêu biểu và được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Số lượng và hình dạng nấm men của các mẫu thu được ở bảy địa điểm khác nhau ở tỉnh Vĩnh Long (VL) và thành phố Cần Thơ (CT)

STT	Địa điểm	Hình dạng tế bào nấm men						Số dòng
		Cầu lớn	Cầu nhỏ	Oval	Elip dài	Elip ngắn	Elip nhọn	
1	VL1	0	0	VL1.1	0	0	VL1.2	2
2	VL2	0	0	VL2.1	0	0	VL2.2	2
3	VL3	0	0	0	VL3.1	0	VL3.2	2
4	CT1	0	CT1.4	0	0	CT1.2; CT1.3	CT1.1	4
5	CT2	0	CT2.2	0	0	CT2.1	0	2
6	CT3	0	0	0	0	CT3.1; CT3.2	0	2
7	CT4	CT4.1	0	0	0	CT4.2; CT4.3	0	3
Tổng		1	2	2	1	7	4	17

Hình dạng tế bào tiêu biểu cho các nhóm được thể hiện ở Hình 1. Với kết quả thu được 17 dòng nấm men, có 2 nhóm hình dạng gồm elip ngắn (7 dòng) và elip nhọn (4 dòng) chiếm đa số trong số các dòng nấm men phân lập được. Trong 7 địa điểm thu mẫu, vườn số 4 (Cần Thơ) là địa điểm có sự đa dạng về hình dạng tế bào nấm men nhất và ngược lại vườn số 6 có ít sự đa

dạng hơn về hình dạng tế bào nấm men. Tại mỗi địa điểm thu mẫu đều có những hình dạng, kích thước khuẩn lạc và tế bào nấm men khác nhau, đặc trưng cho từng địa điểm thu mẫu. Từ kết quả nhận thấy đặc điểm của các nấm men được phân lập từ quả thanh trà khá đa dạng, tương tự như các nghiên cứu trước trên thanh trà ở Vĩnh Long [6], măng cầu xiêm [10], trái giắc [13] và hồng xiêm [14].



Hình 1. Hình dạng tế bào các dòng nấm men

a) cầu lớn; b) cầu nhỏ; c) oval; d) elip dài; e) elip ngắn; f) elip nhọn

Quan sát đặc điểm nảy chồi của 17 dòng nấm men dưới kính hiển vi nhận thấy các dòng nấm men phân lập được đều có khả năng nảy chồi với hai hình thức: nảy chồi nhiều hướng gồm nhóm cầu lớn (CT4.1), cầu nhỏ (CT1.4; CT2.2), oval (VL1.1; VL2.1) và nảy chồi lưỡng cực gồm nhóm elip dài (VL3.1), elip ngắn (CT1.2; CT1.3; CT2.1; CT3.1; CT3.2; CT4.2; CT4.3), elip nhọn (VL1.2; VL2.2; VL3.2; CT1.1). Các đặc điểm hình thái và đặc điểm nảy chồi này góp phần giúp phân loại sơ bộ các dòng nấm men.

3.2. Khả năng lên men đường glucose 2%

Khả năng lên men đường glucose 2% của các dòng nấm men đã phân lập trong thời gian khảo sát 48 giờ được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Chiều cao cột khí CO₂ (mm) trong chuông Durham của các dòng nấm men phân lập trong dung dịch đường glucose 2% trong thời gian khảo sát 48 giờ

Dòng nấm men	Thời gian lên men (giờ)											
	4 giờ	8 giờ	12 giờ	16 giờ	20 giờ	24 giờ	28 giờ	32 giờ	36 giờ	40 giờ	44 giờ	48 giờ
VL1.1	15,0	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7	20,7
VL1.2	0	3,3	10,3	20,3	25,0	-	-	-	-	-	-	-
VL2.1	13,3	22,0	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VL2.2	0	4,3	12,0	20,7	25,0	-	-	-	-	-	-	-
VL3.1	0	4,0	11,0	20,3	25,0	-	-	-	-	-	-	-
VL3.2	0	2,7	7,6	19,3	25,0	-	-	-	-	-	-	-
CT1.1	0	13,0	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT1.2	0	0	0	0	0,7	2,0	6,0	10,0	14,7	21,7	25,0	-
CT1.3	0	0	0	2,7	7,0	12,7	18,0	22,0	25,0	-	-	-
CT1.4	0,7	10,0	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT2.1	0	0	0	0	0,7	2,7	7,0	12,0	17,7	20,0	25,0	-
CT2.2	8,7	22,3	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT3.1	0	0	0	0	0	0	0	1,3	4,3	7,0	10,3	15,0
CT3.2	0	0	0	0	0	0	0	1,0	2,3	5,3	9,7	14,7

Dòng	Thời gian lên men (giờ)											
CT4.1	16,7	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT4.2	0	0	0	0	4,0	11,0	20,3	25,0	-	-	-	-
CT4.3	0	0	0	0	0	0,7	3,7	7,3	11,3	16,0	20,3	25,0
RV002	17,0	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại

Qua kết quả được thể hiện trong Bảng 2 cho thấy, 17 dòng nấm men phân lập và dòng nấm men thương mại RV002, trong khoảng thời gian khảo sát 48 giờ đều có khả năng lên men đường glucose 2% và chiều cao của cột khí tăng liên tục. Trong đó có 14/17 dòng nấm men đã làm đầy chiều cao cột khí trong chuông Durham (đạt 25 mm), nhưng có 3 dòng nấm men không làm đầy chuông Durham và chỉ đạt chiều cao cột khí tương ứng là 20,7 mm (VL1.1), 15 mm (CT3.1), 14,7 mm (CT3.2). Đặc biệt, có một dòng nấm men (CT4.1) đã đạt chiều cao cột khí tối đa chỉ sau 8 giờ, tương đương với dòng thương mại RV002. Bên cạnh đó, VL2.1, CT1.1, CT1.4 và CT2.2 cũng đạt chiều cao cột khí tối đa chỉ sau 12 giờ. Như vậy, CT4.1, VL2.1, CT1.1, CT1.4 và CT2.2 có khả năng lên men glucose cao hơn các dòng khác.

3.3. Khả năng lên men đường saccharose 2%

Khảo sát khả năng lên men đường saccharose 2% của các dòng nấm men đã phân lập trong thời gian 48 giờ cho thấy, chỉ có 5/17 dòng nấm men đã phân lập có khả năng lên men đường saccharose 2% và đã làm đầy chuông Durham là VL1.1, VL2.1, CT1.4, CT2.2, CT4.1 (Bảng 3). Trong đó, dòng VL1.1, CT2.2 và CT4.1 đã đạt chiều cao cột khí tối đa chỉ sau 12 giờ, chỉ chậm hơn 4 giờ so với dòng thương mại RV002, chứng tỏ các dòng này có khả năng lên men saccharose mạnh hơn các dòng khác. Các dòng nấm men còn lại trong thời gian khảo sát 48 giờ không thể hiện khả năng lên men đường saccharose 2% (không thu được khí CO₂ trong chuông Durham).

Bảng 3. Chiều cao cột khí CO₂ (mm) trong chuông Durham của các dòng nấm men phân lập trong dung dịch đường saccharose 2% trong thời gian khảo sát 48 giờ

Dòng nấm men	Thời gian lên men (giờ)											
	4 giờ	8 giờ	12 giờ	16 giờ	20 giờ	24 giờ	28 giờ	32 giờ	36 giờ	40 giờ	44 giờ	48 giờ
VL1.1	0	9,0	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VL2.1	0	7,7	21,0	23,7	25,0	-	-	-	-	-	-	-
CT1.4	0,7	7,3	16,3	17,3	18,3	19,3	20,0	21,0	22,0	24,0	25,0	-
CT2.2	0	14,7	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT4.1	11,0	18,7	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RV002	15,3	25,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại

3.4. Khả năng phân giải urea

Kết quả khả năng phân giải urea của 17 dòng nấm men được tổng hợp ở Bảng 4. Sau 7 ngày ủ ở nhiệt độ 30 ± 2°C cho thấy, 5 nhóm nấm men (cầu lớn, cầu nhỏ, oval, elip dài, elip nhọn) đều có các dòng nấm men không có khả năng phân giải urea. Riêng nhóm nấm men có hình elip ngắn có khả năng phân giải urea làm cho môi trường chuyển sang màu hồng. Khả năng phân giải urea cũng là 1 tiêu chí quan trọng giúp phân loại sơ bộ các dòng nấm men.

Như vậy, 17 dòng nấm men đã phân lập có thể được định danh sơ bộ dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa theo khóa phân loại nấm men [15], [16] được thể hiện trong Bảng 5. Trong 17 dòng nấm men phân lập từ quả thanh trà ở Vĩnh Long và Cần Thơ có 5 dòng thuộc chi *Hanseniaspora*, 7 dòng thuộc chi *Pichia* và 5 dòng thuộc *Saccharomyces*. Sự đa dạng nấm men tự nhiên này cũng tương tự với các kết quả nghiên cứu phân lập nấm men trên một số loại nguyên

liệu khác như trái giác [13], cà na [17], dâu hạ châu [18] và cũng tương tự như kết quả phân lập nấm men trên thanh trà ở Vĩnh Long [6].

Bảng 4. Khả năng phân giải urea của 17 dòng nấm men phân lập

Nhóm	Dòng nấm men	Khả năng phân giải urea
Cầu lớn	CT4.1	-
Cầu nhỏ	CT1.4; CT2.2	-
Oval	VL1.1; VL2.1	-
Elip dài	VL3.1	-
Elip ngắn	CT1.2; CT1.3; CT2.1; CT3.1; CT3.2; CT4.2; CT4.3	+
Elip nhọn	VL1.2; VL2.2; VL3.2; CT1.1	-

Ghi chú: (+) phân giải urea, (-) không phân giải urea

Trong số các chi nấm men trên, chi *Saccharomyces* được sử dụng phổ biến nhất trong lên men các sản phẩm rượu, bia và bánh mì. Do đó, 5 dòng nấm men đã phân lập thuộc chi *Saccharomyces* (VL1.1, VL2.1, CT1.4, CT2.2, CT4.1) được chọn để thực hiện thử nghiệm khả năng lên men 100 mL dịch quả thanh trà.

Bảng 5. Định danh sơ bộ 17 dòng nấm men phân lập

Dòng nấm men	Đặc điểm hình thái		Đặc điểm sinh lý, sinh hóa			Chi (Phân loại sơ bộ)
	Hình dạng tế bào	Hình thức nảy chồi	Khả năng lên men đường	Glucose	Saccharose	Phân giải urea
CT4.1	Cầu lớn	Nhiều hướng	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
CT1.4; CT2.2	Cầu nhỏ	Nhiều hướng	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
VL1.1; VL2.1	Oval	Nhiều hướng	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
VL3.1	Elip dài	Lưỡng cực	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
CT1.2; CT1.3; CT2.1; CT3.1; CT3.2; CT4.2; CT4.3	Elip ngắn	Lưỡng cực	+	-	+	<i>Pichia</i>
VL1.2; VL2.2; VL3.2; CT1.1	Elip nhọn đầu	Lưỡng cực	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>

Ghi chú: (+) phân giải hoặc lên men, (-) không phân giải hoặc không lên men

3.5. Kết quả thử nghiệm lên men rượu quả thanh trà bằng dòng nấm men được tuyển chọn

Khả năng lên men của các dòng nấm men đã chọn (VL1.1, VL2.1, CT1.4, CT2.2, CT4.1) được khảo sát với điều kiện lên men bao gồm hàm lượng chất khô ban đầu là 24°Bx, pH ban đầu là 4,5, mật độ tế bào nấm men là 10^6 tế bào/mL, thể tích lên men là 100 mL, thời gian lên men là 11 ngày ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện kỵ khí. Kết quả các thông số sau lên men được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả pH, °Bx và độ rượu sau lên men của 6 dòng nấm men

Dòng nấm men	pH sau lên men	°Brix sau lên men	Độ rượu (% v/v)
VL1.1	4,14	$10,00 \pm 0,00^a$	$9,67 \pm 0,58^{cd}$
VL2.1	4,14	$10,00 \pm 0,00^a$	$9,00 \pm 0,00^d$
CT1.4	4,20	$7,00 \pm 0,00^c$	$12,00 \pm 0,00^a$
CT2.2	3,94	$10,00 \pm 0,00^a$	$9,00 \pm 0,00^d$
CT4.1	4,39	$8,33 \pm 0,58^b$	$11,00 \pm 0,00^b$
RV002	4,12	$8,00 \pm 0,00^b$	$10,33 \pm 0,58^{bc}$

Ghi chú: Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại $\pm$ SE, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($P < 0,05$).

Kết quả tại Bảng 6 cho thấy, sau 11 ngày lên men ở điều kiện trên, độ Bx ở các nghiệm thức đều giảm so với độ Bx ban đầu và có sự khác biệt giữa các nghiệm thức, chứng tỏ quá trình lên

men đã diễn ra ở các mức độ khác nhau. Nấm men sử dụng đường trong dịch quả làm nguồn carbon, đường bị chuyển hóa qua một chuỗi phản ứng enzyme để tạo ra sản phẩm cuối cùng của sự lên men là ethanol và CO₂, vì vậy độ Bx sau lên men giảm so với ban đầu [19]. Theo Bảng 6, độ Bx sau lên men của dòng CT1.4 đạt giá trị thấp nhất (7,00) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng nấm men còn lại.

Ngoài ra, sự hoạt động của nấm men trong quá trình lên men kỵ khí sinh ra CO₂ và một số acid hữu cơ làm giảm pH của dịch lên men [19]. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6 cho thấy tất cả các nghiệm thức có pH giảm so với ban đầu là 4,5. Trong đó, pH của nghiệm thức lên men bởi dòng CT2.2 giảm nhiều nhất (3,94), ngược lại nghiệm thức lên men bởi dòng CT4.1 giảm ít nhất (4,39), còn các dòng nấm men còn lại làm giảm pH đến khoảng 4,12 – 4,2.

Cùng với sự giảm của lượng đường là sự tăng lên của lượng ethanol được thể hiện qua độ rượu. Kết quả thống kê ở Bảng 6 cho thấy 6 dòng nấm men sau khi lên men dịch quả thanh trà thì thu được hàm lượng ethanol trong khoảng 9 – 12% v/v phù hợp với khoảng độ rượu của nhóm vang phổ thông [20]. Trong đó, dòng nấm men CT1.4 tạo độ rượu cao nhất (12% v/v), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với các dòng nấm men còn lại (kể cả RV002).

Kết quả thử nghiệm lên men dịch quả thanh trà từ nấm men phân lập cũng tương đồng và cao hơn so với một số nghiên cứu đã công bố trên nhiều đối tượng khác nhau như: lên men từ măng cầu xiêm thu hàm lượng ethanol đạt 10,07% v/v [10], từ quả hồng xiêm nồng độ ethanol thu được 10,1% v/v [14], từ cà na thu hàm lượng ethanol đạt 7,44% v/v [17].

3.6. Kết quả định danh dòng nấm men có hoạt lực lên men cao

Dòng nấm men CT1.4 có khả năng lên men cao nên được chọn để định danh bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Trình tự đoạn gene 28S của dòng CT1.4 được so sánh với các trình tự gene 28S rRNA của nấm men trong ngân hàng gene trên NCBI với phần mềm BLASTN cho thấy có độ tương đồng đến 99,91% so với trình tự gene 28S rRNA của *Saccharomyces cerevisiae* (Hình 2). Do đó có thể xác định CT1.4 là nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
☒ Saccharomyces cerevisiae strain CEN.PK113-7D chromosome XII	Saccharomyces cerevisiae	2087	2087	100%	0.0	99.91%	1032974	CP046092.1
☒ Saccharomyces cerevisiae strain YSR128 chromosome XII complete sequence	Saccharomyces cerevisiae	2087	4175	100%	0.0	99.91%	1076801	CP036478.1
☒ Saccharomyces cerevisiae strain Y169 chromosome 12	Saccharomyces cerevisiae	2087	4175	100%	0.0	99.91%	1061690	CP033481.1
☒ Saccharomyces cerevisiae strain X55 chromosome 12	Saccharomyces cerevisiae	2087	4175	100%	0.0	99.91%	1043571	CP033498.1
☒ Saccharomyces cerevisiae strain SY14 chromosome I complete sequence	Saccharomyces cerevisiae	2087	12527	100%	0.0	99.91%	11048804	CP029169.1
☒ Saccharomyces cerevisiae strain BY4742 chromosome XII complete sequence	Saccharomyces cerevisiae	2087	12527	100%	0.0	99.91%	1104511	CP026300.1
☒ Saccharomyces cerevisiae strain CEN.PK113-7D chromosome XII complete sequence	Saccharomyces cerevisiae	2087	12333	100%	0.0	99.91%	1092391	CP022977.1
☒ Saccharomyces cerevisiae strain YSR127 chromosome XII complete sequence	Saccharomyces cerevisiae	2087	4175	100%	0.0	99.91%	1062294	CP011558.1

Hình 2. So sánh trình tự gen rRNA của nấm men CT1.4 và các dòng *Saccharomyces cerevisiae*

4. Kết luận

Từ nguyên liệu thanh trà được thu mua tại 7 địa điểm khác nhau thuộc tỉnh Vĩnh Long và thành phố Cần Thơ đã phân lập được 17 dòng nấm men thuần. Dựa theo mô tả hình thái, có thể phân loại sơ bộ các dòng nấm men trên thuộc 3 nhóm: *Saccharomyces* (5 dòng), *Pichia* (7 dòng) và *Hanseniaspora* (5 dòng). Trong đó, dòng nấm men CT1.4 là dòng nấm men có khả năng lên men dịch quả thanh trà mạnh với các thông số kỹ thuật là 24°Bx, pH 4,5, mật độ tế bào nấm men 10⁶ tế bào/mL, thời gian lên men là 11 ngày và lên men ở nhiệt độ 30 ± 2°C trong điều kiện kỵ khí. Kết quả thu được hàm lượng ethanol cao nhất (12% v/v) và độ Bx giảm thấp nhất (7°Bx). Dòng CT1.4 được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử và được xác định thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* với độ tương đồng 99,91%. Nghiên cứu đã cho thấy sự đa dạng về nấm men tự nhiên trên nguyên liệu quả thanh trà ở Vĩnh Long và Cần Thơ, đồng thời đã chọn được dòng nấm men CT1.4 có tiềm năng ứng dụng trong lên men rượu vang thanh trà và các sản phẩm tương tự.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] I. T. Fu'adah, S. A. Sumiwi, and G. Wilar, "The Evolution of Pharmacological Activities *Bouea macrophylla* Griffith In Vivo and In Vitro Study: A Review," *Pharmaceuticals*, vol. 15, no. 2. MDPI, 2022, doi: 10.3390/ph15020238.
- [2] N. S. Rajan and R. Bhat, "Bioactive Compounds of Plum Mango (*Bouea macrophylla* Griffith)," in *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts, Reference Series in Phytochemistry*, H. N. Murthy and V. A. Bapat (Eds). Springer, Cham, 2020, pp. 529-541.
- [3] N. S. Rajan and R. Bhat, "Antioxidant compounds and antioxidant activities in unripe and ripe kundang fruits (*Bouea macrophylla* Griffith)," *Fruits*, vol. 71, no. 1, pp. 41-47, 2016, doi: 10.1051/fruits/2015046.
- [4] K. Sukalingam, "Preliminary phytochemical analysis and in vitro antioxidant properties of Malaysian 'Kundang' (*Bouea macrophylla* Griffith)," *Trends Phytochem. Res.*, vol. 2, no. 4, pp. 261-266, 2018.
- [5] M. T. Nguyen, T. B. D. Nguyen, T. T. L. Nguyen, and V. T. Ngo, "Development of fruit flavored yoghurt with maprang jam," *J. Vietnam Agric. Sci. Technol.*, vol. 8, no. 105, pp. 99-104, 2019.
- [6] M. T. Nguyen, V. T. Nguyen, and V. T. Ngo, "Isolation, characterization and identification of yeast strains from maprang (*Bouea macrophylla* Griffith) from Vinh Long, Viet Nam for wine making," *Int. J. Eng. Sci. Res. Technol.*, vol. 8, no. 7, pp. 111-121, 2019, doi: 10.5281/zenodo.3352048.
- [7] M. T. Nguyen, T. T. Bui, T. T. Nguyen, and V. T. Ngo, "Optimization of Fermentation Conditions for Maprang Wine Production Using Response Surface Methodology," *Vietnam J. Nutr. Food*, vol. 15, no. 5,6, pp. 43-49, 2019.
- [8] P. Koedrich, E. Dubois, B. Scherens, E. Jacobs, C. Boonchird, and F. Messenguy, "Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves," *Sci. Asia*, vol. 34, pp. 147-152, 2008, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.147.
- [9] W. B. Christensen, "Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types," *J. Bacteriol.*, vol. 52, no. 4, pp. 461-466, 1946, doi: 10.1128/jb.52.4.461-466.1946.
- [10] N. T. Nguyen, V. K. Huynh, T. T. Le, M. C. Luu, T. K. T. Doan, and X. P. Huynh, "Isolation and selection of fermentative yeasts for wine production from soursop (*Annona murica* L.)," *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 57, no. 4B, pp. 131-138, 2021, doi: 10.22144/ctu.jvn.2021.121.
- [11] M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (Eds.), "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics," in *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, 1989, pp. 315-322, doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.
- [12] D. T. Nguyen and T. H. Nguyen, *Ethanol Production Technology and Analysis*. Science and Technics Publishing House, 2007.
- [13] T. K. T. Doan, T. H. Y. Vien, X. P. Huynh, H. D. L. Bui, T. T. Ha, and T. P. D. Ngo, "Selection of thermotolerant yeasts and application in wine production from three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) in Hau Giang," *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 54, no. 4B, pp. 64-71, 2018.
- [14] V. B. Nguyen, T. T. T. Nguyen, T. L. Nguyen, T. C. Pham, and N. T. Chau, "Isolation and Selection of Yeast High Ethanol Tolerance Strains from Fermented Juice of *Manilkara zapota* (L.) P. Royen for Sapote Wine Fermentation," *J. Sci. Res. Econ. Dev.*, vol. 11, pp. 218-227, 2021.
- [15] C. P. Kurtzman and J. W. Fell, *The Yeasts: A taxonomic Study*, 4th ed. Elsevier, 1998.
- [16] D. P. Luong, *Industrial Yeasts*. Science and Technics Publishing House, Hanoi, 2009.
- [17] T. N. Nguyen, N. T. T. Huynh, and D. Do Nguyen, "Isolation, selection of yeast strain (*Saccharomyces* sp.) for *Canarium album* wine fermentation," *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 54, no. 1B, pp. 44-49, 2018, doi: 10.22144/ctu.jvn.2018.007.
- [18] V. V. Nguyen and V. T. Nguyen, "Isolation, selection and identification of yeast strain for *Baccaurea ramiflora* wine fermentation," *Can Tho Univ. J. Sci.*, vol. 54, no. 7B, pp. 22-32, 2018, doi: 10.22144/ctu.jvn.2018.137.
- [19] N. T. Le et al., *Industrial Biochemistry*. Science and Technics Publishing House, 2002.
- [20] D. P. Luong, *Fermentation Technology Textbook*. Vietnam Education Publishing House, 2010.