

## NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG SINH ENZYME NGOẠI BÀO CỦA HAI CHỦNG NẤM MEN SINH BÀO TỬ BẢN THUỘC CHI *BULLERA*

Đào Thị Lương<sup>1</sup>, Phạm Văn Ty<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia, Hà Nội

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia, Hà Nội

### TÓM TẮT

Ba mươi chín chủng nấm men sinh bào tử bản phân lập từ Vườn Quốc gia Cúc Phương thuộc chi *Bullera* được nghiên cứu phân loại sơ bộ dựa vào hình thái các bào tử, hình thái khuẩn lạc, thành phần ubiquinone chính và sự có mặt của xyloza trong tế bào. Cả 39 chủng đều có khả năng phân giải ít nhất 3 trong các cơ chất: tinh bột, casein, CMC, kitin, lipid. Chúng đều không sinh chất kháng sinh kháng lại các vi sinh vật kiểm định. Trong số 39 chủng nghiên cứu, hai chủng VY-116, VY-142 có phức hệ enzyme khá phong phú, chúng có khả năng phân giải tốt đồng thời cả năm loại cơ chất là tinh bột, casein, CMC, kitin, lipid. Xác định trình tự 26S rDNA (D1/D2) và so sánh với trình tự của các loài có quan hệ họ hàng gần cho thấy, hai chủng này được xếp vào 2 loài thuộc chi *Bullera*. Điều kiện tối ưu cho sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme của 2 chủng này là: Môi trường YM, pH 6 - 7, nhiệt độ 20 - 25°C, thời gian nuôi 6 ngày. Điều kiện thích hợp cho enzyme ngoại bào hoạt động của 2 chủng nấm men ở nhiệt độ từ 40 - 50°C; pH 6 - 7.

**Từ khóa:** *Bullera*, điều kiện tối ưu, enzyme ngoại bào, nấm men sinh bào tử bản, 26S rDNA

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam nằm trong khu vực có khí hậu nóng ẩm, tạo điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật phát triển. Việt Nam được đánh giá là một trong các quốc gia có đa dạng sinh học phong phú. Tuy nhiên, đối với vi sinh vật thì sự nghiên cứu đa dạng chưa thật sự được quan tâm đúng mức. Mục tiêu của nghiên cứu đa dạng vi sinh vật là nhằm tìm kiếm các nguồn gen mới, tiến hành nghiên cứu, tìm cách ứng dụng và lưu giữ chúng cho các thế hệ sau. Trong quá trình tìm kiếm các nguồn gen, không phải chỉ chú ý đến các nhóm vi sinh vật đã biết, mà cần phải quan tâm đến các nhóm hiếm, ít được nghiên cứu với hy vọng tìm ra các chất có hoạt tính sinh học mới.

Nấm men sinh bào tử bản cư trú trên lá cây, là nhóm vi sinh vật còn ít được nghiên cứu, nhưng gần đây bắt đầu được đề ý đến do một số loài trong số chúng có hoạt tính sinh học.

Trong hành trình nghiên cứu về nấm men sinh bào tử bản ở Việt Nam, Đào Thị Lương và đồng tác giả (2002; 2005) đã phân lập được 39 chủng thuộc chi *Bullera* từ Vườn Quốc gia Cúc Phương, hai loài mới trong số 39 chủng đã được công bố, một số loài mới khác sẽ được công bố trong thời gian tới. Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu về khả năng sinh một số enzyme ngoại bào của các chủng này, lựa

chọn một số chủng có hoạt tính enzyme mạnh để đưa vào ứng dụng trong thực tiễn.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Các chủng nấm men

Các chủng nấm men được phân lập từ bề mặt các lá cây mọc ở Vườn Quốc gia Cúc Phương, Ninh Bình, được phân lập theo phương pháp của Nakase và Takashima (1993).

**Các đặc điểm hình thái bào tử, khuẩn lạc, đặc điểm nuôi cấy:** Theo mô tả của Yarrow (1998).

#### Các đặc điểm hóa phân loại (chemotaxonomy)

Tách chiết, tinh sạch và xác định ubiquinone theo phương pháp của Nakase và Suzuki (1986). Xylose trong tế bào được phân tích bằng sắc ký lỏng cao áp, sau khi thủy phân tế bào bằng trifluoroacetic acid theo Suzuki và Nakase (1988).

#### Phân tích trình tự và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Trình tự của 26S rDNA đoạn D1/D2 được xác

định theo phương pháp của Kurtman và Robnett (1997), sử dụng phần mềm CLUSTALW ver 1.83 của Thompson và đồng tác giả (1994). Các trình tự tham khảo dùng trong nghiên cứu cây phát sinh chủng loại được lấy từ dữ liệu của DDBJ, EMBL, GenBank. Cây phát sinh được xây dựng theo Kimura (1980) sử dụng phương pháp của Saitou và Nei (1987).

### Hoạt tính enzyme

Được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên thạch sử dụng các cơ chất: Tinh bột (amylase), CMC (cellulase), kitin (chitinase), casein (protease) và Tween 80 (lipase) (Nguyễn Lân Dũng *et al.*, 1972).

### Sinh khối khô

Được xác định theo phương pháp cân trọng lượng không đổi (Nguyễn Lân Dũng *et al.*, 1972).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

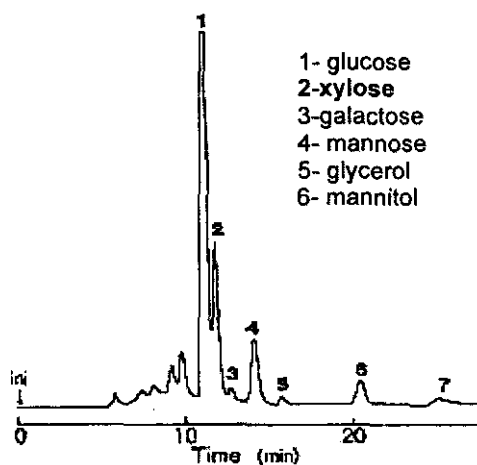
### Tuyển chọn các chủng nấm men có hoạt tính sinh học

Từ 20 mẫu lá cây ở Vườn Quốc gia Cúc Phương, chúng tôi đã phân lập được 121 chủng nấm men sinh bào tử bán. Dựa vào hình thái bào tử, hình thái khuẩn lạc, có thể phân thành 85 nhóm trong đó mỗi nhóm chọn một chủng làm đại diện. Sau khi xác định sự có mặt của xylose trong tế bào (Hình 1) và thành phần ubiquinone chính (Hình 2), các chủng được xếp vào 5 chi, trong đó 5 chủng thuộc chi *Bannoa*, 39 chủng thuộc chi *Bullera*, 5 chủng thuộc chi *Kockovaella*, 34 chủng thuộc chi *Sporobolomyces* và 2 chủng còn lại thuộc chi *Tilletiopsis*.

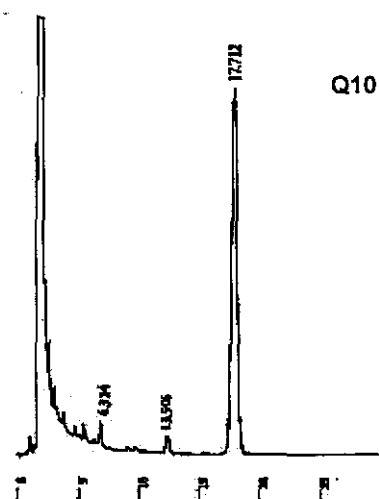
Ba mươi chín chủng thuộc chi *Bullera* có đặc trưng bởi khuẩn lạc có màu trắng đến hơi vàng, sinh sản bằng bào tử bán dạng đối xứng và bằng bào tử nảy chồi, chứa xylose trong tế bào và có ubiquinone chủ yếu là Q-10 (Boekhout, Nakase, 1998).

### Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Ba mươi chín chủng nấm men sinh bào tử bán được nuôi trong môi trường YM dịch thể pH 6 trên máy lắc 220 vòng/phút, ở 20°C trong 5 ngày. Ly tâm thu dịch trong, nhỏ vào các lỗ khoan trên môi trường đã chứa cơ chất (tinh bột, CMC, casein, kitin, Tween 80), đặt trong tủ ấm 30°C. Sau 24 h, đo vòng phân giải cơ chất. Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 1. Phân tích xylose trong tế bào của chủng VY-116.

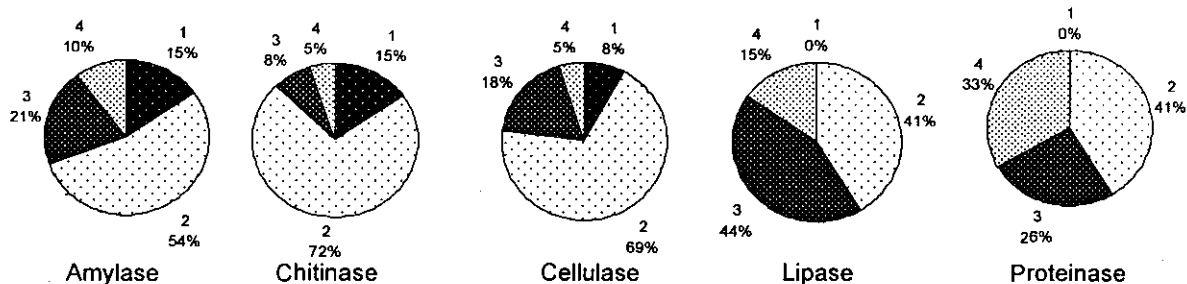


Hình 2. Phân tích hệ thống ubiquinone trong tế bào của chủng VY-142.

Biểu đồ trình bày ở hình 3 cho thấy khả năng phân giải các cơ chất của 39 chủng nấm men là khác nhau. Trên cơ chất tinh bột và kitin, số chủng có hoạt tính enzyme mạnh chiếm 15%, đây cũng là tỷ lệ lớn vì nấm men chủ yếu chỉ sử dụng đường cho sinh trưởng, khả năng sinh enzyme ngoại bào rất ít. Với cơ chất là CMC, số chủng có hoạt tính enzyme mạnh chiếm 8%. Trong khi đó, trên Tween 80 và casein, số lượng chủng không sinh enzyme phân giải các cơ chất chiếm 13 và 33%, không có chủng nào có hoạt tính enzyme mạnh. Đa số các chủng đều có hoạt tính enzyme trung bình, đường kính vòng phân giải cơ chất 10 < D - d < 20 mm chiếm 41 - 72% số chủng.

Trong năm loại cơ chất trên, cả 39 chủng nấm men đều sinh ít nhất 3 loại enzyme. Điều này càng làm sáng tỏ thêm cho câu hỏi về môi trường sống các chủng nấm men này trong tự nhiên, chúng cư trú trên bề mặt lá cây và phân giải các cơ chất có trên bề mặt lá, làm nguồn thức ăn cho sinh trưởng và phát triển.

Trong số 39 chủng nấm men, đáng chú ý nhất là 2 chủng VY-116 và VY-142 cùng sinh cả năm loại enzyme khác nhau với đường kính vòng phân giải lớn hơn so với các chủng còn lại (Bảng 1). Do vậy, hai chủng này sẽ được lựa chọn để nghiên cứu sâu về phân loại và các đặc điểm sinh lý, sinh hóa cần quan tâm.



Hình 3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của 39 chủng nấm men sinh bào tử bản. 1: Hoạt tính enzyme mạnh:  $D - d > 20$  mm, 2: Hoạt tính enzyme trung bình:  $10 < D - d < 20$  mm, 3: Hoạt tính enzyme yếu:  $0 < D - d < 10$  mm, 4: Không sinh enzyme:  $D - d = 0$  mm.

Bảng 1. Hoạt tính enzyme của 2 chủng nấm men sinh bào tử bản.

Chủng nấm men	Hoạt tính enzyme (D - d, mm)				
	Amylase	CMC	Chitinase	Protease	Lipase
VY-116	17	20	21	15	18
VY-142	23	19	21	15	18

**Khả năng sinh các chất kháng sinh**

Các chủng nấm men sinh bào tử bản được nuôi trong môi trường YM dịch thể, pH 6,5, trên máy lắc 220 vòng/phút, ở 20°C, trong 5 ngày. Ly tâm thu lấy dịch trong. Nhỏ vào các lỗ khoan trên những môi

trường chứa sẵn vi sinh vật kiểm định (Bảng 2).

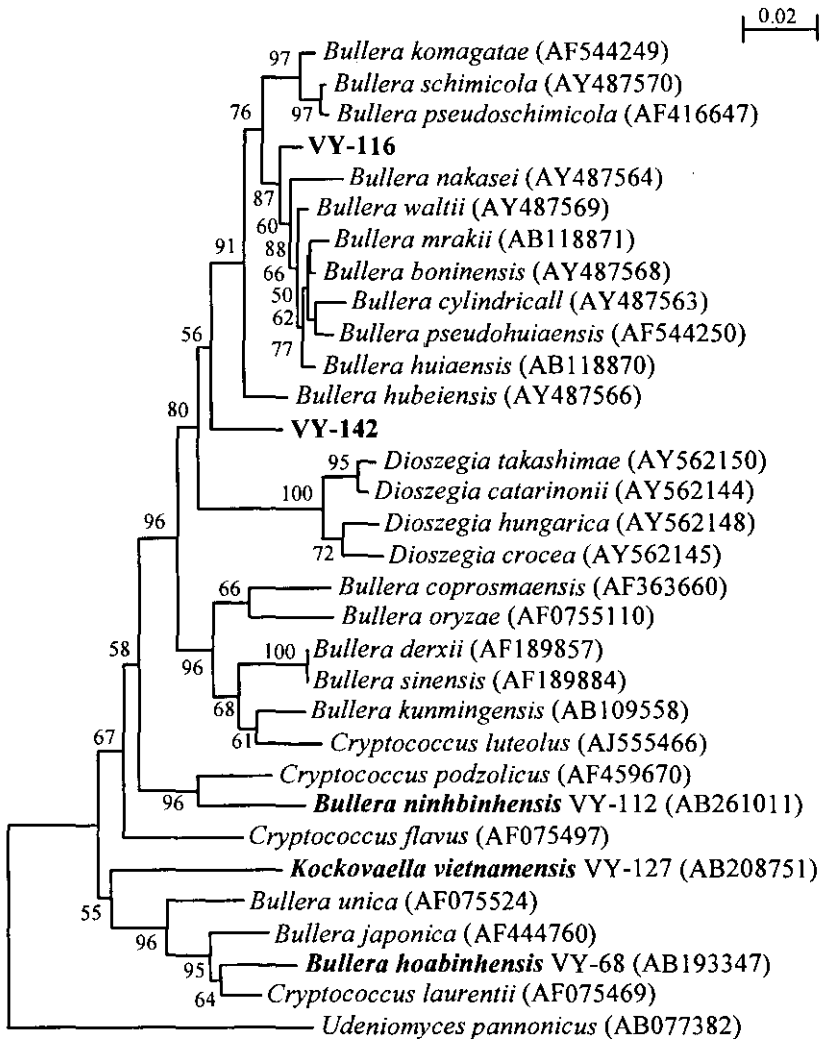
Trong số 39 chủng nấm men sinh bào tử bản thuộc chi *Bullera* của nghiên cứu này không có chủng nào có khả năng sinh chất kháng sinh kháng lại các vi khuẩn và nấm đã sử dụng để kiểm định.

Bảng 2. Các VSV kiểm định đã sử dụng trong nghiên cứu này.

Nhóm VSV kiểm định	Số lượng loài đã thử nghiệm	Tên loài
Vi khuẩn Gram âm	6	<i>Proteus minabilis</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Echerichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> .
Vi khuẩn Gram dương	4	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .
Nấm men	2	<i>Candida albicans</i> , <i>Sacchromyces cerevisiae</i>
Nấm sợi	2	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus flavatus</i>
<b>Tổng số</b>	<b>14</b>	

**Bảng 3.** Đặc điểm hình thái của 2 chủng nấm men VY-116 và VY 142.

Tên chủng nấm men	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Khuẩn ty	Hình thái bào tử bán
VY-116	Màu hơi trắng, xù xì, hơi ướt, giữa nhô cao dạng giọt nước, mép có viền rõ, nhẵn.	Oval kéo dài hoặc hình hạt thóc, các tế bào đứng riêng lẻ hoặc nhóm (2,5 - 6 × 1 - 3,5 μm)	Không hình thành khuẩn ty thật/ giả	Hình cầu, gán cầu kích thước 2 - 3 × 1,7 - 2 μm
VY-142	Màu kem, nhẵn, bóng, giữa dạng chóp nón và giọt nước, chân mép nhẵn	Cầu, oval hoặc oval kéo dài, các tế bào đứng riêng lẻ hoặc nhóm (1,5 - 5 × 1,5 - 3,5 μm)	Hiếm khi có khuẩn ty giả	Hình cầu, gán cầu kích thước 3 - 3,5 × 2,5 - 3 μm

**Hình 4.** Vị trí phân loại của 2 chủng VY-116 và VY-142 với một số loài có quan hệ họ hàng gần dựa vào trật tự của 26S rDNA đoạn D1/D2.

### Đặc điểm sinh học của 2 chủng VY-116 và VY-142

Chủng nấm men VY-116 được phân lập từ bề mặt lá cây thài lài tía (*Zebrina maysorensis*). Chủng nấm men VY-142 được phân lập từ bề mặt lá cây mù u (*Calophyllum membranaceum*).

#### Các đặc điểm hình thái

Hai chủng nấm men được nuôi cấy trên các môi trường YM thạch, YM dịch thể, thạch-ngô để quan sát hình dạng khuẩn lạc, hình dạng tế bào, kiểu sinh sản và khuẩn ty (Bảng 3).

#### Xác định vị trí phân loại dựa vào trình tự 26S rDNA đoạn D1/D2

DNA genome của 2 chủng VY-116 và VY-142 được tách chiết và sử dụng làm khuôn để khuếch đại đoạn D1/D2 của 26S rDNA bằng PCR sử dụng cặp mồi NL1 và NL4. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch qua kit QIAGEN trước khi làm phản ứng đọc trình tự. Trình tự 600 nucleotide đoạn D1/D2 của 26S rDNA được xác định trên máy đọc trình tự 3100-Avant Genetic Analyzer, so sánh độ tương đồng với trình tự của các loài có quan hệ họ hàng gần bằng chương trình Blast.

Cây phát sinh chủng loại (Hình 4) được xây dựng dựa trên trình tự 26S rDNA (D1/D2) của hai

chủng VY-116, VY-142 với 30 loài thuộc các chi *Bullera*, *Cryptococcus*, *Dioszegia*, *Trichosporon*.

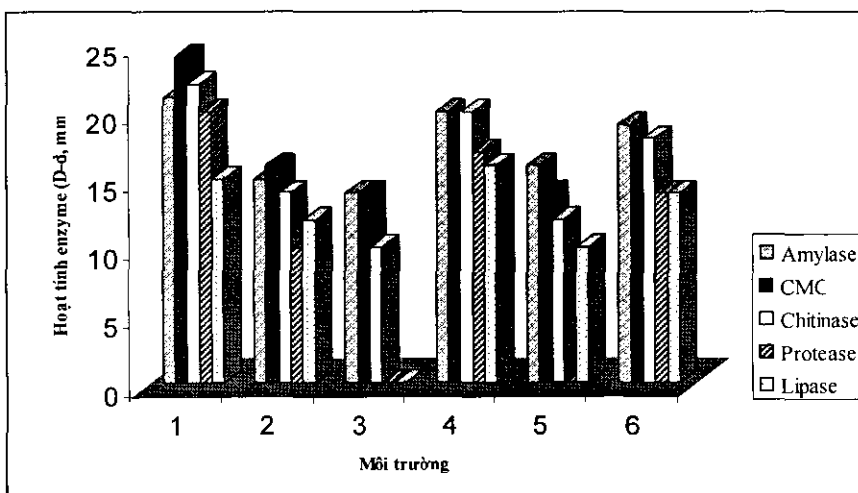
Như vậy, cả hai chủng đều nằm trên 2 nhánh khác hẳn với các loài đã biết trên cây phát sinh. Chủng VY-116 có độ tương đồng 96,9 - 98,4%, chủng VY-142 có độ tương đồng 94,6 - 96,1 ở đoạn D1/D2 26S rDNA với các loài có quan hệ họ hàng gần nhất, do vậy có thể xếp 2 chủng vào hai loài mới của chi *Bullera* (Fell *et al.*, 2000; Kurtzman, Robnett, 1998; Sugita, Nishikawa, 2003).

#### Các điều kiện nuôi cấy tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp enzyme ngoại bào

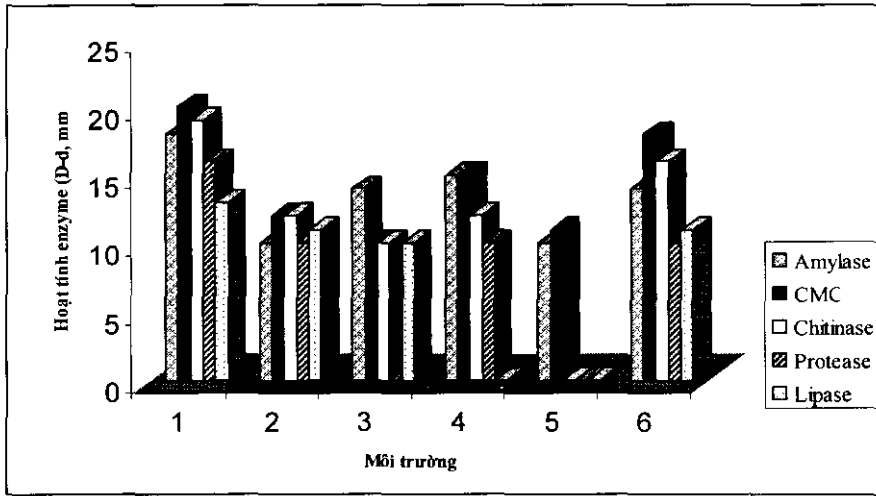
##### Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp

Sáu loại môi trường sử dụng trong thí nghiệm được đánh số: (1) YM; (2) Giá-đường; (3) Sabouraud; (4) Khoai tây; (5) Hansen; (6) Ngô-đường. Hai chủng nấm men VY-116, VY-142 được nuôi trên 6 môi trường, lắc 220 vòng/phút, ở 20°C. Sau 5 ngày thu dịch, xác định pH sau nuôi cấy; sinh khối và hoạt tính enzyme: amylase, protease, CMC, lipase, chitinase.

Kết quả cho thấy môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng nhất định tới khả năng sinh enzyme của 2 chủng nấm men VY-116, VY-142. Cả 2 chủng đều có hoạt tính enzyme (Hình 5a, b) và sinh khối lớn nhất (chủng VY-116: 15,3 mg/l; chủng VY-142: 10,3 mg/l) trên môi trường YM.



Hình 5a. Ảnh hưởng của môi trường tới sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-116.



Hình 5b. Ảnh hưởng của môi trường tới sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-142.

**Lựa chọn pH nuôi cấy thích hợp**

Hai chủng nấm men được nuôi trong môi trường YM, pH thay đổi từ 3 - 9, lắc 220 vòng/phút, ở 20°C. Sau 5 ngày, thu dịch nuôi, xác định hoạt tính các enzyme, pH sau nuôi, sinh khối.

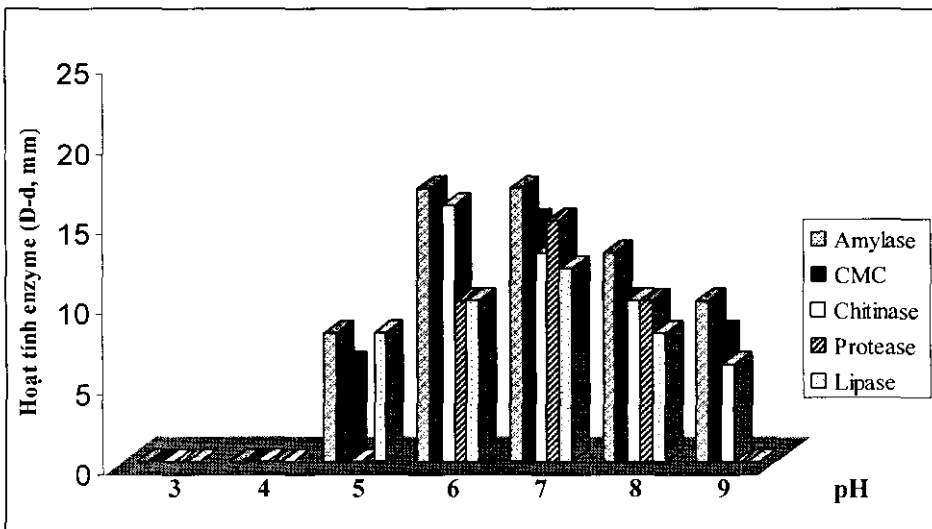
Cả 2 chủng đều không sinh trưởng và sinh enzyme ở pH < 4. Chủng VY-116 sinh trưởng mạnh ở pH 6 - 7 (11,9 - 13,2 mg/l); enzyme được sinh tổng hợp ở pH 6 - 8. Chủng VY-142 sinh trưởng mạnh ở pH 6 - 8 (15 - 17 mg/l); enzyme được sinh tổng hợp ở pH 6 - 8 (trừ lipase không được tổng hợp ở pH 8). Cả 2 chủng đều có hoạt tính enzyme mạnh nhất ở

pH 7 (Hình 6a, b).

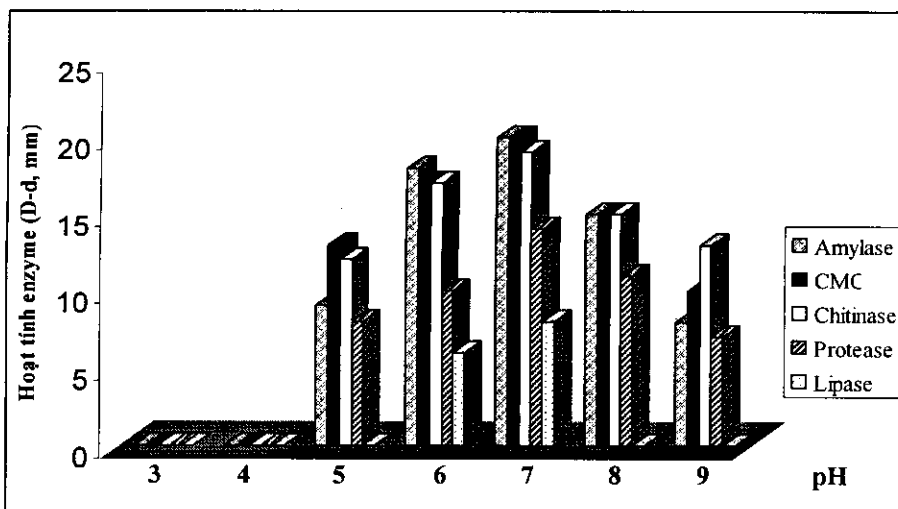
**Lựa chọn nhiệt độ thích hợp**

Các chủng nấm men nghiên cứu được nuôi trong môi trường YM dịch thể, lắc 220 vòng/phút, ở 10, 15, 20, 25, 30°C. Sau 5 ngày, thu dịch nuôi, xác định hoạt tính enzyme, pH sau nuôi và sinh khối.

Kết quả cho thấy cả 2 chủng đều sinh trưởng tốt ở nhiệt độ 20 - 25°C. Chủng VY-116 cũng có hoạt tính enzyme mạnh ở khoảng nhiệt độ này trừ lipase. Chủng VY-142 có hoạt tính enzyme mạnh ở dải nhiệt độ rộng hơn từ 15 - 25°C (Hình 7a, b).



Hình 6a. Ảnh hưởng của pH tới khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-116.



Hình 6b. Ảnh hưởng của pH tới khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-142.

### Lựa chọn thời gian nuôi cấy thích hợp

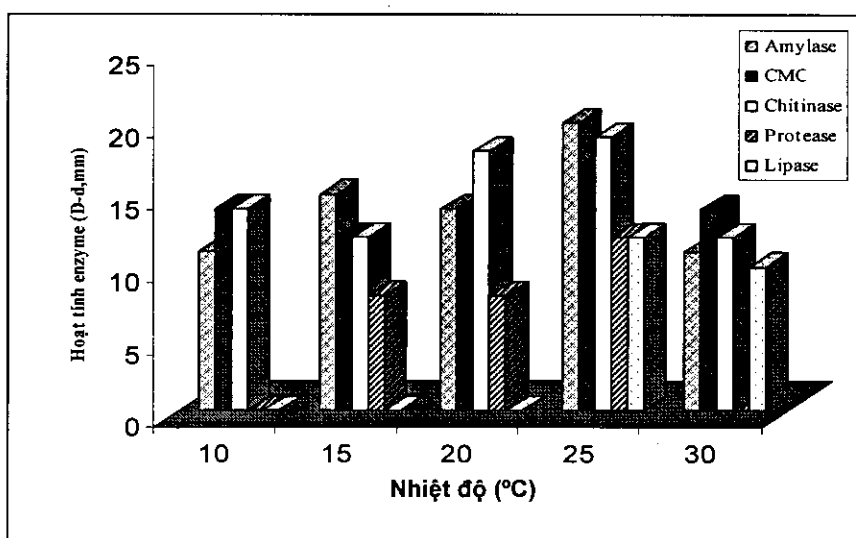
Các chủng nấm men nghiên cứu được nuôi trong môi trường YM dịch thể pH 6,5, lắc 220 vòng/phút, ở 20°C. Trong 10 ngày, mỗi ngày thu dịch nuôi một lần để xác định hoạt tính enzyme, pH sau nuôi cấy, sinh khối.

Khả năng sinh trưởng của 2 chủng nấm men VY-116 và VY-142 tăng theo thời gian từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 8, cao nhất trong thời gian 5 - 8 ngày (15,0 - 16,7 mg/l và 10,2 - 11,3 mg/l). Enzyme được tổng hợp sau 2 - 3 ngày (CMC được tổng hợp sau 1 ngày ở chủng VY-142), hoạt tính mạnh nhất từ ngày 5 - 8 (Hình 8a, b).

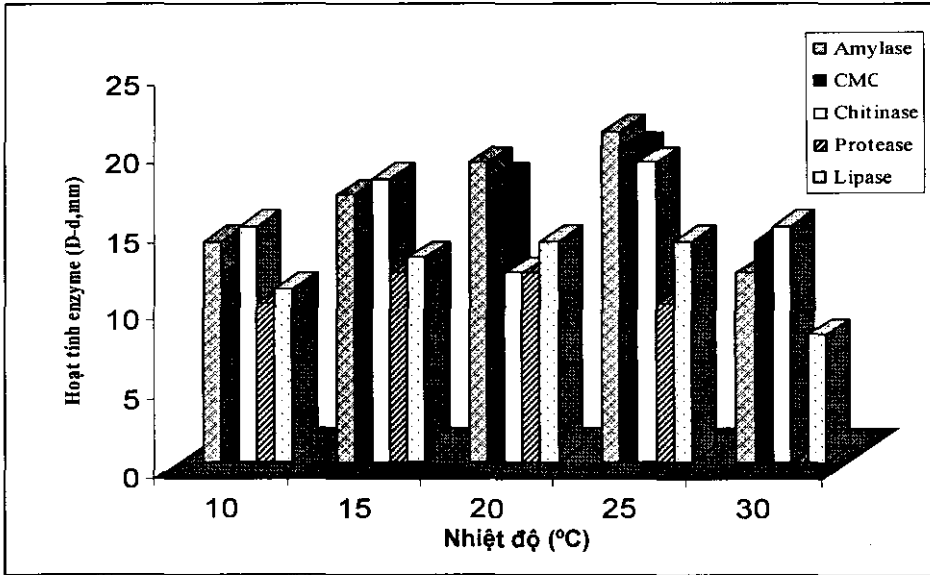
### Nghiên cứu các điều kiện hoạt động tối ưu cho enzyme ngoại bào ở hai chủng VY-116 và VY-142

#### pH tối ưu

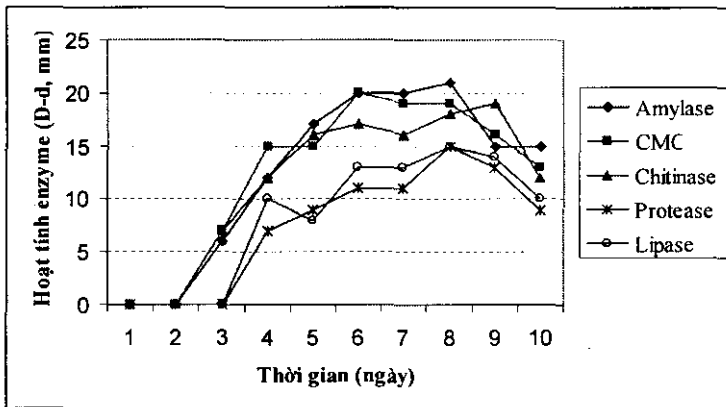
Hai chủng nấm men VY-116 và VY-142 được nuôi cấy trong môi trường YM, lắc 220 vòng/phút, ở 20°C. Sau 6 ngày, ly tâm lấy phần dịch trong là dịch enzyme thô. Nhỏ dịch nuôi vào các môi trường cơ chất ở các pH khác nhau từ 3 - 8. Xác định hoạt tính enzyme dựa vào kích thước vòng phân giải các cơ chất. Kết quả cho thấy ở pH < 5, các enzyme đều bị bất hoạt trên cả 2 chủng nghiên cứu, pH 6 - 7 là thích hợp nhất cho các enzyme hoạt động. Hoạt tính của các enzyme giảm dần ở pH > 8.



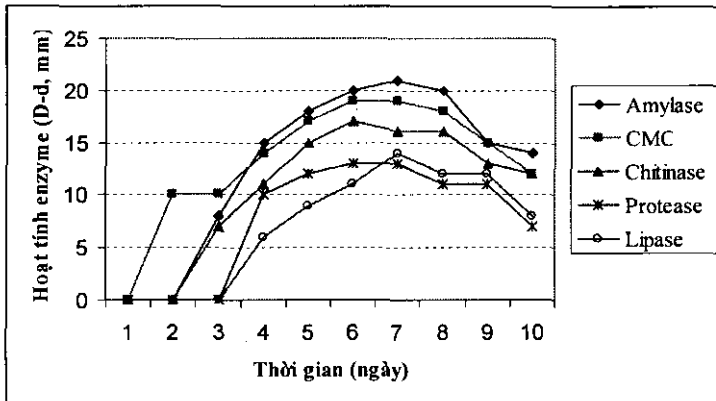
Hình 7a. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-116.



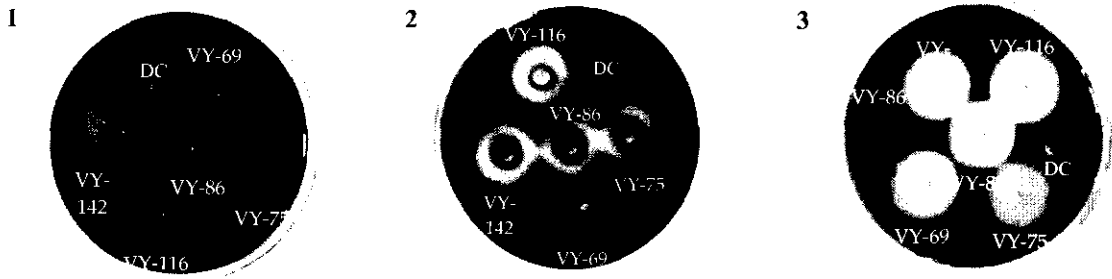
Hình 7b. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-142.



Hình 8a. Khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-116 theo thời gian.



Hình 8b. Khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng VY-142 theo thời gian.



Hình 9. Vòng phân giải các cơ chất: (1), cellulase; (2), amylase; (3) chitinase của các chủng nấm men sinh bào tử bản thuộc chi *Bullera*.

### Nhiệt độ tối ưu

Nhỏ dịch enzyme thô vào các môi trường cơ chất ở các nhiệt độ: 20, 30, 40, 50, 60, 70°C và xác định hoạt tính enzyme qua đánh giá vòng phân giải. Kết quả cho thấy, các enzyme của 2 chủng đều có dải hoạt động rộng từ 20 - 60°C, bất hoạt khi nhiệt độ tăng lên 70°C. Nhiệt độ thích hợp nhất cho các enzyme hoạt động là 40 - 50°C

### KẾT LUẬN

Ba mươi chín chủng nấm men sinh bào tử bản thuộc chi *Bullera* đều có khả năng phân giải ít nhất 3 trong các cơ chất: tinh bột, casein, CMC, kitin, lipid. Chúng đều không sinh chất kháng sinh kháng lại các vi sinh vật kiểm định.

Trong số 39 chủng nghiên cứu, hai chủng VY-116, VY-142 có phức hệ enzyme khá phong phú, chúng có khả năng phân giải tốt đồng thời cả năm loại cơ chất. Hai chủng này được xếp vào 2 loài mới thuộc chi *Bullera* dựa vào trình tự 26S rDNA (D1/D2). Điều kiện tối ưu cho sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme của 2 chủng trên môi trường YM, pH 6 - 7, nhiệt độ 20 - 25°C, thời gian nuôi 6 ngày. Điều kiện thích hợp cho enzyme ngoại bào hoạt động ở nhiệt độ từ 40 - 50°C; pH 6 - 7.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả công trình xin chân thành cảm ơn Đại học Quốc gia Hà Nội và Trung tâm Công nghệ Sinh học đã cấp kinh phí và đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện các nghiên cứu của đề tài QGĐB 06.19.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Boekhout T, Nakase T (1998) *Bullera* Derx. In The

Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed., ed. by Kurtzman CP, Fell JW, Elsevier, Amsterdam: 731-741.

Đào Thị Lương, Phạm Văn Ty, Nguyễn Lâm Dũng, Masako Takashima, Takashi Nakase (2002) *Bullera ninhbinhensis* sp. nov., một loài nấm men mới sinh bào tử bản được phân lập ở Việt Nam. *Tạp chí Di truyền và Ứng dụng*: 35-42.

Đào Thị Lương, Masako Takashima, Phạm Văn Ty, Nguyễn Lâm Dũng, Takashi Nakase (2005) *Bullera hoabinhensis* sp. nov., a new ballistoconidiogenous yeast isolated from a plant leaf collected in Vietnam. *J Gen Appl Microbiol* 51: 335-342.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1351-1371.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.

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.

Nakase T, Suzuki M (1986) *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming large ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis*, and *Sasa* sp. in Japan. *J Gen Appl Microbiol* 32: 225-240.

Nakase T, Takashima M (1993) A simple procedure for

the high frequency isolation of new taxa of ballistosporous yeasts living on the surfaces of plants. *RIKEN Rev* 3: 33-34.

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đăng Đức, Đặng Hồng Miên, Nguyễn Vĩnh Phước, Nguyễn Đình Quyền, Nguyễn Phùng Tiến, Phạm Văn Ty (1976) *Một số phương pháp nghiên cứu Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ thuật, Hà Nội

Saitou, N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Sugita T, Nishikawa A (2003) Fungal identification method based on DNA sequence analysis: Reassessment of the methods of the Pharmaceutical Society of Japan and the Japanese Pharmacopoeia.

*J Health Sci* 49(6): 531-533.

Suzuki M, Nakase T (1988) The distribution of xylose in the cells of ballistosporous yeasts - application of high performance liquid chromatography without derivatization to the analysis of xylose in whole cell hydrolysates. *J Gen Appl Microbiol* 34: 95-103.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22: 4673-4680.

Yarrow D (1998) *Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts*. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed., ed. by Kurtzman CP, Fell JW Elsevier, Amsterdam: 77-100.

## STUDY ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND EXTRACELLULAR ENZYME PRODUCTION OF TWO BALLISTOCONIDIUM-FORMING YEAST STRAINS OF THE GENUS *BULLERA*

Đào Thị Lương<sup>1,\*</sup>, Phạm Văn Ty<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi*

<sup>2</sup>*Hanoi University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

### SUMMARY

Thirty nine ballistoconidium-forming yeast strains, isolated from the wilting leaves in Cuc Phuong National Park in Ninh Binh province, Vietnam, were assigned to the genus *Bullera* based on the colony morphology, the presence of xylose in the cells, of Q-10 as a major ubiquinone and the production of symmetrical ballistoconidia and budding cells. All of these are yeast strains capable of decomposing at least 3 from 5 tested undesirable organic substances as starch, amylase, casein, CMC, chitinase, and lipid. None of these possesses antibacterial substances against pathogenic microorganisms. Among the 39 studied strains, two strains designated as VY-116 and VY-142, showed high amylolytic, chitinolytic, cellulolytic, proteolytic and lipolytic activities. Phylogenetic studies based on the sequence of 26S rDNA (D1/D2) of these strains showed that they might represent 2 new species of the genus *Bullera*. Research on optimization of cultural conditions for the growth and enzyme production was carried out for these two strains. It showed that these strains best grow and produce enzymes at 20 - 25°C, pH 6 - 7, in the YM medium, after 6 days of fermentation. The optimum condition for enzymatic activities are 40 - 50°C, pH 6 - 7.

**Keywords:** *Ballistoconidium-forming yeast, Bullera, extracellular enzyme, optimal conditions, 26S rDNA*

\* Author for correspondence: Tel: 84-4- 9110402; E-mail: [luongdt@vnu.edu.vn](mailto:luongdt@vnu.edu.vn)