

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN NẤM MEN CHỊU NHIỆT ỨNG DỤNG TRONG LÊN MEN RƯỢU VANG TRÁI GIÁC (*Cayratia trifolia* L.)

ISOLATION AND SELECTION OF THERMOTOLERANT YEASTS FOR WINE PRODUCTION
FROM THREE-LEAF CAYRATIA (*Cayratia trifolia* L.)

Đoàn Thị Kiều Tiên^{1,2}, Lữ Hằng Nghi¹, Nguyễn Ngọc Thanh¹, Huỳnh Xuân Phong¹,
Hà Thanh Toàn¹, Ngô Thị Phương Dung¹

¹Trường Đại học Cần Thơ, Tp. Cần Thơ

²Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ Cần Thơ, Tp. Cần Thơ

Email: hxphong@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn nấm men chịu nhiệt có khả năng lên men rượu vang trái giác (*Cayratia trifolia* L.). Kết quả đã phân lập được 55 chủng nấm men từ 20 mẫu trái giác thu thập ở 5 tỉnh vùng đất mặn ven biển vùng Đồng bằng Sông Cửu Long gồm Cà Mau, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Bến Tre và Trà Vinh. Dựa vào các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa, các chủng nấm men được phân loại sơ bộ thuộc ba giống bao gồm *Saccharomyces*, *Pichia* và *Candida*. Các chủng nấm men được khảo sát khả năng phát triển ở các mức nhiệt độ (30, 35, 37, 39, 41, 43, 45 và 47°C) và nồng độ ethanol (3, 6, 9, 12 và 15% v/v) khác nhau, qua đó đã sơ tuyển được 19 chủng nấm men có khả năng phát triển ở 37-45°C và chịu ethanol ở mức 9-12% (v/v). Kết quả thử nghiệm khả năng lên men rượu vang trái giác ở 37°C cho thấy chủng *Saccharomyces* sp. CM3.2 có khả năng lên men cao nhất với hàm lượng ethanol đạt 8,95% (v/v).

Từ khóa: *Cayratia trifolia*, khả năng chịu ethanol, nấm men chịu nhiệt, rượu vang trái giác, *Saccharomyces* sp. CM3.2.

ABSTRACT

The aims of this study were to isolate and to evaluate the thermotolerant yeasts that have the fermentation ability for the production of three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) wine. Fifty-five newly isolated yeasts were obtained from 20 samples of three-leaf cayratia collected from 5 provinces in the coastal saline soil in Mekong Delta region, including Ca Mau, Bac Lieu, Soc Trang, Ben Tre, and Tra Vinh. All isolated yeasts were grouped as follow: *Saccharomyces*, *Pichia*, and *Candida*, based on their basically morphological, physiological, and biochemical characteristics. These isolated yeasts were tested for their growth at different temperatures (30, 35, 37, 39, 41, 43, 45, and 47°C) and ethanol concentrations (3, 6, 9, 12, and 15% v/v). Nine-teen selected isolated yeasts that could grow at 37-45°C and tolerate 9-12% (v/v) ethanol were further evaluated for the fermentation ability of three-leaf cayratia at 37°C. *Saccharomyces* sp. CM3.2 was the promising yeast for three-leaf cayratia wine production as this thermotolerant yeast could produce ethanol concentration of 8.95% (v/v).

Keywords: *Cayratia trifolia*, ethanol tolerant ability, *Saccharomyces* sp. CM3.2, thermotolerant yeast, three-leaf cayratia wine.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rượu vang là một loại thức uống có độ cồn nhẹ, giá trị dinh dưỡng cao, hương vị thơm ngon đặc trưng và có lợi cho sức khỏe khi chúng ta biết sử dụng một cách điều độ. Một trong những yếu tố quan trọng nhất trong sản

xuất vang chính là nguồn nấm men. Đối với nấm men, nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men chuyên hóa đường thành ethanol (Lương Đức Phẩm, 2006). Hiện nay, nhiệt độ trái đất đang âm dần lên do hiện tượng biến đổi khí hậu, đặc biệt đối với các nước nằm ở vùng nhiệt đới và vào khoảng

thời gian mùa hè, trong đó có Việt Nam. Nhiệt độ tăng cao sẽ ảnh hưởng đến khả năng lên men của nấm men trong quá trình sản xuất ethanol cũng như phải tiêu tốn một phần năng lượng để giữ ổn định nhiệt độ cho các hệ thống lên men (Limtong và ctv, 2007; Yuangsaard và ctv, 2013). Vì vậy, việc lựa chọn nấm men chịu nhiệt để lên men rượu là một giải pháp hữu hiệu mang nhiều lợi ích đáng kể như tận dụng được nhiệt độ cao để lên men, làm cho quá trình lên men diễn ra nhanh, nguy cơ nhiễm vi sinh vật giảm và giảm chi phí đầu tư cho thiết bị làm mát mang lại nhiều lợi ích kinh tế trong sản xuất (Roehr, 2001; Limtong và ctv, 2007).

Theo truyền thống, rượu vang được sản xuất từ nho chín, sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* để nâng cao hiệu quả lên men (Bùi Ái, 2005). Nhưng với nhu cầu ngày càng cao của con người hiện nay trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng, vẫn luôn có nhiều nghiên cứu thử nghiệm để tìm ra hương vị mới lạ và nâng cao chất lượng cho loại thức uống được ưa chuộng này. Tuy nhiên, hiện nay những công trình nghiên cứu lựa chọn trái giác làm nguyên liệu lên men rượu vang, đặc biệt là việc kết hợp sử dụng nấm men chịu nhiệt để hỗ trợ quá trình lên men hầu như vẫn còn rất ít và hạn chế.

Giác (*Cayratia trifolia* L.) là một loại cây đại cũng thuộc họ nho (Vitaceae), sinh trưởng rất nhiều tại vùng ĐBSCL, nhất là các vùng đất nhiễm mặn như vùng Cà Mau, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Trà Vinh, Bến Tre,... Đặc biệt, đây là một loại trái cây đặc trưng và mọc tự nhiên rất phong phú ở vùng rừng U Minh thuộc tỉnh Cà Mau. Trong trái giác có chứa các hợp chất như flavonoid, resveratrol,... có khả năng ngăn chặn quá trình oxy hóa, kháng virus, kháng khuẩn, chống ung thư và các hoạt động lợi tiểu,... (Gupta, 2007; Kumar và ctv, 2011; Perumal và ctv, 2015). Với những lợi ích thiết thực về mặt dinh dưỡng, sức khỏe và dược tính mà trái giác mang lại cùng với đặc điểm nguồn nguyên liệu dồi dào và dễ tìm có thể nói trái giác rất có tiềm năng để sản xuất rượu vang ở nước ta. Mục tiêu của nghiên cứu là nhằm phân lập và tuyển chọn nấm men từ trái giác có khả năng chịu nhiệt, chịu ethanol và lên men mạnh để có thể ứng dụng trong lên men rượu vang trái giác.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên vật liệu và môi trường

Hai mươi mẫu trái giác chín được thu thập tại 20 huyện thuộc 5 tỉnh vùng đất mặn vùng Đồng bằng Sông Cửu Long (Cà Mau, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Bến Tre và Trà Vinh). Trái giác sau khi được thu thập sẽ được giữ trong bọc kín và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được dùng trong ngày để phân lập nấm men hoặc trữ trong tủ lạnh (nhiệt độ 4°C).

Môi trường YPD agar (yeast extract 0,5%, peptone 0,5%, glucose 2,0%, agar 2%); môi trường Christensen urea broth (urea 20 g, yeast extract 0,1 g, Na₂HPO₄ 9,5 g, K₂HPO₄ 9,1 g, phenol red 0,01 g, pH 6,7 ± 0,2); môi trường gelatine (peptone 8,3 g, yeast extract 5,0 g, gelatine 120 g, pH 7,7 ± 0,2). Môi trường được chuẩn bị và khử trùng nhiệt uớt ở 121°C trong 15 phút.

Phân lập các chủng nấm men từ dịch quả

Quy trình phân lập: Cho 5 g trái giác chín vào môi trường YPD lỏng (yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L, D-glucose 20 g/L, tetracycline 10%) đã được khử trùng (121°C trong 15 phút). Tiến hành ủ lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ 30°C. Mẫu dịch tăng sinh (100 µL) được cấy trải trên môi trường YPD agar (yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L, D-glucose 20 g/L, tetracycline 10%, agar 20 g/L). Chọn các khuẩn lạc nấm men khác nhau để tiếp tục cấy chuyển đến khi thu được khuẩn lạc nấm men thuần nhất. Kiểm tra độ thuần của tế bào nấm men dưới kính hiển vi.

Phân loại sơ bộ

Phân loại sơ bộ đến mức độ giống các chủng nấm men phân lập dựa vào các đặc điểm như: hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, kiểu nảy chồi, đặc điểm bào tử, hoạt tính phân giải urea và gelatin, khả năng đồng hóa đường (glucose, saccharose và maltose) (Kurtzman và ctv, 2011). Bào tử nấm men được quan sát sau khi nấm men được nuôi cấy trong môi trường thạch nước đến 6 tuần (Luong Đức Phẩm, 2006).

Thử khả năng chịu nhiệt của nấm men phân lập

Cấy rìa các chủng nấm men phân lập lên môi trường YPD agar và ủ ở các nhiệt độ khác nhau (30, 35, 37, 39, 41, 43, 45 và 47°C) trong 48 giờ. Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các chủng nấm men khác nhau trên đĩa thạch (Phong và ctv, 2016; Techaparin và ctv, 2017). Tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng phát triển mạnh trên môi trường ở nhiệt độ cao.

Thử khả năng chịu ethanol của nấm men chịu nhiệt

Cấy rìa các nấm men phân lập trên môi trường YPD agar có bổ sung ethanol tinh khiết (3, 6, 9, 12 và 15% v/v). Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24-48 giờ và quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các chủng nấm men (Dung và ctv, 2012; Phong và ctv, 2016). Tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng phát triển mạnh trên môi trường có nồng độ ethanol cao.

Đánh giá sơ bộ khả năng lên men ethanol của các chủng nấm men tuyển chọn

Nuôi sinh khối các chủng nấm men tuyển chọn trong môi trường YPD lỏng đến khi mật độ nấm men đạt 10^7 tế bào/mL (xác định bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu). Chủng 1 mL dung dịch nấm men vào ống nghiệm chứa 9 mL dung dịch glucose 2% (w/v) và chuông Durham úp ngược, thực hiện 3 lần lặp lại. Ủ ở nhiệt độ 37°C và ghi nhận chiều cao cột khí CO₂ sinh ra trong chuông Durham úp

ngược tại các thời điểm 12, 18, 24, 32, 36, 42 và 48 giờ (Nguyễn Hữu Tường và ctv, 2013).

Thử nghiệm khả năng lên men rượu vang trái giắc

Nuôi cấy nấm men trong môi trường YPD lỏng đến khi mật độ tế bào nấm men đạt 10^8 tế bào/mL. Chủng 1 mL nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác chứa 99 mL dịch trái giắc được điều chỉnh về 22°Brix, ủ lên men 5-7 ngày trong điều kiện kỵ khí ở 37°C (Nguyễn Hữu Tường và ctv, 2013). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Chung cất và đo nồng độ ethanol, quy về nồng độ ethanol ở 20°C (Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng, 2005).

Xử lý số liệu



Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Kết quả phân tích phương sai và kiểm định LSD sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., USA).




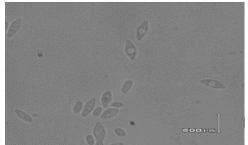
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập nấm men từ trái giắc

Kết quả phân lập được 55 chủng nấm men thuần chủng từ 20 mẫu nguyên liệu trái giắc được thu ở 20 địa điểm thuộc 5 tỉnh vùng ĐBSCL (Cà Mau, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Bến Tre và Trà Vinh). Nấm men phân lập từ trái giắc có 6 hình dạng bao gồm hình cầu nhỏ, hình ovan lớn, hình ovan nhỏ, hình elip dài, hình elip ngắn và hình elip nhọn được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái tế bào nấm men phân lập từ trái giắc

Nhóm	Chủng nấm men	Hình dạng, kích thước (μm) tế bào	Tế bào nấm men dưới kính hiển vi ở vật kính X100
Nhóm 1	CM1.1, CM1.2, ST1.3	Hình cầu nhỏ; 3,71-3,98	
Nhóm 2	CM2.2, CM3.1, CM4.2, BL1.2, BL2.2, ST1.2, BT1.3, BT2.1, BT3.2, BT3.3, TV1.2, TV4.4	Hình ovan lớn; (9,4-10,82) x (7,40-7,99)	

Nhóm	Chủng nấm men	Hình dạng, kích thước (μm) tế bào	Tế bào nấm men dưới kính hiển vi ở vật kính X100
Nhóm 3	CM1.3, CM2.1, CM3.2, CM3.3, CM4.1, CM4.3, BL1.1, BL2.1, BL2.3, BL3.1, BL4.3, ST2.1, ST2.3, ST3.1, ST4.3, BT1.2, BT3.1, TV2.1, TV2.2, TV3.2, TV4.2	Hình ovan nhỏ; (3,71-4,20) x (2,86-3,42)	
Nhóm 4	CM4.4, BL3.2, ST3.3, BT1.1, TV2.3, TV3.1, TV4.1	Hình elip dài; (6,84-10,77) x (3,93-4,57)	
Nhóm 5	BL4.2, ST1.1, ST2.2, BT4.2	Hình elip ngắn; (2,86-3,13) x (1,15-1,42)	
Nhóm 6	BL4.1, ST3.2, ST4.1, ST4.2, BT2.2, BT4.1, TV1.1, TV4.3	Hình elip nhọn; (4,28-4,57) x (1,71-2,27)	

Phân loại ở mức độ giống các chủng nấm men phân lập

Đặc điểm **nảy chồi**: Quan sát hình thức tế bào nảy chồi của 55 chủng nấm men với đại diện là 6 nhóm hình dạng, kết quả có hai hình thức nảy chồi là nảy chồi nhiều hướng và nảy chồi lưỡng cực. Tế bào nảy chồi nhiều hướng gồm 5 hình dạng: nhóm 1 nấm men có hình cầu nhỏ (CM1.1, CM1.2 và ST1.3), nhóm 2 nấm men có hình ovan lớn (CM2.2, CM3.1, CM4.2, BL1.2, BL2.2, ST1.2, BT1.3, BT2.1, BT3.2, BT3.3, TV1.2, TV4.4), nhóm 3 nấm men có hình ovan nhỏ (CM1.3, CM2.1, CM3.2, CM3.3, CM4.1, CM4.3, BL1.1, BL2.1, BL2.3, BL3.1, BL4.3, ST2.1, ST2.3, ST3.1, ST4.3, BT1.2, BT3.1, TV2.1, TV2.2, TV3.2, TV4.2), nhóm 4 hình elip dài (CM4.4, BL3.2, ST3.3, BT1.1, TV2.3, TV3.1, TV4.1) và nhóm 5 hình elip ngắn (BL4.2, ST1.1, ST2.2, BT4.2). Tế bào nảy chồi lưỡng cực gồm 1 nhóm nấm men là nhóm 6 nấm men hình elip nhọn (BL4.1, ST3.2, ST4.1, ST4.2, BT2.2, BT4.1, TV1.1 và TV4.3).

Khả năng tạo bào tử trên môi trường thạch nước: Kết quả cho thấy 6 nhóm nấm men đều hình thành bào tử trong môi trường nghèo dinh dưỡng gồm: nhóm 1 nấm men hình cầu nhỏ tế bào xuất hiện 1-2 bào tử hình tròn, nhóm 2 hình ovan lớn tế bào xuất hiện 1-2 bào tử hình tròn,

nhóm 3 hình ovan nhỏ tế bào xuất hiện 1-2 bào tử hình tròn, nhóm 4 hình elip dài tế bào xuất hiện 1-3 bào tử hình tròn, nhóm 5 hình elip ngắn tế bào xuất hiện 1-3 bào tử hình tròn và nhóm 6 nấm men hình elip nhọn tế bào không xuất hiện bào tử.

Khả năng lên men đường glucose, saccharose, maltose: Kết quả đánh giá khả năng lên men các loại đường khác nhau thông qua sự hình thành bọt khí trong chuông Durham cho thấy hầu hết các chủng nấm men phân lập đều có khả năng lên men chuyển hóa glucose thành ethanol, một số chủng có khả năng lên men đường saccharose và có khá ít chủng có khả năng lên men đường maltose sau 48 giờ. Các chủng nấm men thuộc nhóm hình cầu và hình ovan đều có khả năng chuyển hóa 3 loại đường (glucose, saccharose và maltose) thành ethanol. Đối với các chủng nấm men hình elip, đa số chỉ có thể lên men chuyển hóa đường glucose nhưng không lên men được trên 2 loại đường còn lại.

Khả năng đồng hóa urea và gelatin: Kết quả sau 7 ngày ủ ở 30°C, tất cả các chủng nấm men thuộc nhóm 1 hình cầu nhỏ, nhóm 2 hình ovan lớn, nhóm 3 ovan nhỏ, nhóm 6 hình elip nhọn và một số chủng nấm men nhóm 4 hình elip dài (CM4.4, BL3.2, BT1.1, TV2.3 và TV3.1)

không có khả năng phân giải urea (Bảng 2). Sáu chủng nấm men, trong đó 4 chủng thuộc nhóm 5 hình elip ngắn (BL4.2, ST1.1, ST2.2 và

BT4.2) và 2 chủng nấm men thuộc nhóm 4 hình elip dài (ST3.3 và TV4.1) có khả năng đồng hóa urea phân giải thành CO₂ và NH₃.

Bảng 2. Tổng hợp đặc điểm hình thái và sinh lý các các chủng nấm men phân lập

Chủng nấm men	Đặc điểm hình thái			Đặc điểm sinh lý, sinh hóa					Giống (phân loại sơ bộ)
	Hình dạng nấm men	Kiểu nảy chồi	Đặc điểm bào tử	Khả năng lên men đường			Phân giải urea	Phân giải gelatin	
				Glu	Sac	Mal			
CM1.1, CM1.2 ST1.3	Cầu nhỏ	Nhiều hướng	1-2 bào tử hình tròn	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
CM2.2, CM3.1, CM4.2, BL1.2, BL2.2, ST1.2, BT1.3, BT2.1, BT3.2, BT3.3, TV1.2, TV4.4	Ovan lớn	Nhiều hướng	1-4 bào tử hình tròn	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
CM1.3, CM2.1, CM3.2, CM3.3, CM4.1, CM4.3, BL1.1, BL2.1, BL2.3, BL3.1 BL4.3, ST2.1 ST2.3, ST3.1, ST4.3, BT1.2 BT3.1, TV2.1, TV2.2, TV3.2, TV4.2	Ovan nhỏ	Nhiều hướng	1-2 bào tử hình tròn	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
CM4.4, BL3.2, BT1.1, TV2.3, TV3.1	Elip dài	Nhiều hướng	1-3 bào tử hình tròn	+	-	-	-	-	<i>Candida</i>
ST3.3, TV4.1	Elip dài	Nhiều hướng	1-3 bào tử hình tròn	-	-	-	+	+	<i>Pichia</i>
BL4.2, ST1.1, ST2.2, BT4.2	Elip ngắn	Nhiều hướng	1-3 bào tử hình tròn	+	-	-	+	+	<i>Pichia</i>
BL4.1, ST3.2, ST4.1 ST4.2, BT2.2, BT4.1, TV1.1, TV4.3	Elip nhọn	Lưỡng cực	Không tạo bào tử	+	-	-	-	-	<i>Candida</i>

Ghi chú: Glu, glucose; Sac, saccharose; Mal, maltose; “-”, âm tính và “+” dương tính.

Có thể nói rằng có rất ít chủng nấm men trong số các chủng phân lập có chứa enzyme urease và hầu hết chúng thuộc nhóm nấm men có dạng hình elip ngắn và elip dài. Nấm men không có

hoạt tính phân giải protein mạnh. Tuy nhiên, trong môi trường giàu gelatin, những chủng nấm men có khả năng tiết enzyme gelatinase hoặc protease thì có khả năng phân giải gelatin

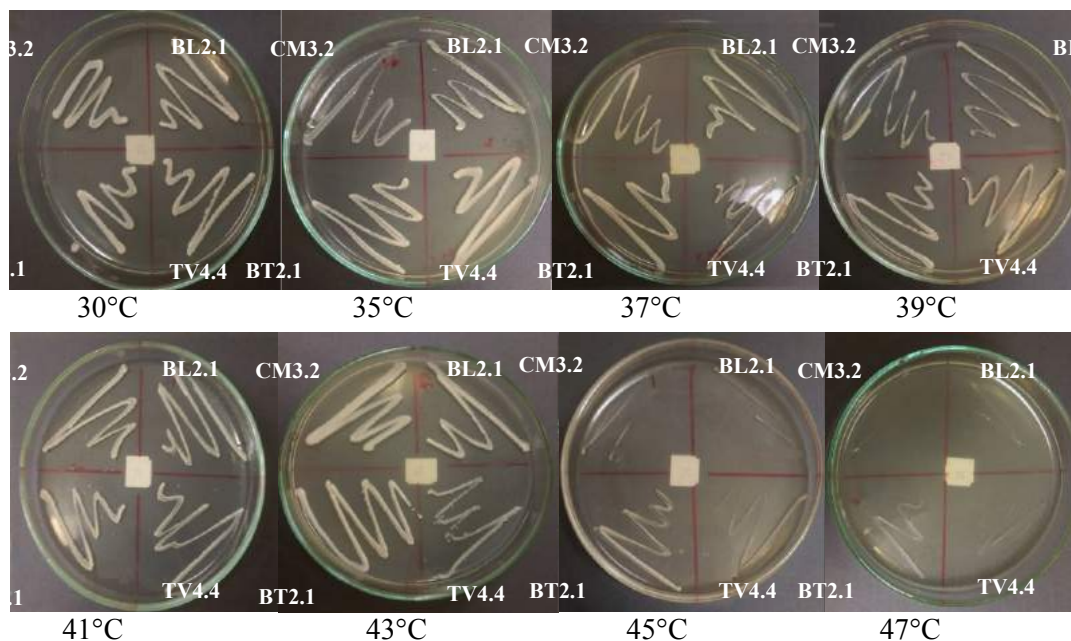
(Kurtzman và ctv, 2011). Những chủng nấm men được cho là có enzyme phân giải gelatin sẽ có phản ứng dương tính, làm môi trường hóa lỏng ở 4°C. Kết quả tổng hợp ở Bảng 2 cho thấy chỉ có 5 chủng nấm men có hoạt tính phân giải gelatin, những chủng nấm men này thuộc nhóm 5 hình elip dài (ST3.3 và TV4.1) và nhóm 7 hình elip ngắn (ST1.1, ST2.2 và BT4.2). Các chủng nấm men còn lại không có khả năng phân giải gelatin.

Khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men

Tất cả 55 chủng nấm men phân lập đều có thể phát triển ở nhiệt độ 30 và 35°C sau 48 giờ nuôi cấy (Hình 1). Ngoại trừ 3 chủng ST3.3, BT4.1 và TV1.1, 52 chủng nấm men còn lại có khả năng phát triển ở mức 37°C và cao hơn. Ở 39°C, có 38 chủng vẫn có khả năng phát triển, tuy nhiên khi tăng đến 41°C, chỉ có 20 chủng có khả năng phát triển được. Ở nhiệt độ 43°C, chỉ còn 8 chủng có khả năng phát triển và khi tăng đến nhiệt độ 45°C thì chỉ còn duy nhất chủng BT2.1 có thể phát triển được thành

khuẩn lạc. Đến mức nhiệt độ khảo sát 47°C không có chủng nấm men phân lập nào có thể sống và phát triển. Khi nhiệt độ tăng cao làm ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng và lên men của nấm men. Kết quả về khả năng chịu nhiệt cũng tương đồng với một số công trình công bố gần đây trên nấm men chịu nhiệt được phân lập từ đất, ca cao, trái cây, phụ phẩm nông nghiệp,... (Dung và ctv, 2012; Nuanpeng và ctv, 2016; Phong và ctv, 2016; Techaparin và ctv, 2017).

Kết quả cho thấy các chủng nấm men phân lập phần lớn có khả năng chịu nhiệt tốt (94,5% chủng nấm men phân lập chịu được nhiệt độ từ 37°C trở lên). Trong số các chủng nấm men có khả năng chịu được nhiệt độ cao phần lớn thuộc giống *Saccharomyces*. Các chủng nấm men chịu nhiệt kém chỉ phát triển ở mức nhiệt độ từ 35°C trở xuống chủ yếu thuộc nhóm *Candida* và *Pichia*. Kết quả chọn được 52 chủng nấm men, ngoại trừ 3 chủng ST3.3, BT4.1 và TV1.1, có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ từ 37°C trở lên để đánh giá khả năng chịu ethanol.



Hình 1. Khuẩn lạc nấm men phát triển trên môi trường YPD ở các nhiệt độ khác nhau

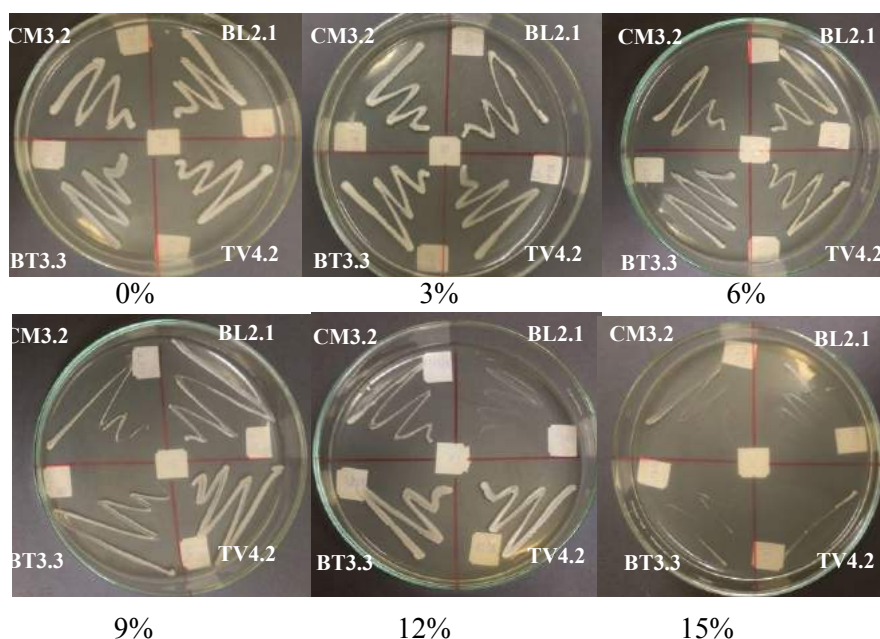
Khả năng chịu ethanol của các chủng nấm men

Năm mươi hai chủng nấm men chịu nhiệt được nuôi cấy 48 giờ ở 37°C trong môi trường có bổ sung ethanol 3, 6, 9, 12 và 15% và kết quả

sự phát triển ở các nồng độ ethanol được minh họa ở Hình 2. Ở mức 0 và 3% (v/v) ethanol, tất cả các chủng nấm men khảo sát đều phát triển tốt; khi tăng nồng độ lên 6%, có 41 chủng nấm men có thể phát triển thành khuẩn lạc và

ở mức 9% thì có 19 chủng có thể phát triển. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ ethanol lên 12%, chỉ có 3 chủng có thể phát triển và hình thành khuẩn lạc trên môi trường YPD, trong đó có 2 chủng phát triển mạnh là CM3.3 và BT3.3, chủng TV4.2 phát triển yếu hơn. Ở mức 15% ethanol thì không có chủng nấm men nào có thể sống và phát triển thành khuẩn lạc được. Kết quả này cũng tương tự như công bố của Nguyễn Hữu Tường và ctv (2013) và Phong và ctv (2016) khi đánh giá khả năng chịu ethanol của nấm men chịu nhiệt.

Nhìn chung, các chủng nấm men phân lập từ dịch trái giấm có khả năng chịu cồn ở mức trung bình, chỉ có khoảng 34,5% (19 chủng) có khả năng chịu cồn ở mức 9% (v/v) ethanol. Trong số các chủng nấm men có khả năng chịu cồn tốt, hầu hết thuộc nhóm *Saccharomyces*. Từ kết quả khảo sát khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol, tuyển chọn được 19 chủng (CM1.1, CM1.3, CM2.1, CM3.2, CM3.3, CM4.2, CM4.3, CM4.4, BL2.1, BL4.3, ST1.1, ST1.3, ST2.1, ST4.3, BT1.2, BT2.1, BT3.1, BT3.3 và TV4.2) có khả năng chịu nhiệt từ 37°C và chịu ethanol từ 9% (v/v) trở lên để đánh giá khả năng lên men dịch trái giấm.



Hình 2. Khuẩn lạc nấm men phát triển trên môi trường YPD bổ sung ethanol ở các nồng độ (% v/v) khác nhau

Đánh giá sơ bộ khả năng lên men dịch trái giấm

Trong quá trình lên men rượu có hai sản phẩm chính là ethanol và CO₂, để xác định hoạt lực lên men của nấm men có thể dựa trên khả năng thoát khí CO₂ trong quá trình lên men (Nguyễn Đức Lượng và ctv, 2003). Chiều cao cột khí sinh ra trong ống Durham tăng theo thời gian, các chủng nấm men khác nhau có chiều cao cột khí CO₂ sinh ra khác nhau (Bảng 3). Cụ thể, sau 6 giờ lên men, có 6 chủng làm đầy cột khí trong ống Durham nhanh nhất là CM2.1, CM3.2, CM4.2, BL2.1, BL4.3, ST2.1 và BT1.2. Ba chủng CM1.1, CM2.1 và ST1.3 có khả năng làm đầy cột khí (30,0 mm) sau 12 giờ lên men.

Sau 18 giờ lên men, có thêm 2 chủng làm đầy cột khí (BT2.1 và BT3.3) và các chủng CM1.3, CM3.3, CM4.3, BT3.1 và TV4.2 mất 24 giờ để làm đầy cột khí trong ống Durham. Sau 30 giờ, hầu hết các chủng nấm men đều sinh khí chiếm đầy thể tích ống Durham (trừ chủng ST1.1). Chủng nấm men ST1.1 có thời gian làm đầy cột khí khá chậm, cụ thể trong thời gian từ 36-48 giờ chiều cao cột khí của ST1.1 không thay đổi, sau 36 giờ lên men chủng nấm men này đã ngừng làm tăng lượng khí CO₂ sinh ra.

Tuy nhiên, chiều cao ống Durham tối đa chỉ có 30 mm nên không thể đánh giá chính xác được khả năng lên men của các chủng nấm men khi trung bình chiều cao cột khí khi đã

đạt mức tối đa. Do đó, phải tiến hành lên men trong bình tam giác, các chủng nấm men có thời gian lên men dài hơn, giúp cho việc đánh giá chủng nấm men có hoạt tính lên men tốt một cách chính xác hơn. Từ kết quả thí nghiệm ở các thí nghiệm trên, tuyển chọn những chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt từ 37°C trở lên, chịu ethanol từ 9% trở lên và lên men tốt (có khả năng sinh khí chiếm đầy thể tích chuông

Durham 30 mm trong 48 giờ) để tiến hành thử nghiệm khả năng lên men rượu vang trái giác. Như vậy, 18 chủng nấm men (CM1.1, CM1.3, CM2.1, CM3.2, CM3.3, CM4.2, CM4.3, CM4.4, BL2.1, BL4.3, ST1.3, ST2.1, ST4.3, BT1.2, BT2.1, BT3.1, BT3.3 và TV4.2) được chọn cho thử nghiệm này, các chủng này đều thuộc giống *Saccharomyces*.

Bảng 3. Chiều cao cột khí CO₂ (mm) trong chuông Durham sau 48 giờ lên men

Stt	Chủng nấm men	Thời gian lên men trên dịch trái giác (giờ)							
		6	12	18	24	30	36	42	48
1	CM1.1	13,0	30,0	-	-	-	-	-	-
2	CM1.3	9,33	23,3	29,3	30,0	-	-	-	-
3	CM2.1	17,3	30,0	-	-	-	-	-	-
5	CM3.2	30,00	-	-	-	-	-	-	-
4	CM3.3	9,33	15,7	19,0	30,0	-	-	-	-
6	CM4.2	30,0	-	-	-	-	-	-	-
7	CM4.3	2,33	4,67	25,3	30,0	-	-	-	-
8	CM4.4	0,0	5,67	7,33	15,7	19,0	30,0	-	-
9	BL2.1	30,0	-	-	-	-	-	-	-
10	BL4.3	30,0	-	-	-	-	-	-	-
11	ST1.1	5,00	10,0	11,7	16,7	19,3	23,3	23,3	23,3
12	ST1.3	27,3	30,0	-	-	-	-	-	-
13	ST2.1	30,0	-	-	-	-	-	-	-
14	ST4.3	1,33	4,00	7,33	17,7	30,0	-	-	-
15	BT1.2	30,0	-	-	-	-	-	-	-
16	BT2.1	7,33	10,0	30,0	-	-	-	-	-
17	BT3.1	6,00	10,3	15,0	30,0	-	-	-	-
18	BT3.3	8,00	18,7	30,0	-	-	-	-	-
19	TV4.2	5,33	11,3	28,3	30,0	-	-	-	-

Ghi chú: “-”: chiều cao cột khí trong chuông Durham đạt mức tối đa 30 mm. Giá trị ghi trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại

Khả năng lên men rượu vang trái giác

Khả năng lên men được khảo sát với mật độ nấm men 10⁷ tế bào/mL trong 7 ngày ở 37°C, dịch ép được điều chỉnh về pH 4,5 và 22°Brix. Kết quả khảo sát khả năng lên men của 18 chủng nấm men trong 100 mL dịch trái giác được thể hiện ở Bảng 4. Sau khi lên men, pH và Brix ở các nghiệm thức đều giảm do nấm men sử dụng đường làm nguồn carbon. Hàm lượng ethanol là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất để

đánh giá khả năng lên men rượu của các chủng nấm men. Kết quả thống kê từ Bảng 4 cho thấy, trong 18 chủng nấm men lên men rượu vang trái giác thì hàm lượng ethanol trung bình sau lên men cao nhất là chủng CM3.2 (8,95% v/v), kế đến là chủng CM3.3 (7,01% v/v) và BT1.2 (6,79% v/v). Các chủng nấm men (CM1.1, ST1.3 và BT3.1) có độ rượu sinh ra thấp nhất chỉ trong khoảng từ 3,19-3,79% (v/v).

Kết hợp so sánh với kết quả đo chiều cao cột khí CO₂ trong ống Durham (Bảng 3) trong dung

dịch đường glucose và dịch trái giắc, các chủng CM1.1, CM4.3, BL4.3 và ST1.3 tuy có thời gian làm đầy cột khí trong ống Durham nhanh (sau 12-18 giờ) nhưng hàm lượng ethanol sau lên men lại rất thấp (chỉ từ 3,65-4,58% v/v), còn các chủng CM3.3, CM4.4 và BT2.2 tuy thời gian làm đầy cột khí ống Durham lâu hơn (24-36 giờ) nhưng hàm lượng ethanol sau lên men lại cao hơn nhiều (6,61-7,01% v/v). Có thể giải

thích thời gian thí nghiệm trong ống Durham khá ngắn, các chủng nấm men CM1.1, CM4.3, BL4.3 và ST1.3 ban đầu tốc độ lên men nhanh tạo ra lượng CO₂ nhưng quá trình lên men lại kết thúc sớm. Ngược lại, một số chủng nấm men (như CM3.3, CM4.4 và BT2.2) lên men chậm hơn nhưng thời gian lên men kéo dài nên có khả năng tạo được lượng ethanol cao hơn.

Bảng 4. Kết quả khả năng lên men của các chủng nấm men

Stt	Chủng nấm men	pH sau lên men	Độ Brix sau lên men	Hàm lượng ethanol (% v/v ở 20°C)
1	CM1.1	3,41	15,7	3,79 ± 0,24 ⁱ
2	CM1.3	3,44	16,3	4,88 ± 0,13 ^{fg}
3	CM2.1	3,43	16,0	5,02 ± 0,12 ^f
5	CM3.2	3,52	11,0	8,95 ± 0,40 ^a
4	CM3.3	3,35	15,0	7,01 ± 0,38 ^b
6	CM4.2	3,49	17,3	5,02 ± 0,12 ^f
7	CM4.3	3,34	14,7	4,50 ± 0,10 ^h
8	CM4.4	3,33	14,3	6,56 ± 0,01 ^{cd}
9	BL2.1	3,32	14,0	6,61 ± 0,11 ^{cd}
10	BL4.3	3,46	16,3	4,58 ± 0,13 ^{gh}
11	ST1.3	3,49	17,7	3,65 ± 0,13 ⁱ
12	ST2.1	3,34	14,0	6,48 ± 0,27 ^{cd}
13	ST4.3	3,40	16,7	4,65 ± 0,13 ^{gh}
14	BT1.2	3,34	14,7	6,79 ± 0,02 ^{bc}
15	BT2.1	3,35	14,7	6,09 ± 0,01 ^e
16	BT3.1	3,46	17,7	3,19 ± 0,15 ^j
17	BT3.3	3,38	15,0	6,09 ± 0,02 ^e
18	TV4.2	3,40	16,0	6,32 ± 0,40 ^{de}

Các giá trị là trung bình của 3 lần lặp lại. Các ký hiệu trên các số liệu giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

Từ các thí nghiệm trên, có thể thấy chủng nấm men *Saccharomyces* sp. CM3.2 có nhiều đặc điểm vượt trội như khả năng chịu nhiệt cao (43°C), thời gian làm đầy cột khí trong ống Durham sớm nhất đạt 30 mm (6 giờ cả trong dịch đường glucose 2% (w/v) và trong dịch trái giắc 22°Brix) và tạo ra hàm lượng ethanol cao nhất (8,95% v/v) trong các chủng nấm men phân lập. Do đó, chủng nấm men *Saccharomyces* sp. CM3.2 là chủng có khả năng lên men cao nhất được tuyển chọn để thử nghiệm và ứng dụng trong lên men men rượu vang trái giắc.

KẾT LUẬN

Kết quả phân lập được 55 chủng nấm men thuần chủng từ 20 mẫu nguyên liệu trái giắc được thu thập ở 5 tỉnh thuộc vùng đất mặn ven biển vùng Đồng bằng Sông Cửu Long (Cà Mau, Bạc Liêu, Sóc Trăng, Bến Tre và Trà Vinh). Các chủng nấm men phân lập được phân loại thuộc 3 giống bao gồm *Saccharomyces*, *Pichia* và *Candida*. Tuyển chọn được 19 chủng nấm men (CM1.1, CM1.3, CM2.1, CM3.2, CM3.3, CM4.2, CM4.3, CM4.4, BL2.1, BL4.3, ST1.1, ST1.3, ST2.1, ST4.3, BT1.2, BT2.1, BT3.1,

BT3.3 và TV4.2) có khả năng chịu nhiệt trong khoảng 37-45°C và chịu ethanol ở mức 9-12% (v/v), trong đó chủng *Saccharomyces* sp. CM3.2 được tuyển chọn khi lên men dịch trái giắc ở 37°C với hàm lượng ethanol đạt 8,95% (v/v).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ một phần kinh phí từ Chương trình CCP (Core-to-Core Program, 2014-2019).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Ái, 2005. *Công nghệ lên men ứng dụng trong Công nghệ thực phẩm*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh: 220-227.
- Dung N.T.P., Thanonkeo P., and Phong H.X., 2012. Screening useful isolated yeasts for ethanol fermentation at high temperature. *International Journal of Applied Science and Technology* 2(4): 65-71.
- Gupta A.K., Shamar M., 2007. *Review on Indian Medical Plant*. New Delhi: Indian Council of Medical Research 7: 879-882.
- Kumar D., Kumar S., Gupta J. Arya R., and Gupta. A. 2011. A review on chemical and biological properties of *Cayratia trifolia* Linn. (Vitaceae). *Pharmacognosy Reviews* 10: 184-188.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., and Robert V., 2011. *Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts*. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5th ed., Vol. 1). San Diego: Elsevier B.V: 87-110.
- Limtong S., Sringiew C., and Yongmanitchai W., 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology* 98: 3367-3374.
- Lương Đức Phẩm. 2006. *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 9-18, 56-60.
- Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền và Nguyễn Ánh Tuyết, 2003. *Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2-Thí nghiệm vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh: 260-291.
- Nguyễn Đình Thường, Nguyễn Thanh Hằng, 2005. *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 67-70.
- Nguyễn Hữu Tường, Phạm Hồng Quang, Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Minh Đồi, 2013. Thử nghiệm lên men ethanol ở nhiệt độ cao bằng nấm men chịu nhiệt. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ* 27: 17-23.
- Nuanpeng S., Thanonkeo S., Yamada M., and Thanonkeo P. (2016). Ethanol production from sweetsorghum juice at high temperatures using a newly isolated thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y-53. *Energies* 9(4): 253.
- Perumal P.C., Sowmya S., Pratibha P., Vidya B., Anusooriya P., Starlin T., Ravi S., and Gopalakrishnan V.K., 2015. Isolation, structural characterization and in silico drug-like properties prediction of a natural compound from the ethanolic extract of *Cayratia trifolia* (L.). *Pharmacognosy Reviews* 7(1): 121-125.
- Phong H. X., Giang N.T.C., Nitiyon S., Yamada M., Thanonkeo P., & Dung N.T.P. (2016). Ethanol production from molasses at high temperature by thermotolerant yeasts isolated from cocoa. *Can Tho University Journal of Science* 3: 32-37.
- Roehr M., (2001). *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. Federal Republic of Germany: 203-210.
- Techaparin A., Thanonkeo P., & Klanrit P., 2017. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian Journal of Microbiology* 48(3): 461-475.
- Yuangsard N., Yongmanitchai W., Yamada M., & Limtong S., 2013. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Antonie van Leeuwenhoek* 103(3): 577-588.