

KHẢO SÁT GIỚI TÍNH VÀ CÁC TÍNH TRẠNG SINH HỌC VÀ CHỐNG CHỊU CỦA CÁC CHỦNG NẤM MEN BÁNH MỠ (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Lưu Thị Phương, Nguyễn Thị Bích Lưu, Đặng Xuân Nghiê

Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Các quy trình thí nghiệm đã được thiết lập mới để khảo sát giới tính và các tính trạng sinh học và chống chịu của 7 chủng nấm men làm nở bánh mỳ được phân lập từ cả trong và ngoài nước, trong số đó có chủng thương mại Ger1 đã được đăng ký bản quyền. Các thí nghiệm đã cho thấy, chủng Ger1 có giới tính là alpha, 3 chủng Ger2, DN1, P1 có giới tính là a và 3 chủng Gm4, KD1, KD2 là lưỡng bội. Các chủng nấm men sâu tằm được có sự khác nhau đáng kể về mỗi tính trạng sinh học và chống chịu. Tốc độ sinh trưởng và năng suất sinh khối của chủng KD1 và KD2 là cao nhất, còn của chủng Ger1 là thấp nhất. Trừ chủng Ger1, các chủng nấm men có sức làm nở bột mỳ ở 40°C nhanh nhất so với ở 30°C và 45°C. Chủng KD1 có sức làm nở bột mỳ có hàm lượng đường cao tốt nhất, đạt yêu cầu trong sản xuất công nghiệp. Chất lượng lên men bánh mỳ của chủng DN1 và P1 là cao hơn khá nhiều so với chủng đối chứng. Khả năng chịu hạn của chủng KD2 và, chịu đông lạnh của chủng KD1 là vượt trội so với các chủng còn lại. Nghiên cứu cũng cho thấy các chủng nấm men phân lập từ trong nước hoàn toàn có thể đáp ứng các yêu cầu của việc lên men làm nở bánh mỳ ở quy mô công nghiệp, đồng thời các kết quả cũng xác định được các chủng nấm men thích hợp cho việc làm nở mỗi loại bánh mỳ khác nhau.

Từ khóa: bánh mỳ, chịu lạnh, chịu khô hạn, chịu áp suất thẩm thấu, giới tính nấm men, MAT locus, nấm men, *Saccharomyces cerevisiae*, sinh khối nấm men

MỞ ĐẦU

Loài nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) đã được người Ai Cập cổ đại dùng để lên men làm nở bánh mỳ cách đây khoảng 5000 năm. Ngày nay, nấm men là vi sinh vật không thể thiếu trong công nghiệp thực phẩm và đồ uống. Các chủng nấm men thương phẩm được chọn tạo để ổn định về chất lượng, khoẻ, lên men nhanh và có sức chống chịu cao. *S. cerevisiae* không chỉ được sử dụng để lên men bánh mỳ mà còn được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm như lên men bia, lên men rượu, sử dụng trong sản xuất rượu vang. Trong y học, *S. cerevisiae* được dùng để sản xuất insulin chữa bệnh tiểu đường, hay mới gần đây chúng được sử dụng để biểu hiện protein của virus viêm gan B (Nguyễn Thị Phương Trang *et al.*, 2007). Gần đây người ta càng tìm ra nhiều ứng dụng của *S. cerevisiae* để phục vụ cho cuộc sống của con người.

Trên thế giới, nghiên cứu ứng dụng nấm men bắt đầu bằng việc phân lập, phân loại, chọn lựa, lai tạo các chủng nấm men có các tính trạng sinh học và chống chịu tốt để dùng vào sản xuất thực phẩm, đồ uống có cồn cũng như thức ăn chăn nuôi (Đậu Ngọc Hào, 2000; Lê Thành Tâm, 1996; Meric *et al.*, 1995;

Myers, Attfeld, 1999). *S. cerevisiae* còn được sử dụng để biểu hiện các protein hay enzyme tái tổ hợp phục vụ nhiều mục đích khác nhau (Ansen *et al.*, 2009; Schoeman *et al.*, 1999; Trần Văn Hiếu *et al.* 2006). Ngày càng nhiều chủng nấm men biến đổi gen với khả năng lên men cao hơn, chất lượng lên men tốt hơn, thành phần dinh dưỡng quý hơn và sức chống chịu cao, đặc biệt là khả năng chịu lạnh, đã được tạo ra (Nevoigt *et al.*, 2000; Panadero *et al.*, 2007; Randerz-Gil *et al.*, 1999).

Nhu cầu trong nước ta về men giống và sinh khối nấm men *S. cerevisiae* là khá lớn và đang tăng nhanh cùng với quá trình đô thị hóa và công nghiệp hóa. Tuy nhiên, các sản phẩm men giống và thực phẩm từ nấm men *S. cerevisiae* của nước ta chỉ đáp ứng được một phần rất nhỏ nhu cầu đó. Qua tìm hiểu sơ bộ tình hình sản xuất các loại bánh mỳ và đồ uống có cồn ở trong nước, chúng tôi nhận thấy các cơ sở sản xuất nhỏ lẻ thường dùng men giống được sản xuất thủ công, chưa được tuyển chọn trên cơ sở khoa học nên chất lượng thực phẩm và đồ uống chưa cao và không ổn định. Các thương hiệu nổi tiếng, với thị phần rất lớn, lại đang phải tốn khá nhiều ngoại tệ để mua men giống từ các công ty của nước ngoài do trong nước chưa có sản phẩm với chất lượng và độ ổn định tương đương.

Vì thực tế nêu trên chúng tôi đã khảo sát các tính trạng sinh học và chống chịu của các chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) làm nở bánh mỳ, làm cơ sở để sản xuất giống nấm men tươi và men khô phục vụ cho các quy mô sản xuất khác nhau cho công nghiệp sản xuất bánh mỳ nói riêng và cho công nghiệp thực phẩm nói chung.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Các chủng nấm men được phân lập từ các nguồn men giống truyền thống trong nước và nước ngoài bao gồm Ger2 (CHLB Đức), P1 (Pháp), DN1 (Việt Nam), Gn4 (Việt Nam), KD1 (Việt Nam), KD2 (Việt Nam). Chủng Ger1 được phân lập từ nấm men bánh mỳ khô thương phẩm đã đăng ký bản quyền của công ty Kuehle (CHLB Đức) được dùng trong các thí nghiệm như một chủng đối chứng.

Môi trường YPD

1% Yeast extract; 2% peptone; 2% glucose. Thêm 2% agar vào môi trường YPD lỏng để được môi trường thạch tương ứng.

Thành phần bột mỳ nhào

Tỷ lệ bột: nước: muối: đường: men ướt tương ứng là 100: 60: 1: 3: 1,2. Trong các thí nghiệm khảo sát khả năng lên men làm nở bánh mỳ có nồng độ đường cao của các chủng nấm men, lượng đường sucrose được tính theo % khối lượng của bột mỳ khô đầu vào. Nấm men ướt được thu từ dịch nuôi cấy ở đầu pha ổn định bằng ly tâm 3000 rpm trong 5 phút. Trước khi cho nấm men vào nhào và bắt đầu tính giờ, các thành phần khác của bột nhào được trộn đều.

PCR

Với cặp mồi dưới đây, phản ứng colony-PCR với các tế bào nấm men có kiểu giới tính α sẽ cho một băng DNA với kích thước khoảng 1000 bp, với tế bào có kiểu giới tính α sẽ cho một băng DNA với kích thước khoảng 1100 bp; còn đối với các tế bào nấm men lưỡng bội sẽ cho ra cả hai băng DNA kể trên.

Mat-RW: TTAAGATAAGAACAAGAATGATGC

Mat-FW: GGTAAATTACAGCAATAGAAAAGAGC

Thành phần một phản ứng PCR: 40,5 μ l ddH₂O; 5 μ l 10X PCR buffer; 1 μ l 10mM dNTPs; 4 μ l primer mix; 2 μ l selfmade Taq; 0,5 μ l tế bào nấm men.

Chu trình nhiệt của phản ứng colony-PCR: 95°C 5 phút $\rightarrow$ (95°C 30 giây $\rightarrow$ 53°C 30 giây $\rightarrow$ 72°C 90 giây) $\times$ chu kỳ $\rightarrow$ 72°C 2 phút $\rightarrow$ 4°C khi kết thúc.

Khảo sát tốc độ sinh trưởng và năng suất sinh khối

Tốc độ sinh trưởng của các chủng nấm men được xác định bằng phương pháp đo mật độ tế bào (ở OD₆₂₀) với máy quang phổ. Nấm men được nuôi lắc 200 rpm trong môi trường YPD ở 30°C.

Xác định sức làm nở bột mỳ

Cân các nguyên liệu: bột mỳ, muối ăn, đường vào khay rồi trộn đều, cho nước vào nhào thật kỹ trong 10 phút, tiếp tục cho nấm men ướt vào nhào thêm 10 phút. Sau đó, cục bột được chia làm 3 phần (mỗi phần 10,5 g) cho vào khuôn và cho vào ống nghiệm. Đưa các ống nghiệm vào trong bể ổn nhiệt được bật sẵn ở nhiệt độ cần khảo sát. Đo chiều cao khối bột để tính thể tích. Các mẫu được làm đồng thời với khối lượng nguyên liệu và nấm men như nhau.

Đánh giá cảm quan chất lượng bánh mỳ thành phẩm

Trong thí nghiệm này, bột nhào được nhào tương tự như các thí nghiệm đo sức làm nở ở trên với hàm lượng đường sucrose là 3% (so với khối lượng bột). Sau khi nhào bột với nấm men, để bột nhào nghỉ trong 45 phút sau đó đem rạch bánh, phết trứng và đem đi nướng trong 20 phút ở nhiệt độ thích hợp. Bằng việc xây dựng bảng câu hỏi để điều tra ngẫu nhiên với người đánh giá là người nhân viên của cơ sở sản xuất bánh mỳ và những sinh viên trong trường đã được tập huấn (tổng số 10 người), chất lượng bánh mỳ sau nướng được đánh giá bởi các chỉ tiêu như: mùi, vị, hình thức bên ngoài của sản phẩm cũng như thể tích, cấu trúc bên trong, màu sắc và độ giòn của vỏ bánh. Các chỉ tiêu được đánh giá theo thang điểm 1 - 10 (Curic et al., 2008; Plessas et al., 2005). Việc nướng bánh được tiến hành tại cơ sở nướng bánh mỳ của chị Hoàng Thanh Huyền ở Đức Tú - Đồng Anh - Hà Nội

Đánh giá khả năng chịu lạnh

Tế bào nấm men từ 5 ml dịch nuôi lắc đến OD₆₂₀ khoảng bằng 1 được đem ly tâm, rửa bằng nước cất vô trùng. Sau đó, tế bào nấm men được hòa 1,2 ml nước cất vô trùng và vortex đều. Pipette 200 μ l dịch nấm men ra 6 ống eppendorf. Ba ống được đưa vào tủ lạnh mát 4°C, 3 ống còn lại được đặt ngẫu nhiên vào giá kim loại để ống eppendorf đã được đặt trước

vào từ -20°C (Dang, 2008). Sau 20 h, mẫu được lấy ra làm tan đá đột ngột bằng cách thả vào bể ổn nhiệt ở 30°C . Sau đó chúng được để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Mẫu đối chứng được xác định có tỷ lệ sống sót là 100%.

Đánh giá khả năng chịu khô hạn

5 ml mẫu đã nuôi đến OD_{620} bằng 5 được đem ly tâm, rửa lại bằng nước cất vô trùng và ly tâm lại. Sau đó, tế bào nấm men được hòa trong 1,2 ml nước vô trùng và đem vortex nhẹ. Dịch nấm men này được hút ra 6 ống eppendorf với thể tích mẫu ở mỗi ống là 200 μl sau đó được đem ly tâm bỏ hết nước. 3 ống được mở nắp và 3 ống được đậy nắp. Các ống chứa mẫu được đặt ngẫu nhiên trong tủ với nhiệt độ 30°C (Tsaousi *et al.*, 2008) có độ ẩm 75%. Độ ẩm tương đối được cân duy trì bằng dung dịch muối NaCl bão hòa (Rockland, 1960). Sau 15 tiếng, 200 μl mỗi trường YPD được cho vào mỗi ống eppendorf, vortex nhẹ và để trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu đối chứng được xác định có tỷ lệ sống sót là 100%.

Xác định tỷ lệ sống chết của tế bào nấm men

Phương pháp xác định tỷ lệ sống/sót của các tế bào nấm men trong các thí nghiệm chịu đông lạnh, khô hạn được thiết lập mới như sau:

Giả sử: số tế bào sống là x; số tế bào chết là y; tổng số tế bào là a ta có phương trình sau:

$$x + y = a \quad (1)$$

Bảng thực nghiệm chúng tôi coi t^0 là thời điểm sau khi nuôi lắc 30 phút vì khi đó tế bào bắt đầu vào pha sinh trưởng và trong pha sinh trưởng, trung bình sau 2 h thì số lượng tế bào lại tăng gấp đôi.

Sau 2 h tổng số tế bào của mẫu là:

$$2x + y \text{ hay } 2x + (a - x)$$

Nếu coi thời gian nuôi là t (h) thì số tế bào sống tương ứng với khoảng thời gian đó là: $2^{t^2} \cdot x$

Tổng số tế bào là:

$$2^{t^2} \cdot x + (a - x) \Leftrightarrow (2^{t^2} - 1)x + a \quad (2)$$

Từ công thức (2) ta có thể tính ra x (số tế bào sống sót).

Tỷ lệ số tế bào sống là: $(x/a) 100\%$

Tỷ lệ số tế bào chết là: $((a - x)/a) 100\%$.

Vì 1 ml dịch có OD_{620} bằng 1 chứa khoảng $1,5 \cdot 10^7$ tế bào nấm men (Xiao, 2005), ta có thể dựa vào việc đo OD tại t^0 để tính a, và tại t để thay vào

biểu thức (2) tính x, từ đó chúng ta có thể xác định được tỷ lệ sống sót của tế bào nấm men. Kết quả từ phương pháp đơn giản này phù hợp với kết quả của phương pháp đếm khuẩn lạc được tiến hành song song.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

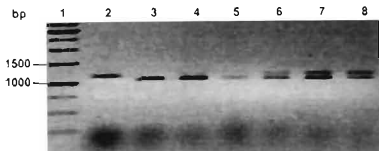
Giới tính của các nấm men mẫu thu thập

Nấm men có chu kỳ sinh sản hoàn chỉnh nhưng đơn giản hơn rất nhiều so với động vật và thực vật bậc cao. Ở sinh vật này, không có sự biệt hóa vĩnh viễn thành các tế bào dòng sinh dục và tế bào sinh dưỡng. Thay vào đó, sự biệt hóa tạm thời xảy ra trong những điều kiện nhất định (Herskowitz *et al.*, 1992).

Kiểu giới tính ở nấm men được xác định bởi một locus gen duy nhất, được gọi là MAT, trên vai phải của nhiễm sắc thể số III. Các locus MATa và MAT α dài khoảng 2500 bp. Mỗi locus mang một trình tự trung tâm duy nhất, ước khoảng 750 bp ở MATa và 850 ở MAT α . Những trình tự duy nhất này được bao quanh bởi các trình tự tương đồng dài khoảng 1400 bp về bên trái và 320 cặp về bên phải. Locus giới tính MAT mã hóa cho các protein điều hòa kiểm soát các gen không liên kết đặc hiệu - a hoặc đặc hiệu - α . Nấm men đơn bội kiểu giới tính a biểu hiện gen a1 và a2 từ locus MAT, trong khi nấm men đơn bội kiểu giới tính α biểu hiện gen $\alpha 1$ và $\alpha 2$ từ locus này (Herskowitz, 1983; Herskowitz *et al.*, 1992). Locus MATa mang ít nhất hai gen điều hòa. MATa1 protein kiểm soát sự biểu hiện các gen đặc hiệu cho kiểu giới tính a. Protein a1 được mã hóa bởi MATa không cần thiết cho việc dung hợp tế bào; nó hoạt động cùng với protein a2 để thực hiện các chức năng sinh bào tử (Herskowitz, 1992).

Do trình tự nucleotide trong locus MAT đặc trưng cho *S. cerevisiae* cho nên chúng tôi đã thiết kế một cặp mồi để nhân vùng trung tâm của locus MAT. Chỉ bằng việc chạy phản ứng colony - PCR chúng tôi vừa có thể có bằng chứng ở mức độ phân tử xác thực các chủng nấm men phân lập được lại vừa xác định được giới tính của các chủng đó. Với cách mồi kể trên, phản ứng colony - PCR với các tế bào nấm men có kiểu giới tính a sẽ cho một băng DNA với kích thước khoảng 1000 bp, với tế bào có kiểu giới tính α sẽ cho một băng DNA với kích thước khoảng 1100 bp, còn đối với các tế bào nấm men lưỡng bội sẽ cho ra cả hai băng DNA kể trên.

Sản phẩm PCR khẳng định tất cả các mẫu phân lập được đều là nấm men. Nấm men Ger1 có kiểu giới tính alpha, 3 mẫu Ger2, DN1, P1 có kiểu giới tính a và 3 mẫu Gn4, KD1, KD2 là lưỡng bội (Hình 1).

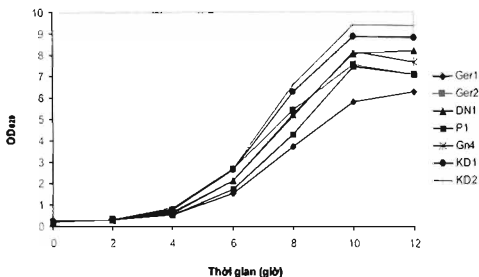


Hình 1. Sản phẩm phản ứng colony-PCR của vùng trung tâm của locus MAT. 1. thang DNA 1 kb; 2. Ger1; 3. Ger2; 4. DN1; 5. P1; 6. Gn4; 7. KD1; 8. KD2

Tốc độ sinh trưởng và năng suất sinh khối

Ở điều kiện nuôi cấy bình thường, tốc độ sinh trưởng của các chủng có sự phân biệt khá rõ rệt (Hình 2). Với mật độ tế bào tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy có OD₆₂₀ bằng 0,2, sau 11 h, trừ chủng G1, tất cả các chủng đang ở đầu pha ổn định. Chủng KD2 có khả năng sinh trưởng mạnh nhất, năng suất

sinh khối cao nhất với OD₆₂₀ đạt 9,4; chủng KD1 gần tương đương với OD₆₂₀ là 8,86; trong khi đó OD₆₂₀ của chủng Ger1 ở 12 h là 6,26. Chủng DN1 có mật độ tế bào đạt 8,20; chủng Gn4 là 8,14; chủng Ger2 là 7,54; còn chủng P1 là 7,46. Chủng KD2 và KD1 có sức sinh trưởng mạnh và có thể có sức chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi của môi trường đã bị biến đổi, chẳng hạn pH giảm, nồng độ đường giảm.



Hình 2. Tốc độ sinh trưởng của các chủng nấm men ở 30°C.

Sức làm nở bột mỳ ở các nhiệt độ khác nhau

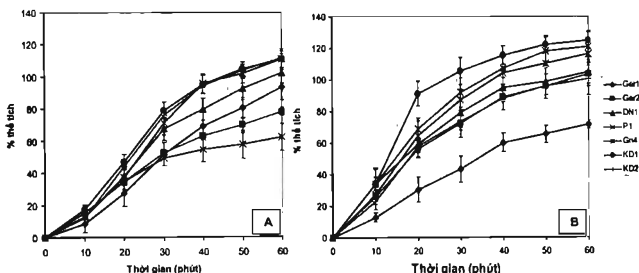
Sức làm nở ở 30°C của tất cả các chủng nấm men không cao bằng ở 40°C (Hình 3). Sau 50 phút, ở 30°C các chủng KD1, KD2, P1 có sức làm nở mạnh, dao động trong khoảng 102 - 104% so với thể tích ban đầu. Chủng DN1 làm tăng thể tích bột nhào 93% so với thể tích ban đầu, các chủng còn lại đều làm nở chậm, chậm nhất là chủng Gn4 chỉ làm tăng 58% so với thể tích bột nhào ban đầu.

Ở 40°C sau 50 phút, chủng Ger1 có sức làm nở (65%) thấp hơn ở 30°C (81%). Nói cách khác, chủng Ger1 lên men tốt hơn ở 30°C. Ở 40°C, sau 50 phút, sức làm nở mạnh nhất thấy ở chủng KD1 lên tới 122%, chủng Gn4 là 118% và chủng P1 là 110%. Như vậy sức làm nở của các chủng KD1, Gn4, P1 nhiệt độ này rất tốt, đạt yêu cầu về thời gian cũng như khả năng làm nở. Kết quả của thí nghiệm rất phù hợp với thực tế sản xuất bởi vì trong sản xuất công

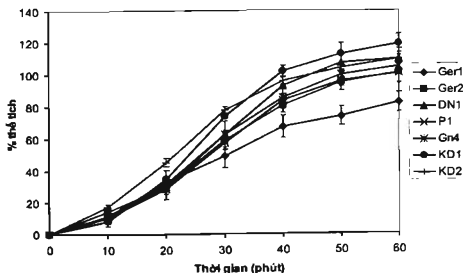
ngiệp thì bột nhào sau khi được trộn với nấm men được ủ trong 45 - 50 phút ở 40°C để khối bột tăng thể tích gấp đôi so với ban đầu trước khi đem nướng (Cauvain, 1998). Sau 50 phút, các chủng DN1, Ger2, KD2 có sức làm nở khác nhau không đáng kể, dao động trong khoảng 95 - 98% thể tích ban đầu. Đặc biệt, ở 40°C chủng Gn4 có sức làm nở cao hơn ở 30°C.

Ở 45°C, chủng KD1 vẫn có sức làm nở mạnh nhất, đạt 112% sau 50 phút, chủng DN1 là 107%, chủng KD2 là 104% (hình 3C). Tuy nhiên, trừ chủng Ger1, sức làm nở của tất cả các chủng vẫn thấp hơn

ở 40°C. Kết quả đó có thể do nhiệt độ cao làm cho quá trình lên men xảy ra quá nhanh làm tăng hoạt động của các enzyme thủy phân protein gây phá vỡ cấu trúc protein dẫn tới bột nhào chóng nhão ra, làm cho khối bột không phồng lên được (Cauvain, Young, 1998). Ở 30°C và 40°C chủng P1 có sức làm nở mạnh hơn ở 45°C, như vậy chủng P1 có sức làm nở phù hợp cho việc lên men ở 30°C - 40°C. Ngoài khoảng nhiệt độ đó thì sức làm nở bột nhào của các chủng nấm men này sẽ kém và không đạt yêu cầu trong sản xuất bánh mì. Chủng Ger1 lên men bột nhào thích hợp ở 30°C vì ở 40°C và 45°C, chủng có độ nở thấp hơn.



Hình 3. Sức làm nở bột mì ở 30°C (A) và 40°C (B).

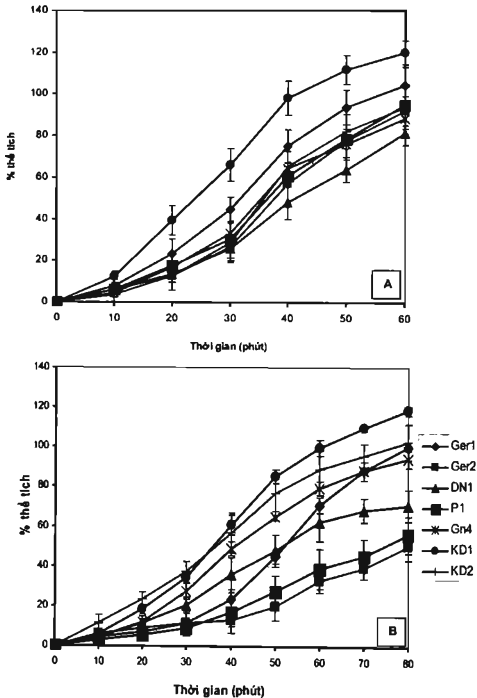


Hình 3C. Sức làm nở bột mì ở 45°C.

Trừ chủng Ger1, các chủng đều có sức làm nở yếu nhất ở 30°C, mạnh nhất ở 40°C và giảm xuống ở 45°C. Như vậy có thể khẳng định rằng ở 40°C thì hầu như tất cả các chủng đều có lực lên men cao. Trong thực tế sản xuất ở quy mô công nghiệp, người ta cũng sử dụng nhiệt độ lên men là 40°C. Ở cả ba nhiệt độ, chủng KD1 đều có sức làm nở bột nhào

mạnh nhất.

Thí nghiệm này cho thấy nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn tới sự lên men làm nở bánh mỳ của nấm men, đồng thời cũng xác định được 3 chủng có nguồn gốc trong nước phù hợp với các quy trình sản xuất bánh mỳ nhạ ở quy mô công nghiệp là chủng KD1, DN1 và KD2.



Hình 4. Sức làm nở bột mỳ ở 40°C, 10% đường (A), 20% đường (B).

Sức làm nở bột mỳ ở các hàm lượng sucrose khác nhau

Quá trình lên men của một số chủng nấm men bị ức chế ở trong bột nhào có hàm lượng đường cao, nhưng bên cạnh đó cũng có những chủng lại có tính thích ứng cao (Attfield, Kleetsas, 2000).

Các chủng nấm men có khả năng lên men khác nhau ở các nồng độ đường cao bởi vì nồng độ đường cao có thể tạo ra stress thẩm thấu. Sức làm nở bột mỳ được thực hiện ở 2 nồng độ đường khác nhau là 10% và 20%.

Hai thí nghiệm này cho thấy sức làm nở bột có tỷ lệ đường 10% (Hình 4A) của các chủng nấm men yếu hơn sức làm nở ở nồng độ đường 3%, và càng yếu hơn với bột có tỷ lệ đường 20%. Đối với bột mỳ 10% đường, chủng KD1 vẫn có sức nở mạnh nhất đạt 112% sau 50 phút; chủng Ger1 là 93%, các chủng còn lại đều thấp hơn 90% và chủng thấp nhất là DN1 với 64%. Kết quả cho thấy chủng KD1 ở tất cả các điều kiện đều có sức nở mạnh nhất, chủng to chủng này có khả năng thích ứng rất rộng. Chủng Ger1 cũng có sức làm nở khá mạnh.

Như vậy, chủng KD1 và Ger1 có khả năng lên men với nồng độ đường cao. Các chủng còn lại cũng có sức nở khá tốt vì đối với việc làm bánh ngọt nếu chưa cho các chất phụ gia vào mà có sức nở trên 80% là chấp nhận được.

Sức làm nở bột có tỷ lệ đường 20% giảm rõ rệt, nhất là đối với các chủng Ger2, P1 (Hình 4B). Sau 60 phút, chủng KD1 vẫn có sức làm nở mạnh nhất (100%), sau đó là KD2 (89%), chủng Gn4 là 79%. Ở

thí nghiệm này, chủng Ger1 cũng có sức làm nở kém hơn so với sức làm nở bột mỳ 10% đường. Do nồng độ đường cao tạo áp suất thẩm thấu lớn, gây ra stress thẩm thấu làm chúng không sinh trưởng được hoặc sinh trưởng chậm đi cho nên khả năng lên men giảm, và nồng độ đường cao làm cho bột nhào trở nên nhão hơn, giảm lượng nước liên kết trong bột nhào làm chậm quá trình tạo gluten.

Sức làm nở của các chủng nấm men ở các thí nghiệm này thấp hơn so với thực tế sản xuất vì các thành phần bột chỉ gồm: bột mỳ, muối NaCl, men bánh mỳ và nước cất. Còn trong thực tế sản xuất người ta cho thêm các phụ gia khác như: bơ, trứng, sữa, dầu ăn, vitamin C, các enzyme thủy phân tinh bột: α -amylase, hemicellulase, proteinase, NaHCO_3 và $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ với tỷ lệ nhất định giúp bánh mỳ nở hơn, chất lượng tốt hơn.

Đánh giá cảm quan chất lượng bánh mỳ thành phẩm

Các chỉ tiêu cảm quan được trình bày ở bảng 1. Mẫu bánh mỳ lên men làm nở bởi chủng DN1 được đánh giá tốt nhất với số điểm trung bình 9, vỏ bánh có màu vàng đẹp, nhẵn, bóng, màu đồng đều, ruột bánh có hương thơm đặc trưng của nấm men và có độ xốp đều, vị ngon (Bảng 1). Đây là một kết quả bất ngờ bởi vì chủng DN1 được phân lập từ nguồn nấm men ở trong nước. Tiếp theo là mẫu chứa chủng nấm men P1 với số điểm trung bình là 8,5. Mẫu lên men bởi chủng KD2 đạt số điểm trung bình là 8,2. Mẫu lên men bởi chủng KD1 là 7,8; Gn4 là 7,5; Ger1 là 7,3 và kém nhất là mẫu lên men bởi chủng Ger2 với số điểm trung bình là 6,8.

Bảng 1. Bảng điểm đánh giá chất lượng bánh mỳ thành phẩm.

Chủng nấm men	Màu sắc, hình dạng	Mùi vị	Thế tích và cấu trúc ruột bánh	Trung bình
Ger1	7,3 $\pm$ 0,25	7,2 $\pm$ 0,13	7,4 $\pm$ 0,11	7,3
Ger2	7,0 $\pm$ 0,19	6,7 $\pm$ 0,12	6,7 $\pm$ 0,10	6,8
DN1	9,3 $\pm$ 0,28	8,7 $\pm$ 0,12	9,0 $\pm$ 0,18	9,0
P1	8,0 $\pm$ 0,16	8,5 $\pm$ 0,10	9,0 $\pm$ 0,16	8,5
Gn4	7,4 $\pm$ 0,16	7,8 $\pm$ 0,16	7,3 $\pm$ 0,16	7,5
KD1	8,0 $\pm$ 0,15	7,7 $\pm$ 0,16	7,7 $\pm$ 0,13	7,8
KD2	8,4 $\pm$ 0,11	8,0 $\pm$ 0,12	8,2 $\pm$ 0,12	8,2

Khả năng chịu lạnh của các chủng nấm men

Nhu cầu chủ phi lao động thấp và vực thị trường lớn hơn dẫn tới việc thợ bánh mỳ sử dụng công nghệ làm

lạnh hoặc đông lạnh bột nhào bánh mỳ ở nhiều nước.

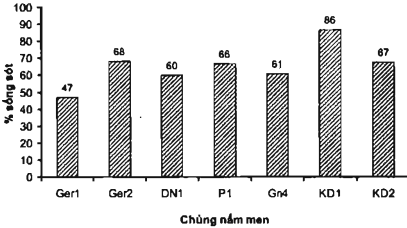
Nhưng, khả năng chịu đựng đông lạnh của nấm men được xác định bởi các đặc tính di truyền của

giống. Một số chủng nấm men có khả năng chống lại sự đông lạnh cao hơn các chủng khác đã được phân lập từ các nguồn tự nhiên và thông qua các thao tác gen (Hino *et al.*, 1987; Nishida *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 1986; Shima *et al.*, 2009).

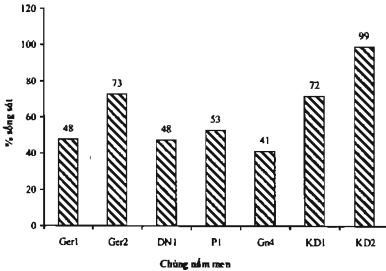
Khả năng chịu lạnh của các chủng nấm men được khảo sát là khá cao (hình 5). Chủng KD1 có tỷ lệ sống sót cao nhất với phần trăm sống sót là 86%. Chủng Ger2 có tỷ lệ sống sót là 68%, chủng KD2 là

67%, chủng P1 là 66%, chủng Ger1 có tỷ lệ sống sót thấp nhất, chỉ đạt 47%, các chủng còn lại dao động trong khoảng 60%. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả đếm khuẩn lạc được tiến hành song song.

Các chủng nấm men có khả năng chịu lạnh khá cao, nhất là chủng KD1, có thể được sử dụng để sản xuất bánh mỳ tươi hoặc có thể đề phục vụ cho các nghiên cứu về các cơ chế chống chịu đông lạnh ở nấm men bánh mỳ.



Hình 5. Tỷ lệ sống sót của các chủng nấm men sau khi được đông đá và làm tan.



Hình 6. Tỷ lệ sống sót của các chủng nấm men ở 30°C, độ ẩm 75%.

Khả năng chịu khô hạn của các chủng nấm men

Trong sản xuất bánh mỳ, nấm men khô có nhiều lợi thế so với men ướt, chẳng hạn như nấm men khô hoạt động (chất khô 92 - 94%) và men khô nhanh (chất khô 94 - 96%), có sự ổn định cao hơn, độ ẩm thấp hơn là 2 yếu tố làm giảm chi phí vận chuyển và lưu trữ. Để có được lợi thế lớn hơn như vậy, men

phải giữ lại khả năng lên men cao và còn hương vị sau quá trình sấy bằng không khí khô.

Tỷ lệ sống sót giữa các chủng có sự khác nhau rõ rệt, đặc biệt chủng KD2 có tỷ lệ sống sót rất cao đạt 99% so với mẫu đối chứng (Hình 6). Ngoài ra có hai chủng là Ger2 và KD1 cũng có tỷ lệ sống sót khá cao, lần lượt đạt 73% và 72%. Các chủng có tỷ lệ

sống sót cao như KD2, Ger2, KD1 có thể được sử dụng để sản xuất nấm men khô phục vụ cho các mục đích khác nhau như chúng. Chủng Ger2 và KD2 được sấy khô có tỷ lệ sống sót cao hơn so với trong điều kiện đông lạnh (hình 5, 6), như vậy việc sấy khô sẽ thuận tiện cho sản xuất và giảm chi phí bảo quản chủng. Chủng Ger1, DN1 và Gn4 đều có tỷ lệ sống sót nhỏ hơn 50%, đặc biệt là chủng Gn4 có tỷ lệ sống sót chỉ đạt 41%. Stress không khí khô là một stress khá phức tạp bao gồm cả việc mất nước và nhiệt độ tăng. Sự mất nước gây ra tạo bởi quá trình làm khô, chẳng hạn như khi khô và sự bay hơi. Điều này gây thiệt hại nghiêm trọng cho tế bào nấm men, đặc biệt là màng tế bào và protein (Franca *et al.*, 2007). Sự mất nước có thể làm tăng khả năng gây biến tính protein và gây tổn thương tới nucleic acid (Berlett, Stadtman, 1997).

Hiện nay các sản phẩm nấm men *S. cerevisiae* sấy khô được sử dụng như một sản phẩm thay thế cạnh tranh, với các sản phẩm nấm men bánh mỳ dạng ướt hay được ép. Các phân tích chất dễ bay hơi trong bánh mỳ thành phẩm cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa nấm men đông lạnh ướt và nấm men khô (Tsaousi *et al.*, 2008). Điều này đảm bảo việc sấy khô nấm men ở nhiệt độ thấp sẽ không ảnh hưởng đến chất lượng lên men bánh mỳ.

KẾT LUẬN

1. Phương pháp xác định tỷ lệ sống sót của nấm men bằng cách đo mật độ tế bào sau khi nuôi cấy đã được thiết lập mới và cho kết quả đáng tin cậy.

2. Bảy chủng nấm men được phân lập và xác định giới tính. Chủng nấm men Ger1 có kiểu giới tính alpha, ba chủng Ger2, DN1, P1 có kiểu giới tính a và ba chủng Gn4, KD1, KD2 là lưỡng bội. Việc khảo sát các tính trạng sinh học và chống chịu của 7 chủng nấm men đã khẳng định là các chủng nấm men có nguồn gốc trong nước như KD1, KD2, DN1 hoàn toàn có thể sử dụng để sản xuất men giống phục vụ sản xuất bánh mỳ ở quy mô công nghiệp. Chủng KD1 có tốc độ sinh trưởng, năng suất sinh khối, khả năng chịu stress cao nhất. Bánh mỳ được làm nở bởi chủng DN1 cho chất lượng tốt nhất.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí từ Đề tài trọng điểm cấp Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, do TS. Đặng Xuân Nghiêm làm chủ trì. Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Cơ sở nuôi bánh mỳ của chị Hoàng Thanh Huyền ở Dục Tú - Đông Anh - Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ansen EH, Møller BL, Kock GR, Büchner CM, Kristensen C, Ole R, Jensen OR, Okkels FT, Olsen CE, Motawia MS, Hansen J (2009) De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*S. cerevisiae*). *Appl Environ Microbiol* 75(9): 2765-2774.
- Attfield PV, Kleetsas S (2000) Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. *Lett Appl Microbiol* 31: 323-327.
- Berlett BS, Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-20316.
- Burke D, Dawson D, Tim steams (2000) *Methods in yeast genetics*. Ed. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.
- Cauvain, SP (1998) Breadmaking Processes, in *Technology of Breadmaking*, ed. S. P. Cauvain, L. S. Young, Blackie Academic and Professional, London, pp 18-44.
- Curic D, Novotni D, Skevin D, Rosell CM, Collar M, Le Bail A, Colic-Baric I, Gabric D (2008) Design of a quality index for the objective evaluation of bread quality: Application to wheat breads using selected bake off technology for bread making. *Food Res Inter* 41: 714-719.
- Dang XN (2008) Functional characterization of candidate *Arabidopsis thaliana* (L.) LEA proteins and *S. cerevisiae* hydrophilins. *PhD thesis*. University of Potsdam, Germany.
- Đậu Ngọc Hào (2000) Một số đặc tính chọn lọc của các chủng nấm men *S. cerevisiae* sử dụng bổ sung vào thức ăn phòng chống tác hại của Aflatoxin và bệnh tiêu hóa. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*. 1: 57-62.
- Franca MB, Panek AD, Eleutherio EC (2007) Oxidative stress and its effects during drying. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 621-631.
- Herskowitz I, Rine J, Strathern J, Jones EW, Pringle JR, Broach JR (1992) Mating-type determination and mating type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. eds Jones EW, Pringle JR, Broach JR (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY): 583-656.
- Hino A, Takano H, Tanaka Y (1987) New freeze tolerant yeasts for frozen dough preparations. *Cereal Chem* 64: 269-293.
- Lê Thành Tâm (1996) Nghiên cứu di truyền học một số tính trạng có ý nghĩa kinh tế của nấm men *Saccharomyces* spp. *Luận án Phó tiến sĩ Khoa học Sinh học. Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*.
- Menc L, Lamberg-Guilis O, Neyreneuf O, Richard-Molard D (1995) Cryoresistance of baker's yeast *S. cerevisiae* in frozen dough: contribution of cellular trehalose. *Cereal Chem* 72: 609-615.
- Morris GJ, Coulson GE, Clarke KJ (1988) Freezing injury in *S. cerevisiae*. The effects of growth conditions. *Cryobiology* 25: 471-472.

Myers DK, Atfield PV (1999) Intracellular concentration of exogenous glycerol in *S. cerevisiae* provides for improved leavening of frozen sweet doughs. *Food Microbiol* 16: 45-51.

Nevoigt E (2008) Progress in metabolic engineering of *S. cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(3): 379-412.

Nishida O, Kuwazaki S, Suzuki C, Shima J (2004) Superior molasses 3 assimilation, stress tolerance, and trehalose accumulation of baker's yeast isolated from dried 4 sweet potatoes (hoshi-imo). *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1442-1448.

Nguyễn Thị Phương Trang, Kim Young-Ho, Đinh duy Kháng, Đồng Văn Quyền (2007) Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa polymerase của virus viêm gan B trên bề mặt tế bào *S. cerevisiae*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4: 419-424.

Oda Y, Uno K, Ohta S (1986) Selection of yeasts for breadmaking by the frozen-dough method *Appl Environ Microbiol* 52: 941-943.

Panadero J, Hernández-López MJ, Prieto JA, Ranz-Gil F (2007) Overexpression of the calcineurin target *CRZ1* provides freeze tolerance and enhances the fermentative capacity of baker's yeast. *Appl Environ Microbiol* 73: 4824-4831.

Plessas S, Pherson L, Bekatorou A, Nigam PA, Koutinas A (2005) Bread making using kefir grains as baker's yeast.

Food Chem 93: 585-589.

Randez-Gil F, Pascual Sanz P, Prieto JA (1999) Engineering baker's yeast: room for improvement. *TIBTECH* 17: 237-243

Rockland LB (1960) Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5°C and 40°C. *Anal Chem* 32: 1375-1376.

Schoeman H, Vivier MA, Du Toit M, Dicks LMT, Pretorius IS (1999) The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pedilococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *S. cerevisiae*. *Yeast* 15: 647-656.

Shima J, Takagi H (2009) Stress-tolerance of baker's-yeast (*S. cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol Appl Biochem* 53: 155-164.

Trần Văn Hiếu, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc (2006) Biểu hiện gen LAP mã hóa protein P60 chủng *Listeria monocytogenes* trên bề mặt nấm men *S. cerevisiae*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1: 41-46

Tsaousi K, Dimitrellou D, Koutinas AA (2008) Low-temperature thermal drying of *S. cerevisiae* starter culture for food production. *Food Chem* 110: 547-553.

Xiao W (2005) *Yeast protocols (Molecular methods)*. 2ed. Humana Press, Totowa, New Jersey.

SCREENING MATING TYPES AND BIOLOGICAL AND RESISTANCE TRAITS OF SEVEN BAKER'S YEASTS (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Luu Thi Phuong, Nguyen Thi Bich Luu, Dang Xuan Nghiem*

Hanoi University of Agriculture

SUMMARY

In this project, novel procedures and protocols were successfully established to screen mating types, viability, and biological and resistance traits of seven Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains of different sources, including the commercialized Ger1 strain as the reference. Among seven collected yeast strains, Ger1 is *alpha* mating type, Ger2, DN1, P1 are *a* mating type, while Gn4, KD2 and KD2 are diploid (*alpha/a*). The yeasts are varied in biological and resistance traits and stress tolerance. Growth rate and biomass yield of KD1 and KD2 are the highest, and the ones of Ger1 are the lowest. Except Ger1, all strains rise the dough faster at 40°C than at 30°C and 45°C. KD1 has the best high-sugar dough raising capacity, meeting the industrial demand in sweet bread production. The quality of breads risen by DN1 and P1 is much more better than the one risen by Ger1. Desiccation tolerance of KD2 and freezing tolerance of KD1 are significantly higher than corresponding tolerance of other strains. In general, domestic yeast strains were proven to be potential for industrial-scale production and commercialization with even better economic traits in comparison with strains from other sources. Besides, suitable strains for each kind of bread or cake were also recognized.

Keywords: Bread production, desiccation stress, freezing stress, mating type, MAT locus, osmotic stress, *Saccharomyces cerevisiae*, stress tolerance, yeast biomass

* Author for correspondence: Tel: 84-(0)915459592; E-mail: dxnghiem@hva.edu.vn