

PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC NẤM MEN CÓ KHẢ NĂNG LÊN MEN D-XYLOSE

Vũ Nguyên Thành, Nguyễn Thanh Thủy, Ninh Thị Huyền, Đào Anh Hải, Nguyễn Thị Hương Giang
Viện Công nghệ Thực phẩm

TÓM TẮT

Trong công nghệ sản xuất cồn nhiên liệu từ lignocellulose, chuyển hóa xylose thành ethanol là một trong những công đoạn khó khăn nhất hiện nay. Trong nghiên cứu này, nấm men có khả năng lên men xylose được phân lập và sàng lọc nhằm xác định sự đa dạng, tiềm năng ứng dụng và định hướng sàng lọc, tuyển chọn tại Việt Nam. Từ 450 mẫu đất, xác thực vật phân hủy, phân sáu.... 117 chủng nấm men có khả năng chuyển hóa D-xylose thành ethanol được thu nhận. Nấm men được phân nhóm bằng PCR fingerprinting sử dụng môi vệ tinh (GAC), và định tên tới loài bằng giải trình tự vùng 26S rDNA D1/D2. Phân bố loài theo thứ tự giảm dần về số lượng được xác định như sau: *Candida tropicalis* (51 chủng), *Trichosporon* sp. (9 chủng), *C. fermentati* (8 chủng), *C. gorgasii* (7 chủng), *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* (4 chủng), *C. pseudointermedia* (4 chủng), *Debaryomyces nepalensis* (4 chủng), nhóm chưa phân loại (30 chủng). Trong số nấm men phân lập được, *C. pseudointermedia* có khả năng lên men mạnh nhất và tạo tới 1,67% ethanol, kế tiếp là *A. pullulans* var. *melanigenum* (1,5% ethanol). *C. tropicalis* phổ biến nhất nhưng có hoạt lực không cao (tạo tối đa 0,86% ethanol). Các chủng thuộc nhóm *Trichosporon* sp., *C. fermentati*, *C. gorgasii*, *D. nepalensis* và nhóm chưa phân loại đều có năng lực lên men thấp (tối đa 0,65% ethanol). Thử nghiệm với 55 mẫu đất, xác thực vật trong môi trường kỵ khí cho thấy nấm men không sử dụng được D-xylose trong điều kiện này. Thách thức lớn cho việc phân lập, tuyển chọn nấm men lên men D-xylose sinh ethanol là phát triển môi trường chọn lọc và loại trừ những loài phổ biến nhưng có khả năng lên men thấp như *C. tropicalis*.

Từ khóa: Cồn nhiên liệu, D-xylose, lên men, lignocellulose, nấm men

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây công nghệ sản xuất cồn nhiên liệu từ lignocellulose được quan tâm đặc biệt. So với những nguồn nguyên liệu khác, nguồn lignocellulose thật sự dồi dào và việc sử dụng chúng không ảnh hưởng tới an ninh lương thực. Tuy nhiên, hiện tại công nghệ sản xuất cồn từ lignocellulose ở Việt Nam và trên thế giới vẫn còn trong giai đoạn nghiên cứu phát triển. Một trong số những khó khăn gặp phải là việc sử dụng đường xylose, thành phần chiếm tới 15 - 25% khối lượng của lignocellulose (Merino, Cherry, 2007). Có rất ít vi sinh vật có khả năng lên men sinh ethanol một cách hiệu quả từ xylose. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, vi sinh vật chủ đạo trong công nghệ sản xuất cồn không có khả năng chuyển hóa trực tiếp xylose thành ethanol (Lin, Tanaka, 2006).

Từ 25 năm trước, nấm men *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *C. tropicalis* đã được phát hiện có khả năng tích lũy ethanol khi phát triển trên môi trường chứa D-xylose. Trong quá trình lên men, *Pach. tannophilus* tạo 0,34 g ethanol từ 1 g D-xylose và nồng độ ethanol đạt được khoảng 1,6 - 2,0%. Tương tự như vậy, trong điều kiện tối nhất,

nấm men *C. shehatae* có thể tích lũy đến 3,7% ethanol trong canh trường và hiệu suất chuyển hóa là 0,32 g ethanol/1g D-xylose (Toivola *et al.*, 1984). Cho tới nay *Pach. tannophilus* và *C. shehatae* vẫn được coi là những nấm men có khả năng lên men D-xylose mạnh nhất. Tuy nhiên, nếu so sánh lên men D-xylose với lên men D-glucose thì quá trình lên men D-glucose hiệu quả hơn rất nhiều. *S. cerevisiae* có thể tạo 0,51 g ethanol từ 1 g D-glucose và nồng độ ethanol tích lũy thông thường đạt 15 - 16% (Lin, Tanaka, 2006).

Một số nấm mốc thuộc chi *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor* cũng có khả năng lên men D-xylose (Millati *et al.*, 2005). Khả năng lên men sinh ethanol còn được tìm thấy ở vi khuẩn *Clostridium*, *Bacillus*, tuy nhiên với nồng độ ethanol tạo ra thấp và chứa nhiều sản phẩm lên men khác (Rosenberg, 1980). Đã có nhiều nghiên cứu tạo vi sinh vật tái tổ hợp phục vụ lên men D-xylose, tuy nhiên cho tới nay vẫn chưa có chủng nào có đủ khả năng ứng dụng thương mại (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Matsushika *et al.*, 2009; Van Vleet, Jeffries, 2009). Trong nghiên cứu này, nấm men có khả năng lên men D-xylose từ môi trường thiên nhiên Việt Nam được phân lập, sàng lọc và phân loại nhằm đánh giá sự đa dạng, tiềm năng

ứng dụng và định hướng sàng lọc, tuyển chọn trong tương lai.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu phân lập và chủng giống

Mẫu phẩm phục vụ phân lập được lấy từ các nguồn có chứa mô thực vật trong trạng thái phân hủy như rơm rạ mục, lá cây mục, phân sấu, phân và thức ăn trong đường tiêu hóa của côn trùng đục thân, phân động vật ăn cỏ, nước thải nhà máy giấy... tại các địa phương như Hà Nội, Bắc Ninh, Nam Định, Thanh Hóa, Nghệ An, Bình Dương. Mẫu được sử dụng trong ngày hoặc bảo quản ở điều kiện lạnh tới khi phân tích. Để phục vụ so sánh, 7 chủng nấm men thường được nhắc đến trong các nghiên cứu về lên men D-xylose được tiếp nhận từ Thư tập giống Hà Lan (Centraalbureau voor Schimmelcultures). Các chủng này bao gồm *C. shehatae* CBS4286, *C. shehatae* CBS5813, *Pach. tannophilus* CBS4044, *Pach. tannophilus* CBS4045, *Pichia stipitis* CBS5773, *P. stipitis* CBS5776, *C. lyxosophila* CBS8194 (Toivola *et al.*, 1984).

Phân lập nấm men có khả năng lên men D-xylose

Quá trình tìm kiếm các chủng nấm men có khả năng lên men D-xylose gồm ba bước: (1) làm giàu chọn lọc; (2) phân lập nấm men có khả năng sử dụng D-xylose; (3) thử khả năng chuyển hóa D-xylose thành ethanol. Trong bước làm giàu chọn lọc, 0,5 g mẫu được chuyển vào ống nghiệm chứa 8 ml môi trường làm giàu (D-xylose 5%, cao nấm men 0,3%, chloramphenicol 0,01%) được phủ bởi 2 ml paraffin lỏng. Ống được giữ ở 28°C trong 1 tuần và theo dõi độ đục, sự hình thành khí. Vì sinh vật từ những ống có biểu hiện lên men được cấy ra lên đĩa Petri với môi trường chứa D-xylose là nguồn cacbon duy nhất (D-xylose 2,0 g.l⁻¹, KH₂PO₄ 0,85 g.l⁻¹, K₂HPO₄ 0,15 g.l⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,5 g.l⁻¹, NaCl 0,1 g.l⁻¹, CaCl₂.6H₂O 0,1 g.l⁻¹, H₃BO₃ 0,5 mg.l⁻¹, CuSO₄.H₂O 0,04 mg.l⁻¹, K₂I 0,1 mg.l⁻¹, FeCl₃.6H₂O 0,2 mg.l⁻¹, MnSO₄.H₂O 0,4 mg.l⁻¹, Na₂MoO₄.2H₂O 0,2 mg.l⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 0,4 mg.l⁻¹, cao nấm men 0,5 g.l⁻¹, agar 20 g.l⁻¹). Các đĩa được nuôi cấy ở điều kiện 28°C trong 5 ngày. Nấm men sau đó được làm sạch và bảo quản trên cùng môi trường.

Sàng lọc nấm men sinh ethanol từ D-xylose

Để sàng lọc các chủng có khả năng sinh ethanol từ D-xylose, một vòng que cấy được chuyển vào 5 ml môi trường chứa 5% D-xylose, 0,5% cao nấm

men trong ống nghiệm. Sau 7 ngày nuôi cấy ở 28°C, 1 ml dịch huyền phù được chuyển sang ống eppendorf, ly tâm 10000 g trong 2 phút ở 4°C. Phần dịch trong được xét nghiệm định tính sự có mặt của ethanol bằng phương pháp enzyme sử dụng hệ alcohol oxidase-peroxidase (xem phương pháp phân tích ethanol). Các chủng dương tính được phân nhóm bằng kỹ thuật PCR fingerprinting và các chủng đại diện được phân loại tới loài bằng giải trình tự vùng 26S rDNA D1/D2.

Để xác định năng lực lên men, giống cấp một được nuôi cấy lắc (150 vòng/phút) trong môi trường chứa 5% xylose, 0,5% cao nấm men ở 28°C. Sau 24 h, 10% giống được tiếp vào môi trường lên men chứa 10% xylose, 0,5% cao nấm men và nuôi cấy ở chế độ lắc yếu (50 vòng/phút), nhiệt độ 28°C trong 7 ngày. Dịch huyền phù được loại bỏ bằng ly tâm và nồng độ ethanol trong canh trường được xác định bằng phương pháp enzyme.

Phân tích ethanol

Để xác định ethanol, mẫu được pha loãng bằng đệm SPB (sodium phosphate buffer 50 mM, pH 7,0). Mẫu pha loãng (0,5 ml) sau đó được bổ sung vào 1 ml hỗn hợp enzyme alcohol oxidase (MP Biomedicals, Pháp) 0,2 U/ml, peroxidase 1,5 U/ml và chất tạo màu TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 0,45 mM pha trong đệm SPB. Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong thời gian 20 phút. Để dừng phản ứng, 0,5 ml HCl 0,8M được bổ sung và đo mật độ quang ở bước sóng 450 nm sử dụng thiết bị UV-1650PC (Shimadzu, Nhật). Nồng độ ethanol trong mẫu được tính toán dựa trên đường chuẩn xây dựng với các nồng độ ethanol khác nhau. Trong trường hợp sàng lọc định tính, phản ứng được thực hiện trong khay vi đĩa 96 giếng với lượng mẫu sử dụng là 50 µl. Ở những mẫu dương tính, dung dịch phản ứng sẽ xuất hiện màu xanh dương và chuyển sang vàng khi dừng phản ứng bằng HCl 0,8 M.

Phân nhóm nấm men bằng kỹ thuật PCR fingerprinting

Nấm men được nuôi cấy trên môi trường Malt-glucose agar (malt 1%, glucose 1%, agar 2%). Một vòng que cấy được chuyển sang ống Eppendorf chứa 500 µl đệm SSC (NaCl 0,3 M, trisodium citrate 30 mM, pH 7,0) và giữ ở 99°C trong 10 phút. Sinh khối được thu hồi bằng ly tâm ở 10000 g trong 2 phút sau đó rửa một lần bằng nước cất vô trùng. Khoảng 100 µl hạt thủy tinh đường kính 0,2 - 0,5 mm (Roth, Đức), 100 µl dung dịch phenol/chloroform (tỉ lệ 1:1) và 100

ủi nước cất vô trùng được bổ sung và tế bào được phá bằng máy Mini-Beadbeater-8 (Biospec, Anh) trong 1 phút. Hỗn hợp được ly tâm ở 10000 g, nhiệt độ 4°C trong 10 phút. Phần dịch trong phía trên được sử dụng trực tiếp làm khuôn cho phản ứng PCR.

Các chủng nấm men được phân nhóm bằng kỹ thuật fingerprinting sử dụng môi MST2 (GAC)₃ được thiết kế dựa trên trình tự DNA vệ tinh (Lieckfeldt *et al.*, 1993). Phản ứng PCR được thực hiện trên thiết bị GeneAmp[®] PCR System 9700 (Perkin Elmer, Mỹ) theo chương trình: 95°C trong 2 phút; (94°C trong 40 giây, 55°C trong 40 giây, 72°C trong 2 phút, lặp lại 35 chu kỳ); ủ ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 1.5% trong đệm TBE (Tris base 89 mM, Boric acid 89 mM, EDTA 2 mM). Gel được nhuộm bằng ethidium bromide 0.5 mg/l, hiển thị bằng Benchtop UV-Transilluminator VWR (Anh) và hình ảnh được ghi lại bằng máy Olympus 4040Z (Nhật). Phổ fingerprinting được phân tích sử dụng bộ phần mềm Phoretix 1D Pro (TotalLab, Anh).

Phân loại bằng đọc trình tự vùng gen 26S rDNA D1/D2

Vùng bảo thủ đầu ITS và 26S rDNA D1/D2 được nhân đôi xứng sử dụng cặp mồi: ITS-1 (5'-TCGCTAGGTGAACCTGCGG-3') và NL-4 (5'-GGCTCGGTGTTCAAGACGG-3') (Kurtzman, Robnett, 1997). Chương trình nhiệt cho PCR bao gồm các bước: 95°C trong 2 phút; (94°C trong 40 giây, 52°C trong 40 giây, 72°C trong 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ); ủ ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được làm sạch bằng kit QIAEX II (Qiagen, Mỹ) theo khuyến cáo của hãng. Trình tự DNA được đọc bằng phương pháp "dye terminator" sử dụng mồi NL-4 trên hệ thống ABI thông qua dịch vụ của NorthWoods DNA (Mỹ). Trình tự DNA được so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank thông qua giao diện BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Các chuỗi liên quan được chuyển tải về sau đó xử lý bằng phần mềm BioEdit (Hall, 1999) và so sánh bằng phần mềm ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập nấm men có khả năng lên men D-xylose

Thông thường, để phân lập vi sinh vật có khả năng lên men một loại đường nào đó (ví dụ glucose, lactose...) người ta làm giàu mẫu bằng loại đường quan tâm trong điều kiện kỵ khí. Tuy nhiên, với nấm

men lên men D-xylose điều này không thực hiện được. Quá trình lên men D-xylose ở nấm men đòi hỏi một lượng oxy nhất định để tạo cân bằng về NAD(P)/NAD(P)H (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Van Vleet, Jeffries, 2009). Trong điều kiện có oxy, nấm men lại thiên về sử dụng xylose theo con đường oxy hóa thay vì lên men. Một khó khăn nữa là có rất nhiều nấm men có khả năng oxy hóa xylose nhưng không có khả năng lên men xylose và chúng sẽ áp đảo trong quá trình làm giàu khi có mặt oxy.

Nhằm kiểm tra sự tồn tại của nấm men có khả năng lên men xylose trong điều kiện kỵ khí hoàn toàn, 55 mẫu đất mùn, xác thực vật được chuyển vào môi trường làm giàu kỵ khí sử dụng hệ GasPakTM Anaerobic System Envelopes (Becton Dickinson, Ireland). Sau 4 tuần nuôi cấy ở 28°C, chúng tôi không phát hiện được sự sinh trưởng, phát triển của nấm men trong các mẫu khảo sát. Ở một vài mẫu có biểu hiện sinh khí nhưng do vi khuẩn gây nên. Quan sát này phù hợp với thực tế là cho tới nay chưa có nấm men nào được biết có khả năng sử dụng xylose trong điều kiện kỵ khí. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa thể khẳng định nhóm nấm men này không tồn tại trong thiên nhiên.

Trong những khảo sát tiếp theo, việc làm giàu được thực hiện trong ống nghiệm có phủ một lớp paraffin lỏng với độ dày khoảng 1 cm để tạo điều kiện vi hiếu khí và hạn chế sự phát triển của nấm mốc trên bề mặt. Từ 450 mẫu phẩm, 1177 chủng nấm men có khả năng sử dụng D-xylose như nguồn cacbon duy nhất được thu nhận. Nấm men sử dụng D-xylose theo con đường oxy hóa có mặt trong hầu hết các mẫu phẩm và điều này cho thấy chúng khá phổ biến trong thiên nhiên. Tuy nhiên, trong số đó chỉ có 117 chủng có khả năng sinh ethanol từ D-xylose.

Định tên các chủng nấm men sinh ethanol từ D-xylose

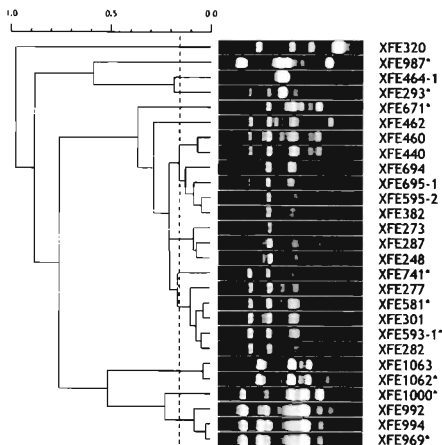
Để có một cái nhìn tổng quát về sự đa dạng của nấm men có khả năng chuyển hoá D-xylose thành ethanol, các chủng lên men D-xylose được phân loại tới loài. Trước hết, các chủng được phân nhóm bằng kỹ thuật PCR fingerprinting sử dụng mồi thiết kế theo trình tự DNA vệ tinh. PCR fingerprinting sử dụng mồi (GAC)₃ cho phép phân nhóm nấm men ở mức độ dưới loài (Lieckfeldt *et al.*, 1993; da Silva-Filho *et al.*, 2005). Các đại diện của mỗi nhóm sau đó được phân loại tới loài bằng việc giải trình tự phân đoạn D1/D2 của 26S rDNA. Các chủng cùng nhóm fingerprinting sẽ được xếp vào cùng loài với

chủng đại diện.

PCR sử dụng mồi (GAC)₃ với 117 chủng sinh ethanol từ D-xylose tạo phổ fingerprinting nhất quán và có độ phân giải cao. Sản phẩm PCR của những lần phản ứng khác nhau từ cùng một khuôn hoặc từ khuôn của các lần tách chiết khác nhau từ cùng một chủng tạo phổ có độ tương đồng cao và có thể nhận biết được từ các gel khác nhau. Độ tương đồng giữa các phổ được đánh giá sử dụng tương quan Pearson và hiển thị bằng dendrogram dạng UPGMA bằng phần mềm Phoretix 1D Pro. Đánh giá độ tương đồng giữa các chủng với một gel điện di đại diện được thể hiện trong hình 1. Với giá trị khác biệt ngưỡng trong khoảng 0,15 - 0,20, toàn bộ 117 chủng có thể được phân thành 28 nhóm. Phân đoạn ITS-D1/D2 của 28 chủng đại diện được khuếch đại bằng PCR và giải trình tự, tuy nhiên vì lý do kỹ thuật chỉ có 23 trình tự được thu nhận. Trong phần lớn các trường hợp, mỗi NL-4 chỉ cho phép đọc phân đoạn D1/D2, tuy nhiên với một số mẫu, mỗi cho phép đọc tiếp tới phân đoạn

ITS. Kết quả so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank cho thấy 23 chủng đại diện này có thể xếp vào 7 loài (bảng 1). Với những nhóm chỉ khác biệt về độ đậm nhạt của băng hoặc vắng mặt một vài băng, kết quả giải trình D1/D2 cho thấy sự khác biệt này nằm trong tính đa hình của cùng một loài (hình 1 - XFE293, XFE581, XFE671, XFE969, XFE1000).

Có 14 chủng được định danh là *C. tropicalis*, đó là XFE264-1, XFE283, XFE293, XFE294, XFE485, XFE528, XFE577, XFE581, XFE593, XFE593-1, XFE595-1, XFE671, XFE741 và XFE321. Trong đó, phân đoạn D1/D2 được giải trình tự của 13 chủng đầu tiên không có một khác biệt nào so với nhau và so với trình tự mã số U45749 của chủng chuẩn *C. tropicalis* CBS94. Riêng trình tự D1/D2 của XFE321 có 1 nucleotide khác biệt với 13 chủng còn lại và với CBS94. Vùng đặc biệt bắt đầu thủ ITS của các chủng XFE264-1, XFE283, XFE293, XFE485, XFE528, XFE671 tương đồng hoàn toàn với nhau và với trình tự mã số AY282528 của *C. tropicalis* CBS94.



Hình 1. Phân nhóm các chủng nấm men lên men D-xylose dựa trên phổ PCR-fingerprinting sử dụng mồi DNA vệ tinh MST2. Độ tương đồng giữa các phổ được đánh giá sử dụng tương quan Pearson và hiển thị bằng dendrogram dạng UPGMA. (*) - chủng được phân loại bằng giải trình tự 26S rDNA D1/D2.

Hai chủng XFE969 và XFE1000 có trình tự D1/D2 trùng nhau và trùng với trình tự mã số FJ150926 của chủng chuẩn *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* CBS105.22. *A. pullulans* là một loài phức hợp với 4 dưới loài được công nhận (*A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum*, *A. pullulans* var. *subglaciale*, *A. pullulans* var. *namibiense*). Các dưới loài của *A. pullulans* có thể khác biệt nhau tới 15 nucleotide trong phân đoạn 26S rDNA D1/D2 (Zalar *et al.*, 2008).

Chủng XFE297 gần nhất với XFE4 và *Debaryomyces nepalensis*. Trong phân đoạn D1/D2, XFE297 khác biệt với XFE4 bởi 2 nucleotide và với trình tự mã số U45839 của chủng chuẩn *D. nepalensis* NRRLY-7108 bởi 3 nucleotide. Ở vùng

ITS, chủng này khác biệt với NRRLY-7108 bởi 4 nucleotide. Tuy nhiên, sự khác biệt này vẫn nằm trong phạm vi của cùng một loài (Kurtzman, Robnett, 1997, Kurtzman, Robnett, 1998; Scorzett *et al.*, 2002). Trình tự D1/D2 của XFE4 trùng với trình tự của NRRLY-7108.

Chủng XFE987 có trình tự đoạn D1/D2 trùng khớp với các trình tự mã số EU348786 của chủng chuẩn *Meyerozyma caribbica* NRRLY-27274 và EU568912 của chủng chuẩn *Candida fermentati* CBS2022. *M. caribbica* được đổi tên từ *P. carabibica* và là thể hoàn thành (perfect state) của *C. fermentati* (Kurtzman và Suzuki, 2010). Trong nghiên cứu này pha sinh sản hữu tính của XFE987 không được phát hiện, do vậy chủng XFE987 được xếp vào loài *C. fermentati*.

Bảng 1. Danh sách các chủng nấm men đại diện được định tên bằng giải trình tự D1/D2, ITS

Chủng	Tên loài	Trình tự tham chiếu			
		D1/D2	Tương đồng	ITS	Tương đồng
XFE969	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i>	FJ150926	381/381	nd	nd
XFE1000	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i>	FJ150926	285/285	nd	nd
XFE987	<i>Candida fermentati</i>	EU348786	534/534	nd	nd
XFE576	<i>Candida gorgasii</i>	AY520300	432/432	nd	nd
XFE633	<i>Candida gorgasii</i>	AY520300	468/470	nd	nd
XFE1062	<i>Candida pseudointermedia</i>	U44816	424/424	nd	nd
XFE264-1	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	538/538	AY282528	103/103
XFE283	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	534/534	AY282528	103/103
XFE293	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	538/538	AY282528	222/223
XFE294	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	156/156	nd	nd
XFE321	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	297/298	nd	nd
XFE485	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	537/537	AY282528	103/103
XFE528	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	534/534	AY282528	96/96
XFE577	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	99/99	nd	nd
XFE581	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	110/110	nd	nd
XFE593	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	263/263	nd	nd
XFE593-1	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	431/431	nd	nd
XFE595-1	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	394/394	nd	nd
XFE671	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	548/548	AY282528	103/103
XFE741	<i>Candida tropicalis</i>	U45749	232/232	nd	nd
XFE4	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	U45839	240/240	nd	nd
XFE287	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	U45839	534/537	AB053099	266/270
XFE483	<i>Trichosporon</i> sp.	AB557786	112/114	nd	nd

Ghi chú: nd - không có dữ liệu.

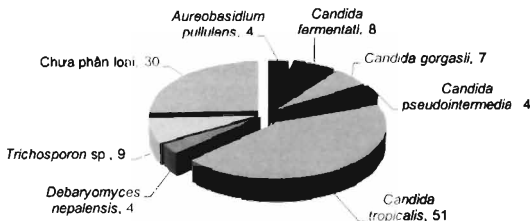
Hai chủng XFE633 và XFE576 có trình tự vùng D1/D2 trùng nhau. Chủng XFE633 chỉ khác với

chủng chuẩn *C. gorgasii* CBS9880 bởi 2 nucleotide ở phía đầu 5' của D1/D2. Cả hai chủng do vậy được

xếp vào loài *C. gorgasii*. Tương tự như vậy, XFE1062 được xếp vào loài *C. pseudointermedia* do có trình tự D1/D2 trùng với trình tự mã số U44816 của chủng chuẩn *C. pseudointermedia* NRRLY-10939. XFE483 được xếp vào chi *Trichosporon* do

đặc điểm hình thái đặc trưng (không sinh sắc tố, nảy chồi và tạo bào tử đốt) và độ tương đồng nhất định với mã số AB557786 của *T. asahii*.

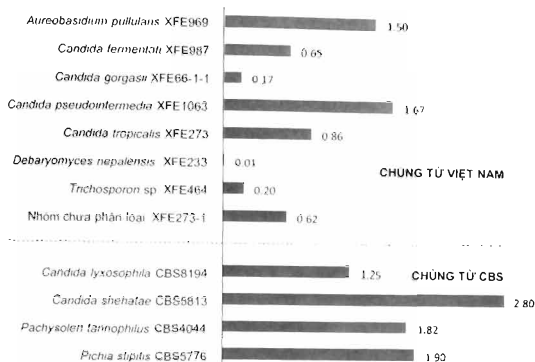
Phân bố loài của 117 chủng nấm men lên men D-xylose phân lập từ Việt Nam được tổng hợp trong hình 2. Tương tự như vậy, tổng hợp về khả năng sinh ethanol của các chủng được trình bày trong bảng 2 và hình 3.



Hình 2. Phân bố số lượng của 117 chủng nấm men phân lập được có khả năng sinh ethanol từ xylose.

Bảng 2. Tổng hợp về khả năng lên men của các loài/nhóm chủng khảo sát.

Tên loài/nhóm	Số lượng chủng	Nồng độ cồn trung bình, %	Độ lệch giữa các chủng
Các chủng phân lập tại Việt Nam			
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i>	4	0.94	0.43
<i>Candida fermentati</i>	4	0.44	0.21
<i>Candida gorgasii</i>	4	0.07	0.07
<i>Candida pseudointermedia</i>	2	1.66	0.01
<i>Candida tropicalis</i>	34	0.45	0.29
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	3	0.01	0.00
<i>Trichosporon sp</i>	4	0.09	0.10
Nhóm chưa phân loại	12	0.16	0.16
Các chủng tiếp nhận từ CBS			
<i>Candida shehatae</i>	2	1.95	1.20
<i>Pachysolen tannophilus</i>	2	1.74	0.12
<i>Pichia stipitis</i>	2	1.70	0.28
<i>Candida lyxosophila</i>	1	1.25	0.00



Hình 3. So sánh khả năng lên men D-xylose của các loài/nhóm theo chủng đại diện sinh ethanol mạnh nhất (đơn vị %, v/v)

Trong số các chủng nấm men lên men D-xylose phân lập được, *C. tropicalis* chiếm thành phần áp đảo (51 chủng trên tổng số 117 chủng). Nấm men *C. tropicalis* có thể phát triển ở nhiệt độ tới 40°C và là loài phổ biến ở các nước nhiệt đới. *C. tropicalis* sử dụng được nhiều nguồn cacbon khác nhau, phát triển được trong điều kiện hiếu khí, vi hiếu khí và kỵ khí. *C. tropicalis* có thể được phân lập từ đất, nước, hoa quả, ri đường, đồ uống lên men, phân, bệnh phẩm... (Meyer *et al.*, 1998). Theo đặc tính lên men sử dụng trong phân loại (dựa vào khả năng sinh khí) *C. tropicalis* không lên men đường xylose. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, *C. tropicalis* có thể tạo tối đa 0,86% ethanol trong canh trường chứa D-xylose ở điều kiện vi hiếu khí (hình 3). Khả năng lên men hạn chế D-xylose cũng như sự phổ biến của *C. tropicalis* gây khó khăn trong việc tìm kiếm nấm men lên men D-xylose với hoạt lực cao.

Các chủng thuộc loài *C. fermentati* và 3 chủng thuộc nhóm chưa phân loại (XFE82-12-1, XFE464-1, XFE273-1) có khả năng lên men tương tự như *C. tropicalis*. Khả năng lên men của các chủng thuộc loài *C. gorgasii*, *D. nepalensis*, *Trichosporon* sp. và những chủng còn lại thuộc nhóm chưa phân loại khá thấp với nồng độ ethanol tích lũy không quá 0,2%. Trong số những chủng phân lập từ Việt Nam, chủng *C. pseudointermedia* XFE1063 có khả năng lên men

mạnh nhất (tạo 1,67% ethanol trong canh trường) và tương đương với các chủng nấm men *C. lyxosophila* CBS8194 (tạo 1,25% ethanol), *Pach. tannophilus* CBS4044 (tạo 1,82% ethanol) và *P. stipitis* CBS5776 (tạo 1,90% ethanol) đang được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu về lên men D-xylose. Khả năng lên men D-xylose của *C. pseudointermedia* chưa từng được công bố. Trong nghiên cứu này, *C. shehatae* CBS5813 có khả năng lên men D-xylose mạnh nhất với nồng độ ethanol tích lũy đạt 2,8%, vượt khá xa so với *C. pseudointermedia* XFE1063. Tuy nhiên, việc sử dụng *C. shehatae* CBS5813 trong sản xuất ethanol từ D-xylose đã được bảo hộ bởi patent quốc tế PCT/SE 84/00155 (<http://www.cbs.knaw.nl>).

Khả năng sinh ethanol của *A. pullulans* var. *melanigenum* ở mức độ khá cao là điều đáng ngạc nhiên (tối đa 1,5%). Khả năng lên men D-xylose của *A. pullulans* từng được nhắc đến, tuy nhiên nồng độ cồn tích lũy không quá 0,5% (Nigam *et al.*, 1985). Thông thường nấm men sinh ethanol từ D-xylose (trong điều kiện vi hiếu khí) đều có khả năng lên men D-glucose (trong điều kiện kỵ khí). Tuy nhiên tất cả 4 chủng *A. pullulans* var. *melanigenum* phân lập được không có khả năng lên men D-glucose. Trong điều kiện, *A. pullulans* thường là thành phần áp đảo trên bề mặt phần trên của cây (phyllosphere)

(Andrews *et al.*, 1994). Hiện tượng nấm men hiệu khí có khả năng sinh một lượng ethanol đáng kể từ D-xylose trong điều kiện vi hiếu khí và việc nấm men không có khả năng sử dụng D-xylose trong điều kiện kỵ khí cho thấy lên men D-xylose không phải là đặc thù của nấm men. Ethanol có thể coi là sản phẩm phụ tạo bởi sự bất cân đối về NAD(P)/NAD(P)H khi oxy bị thiếu hụt trong quá trình oxy hóa D-xylose.

Lên men D-xylose tạo ethanol là một đặc tính hiếm gặp ở nấm men cũng như ở vi sinh vật nói chung. Các nghiên cứu tìm kiếm/cải thiện nấm men lên men D-xylose đã được bắt đầu từ hơn 25 năm trước (Toivola *et al.*, 1984; Nigam *et al.*, 1985) và hiện vẫn đang được tiếp tục (Nguyễn *et al.*, 2006; Matsushika *et al.*, 2009). Một thách thức lớn trong phân lập tuyển chọn nấm men lên men D-xylose là phát triển môi trường chọn lọc và phương pháp loại trừ những nấm men phổ biến nhưng có hoạt lực không cao (ví dụ như *C. tropicalis*).

KẾT LUẬN

Từ một số lượng khá lớn mẫu phẩm thiên nhiên Việt Nam (450 mẫu) đã thu nhận được 117 chủng nấm men có khả năng lên men D-xylose, trong đó *C. tropicalis* là loài phổ biến nhất. Khả năng tích lũy ethanol cao nhất được phát hiện ở *C. pseudointermedia* và *A. pullulans* var. *melanigenum*. Thách thức lớn cho việc phân lập, tuyển chọn nấm men lên men D-xylose là phát triển môi trường chọn lọc và loại trừ những loài phổ biến nhưng có khả năng lên men thấp như *C. tropicalis*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Nhà nước KC.04.07/06-10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andrews JH, Harris RF, Speare RN, Lau GW, Nordheim EV (1994) Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Can J Microbiol* 40: 6-17.

da Silva-Filho EA, Brito dos Santos SK, Resende Ado M, de Moraes JO, de Moraes MA Jr, Ardaillon Simões D (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88: 13-23.

Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 937-953

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 41: 95-98.

Kurtzman CP, Robnett CJ (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 35: 1216-1223.

Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 331-371.

Kurtzman CP, Suzuki M (2010) Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 51: 2-14.

Lieckfeldt E, Meyer W, Börner T (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J Basic Microbiol* 33: 413-425.

Lin Y, Tanaka S (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 627-642.

Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S (2009) Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 37-53.

Merino ST, Cherry J (2007) Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. Scheper T, ed. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 108. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 95-120.

Meyer SA, Payne RW, Yarrow D (1998). *Candida* Berkhout Kurtzman CP, Fell JW, eds. *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam. 454-573.

Millati R, Edebo L, Taherzadeh MJ (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme Microb Technol* 36: 294-300

Nguyen NH, Suh SO, Marshall CJ, Blackwell M (2006) Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spaihaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycol Res* 110: 1232-1241.

Nigam JN, Ireland RS, Margaritis A, Lachance MA (1985) Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. *Appl Environ Microbiol* 50: 1486-1489

Rosenberg SL (1980) Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enzyme Microb Technol* 2: 185-193.

Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, Statzell-Tallman A (2002) Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of

large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res* 2: 495-517.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 25: 4786-4882.

Tavola A, Yarrow D, van den Bosch E, van Dijken JP, Scheffers WA (1984) Alcoholic Fermentation of d-Xylose

by Yeasts. *Appl Environ Microbiol* 47: 1221-1223.

Van Vleet JH, Jeffries TW (2009) Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr Opin Biotechnol* 20: 300-306.

Zalar P, Gostincar C, de Hoog GS, Ursic V, Sudhaham M, Gunde-Cimerman N (2008) Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol* 61: 21-38.

ISOLATION AND SCREENING OF D-XYLOSE FERMENTING YEASTS

Vu Nguyen Thanh*, Nguyen Thanh Thuy, Dao Anh Hai, Ninh Thi Huyen, Nguyen Thi Huong Giang

Food Industries Research Institute

SUMMARY

D-xylose is the second most abundant sugar constituent of lignocellulose, after D-glucose. Bioconversion of D-xylose to ethanol represents one of the major bottlenecks in industrial production of bioethanol from lignocellulose. In this study, diversity and fermentation capability of D-xylose fermenting yeasts isolated from Vietnam were investigated. From 450 samples of soil, plant residues, insect frass..., 117 D-xylose fermenting yeasts were isolated. The strains were clustered into groups based on PCR fingerprinting using (GAC)₃ primer and identified by sequence analysis of 26S rDNA D1/D2 and ITS regions. The following yeast groups were found: *Candida tropicalis* (51 strains), *Trichosporon* sp. (9 strains), *C. fermentati* (8 strains), *C. gorgasii* (7 strains), *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* (4 strains), *C. pseudointermedia* (4 strains), *Debaryomyces nepalensis* (4 strains), and unclassified (30 strains). *C. pseudointermedia* and *A. pullulans* var. *melanigenum* were the most active and could accumulate up to 1.67% and 1.50% ethanol, respectively. *C. tropicalis* was the most common yeast-group with moderate fermentation capability (accumulated up to 0.86% ethanol). Strains of *Trichosporon* sp., *C. fermentati*, *C. gorgasii*, *D. nepalensis* and the unclassified groups showed low fermentation activity and accumulated less than 0.65% ethanol. Anaerobic incubation of 55 soil and decaying plant tissue samples with D-xylose failed to enrich D-xylose fermenting yeast since no yeast growth was observed. It was acknowledged that the major challenges in obtaining of an efficient D-xylose fermenter were to develop a selective medium for xylose fermenting yeasts and to exclude cosmopolitan species with low D-xylose fermentation capability like *C. tropicalis*.

Keywords: D-xylose, fermentation, fuel ethanol, lignocelluloses, Yeast

* Author for correspondence: Tel: 84-4-35589004; E-mail: thanh@firi.ac.vn