Tạp chí Khoa học - Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn

# PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH NẤM MEN TRONG LÊN MEN RƯỢU VANG KHÓM

Nguyễn Văn Thành[1], Nguyễn Minh Thủy[2], Trần Thị Quế[3] và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền[2]

[1]*Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ*
[2]*Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ*
[3]*Học viên Cao học Công nghệ Thực phẩm và Đồ uống K16*

***Thông tin chung:***
*Ngày nhận: 07/08/2012*
*Ngày chấp nhận: 22/03/2013*

***Title:***
*Isolation, selection and identification of yeast strains for pineapple wine fermentation*

***Từ khóa:***
*Định danh, phân lập, nấm men, rượu vang khóm, Saccharomyces cerevisiae*

***Keywords:***
*Identification, isolation, yeast, pineapple wine, Saccharomyces cerevisiae*

## ABSTRACT

*A study was undertaken with the aim to find out the pure yeasts from pineapple to produce high quality pineapple wine. Results of study were followed, 23 yeast strains were obtained from pinapple juices at different treatment conditions (without and with added glucose) in two different ecological zones, Kien giang (Go Quao) and Hau giang (Vi Thanh and Long My). Based on the classification keys of yeasts (morphology, physiology, and biochemistry), the yeast strains were generally characterized as three genera: Saccharomyces, Hanseniaspora and Pichia. Fermenting activity of isolated yeasts was higher than commercial yeast (saccharomyes cerevisiae). The isolated yeast strain namely VK1 (from natural fermented pineapple juice – pineapple fruit was collected at Vi Thanh city) has showed the best fermenting activity such as fast fermentation by Durham test (6 hrs) and highest ethanol content (13,26% v/v). Identification of yeast by DNA sequencing showed the superior yeast strain VK1 belong to Saccharomyces cerevisiae.*

## TÓM TẮT

*Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu tìm ra nấm men thuần để sản xuất rượu vang khóm chất lượng cao. Kết quả nghiên cứu như sau, 23 dòng nấm men phân được từ dịch khóm lên men (có và không có bổ sung đường) thu hoạch từ hai vùng sinh thái khác nhau, Kiên Giang (Gò Quao) và Hậu Giang (Long Mỹ và Vị Thanh). Dựa vào các khóa phân loại của nấm men (hình dáng, sinh lý, sinh hóa) đã xác định các dòng nấm men phân lập được bao gồm ba giống Sacccharomyces, Pichia và Hanseniaspora. Hoạt tính lên men của các dòng nấm men phân lập cao hơn so với nấm men Saccharomyes cerevisiae (Pháp) và dòng nấm men VK1 (phân lập từ dịch khóm Vị Thanh lên men tự nhiên) có thời gian lên men nhanh và cho độ cồn cao nhất (13,26% v/v). Bằng phương pháp giải trình tự xác định được dòng nấm men VK1 là Saccharomyces cerevisiae.*

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Chế biến rượu vang quả đối với các nước trên thế giới đã là một nghề cổ xưa nhưng ở Việt Nam chỉ mới xuất hiện vài chục năm gần đây (Vũ Công Hậu, 1987). Việc tiêu thụ rượu vang tuy không mạnh nhưng từng bước được người tiêu dùng ưa chuộng do có độ cồn nhẹ, hương vị thơm tự nhiên, có tác dụng kích thích tiêu hoá… và rượu vang dần dần được chọn

thay cho các loại rượu mạnh (Vũ Công Hậu, 1987) trong các dịp lễ tết. Tuy nhiên, ngành công nghiệp sản xuất rượu vang ở nước ta vẫn còn nhiều hạn chế, chưa thực sự đáp ứng được yêu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng. Nghiên cứu nâng cao chất lượng rượu vang là vấn đề rất được quan tâm hiện nay. Một trong những phương pháp cải tiến chất lượng là sử dụng nguồn nấm men tự nhiên được phân lập từ nguyên liệu cho quá trình sản xuất rượu vang sẽ cho rượu có độ cồn cao, chất lượng rượu ổn định và mùi vị đặc trưng (Lương Đức Phẩm, 2006). Do vậy, mục tiêu nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn các dòng nấm men có hoạt lực cao từ nước khóm để sử dụng hiệu quả cho tiến trình sản xuất rượu vang khóm. Hoạt động này giúp cải thiện và tăng cường chất lượng rượu vang, góp phần đa dạng hóa sản phẩm, nâng cao giá trị kinh tế của trái khóm Kiên Giang, Hậu Giang và phần nào đáp ứng nhu cầu sử dụng các dạng nước uống có cồn đa dạng hiện nay.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện nghiên cứu

Trái khóm được thu hoạch ngẫu nhiên tại các huyện Gò Quao (Kiên Giang), Vị Thanh và Long Mỹ (Hậu Giang) và vận chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Pháp) (Sllesaffre 59703 Macrq, France).

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

*2.2.1 Phân lập nấm men*

Quy trình phân lập: Khóm chín (sử dụng cả vỏ) → Ép lấy nước → Chỉnh đến 20 $^{o}$Brix bằng đường saccharose → lên men 24 giờ ở nhiệt độ 28-30 °C → Nuôi cấy khuẩn lạc trên môi trường PGA (Potato extract 4 g/l, dextrose 20 g/l, agar 15 g/l) có bổ sung khoáng $(NH_4)_2SO_4$ và $KH_2PO_4$ → Phân lập → Tách ròng và làm thuần → Kiểm tra độ thuần → Cấy và trữ trong môi trường Sabouraud ở 4 $^{o}$C.

*Định danh sơ bộ*

Các dòng nấm men được định danh sơ bộ đến mức độ giống dựa vào các đặc điểm như: đặc tính nuôi cấy, hình thái tế bào nấm men và kích thước, quá trình nẩy chồi của tế bào nấm men, sự hình thành bào tử của tế bào nấm men, hoạt tính phân giải urea, khả năng đồng hóa đường của nấm men.

*2.2.2 Khảo sát hoạt tính lên men của các dòng nấm men phân lập thuần chủng và so sánh với nấm men Saccharomyces cerevisiae hiện có trên thị trường*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố (số dòng nấm men phân lập được tuyển chọn chỉ từ giống *Saccharomyces*) và 3 lần lặp lại.

*Khảo sát hoạt tính nấm men*: Nước khóm tươi được điều chỉnh đến pH 4,5, tổng chất khô hòa tan 20 $^{o}$Brix, thanh trùng $NaHSO_3$ (120mg/lít), trong thời gian 2 giờ, bổ sung men giống đã được chuẩn bị sẵn. Thực hiện lên men ở nhiệt độ 28-30 °C đến khi kết thúc quá trình lên men (khoảng 10 ngày).

Các chỉ tiêu theo dõi: Sự thay đổi pH, hàm lượng đường sót (%) (phương pháp Lane – Eynone), chiều cao cột khí $CO_2$ (cm) (phương pháp ống Durham), độ cồn tạo thành (% v/v) (phương pháp chưng cất).

Từ kết quả của các thí nghiệm, tuyển chọn được dòng nấm men có hoạt tính lên men tốt cho độ cồn cao.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Ảnh hưởng của địa điểm và điều kiện xử lý đến khả năng phân lập nấm men từ khóm giống Queen

Kết quả phân lập được 23 dòng nấm men từ nước khóm lên men có hoặc không bổ sung đường), khóm được thu hoạch ở Gò Quao, Vị Thanh, Long Mỹ (Bảng 1). Trong đó, số lượng dòng nấm men được phân lập từ nước khóm (khóm thu hoạch ở Gò Quao) là 9 dòng, nhiều hơn số dòng nấm men phân lập từ nước khóm lấy mẫu ở Vị Thanh (8 dòng) và Long Mỹ (6 dòng). Nấm men phân lập từ khóm ở Gò Quao và Vị Thanh có 5 hình dạng: hình cầu, hình oval lớn, oval nhỏ, elip dài và elip nhọn. Nấm men phân lập từ khóm Long Mỹ không có dòng nấm men oval nhỏ và elip nhọn. Gò Quao và Vị Thanh là 2 vùng sản xuất lớn, canh tác khóm gần như quanh năm có lẽ vì lý do này mà đã tạo nên quần thể nấm men đa dạng hơn.

**Bảng 1: Hình dạng, kích thước của các tế bào nấm men (NM) và khuẩn lạc của các dòng nấm men từ nước khóm (Gò Quao, Vị Thanh, Long Mỹ) lên men tự nhiên và có bổ sung đường được nuôi cấy trên môi trường PGA**

| Địa điểm và điều kiện xử lý | Dòng NM | Hình dạng NM | Kích thước NM (µm) | Hình dạng khuẩn lạc | Kích thước khuẩn lạc (mm) |
|---|---|---|---|---|---|
| Gò Quao (K) | GK1 | Cầu | 6,9 x 6,9 | Tròn đều, rìa nguyên, trắng sữa, nhô cao, bề mặt trơn láng | 2-2,5 |
| Gò Quao (K) | GK2 | Oval | 5,1 x 6,8 | hình tròn, nhô cao, trắng đục, bề mặt khô, bìa nguyên | 2 - 2,5 |
| Gò Quao (K) | GK3 | Elip nhọn | 3,4 x 4,5 | hình tròn, rìa nguyên, trắng đục, bề mặt trơn láng | 2,5 |
| Gò Quao (K) | GK4 | Elip dài | 5,1 x 10,7 | hình tròn, màu trắng mốc, bề mặt sần sùi, rìa răng cưa nhỏ | 4 |
| Gò Quao (C) | GC1 | Cầu | 6,9 x 6,9 | tròn đều, rìa nguyên, trắng sữa, nhô cao, bề mặt trơn láng | 2-2,5 |
| Gò Quao (C) | GC2 | Oval | 5,1 x 6,8 | hình tròn, nhô cao, trắng đục, bề mặt khô, bìa nguyên | 1,5 |
| Gò Quao (C) | GC3 | Elip nhọn | 2,6 x 5,0 | tròn, trắng sữa, rìa nguyên, bề mặt trơn láng | 2,5 |
| Gò Quao (C) | GC4 | Elip dài | 2,6 x 8,5 | không tròn, trắng đục, bề mặt khô sợi nhỏ sần sùi, rìa răng cưa lớn | 4 |
| Gò Quao (C) | GC5 | Oval nhỏ | 3,4 x 5,2 | tròn nhỏ nhô cao, màu trắng sữa, bề mặt trơn bóng | 1 |
| Vị Thanh (K) | VK1 | Cầu | 6,8 x 6,8 | Tròn, nhô cao, màu trắng sữa, rìa nguyên, bề mặt trơn láng | 2,5 |
| Vị Thanh (K) | VK2 | Oval | 5,1 x 6,8 | màu trắng sữa, nhô cao, bề mặt trơn bóng, rìa nguyên | 2,5 |
| Vị Thanh (K) | VK3 | Elip nhọn | 2,6 x 5,0 | tròn, trắng sữa, rìa nguyên, bề mặt trơn láng | 2,5 |
| Vị Thanh (K) | VK4 | Oval nhỏ | 3,4 x 4,2 | màu trắng đục, nhô cao, bề mặt khô, rìa nguyên | 1 |
| Vị Thanh (C) | VC1 | Cầu | 6,8 x 6,8 | Tròn, nhô cao, màu trắng sữa, rìa nguyên, bề mặt trơn láng | 2,5 |
| Vị Thanh (C) | VC2 | Oval | 5,2 x 6,7 | nhô cao, màu trắng sữa, bề mặt trơn bóng, rìa nguyên | 2 |
| Vị Thanh (C) | VC3 | Oval nhỏ | 3,4 x 4,2 | nhô cao, màu trắng đục, bề mặt khô, rìa nguyên | 1 |
| Vị Thanh (C) | VC4 | Elip dài | 2,6 x 8,5 | không tròn, màu trắng mốc, rìa tạo sợi nhỏ xung quanh, bề mặt tạo sợi giống mốc | 3 |
| Long Mỹ (K) | LK1 | Cầu | 5,1 x 5,1 | tròn nhô cao màu trắng đục, bề mặt khô, rìa nguyên. Khuẩn lạc bám chặt vào bề mặt thạch | 2 |
| Long Mỹ (K) | LK2 | Oval | 6,8 x 7,7 | tròn nhô cao, bề mặt trơn bóng, rìa nguyên, màu trắng sữa | 2 |
| Long Mỹ (K) | LK3 | Elip dài | 3,4 x 8,5 | không tròn, màu trắng mốc, rìa răng cưa, bề mặt tạo sợi giống mốc | 4 |
| Long Mỹ (C) | LC1 | Cầu | 5,1 x 5,1 | tròn nhô cao màu trắng đục, bề mặt khô, rìa nguyên. Khuẩn lạc bám chặt vào bề mặt thạch | 2 |
| Long Mỹ (C) | LC2 | Oval lớn | 5,1 x 5,8 | nhô cao, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng rìa nguyên | 2 |
| Long Mỹ (C) | LC3 | Elip dài | 5,1 x 13,6 | trắng đục nhô cao, bề mặt trơn láng, tròn rìa nguyên | 2 |

*Chú thích: (K) lên men tự nhiên; (C) dịch lên men có bổ sung đường saccharose*

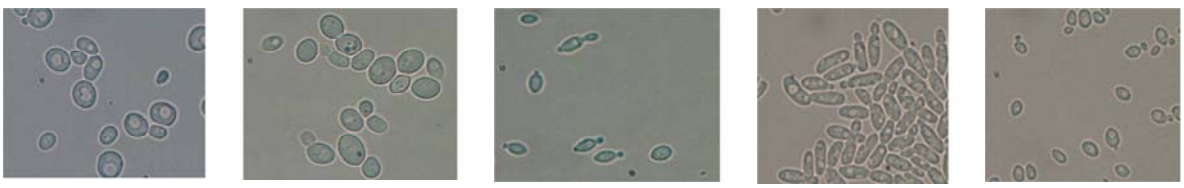
Hình dạng nấm men phân lập từ dịch lên men bổ sung đường đa dạng hơn mẫu phân lập lên men tự nhiên. Việc bổ sung đường giúp các dòng nấm men ít sự cạnh tranh, tăng sinh khối tốt hơn và giảm khả năng bỏ sót các dòng nấm men có mật số thấp trong quần thể ban đầu (Lương Đức Phẩm, 2006).

Các dòng nấm men tương ứng với mỗi hình dạng trong hai điều kiện lên men đều có điểm giống nhau về hình dạng và kích thước tế bào, đặc điểm khuẩn lạc, màu sắc khuẩn lạc hoặc khác biệt không đáng kể (Bảng 1).

### 3.2 Định danh sơ bộ nấm men (đến mức độ giống)

#### *3.2.1 Đặc điểm hình thái của 23 dòng nấm men phân lập*

Kết quả mô tả đặc điểm hình thái tế bào nấm men cho thấy 23 dòng nấm men có thể xếp thành 5 nhóm hình dạng đặc trưng (Hình 1).



Nhóm 1. Tế bào hình cầu | Nhóm 2. Tế bào hình oval lớn | Nhóm 3. Tế bào hình elip nhọn | Nhóm 4. Tế bào hình elip dài | Nhóm 5. Tế bào hình oval nhỏ

**Hình 1: Hình dạng 5 nhóm nấm men**

*Nhóm 1 – tế bào nấm men hình cầu có 6 dòng: GK1, GC1, LK1, LC1, VK1, VC1.*
*Nhóm 2 – tế bào hình oval lớn có 6 dòng: GK2, GC2, LK2, LC2, VK2, VC2.*
*Nhóm 3 – tế bào hình elip nhọn có 3 dòng: GK3, GC3, VK3.*
*Nhóm 4 – tế bào hình elip dài có 5 dòng: GK4, GC4, LK3, LC3, VC4.*
*Nhóm 5 – tế bào hình oval nhỏ có 3 dòng: GC5, VK4, VC3.*

#### *3.2.2 Hình thức nẩy chồi của các nhóm nấm men*

Quan sát cho thấy 23 dòng nấm men đều có khả năng nẩy chồi với hai hình thức nẩy chồi là: nẩy chồi nhiều hướng và nẩy chồi lưỡng cực (Hình 2).

Nhóm1. hình cầu (nẩy chồi nhiều hướng) | Nhóm 2. hình oval (nẩy chồi nhiều hướng) | Nhóm 3. hình elip nhọn (nẩy chồi lưỡng cực) | Nhóm 4. hình elip dài (nẩy chồi nhiều hướng) | Nhóm 5. hình oval nhỏ (nẩy chồi nhiều hướng)

**Hình 2: Hình thức nẩy chồi của các nhóm nấm men**

Tế bào nẩy chồi nhiều hướng bao gồm 4 nhóm hình dạng: nhóm 1 nấm men hình cầu (GK1, GC1, LK1, LC1, VK1, VC1), nhóm 2 nấm men hình oval lớn (GK2, GC2, LK2, LC2, VK2, VC2), nhóm 4 nấm men hình elip dài (GK4, GC4, LK3, LC3, VC4), nhóm 5 nấm men hình oval nhỏ (GC5, VK4, VC3).

Tế bào nẩy chồi lưỡng cực: nhóm 3 nấm men hình elip nhọn (GK3, GC3, VK3).

#### *3.2.3 Khả năng tạo bào tử trên môi trường nghèo dinh dưỡng*

Khả năng tạo bào tử là yếu tố đầu tiên để phân loại nấm men thuộc lớp nấm túi (Ascospore) hay lớp nấm bất toàn (Fungi imperfect). Hình thành bào tử là một hình thức sinh tồn của nấm men khi gặp điều kiện bất lợi cho hoạt động sống. Bào tử thường có vách rất bền và khả năng chịu nhiệt cao (khoảng 70 $^{o}$C).

Số bào tử xác định được ở các nhóm như sau: nhóm 1 nấm men hình cầu (GK1, GC1, LK1, LC1, VK1, VC1): tế bào xuất hiện 1 - 2 bào tử hình tròn; nhóm 2 nấm men hình oval lớn (GK2, GC2, LK2, LC2, VK2, VC2): tế bào xuất hiện 1 - 2 bào tử hình tròn; nhóm 3 nấm men hình elip nhọn (GK3, GC3, VK3): tế bào xuất hiện 1 - 4 bào tử hình tròn; nhóm 4 nấm men hình elip dài (GK4, GC4, LK3, LC3, VC4): tế bào xuất hiện 1 - 2 bào tử hình tròn và nhóm 5: nấm men hình oval nhỏ (GC5, VK4, VC3): tế bào xuất hiện 1 - 2 bào tử hình tròn.

### *3.2.4 Khả năng lên men đường glucose và saccharose*

Kết quả thể hiện ở Bảng 2 cho thấy tất cả 23 dòng nấm men phân lập đều sử dụng được đường glucose, tuy nhiên chỉ có nhóm hình cầu, hình oval lớn và 1 dòng elip dài (LC3) lên men được đường saccharose.

**Bảng 2: Khả năng lên men đường glucose và saccharose của 23 dòng nấm men phân lập**

| Nhóm nấm men | Đường glucose | Đường saccharose |
|---|---|---|
| 1. Hình cầu GK1, GC1, LK1, LC1, VK1, VC1 | Tạo nhiều bọt khí, chiều cao cột khí $CO_2$ đạt 4,5 cm sau 10 – 12 giờ lên men | Tạo nhiều bọt khí, chiều cao cột khí $CO_2$ đạt 4,5 cm sau 16 giờ lên men |
| 2. Hình oval lớn GK2, GC2, LK2, LC2, VK2, VC2 | Tạo bọt nhiều bọt khí nhỏ, chiều cao cột khí $CO_2$ đạt 4,5 cm sau 11 – 20 giờ lên men. | Tạo bọt nhiều bọt khí, chiều cao cột khí $CO_2$ đạt 4,5 cm sau 11- 30 giờ lên men. |
| 3. Hình elip nhọn GK3, GC3 VK3 | Chiều cao cột khí $CO_2$ đạt 4,5 cm sau 27 – 32 giờ lên men. | Không lên men. |
| 4. Hình elip dài GK4, GC4, LK3, LC3, VC4 | Tạo bọt chiều cao cột khí $CO_2$ đạt 4,5 cm sau 12 - 42 giờ lên men. | Không lên men (ngoại trừ dòng LC3 tạo chiều cao cột khí 4,5 cm sau 32 giờ lên men). |
| 5. Oval nhỏ GK5, VK4, VC3 | Tạo bọt khí, chiều cao cột khí $CO_2$ đạt 4,5 cm sau 18 - 34 giờ lên men. | Không lên men. |

Với cùng hình dạng nấm men, thời gian để cột khí $CO_2$ đạt đến mức 4,5cm đối với lên men đường saccharose thường chậm hơn lên men glucose. Điều nầy chính là do saccharose là disaccharide, nên trước khi hấp thụ, nấm men phải sử dụng enzyme invertase để thủy phân đường này thành glucose và fructose, sau đó mới được vận chuyển vào tế bào.

### *3.2.5 Khả năng đồng hóa urea*

Trong môi trường Christensen có chứa chất chỉ thị màu phenol red nên môi trường có màu vàng (ở pH môi trường 6,8). Khi nấm men có enzyme urease để phân giải urea tạo thành $CO_2$ và $NH_3$, chính $NH_3$ làm pH môi trường tăng lên trên 8,2 thì môi trường sẽ có màu hồng (bright pink). Trong 23 dòng nấm men, có 4 dòng (GK4, GC4, LK3, VC4) có khả năng tạo ra urease để phân giải urea tạo thành $CO_2$ và $NH_3$ (Hình 3).

Nhóm 1: GK1, GC1, LK1, LC1, VK1, VC1 | Nhóm 2: GK2, GC2, LK2, LC2, VK2, VC2 | Nhóm 3: GK3, GC3, VK3 | Nhóm 4: GK4, GC4, LK3, LC3, VC4 | Nhóm 5: GK5; VK4; VC4

**Hình 3: Màu môi trường Christensen nuôi cấy nấm men sau 6 ngày**

Dựa vào khóa phân loại của Kreger-van Rij (1984), mô tả phân loại sơ bộ đến giống của Kurtzman và Fell (1998), có thể phân loại sơ bộ như sau:

Các dòng nấm men thuộc nhóm 1 (hình cầu), nhóm 2 (hình oval lớn) và một dòng hình elip dài (LC3) thuộc giống nấm men *Saccharomyces*: GK1, GC1, LK1, LC1, VK1,

VC1, GK2, GC2, LK2, LC2, VK2, VC2, LC3. Nấm men nhóm 5 (hình oval nhỏ) là giống nấm men *Hanseniaspora*: GK3, GC3, VK3, GC5, VK4, VC3. Các dòng nấm men hình elip dài nhóm 4: GK4, GC4, LK3, VC4 thuộc giống *Pichia.*

### 3.3 Khả năng lên men rượu vang khóm của các chủng nấm men phân lập và nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Từ kết quả thí nghiệm trên, 12 dòng nấm men (9 dòng *Saccharomyces*: GK1, GK2, LK1, LK2, LC1, LC3, VK1, VK2, VC2**;** 2 dòng *Pichia*: GK4, VC4 và 1 dòng *Hanseniaspore* VK4) có hình dạng khác nhau được chọn để khảo sát khả năng lên men rượu và so sánh với nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Pháp).

#### *3.3.1 Chiều cao cột khí $CO_2$ ở ống Durham*

Trong quá trình lên men rượu có 2 sản phẩm chính là rượu ethanol và $CO_2$, để xác định hoạt lực lên men của nấm men có thể dựa trên khả năng thoát khí $CO_2$ trong quá trình lên men (Nguyễn Đức Lượng *và ctv.,* 2003). Trên cơ sở tạo cột khí $CO_2$ (Bảng 3) trong ống Durham, nhận thấy các dòng nấm men có ký hiệu VC2, VK1, VK2, TM lên men nhanh chóng. Các dòng còn lại sau 14 giờ cột khí tạo thành đạt 45 mm. Ngoại trừ VK4 và GK4 vẫn không lên men sau 16 giờ.

**Bảng 3: Chiều cao cột khí $CO_2$ (cm) của 13 dòng nấm men**

| STT | Dòng nấm men | Thời gian quan sát (giờ) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **2** | **4** | **6** | **8** | **10** | **12** | **14** | **16** |
| 1 | **TM** | 0,5 | 3,0 | **4,5** | | | | | |
| 2 | **VC2** | 0,7 | 3,5 | **4,5** | | | | | |
| 3 | **GK1** | – | – | 0,5 | 3,0 | 0,6 | 2,0 | **4,5** | |
| 4 | **VK1** | 0,1 | 2,0 | 4,3 | **4,5** | | | | |
| 5 | **GK2** | – | – | – | – | 0,1 | 1,8 | **4,5** | |
| 6 | LK2 | – | – | – | – | 0,2 | 2,5 | **4,5** | |
| 7 | LC3 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,5 | 2,5 | 4,5 | | |
| 8 | LC1 | – | – | – | – | 0,1 | 0,8 | 2,7 | **4,5** |
| 9 | VK2 | 0,5 | 0,5 | 1,6 | **4,5** | | | | |
| 10 | VC4 | – | 0,3 | 0,4 | 1,6 | 2,0 | 2,5 | **45** | |
| 11 | GK4 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 12 | LK1 | – | – | – | – | 0,1 | 0,3 | 3,0 | **4,5** |
| 13 | VK4 | – | – | – | – | – | – | – | – |

*Ghi chú: (-) chưa tạo $CO_2$ trong ống Durham*

#### *3.3.2 Khả năng lên men rượu của 13 dòng nấm men*

Sau quá trình lên men, pH rượu vang lên men bởi 13 dòng nấm men đều giảm so với pH = 4,5 của dịch lên men ban đầu (Bảng 4). Hoạt động của nấm men trong quá trình lên men kỵ khí sinh ra $CO_2$ và một số acid hữu cơ làm giảm pH của dịch lên men (Lương Đức Phẩm, 2006). Trong đó pH ở mẫu dòng TM và VK1 chỉ giảm nhẹ, các dòng phân lập còn lại thấp hơn 4,0. Hai dòng GK4 và VC4 thuộc giống *Pichia* và VK4 thuộc giống *Hanseniaspore* lên men rượu rất thấp từ 1–2% v/v. Riêng GK4 và VC4 tạo lớp màng trắng trên bề mặt dịch lên men. Theo Nguyễn Đức Lượng *và ctv.* (2003), chúng sinh ra các acid bay hơi và các chất khác cho mùi vị ester trong bia. Khi có mặt thoáng trong chai, thùng chứa thì chúng phát triển làm cho bia bị đục và giảm chất lượng. Giống *Hanseniaspore* phát triển ở dịch quả, dịch đường, malt tạo cặn và có vòng bên thành dụng cụ chứa đựng. Đây là loại khá phổ biến trong tự nhiên, thường gặp ở các loại quả chứa đường glucose và fructose, không lên men hoặc lên men yếu. Như vậy 2 giống men *Pichia* và *Hanseniaspore* không thích hợp để chế biến vang khóm. 9 dòng *Saccharomyces* phân lập có khả năng tạo ethanol là rất khác nhau; trong đó dòng VK1 tạo độ rượu cao nhất (13,26% v/v), cao hơn dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* chuẩn (11,1% v/v). Các dòng GK1, GK2 và VC2 tạo được độ rượu trung bình (7,26%; 6,13%, và 8,13%, tương ứng). Các dòng VK2, LK1, LC1, LK2, LC3 tạo rượu rất

thấp (từ 3–4% v/v). Nấm men VK1 và TM có khả năng lên men kiệt đường trong dịch quả, đồng thời hàm lượng ethanol cao làm tăng khả năng bảo quản rượu vang khóm.

Như vậy, dòng VK1 được phân lập từ dịch khóm lên men tự nhiên là dòng nấm men được tuyển chọn từ 23 dòng nấm men phân lập và thể hiện hoạt lực cao nhất với các ưu điểm có thời gian kết thúc cột khí $CO_2$ sớm và rượu có độ cồn cao.

**Bảng 4: Độ cồn, tỷ lệ đường sót, độ Brix, và pH tạo thành và sau lên men**

| STT | Dòng nấm men | pH sau lên men | Bx sau lên men | Độ cồn (ở 20°C) | Tỷ lệ đường sót (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TM | 4,49 | 7,20[a] | 11,10[h] | 0 |
| 2 | GK1 | 3,70 | 12,27[c] | 7,26[f] | 5,30 |
| 3 | GK2 | 3,70 | 12,67[cd] | 6,13[e] | 5,33 |
| 4 | VK1 | 4,45 | 6,87[a] | 13,26[k] | 0 |
| 5 | VK2 | 3,70 | 15,33[f] | 4,26[d] | 6,65 |
| 6 | LK1 | 4,00 | 15,87[g] | 2,74[b] | 5,40 |
| 7 | VC2 | 4,10 | 11,20[b] | 8,13[g] | 5,20 |
| 8 | LC1 | 3,60 | 13,00[d] | 4,6[d] | 5,36 |
| 9 | LK2 | 3,70 | 15,33[f] | 4,26[d] | 6,17 |
| 10 | LC3 | 3,60 | 14,40[e] | 3,16[c] | 5,44 |
| 11 | VK4 | 4,10 | 14,33[e] | 2,7[b] | 6,05 |
| 12 | VC4 | 4,00 | 17,13[h] | 1,79[a] | 7,90 |
| 13 | GK4 | 4,00 | 17,20[h] | 1,65[a] | 8,14 |

** Số liệu là trung bình của ba lần lặp lại, các số mang chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê (p<0,05) theo phép thử LSD*

### *3.3.3 Khả năng chịu cồn của dòng nấm men VK1*

Khả năng chịu cồn là đặc tính quan trọng cho việc sử dụng nấm men trong sản xuất ethanol công nghiệp (Jimenez và Benitez, 1986). Dịch lên men có chứa 2% glucose và nồng độ ethanol được bổ sung lần lượt là 0, 6, 9, 12, 15% v/v và mật số nấm men ban đầu là $10^6$ tế bào/ml.

*Chiều cao ống Durham*

Xác định khả năng chịu cồn của nấm men bởi sự tạo khí $CO_2$ trong ống Durham ở nhiệt độ 30 °C và mật số tế bào sống trong dịch lên men ở các khoảng thời gian (0, 24, 48, 72, 96, 120 giờ). Kết quả ở bảng 5 cho thấy thời gian để chiều cao cột khí $CO_2$ tăng lên đến 4,5 cm trong điều kiện tăng nồng độ ethanol bổ sung ban đầu. Điều này chứng tỏ nấm men sinh trưởng và phát triển tốt nhất ở mẫu không có bổ sung ethanol và tốc độ sinh trưởng giảm dần khi tăng nồng độ ethanol trong dung dịch. Sự tăng sinh khối của nấm men chậm hơn khi bổ sung 6% ethanol, tuy nhiên cột khí $CO_2$ trong ống Durham cũng đạt mức tối đa 4,5 cm sau 48 giờ. Trong dịch lên men có bổ sung 9% và 12% ethanol, khí sinh ra trong ống Durham rất ít vì nấm men bị sốc ở giai đoạn này, nấm men có thể bị ức chế trao đổi chất. Riêng ở mẫu có bổ sung 15% cồn đã vô hoạt hoàn toàn khả năng trao đổi chất của nấm men VK1, không có bọt khí được tạo thành sau 120 giờ lên men.

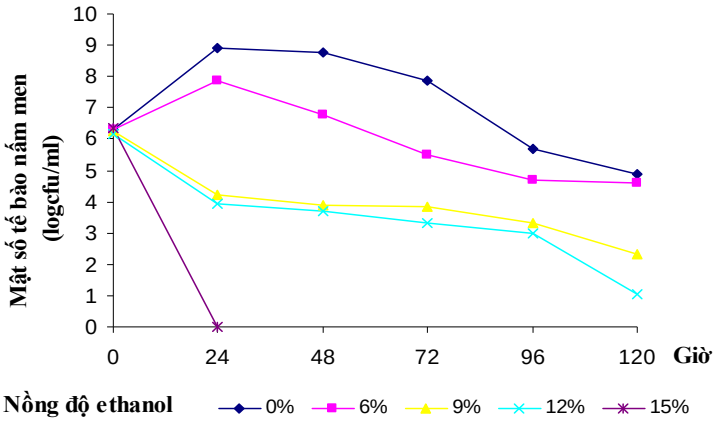
**Bảng 5: Chiều cao cột khí (cm) hình thành trong ống Durham**

| Nồng độ ethanol (% v/v) | Thời gian (giờ) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| 0 | 0 | 4,5 | - | - | - | - |
| 6 | 0 | 3,0 | 4,5 | - | - | - |
| 9 | 0 | 0,1 | 2,1 | 2,3 | 2,7 | 2,9 |
| 12 | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,9 | 0,9 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Mật số nấm men*

Ở mẫu đối chứng 0% cồn và bổ sung 6% cồn thì nấm men phát triển bình thường, sau 48 giờ mật số nấm men đạt 7,9 - 8,9 log cfu/ml (tăng 1,9 - 2,9 log cfu/ml so với mật số ban đầu là 6 log cfu/ml) (Hình 4). Sau 120 giờ (5 ngày) lên men, mật số nấm men sống ở mẫu 0% và 6% cồn đều giảm còn lại 4,6 - 4,9 log cfu/ml. Có thể do nguồn dinh dưỡng trong dịch lên men đã cạn kiệt, nấm men chết rất nhiều so với ban

đầu. Trong dịch lên men có 9% và 12% cồn, từ 48–96 giờ mật số nấm men giảm không đáng kể, có thể lúc này nấm men đã thích nghi với nồng độ ethanol trong môi trường. Như vậy nấm men VK1 có thể chịu được độ cồn 12% vì ở nồng độ này nấm men vẫn tồn tại nhưng không thể trao đổi chất với môi trường. Khi tăng nồng độ ethanol bổ sung lên 15%, nấm men không thể chịu đựng được cho đến 24 giờ, có lẻ chúng đã chết hoàn toàn nên không có colony nào xuất hiện trên đĩa môi trường nuôi cấy.




**Hình 4: Đồ thị thể hiện khả năng chịu cồn của nấm men VK1**

### 3.4 Định danh dòng nấm men phân lập VK1 bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 28S rRNA

Dòng VK1 được định danh bằng phương pháp giải và phân tích trình tự gen 28S rRNA. Kết quả giải trình tự trên đoạn gen 28S rRNA của dòng VK1 như sau:

TGGCAGTATTCCACAGGCTATAATACTT
ACCGAGGCAAGCTACATTCCTATGGATTT
ATCCTGCCACCAAAACTGATGCTGGCCCA
GTGAAATGCGAGATTCCCCTACCCACAAG
GAGCAGAGGGCACAAAACACCATGTCTGA
TCAAATGCCCTTCCCTTTCAACA

Trình tự đoạn gen được giải gồm 168 base nitrogen và đoạn gen này được so sánh với các gen 28S rRNA của nấm men trên Genbank với phần mềm BLASTN.

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|---|---|---|---|---|---|---|
| JN417615.1 | Saccharomyces cerevisiae strain 1.12 26S ribosomal RNA gene, partia | 303 | 303 | 100% | 1e-79 | 99% |
| JF682845.1 | Saccharomyces cerevisiae strain NAU-ZH-GY1 26S ribosomal RNA ger | 303 | 303 | 100% | 1e-79 | 99% |
| JF682782.1 | Saccharomyces cerevisiae strain WHH6 26S ribosomal RNA gene, part | 303 | 303 | 100% | 1e-79 | 99% |
| JN248598.1 | Saccharomyces cerevisiae isolate 31 26S ribosomal RNA gene, partial | 303 | 303 | 100% | 1e-79 | 99% |

```
gb|JN417615.1|  Saccharomyces cerevisiae strain 1.12 26S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=587 ; Score =  303 bits (164),  Expect = 1e-79
 Identities = 167/168 (99%), Gaps = 1/168 (1%); Strand=Plus/Minus
```

**Hình 5: So sánh trình tự gen 28S rRNA của VK1 và của chủng *Saccharomyces cevevisiae* với số đăng ký JN417615.1**

Kết quả nhận được cho thấy đoạn gen 28S rRNA của dòng VK1 có độ tương đồng lên đến 99% so với trình tự gen 28S rRNA của *Saccharomyces cevevisiae* strain 1.22 với số đăng ký trên ngân hành gen quốc tế là JN417615.1 (Hình 5).

Kết quả định danh đã xác định dòng VK1 là loài Saccharomyces *cerevisiae,* đây là loài nấm men hữu dụng trong công nghiệp sản xuất rượu, nó không chỉ lên men nước quả hay môi trường chứa hàm lượng đường cao mà còn tạo ra sản phẩm lên men với hương vị đặc trưng. Chúng có dạng hình cầu, oval hoặc elip, hình thái thay

đổi tùy theo loài và môi trường nuôi cấy nấm men, cấu tạo đơn bào, sinh sản chủ yếu bằng cách nẩy chồi, có thể đồng hóa phosphor, kali và các hợp chất hữu cơ. Loài này lên men rượu có nồng độ tới 16% v/v, nếu dịch lên men là đường hay sirô có thể làm cho nấm men tạo ra 18% v/v rượu hoặc cao hơn (Pretorius, 2000).

## 4 KẾT LUẬN

Phân lập được 23 dòng nấm men từ khóm (giống Queen) thu hoạch ở 3 địa điểm: Vị Thanh (tỉnh Hậu Giang), Long Mỹ (tỉnh Hậu Giang) và Gò Quao (Kiên Giang) với 2 dạng lên men tự nhiên và lên men có bổ sung đường. Dựa trên mô tả các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh lý bước đầu đã xác định được 3 giống nấm men *Saccharomyces, Hanseniaspora* và *Pichia*. Dòng nấm men VK1 phân lập từ dịch khóm (trái thu hoạch tại Vị Thanh) lên men tự nhiên (được tuyển chọn từ 23 dòng nấm men phân lập) là dòng nấm men có hoạt lực lên men cao nhất (độ cồn đạt được 13,26% v/v). Thực hiện định danh bằng phương pháp giải trình tự đã xác định dòng VK1 là loài *Saccharomyces cerevisiae.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jimenez, J. and Benitez, T. 1986. Characterization of wine yeasts for ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 150-154.
2. Kreger-van Rij N.J.W. 1984. The yeast, a taxonomic study, 3th ed., Elsevier, Amsterdam.
3. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 1998. The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th ed, Elsevier, Amsterdam, pp.113-121.
4. Lương Đức Phẩm. 2006. Nấm men công nghiệp. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
5. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết. 2003. Thí nghiệm công nghệ sinh học tập 2, Thí nghiệm vi sinh vật học, NXB Đại quốc gia TP Hồ Chí Minh, tr 260 – 291.
6. Pretorius. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of wine marking yeast, pp 675 – 729.
7. Vũ Công Hậu. 1987. Làm vang trái cây trong gia đình. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.