

# Phân lập và tuyển chọn nấm men lên men rượu vang khóm Tắc Cậy (*Ananas comosus*)

Đường Thị Su San<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Thành<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Học viên cao học Khoa 27, Ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 30/4, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 30/4, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/8/2022; ngày chuyển phản biện 25/8/2022; ngày nhận phản biện 25/9/2022; ngày chấp nhận đăng 28/9/2022

## **Tóm tắt:**

Việc phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng lên men rượu là bước quan trọng nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất và chất lượng sản phẩm. Nghiên cứu này tập trung vào việc khai thác và đánh giá tiềm năng các chủng nấm men từ nguyên liệu khóm Tắc Cậy (*Ananas comosus*), một đặc sản của vùng Kiên Giang, để phục vụ quá trình sản xuất rượu vang. Kết quả đã phân lập được 34 dòng nấm men từ dịch quả khóm thu thập tại các tỉnh Kiên Giang, Hậu Giang và Tiền Giang. Dựa vào các tiêu chí phân loại nấm men như hình thái, sinh lý, sinh hóa, nghiên cứu này đã phân lập được 34 dòng nấm men thuộc ba chi (giống): *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia*. Trong số 34 dòng này, các dòng thuộc chi *Saccharomyces* được đặc biệt chú trọng. Trong đó, chủng TC4.2 có đặc tính tốt, được phân lập từ nước ép khóm Tắc Cậy ở tỉnh Kiên Giang, TC4.2 cho thấy khả năng lên men vượt trội. Dòng TC4.2 hoàn thành quá trình lên men nhanh nhất (trong 8 giờ), tạo ra hàm lượng rượu cao nhất (11,62%) và để lại lượng đường sót thấp nhất (5,67°Brix). Phân tích DNA xác nhận rằng, TC4.2 thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* với độ tương đồng 100%.

**Từ khóa:** lên men, nấm men, rượu vang khóm, *Saccharomyces cerevisiae*.

**Chỉ số phân loại:** 1.6, 2.8, 2.10

---

## Isolation and selection of yeast strain for Tac Cau pineapple (*Ananas comosus*) wine fermentation

Thi Su San<sup>1</sup> Duong<sup>1</sup>, Van Thanh Nguyen<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate student Course 27, Major in Biotechnology, Can Tho University, Campus 2, 30/4 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

<sup>2</sup>Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Campus 2, 30/4 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 20 August 2022; revised 25 September 2022; accepted 28 September 2022

## **Abstract:**

The study aimed to isolate and select yeast strains with high fermentative activity from fermented pineapple fruit juice to apply for fermentation to produce high-quality Tac Cau pineapple wine. The result of the study isolated 34 yeast strains from fermented pineapple fruit juices collected in Kien Giang, Hau Giang and Tien Giang provinces. Based on the classification keys of yeasts (morphology, physiology and biochemistry), 34 isolated yeasts belong to three genera: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* and *Pichia*. Results of the selective experiment from isolated yeasts belonging to *Saccharomyces* genera isolated the yeast strain TC4.2. TC4.2 from fermented pineapple fruit juice at Chau Thanh district (Kien Giang province) has the best fermentation activities, such as the fastest fermentation (8 hours), highest ethanol content (11.62% v/v) and lowest remaining sugar content (5.67°Brix). The identification results of the yeast strain TC4.2 using DNA sequencing confirmed that the TC4.2 strain is 100% homologous to *Saccharomyces cerevisiae*.

**Keywords:** fermentation, pineapple wine, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast.

**Classification numbers:** 1.6, 2.8, 2.10

---

\*Tác giả liên hệ: Email: nvthanh@ctu.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, rượu vang ngày càng trở nên phổ biến tại Việt Nam nhờ những lợi ích tích cực đối với sức khỏe và sự phong phú về nguồn nguyên liệu trong nước. Với điều kiện khí hậu nhiệt đới, Việt Nam sở hữu nhiều loại trái cây có hương vị đặc trưng và giá trị dinh dưỡng cao. Trong số đó, khóm Tắc Cậu (*Ananas comosus*), thuộc giống khóm Queen, trồng tại tỉnh Kiên Giang, nổi bật với vị ngọt và hương thơm đặc trưng. Những đặc tính này được hình thành nhờ vùng sinh thái độc đáo kết hợp giữa nước ngọt, nước mặn và phù sa, đưa khóm Tắc Cậu trở thành một trong những đặc sản nổi tiếng của vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Khóm là loại trái cây giàu dinh dưỡng, chứa nhiều hợp chất chống viêm, giúp cải thiện sức khỏe xương và hệ tiêu hóa. Tuy nhiên, khóm có đặc điểm nhanh chín, dễ hư hỏng và dập nát nếu không được bảo quản đúng cách, dẫn đến đầu ra không ổn định. Tình trạng "giải cứu nông dân" thường xuyên xảy ra, đặc biệt vào thời điểm chính vụ. Do đó, cần có các giải pháp linh hoạt và hiệu quả để tiêu thụ khóm tươi cũng như các loại nông sản khác của Việt Nam.

Từ thực tiễn trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra các dòng nấm men có hoạt lực lên men cao từ dịch quả khóm. Mục tiêu là sản xuất sản phẩm rượu vang khóm chất lượng cao nhằm đa dạng hóa sản phẩm chế biến từ khóm, tận dụng hiệu quả nguồn nguyên liệu dồi dào tại địa phương, đồng thời nâng cao giá trị kinh tế của khóm Tắc Cậu - một đặc sản tiêu biểu của Kiên Giang.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Mẫu khóm phân lập nấm men: khóm Tắc Cậu (thu tại huyện Châu Thành, Kiên Giang), khóm Cầu Đúc (thu tại TP Vị Thanh, Hậu Giang), khóm Tân Phước (thu tại huyện Tân Phước, Tiền Giang).

Mẫu khóm lên men rượu vang: khóm Tắc Cậu được thu tại huyện Châu Thành, Kiên Giang.

Chủng nấm men đối chứng *Saccharomyces cerevisiae* AWRI796 (Viện Nghiên cứu Rượu vang Úc) - ký hiệu ĐC, được lưu trữ tại Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2. Hóa chất và môi trường

Môi trường YPD gồm yeast extract 0,5%; peptone 0,5%; D-glucose 2,0%.

Môi trường YPD Agar gồm môi trường YPD bổ sung 1,5 g/l agar.

Môi trường Christensen gồm urea 20 g/l; yeast extract 0,1 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9,5 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  9,1 g/l; phenol red 0,01 g/l; pH được chỉnh về 6,7.

Môi trường thạch nước 2% (WA): 2,0% agar, nước cất.

### 2.3. Phân lập và xác định đặc điểm hình thái, sinh hóa của các dòng nấm men tự nhiên từ dịch quả khóm

Mẫu quả khóm chín thu được từ các địa điểm khác nhau: Tắc Cậu (Kiên Giang), Cầu Đúc (Hậu Giang), Tân Phước (Tiền Giang). Quả khóm chín (vỏ có màu vàng cam đậm) được thu tại vườn, bọc lại bằng giấy báo. Mẫu khóm thu về loại bỏ những quả hư, nhiễm vi sinh vật gây hư hỏng quả. Cắt phần vỏ và thịt quả khóm cho vào bình tam giác 100 ml chứa môi trường YPD, tăng sinh ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành phân lập trên môi trường YPD Agar đến khi đạt được những dòng nấm men thuần chủng.

Định danh sơ bộ dòng nấm men thuần chủng bằng các đặc điểm hình thái và sinh hóa dựa vào khóa phân loại nấm men [1-3].

### 2.4. Xác định đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa các dòng nấm men phân lập

**Xác định đặc điểm hình thái:** Các chủng nấm men đã tách rông được cấy lên đĩa petri chứa môi trường YPDA. Ủ các đĩa petri ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Ghi nhận hình dạng, màu sắc và kích thước khuẩn lạc các chủng nấm men trên đĩa. Làm tiêu bản các chuẩn nấm men quan sát dưới kính hiển vi để xác định hình dạng, kích thước của tế bào nấm men.

**Xác định đặc điểm sinh lý, sinh hóa của nấm men:** Giống nấm men được chủng vào môi trường YDP, ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Sau đó lấy ra quan sát dưới kính hiển vi. Quan sát sự hình thành bào tử, cách nảy chồi của bào tử nấm men.

**Quan sát sự hình thành bào tử:** Quan sát, ghi nhận khả năng hình thành bào tử, hình dạng và số lượng bào tử của nấm men trong môi trường thạch nước (WA) 6 tuần.

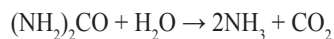
**Quan sát sự nảy chồi:** Sử dụng kính hiển vi quan sát vị trí, cách nảy chồi của tế bào nấm men.

### 2.5. Khả năng lên men đường glucose và saccharose

Chỉ tiêu đánh giá: sự hình thành cột khí  $\text{CO}_2$  trong chuông Durham úp ngược sau 48 giờ ủ, thí nghiệm được quan sát lặp lại 3 lần. Khảo sát khả năng lên men đường glucose được thực hiện các bước tương tự đối với dung dịch đường saccharose.

### 2.6. Khả năng phân giải urea

Các dòng nấm men đã tách rông được chủng vào ống nghiệm có chứa môi trường Christensen urea broth ở 30°C trong 24 giờ. Chủng nấm men có sinh ra enzyme urease sẽ phân giải urea thành ammonia và carbondioxide, ammonia sinh ra làm kiềm hóa môi trường và làm thay đổi chất chỉ thị màu [4].



Khi môi trường chuyển sang màu đỏ sẫm, điều đó cho thấy nấm men phân giải được urea. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại. Quan sát, ghi nhận màu sắc môi trường thay đổi sau thời gian ủ.

### 2.7. Tuyển chọn nấm men có hoạt lực lên men cao từ các dòng nấm men phân lập

Mục đích của nghiên cứu nhằm so sánh khả năng lên men của các dòng nấm men và lựa chọn dòng có khả năng lên men tốt nhất để phục vụ quá trình lên men rượu vang khóm Tắc Cậu.

Chuẩn bị dịch khóm phối chế: khóm Tắc Cậu được ép lấy dịch bằng cách sử dụng máy ép trái cây. Phối chế dịch khóm (đường mía Biên Hoà) đến 24°Brix, điều chỉnh pH=4,5 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acid citric) [5] và tiến hành quá trình thanh trùng với NaHSO<sub>3</sub> với liều lượng 140 mg/l trong 2 giờ.

Dòng nấm men đã tuyển chọn được nuôi lactic trong môi trường YPD đến mật độ nấm men đạt 10<sup>6</sup> tế bào/ml.

Bổ trí thí nghiệm song song ống nghiệm chuông Durham và bình tam giác.

### 2.8. Thí nghiệm lên men trong ống nghiệm chứa chuông Durham

Lấy 9 ml dịch khóm cho vào một ống nghiệm có đặt chuông Durham, sau đó thêm 1 ml dịch nấm men đã nuôi lactic (mật độ nấm men 10<sup>6</sup> tế bào/ml). Vặn chặt nắp, lắc kỹ, sau đó ủ ở nhiệt độ 30°C. Quan sát và đo cột khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham ở những khoảng thời gian nhất định: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 và 36 giờ [6].

### 2.9. Thí nghiệm lên men trong bình tam giác

Nhằm xác định hàm lượng ethanol sinh ra và so sánh với chủng nấm men đối chứng *S. cerevisiae* AWRI796. Chủng 1 ml dịch nấm men phân lập (mật độ nấm men 10<sup>6</sup> tế bào/ml) và 99 ml dịch quả khóm phối chế vào bình tam giác 250 ml, lên men 10 ngày ở nhiệt độ 30°C. Xác định chỉ tiêu độ rượu (bằng phương pháp chưng cất), độ Brix sau khi lên men (bằng Brix kế).

Tuyển chọn được chủng nấm men có hoạt lực lên men tốt nhất dựa vào khả năng lên men nhanh và cho độ rượu cao nhất.

### 2.10. Chỉ tiêu theo dõi

Lượng CO<sub>2</sub> sinh ra trong một khoảng thời gian.

pH trước và sau khi lên men (bằng pH kế). Lượng đường trước và sau khi lên men (bằng chiết quang kế). Xác định nồng độ Ethanol sau khi lên men bằng phương pháp chưng cất.

Dòng nấm men cho độ rượu cao nhất và có cột khí CO<sub>2</sub> làm đầy ống chuông Durham nhanh nhất là dòng lên men mạnh nhất.

### 2.11. Định danh nấm men bằng phương pháp giải trình tự gen

Sử dụng phản ứng PCR và giải trình tự gen, dòng nấm men có hoạt lực lên men tốt nhất đã được lựa chọn để định danh với cặp mồi ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') [7]. Trình tự gen thu được sẽ được so sánh mức độ tương đồng với các trình tự của dòng nấm men trong cơ sở dữ liệu NCBI bằng phần mềm BLASTN thông qua chương trình Nucleotide Blast.

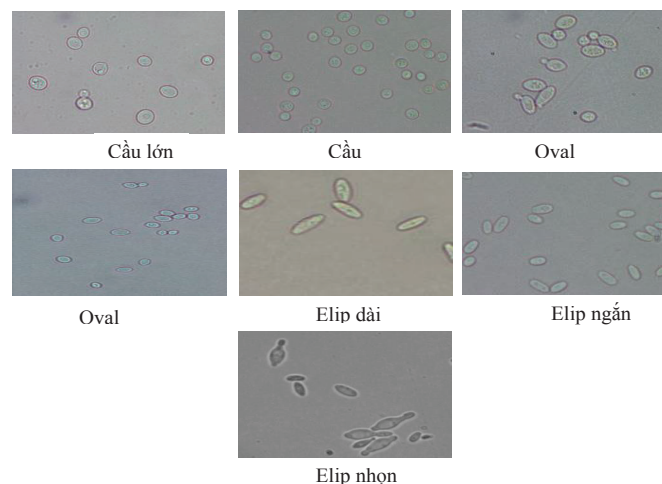
## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Phân lập nấm men và định danh sơ bộ các dòng nấm men tự nhiên từ dịch quả khóm

Kết quả phân lập được 34 dòng nấm men chia thành 7 nhóm hình dạng khác nhau: cầu lớn, cầu nhỏ, oval lớn, oval nhỏ, elip dài, elip ngắn, elip nhọn được thể hiện qua bảng 1.

**Bảng 1. Số lượng và hình dạng 34 dòng nấm men phân lập được.**

Địa điểm	Ký hiệu	Số dòng nấm men	Hình dạng tế bào nấm men						
			Cầu lớn	Cầu nhỏ	Oval lớn	Oval nhỏ	Elip dài	Elip ngắn	Elip nhọn
Châu Thành	TC	27	4	3	3	3	6	3	1
Vị Thanh	CD	7	1	0	0	2	1	3	0
Tân Phước	TP	5	1	1	0	1	0	0	2
Tổng		34	6	4	3	6	7	6	3



**Hình 1. Các nhóm hình dạng tế bào nấm men phân lập từ huyện Châu Thành.**

Từ kết quả bảng 1 cho thấy, các dòng nấm men cầu lớn, oval nhỏ đều có ở ba địa điểm thu mẫu. Tuy nhiên, màu sắc và kích thước khuẩn lạc có sự khác biệt giữa các địa điểm. Trong đó, địa điểm tại huyện Châu Thành có sự đa dạng về hình dạng và số lượng dòng nấm men (27 dòng nấm men). Mặt khác, ở mỗi địa điểm thu mẫu đều có những dòng nấm men có hình dạng đặc trưng riêng. Tại TP Vị Thanh, thu được dòng nấm men có hình dạng elip ngắn mà ở huyện Tân Phước không có. Tại huyện Tân Phước, phân lập được tế bào nấm men có hình elip nhọn nhiều nhất (2 dòng nấm men) trong các địa điểm (hình 1). Kết quả phân lập cho thấy, sự phân bố đa dạng của nấm men ở các vùng khác nhau. Kết luận phù hợp với nghiên cứu của N.X. Thành và cs (2005) [8] cho rằng nấm men phân bố rộng rãi khắp các nơi, nhất là hoa, vỏ quả, đất vườn, bề mặt của nhiều loại lá.

### 3.2. Đặc điểm nảy chồi của các dòng nấm men phân lập

Hai kiểu nảy chồi chính đã được xác định từ kết quả quan sát 34 dòng nấm men, đại diện cho 7 nhóm hình thái khác nhau: nảy chồi đa hướng và nảy chồi lưỡng cực. Bảng 2 trình bày kết quả cụ thể về kiểu nảy chồi của các nhóm.

### 3.3. Đặc điểm hình thành bào tử của các dòng nấm men phân lập

Sự hình thành bào tử của các dòng nấm men phân lập đã được quan sát trên môi trường thạch nước sau 6 tuần ủ ở nhiệt độ 30°C. Kết quả cho thấy 6 nhóm nấm men phân lập có khả năng hình thành bào tử, trong khi một nhóm không xuất hiện hiện tượng này, kết quả được trình bày trong bảng 2.

Các loài nấm men có thể được nhận diện dựa trên khả năng hình thành bào tử và hình thái bào tử của chúng, trong quá trình nuôi cấy nấm men chuyển đột ngột từ môi trường giàu sang môi trường nghèo dinh dưỡng, trong khi vẫn giữ nguyên độ âm tính tụ các hợp chất trung gian, đủ oxy của không khí thì tế bào sẽ sinh bào tử nằm trong các túi gọi là bào tử nang. Bào tử nang bền với các tác nhân bên ngoài như nhiệt độ cao, khô hạn nhưng kém bền hơn so với bào tử vi khuẩn [1].

### 3.4. Khả năng lên men đường glucose và saccharose

34 dòng nấm men phân lập được đánh giá khả năng lên men đường bằng cách nuôi cấy trên môi trường chứa glucose (2%) và saccharose (2%) sử dụng các ống nghiệm 10 ml có đặt chuông Durham [2] được trình bày trong bảng 2.

Kết quả cho thấy, hầu hết các dòng nấm men phân lập đều lên men được đường glucose và một số dòng nấm men không lên men được đường saccharose. Trong đó, 4 nhóm nấm men hình cầu nhỏ, cầu lớn, oval nhỏ, oval lớn đều có khả năng lên men được 2 loại đường glucose và saccharose. Ở nhóm nấm men hình elip ngắn và elip nhọn, lên men rất yếu hoặc không lên men được đường glucose và không lên men được saccharose. Ở nhóm nấm men elip dài có lên men đường glucose nhưng không lên men được đường saccharose. Đây là cơ sở để xây dựng phương pháp định danh các loài nấm men.

### 3.5. Khả năng phân giải urea

Sau 7 ngày quan sát, 7 dòng thuộc nhóm elip dài (TC1.2, TC1.4, TC2.4, TC4.4, TC4.5, TC5.3, CD1.4) và 6 dòng thuộc nhóm elip ngắn

**Bảng 2. Tổng hợp các đặc điểm hình thái và sinh lý, sinh hoá của 34 dòng nấm men.**

Dòng nấm men	Đặc điểm hình thái		Đặc điểm sinh lý, sinh hoá				Chi (nhận diện sơ bộ)
	Hình dạng	Nảy chồi	Bào tử	Lên men Glucose	Lên men Saccharose	Phân giải Urea	
TC1.1; TC3.1 TC6.2; CD1.1 TP1.2	Cầu lớn	Nhiều hướng	1-2	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
TC1.3; TC4.1 TC6.1; TP1.3	Cầu nhỏ	Nhiều hướng	1-2	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
TC2.1; TC2.2 TC6.3; CD1.2 CD2.1; TP2.1	Oval nhỏ	Nhiều hướng	1-2	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
TC3.1; TC3.4 TC4.2	Oval lớn	Nhiều hướng	1-2	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
TC2.4; TC4.5 TC1.2; TC1.4 TC4.4; TC5.3 CD1.4	Elip dài	Lượng cực	1-3	+	-	+	<i>Pichia</i>
TC4.3; TC5.1 TC5.2; CD1.3 CD2.2; CD2.3	Elip ngắn	Lượng cực	1-2	Lên men yếu hoặc không lên men	-	+	<i>Pichia</i>
TC3.2; TP1.1 TP2.2	Elip nhọn	Lượng cực	0	Lên men yếu hoặc không lên men	-	+	<i>Hanseniaspora</i>

\* (+) Có lên men/ phân giải; (-) Không lên men/phân giải.

(TC4.3, TC5.1, TC5.2, CD1.3, CD2.2, CD2.3) phân giải được urea (cụ thể màu môi trường Christensen chuyển từ màu vàng sang đỏ tím). Các dòng còn lại (nhóm cầu nhỏ, cầu lớn, oval nhỏ, oval lớn, elip nhọn) không có khả năng phân giải urea.

### 3.6. Tuyển chọn dòng nấm men có hoạt lực lên men cao nhất từ các dòng đã phân lập

Theo ghi nhận hình thái, nhận diện sơ bộ đến giống nấm men của Kurtzman và cs (1998) [2] và L.D. Pham (2009) [1], tiến hành định danh sơ bộ 34 dòng nấm men thu được dựa trên các khảo sát đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa (bảng 2).

Các dòng nấm men thuộc nhóm cầu lớn (TC1.1, TC3.1, TC6.2, CD1.1, TP1.2), cầu nhỏ (TC1.2, TC4.1, TC6.1, TP1.3), oval nhỏ (TC2.1, TC2.2, TC6.3, CD1.2, CD2.1, TP2.1), oval lớn (TC3.1, TC3.4, TC4.2) thuộc chi *Saccharomyces*.

Các dòng nấm men thuộc nhóm elip dài (TC1.2, TC1.4, TC2.4, TC4.4, TC4.5, TC5.3, CD1.4), elip ngắn (TC4.3, TC5.1, TC5.2, CD1.3, CD2.2, CD2.3), elip nhọn (TC3.2, TP1.1, TP2.2) thuộc chi *Pichia*.

Giống *Saccharomyces* quan trọng nhất là loài *Saccharomyces cerevisiae* được dùng nhiều trong công nghiệp thực phẩm như rượu, bia, rượu vang...[9]. Các giống *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida*... làm hồng rượu, đặc biệt là mất mùi rượu vang [1].

Như vậy, tại 3 địa điểm thu mẫu Châu Thành, Vị Thanh, Tân Phước đã phân lập được 34 dòng nấm men từ quả khóm. Kết quả định danh sơ bộ 34 dòng nấm men này thuộc 3 chi *Saccharomyces*, *Pichia* và *Hanseniaspora*. Tiếp tục lựa chọn 18 dòng nấm men thuộc chi *Saccharomyces* để thực hiện thí nghiệm tiếp theo. Thí nghiệm được tiến hành song song trong bình tam giác và trong ống Durham.

### 3.7. Hoạt tính lên men của các dòng nấm men trong chuông Durham

Kết quả đo cột khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham của 19 dòng nấm men cho thấy, thời gian đẩy khí CO<sub>2</sub> làm đầy cột khí trong ống Durham của các dòng nấm men khác nhau là khác nhau. Tại thời gian lên men 88 giờ, tất cả các dòng nấm men đã hoàn toàn làm đầy cột khí ống Durham. Bốn dòng TC2.1, TC3.1, TC4.2, CD1.2 có khả năng lên men mạnh, làm đầy cột khí ống Durham nhanh nhất tại thời điểm 8 giờ. Bên cạnh đó, 2 dòng TC6.3 và TP2.1 có thời gian kết thúc khá chậm (32 giờ). Thời gian làm đầy khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham là tiêu chí để xác định dòng nấm men có hoạt tính lên men mạnh nhất từ các dòng đã phân lập.

### 3.8. Hoạt tính lên men của các dòng nấm men trong bình tam giác

Tiềm năng chuyển hóa và hiệu suất lên men của nấm men được phản ánh qua lượng rượu được sinh ra sau quá trình lên men. Độ rượu càng cao chứng tỏ hoạt lực lên men của nấm men càng mạnh, do tạo ra lượng rượu etylic lớn [6].

**Bảng 3** Các chỉ tiêu pH, độ Brix và độ rượu sau khi lên men của 18 dòng nấm men.

STT	Dòng nấm men	pH	Độ Brix	Độ rượu (% v/v)
1	TC1.1	3,67	11,00 <sup>ghi</sup>	6,49 <sup>hi</sup>
2	TC1.3	3,98	7,67 <sup>cde</sup>	7,97 <sup>fg</sup>
3	TC2.1	4,07	6,00 <sup>ab</sup>	9,56 <sup>bcd</sup>
4	TC2.2	4,02	7,50 <sup>cde</sup>	8,23 <sup>efg</sup>
5	TC3.1	4,10	8,67 <sup>ef</sup>	9,64 <sup>bcd</sup>
6	TC3.3	4,05	7,67 <sup>cde</sup>	9,26 <sup>bcd</sup>
7	TC3.4	3,97	7,17 <sup>bcd</sup>	7,43 <sup>gh</sup>
8	TC4.1	3,99	7,50 <sup>cde</sup>	9,3 <sup>bcd</sup>
9	TC4.2	4,06	5,67 <sup>a</sup>	11,62 <sup>a</sup>
10	TC6.1	3,93	12,00 <sup>hij</sup>	6,71 <sup>hi</sup>
11	TC6.2	4,00	8,00 <sup>de</sup>	8,20 <sup>efg</sup>
12	TC6.3	3,70	10,67 <sup>gh</sup>	6,47 <sup>hi</sup>
13	CD1.1	4,03	6,50 <sup>abc</sup>	9,75 <sup>bc</sup>
14	CD1.2	4,06	6,33 <sup>abc</sup>	10,06 <sup>b</sup>
15	CD2.1	3,88	7,67 <sup>cde</sup>	8,78 <sup>def</sup>
16	TP1.2	3,76	12,50 <sup>j</sup>	5,71 <sup>i</sup>
17	TP1.3	3,76	12,33 <sup>ji</sup>	6,31 <sup>hi</sup>
18	TP2.1	3,97	7,17 <sup>bcd</sup>	8,20 <sup>efg</sup>
19	Đối chứng	3,62	9,67 <sup>fg</sup>	8,52 <sup>defg</sup>
CV (%)			27,01	19,55

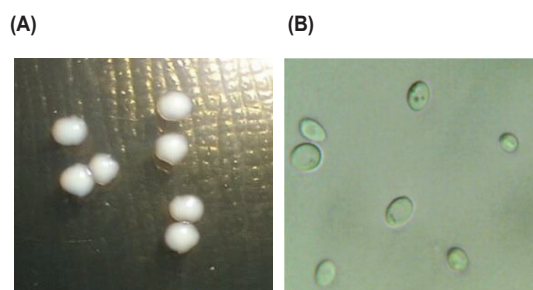
\*Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. a, b, c, d, e, f, g, h, i, j; Trong cùng một cột, các số có mang số mũ giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (p<0,05).

Kết quả bảng 3 cho thấy, trong 18 dòng nấm men lên men rượu vang khóm Tắc Cậu thì dòng nấm men TC4.2 cho độ rượu cao nhất (11,62%v/v) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các dòng nấm men còn lại. Theo A. Boondaeng và cs (2021) [10] nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dịch khóm đến các đặc tính của rượu khóm trong quá trình lên men bằng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Khảo sát ba nghiệm thức với tỷ lệ nước ép khóm:nước (1:1, 1:2 và 2:1) trong 10 ngày ở nhiệt độ 25°C đạt độ rượu cao nhất là 10,71% v/v ở tỷ lệ 2:1, tỷ lệ hỗn hợp 1:1 và 1:2 thu được độ rượu giá trị lần lượt là 9,61 và 8,35% v/v [10]. Theo N. Qi và cs (2017) [11] nghiên cứu khảo sát quy trình lên men rượu khóm ở nhiệt độ 20°C trong 7 ngày thu được độ rượu là 10,2% v/v và 5,4° độ Brix [11]. Qua so sánh các nghiên cứu có giá trị khoa học của quốc tế, cho thấy chủng nấm men TC4.2 cho độ rượu (11,62%v/v) cao hơn độ rượu của các nghiên cứu trên. Hơn nữa chủng nấm men TC4.2 còn cho độ rượu cao hơn các dòng nấm men chịu nhiệt theo nghiên cứu của H.X. Phong và cs (2017) [12] đã tiến hành tuyển chọn và định danh các chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu cồn, đồng thời khảo sát các điều kiện tối ưu cho quá trình lên men rượu vang khóm. Kết quả cho thấy, điều kiện lên men thích hợp nhất đối với dòng *S. cerevisiae* Y8 là ở nhiệt độ 37°C với thời gian lên men kéo dài 5 ngày, độ rượu đạt 10,03% v/v. Tuy nhiên, chủng nấm men TC4.2 cho độ rượu (11,62%v/v) thấp hơn so với nghiên cứu của N.V. Thành và cs (2013) [4] đã khảo sát ảnh hưởng của độ Brix, độ pH và mật số nấm men phân lập của dịch lên men đến chất lượng rượu vang khóm Cầu Đức, kết quả rượu vang khóm đạt độ rượu cao từ 15,3-

15,95% v/v và hàm lượng đường sót còn lại thấp. Sự khác biệt này có lẽ do nguyên liệu khóm Cầu Đức có thành phần dinh dưỡng cao hơn khóm Tắc Cậu nên chủng nấm men này hoạt động tốt hơn.

Sự thay đổi hàm lượng đường trong quá trình lên men cũng là một tiêu chí quan trọng để đánh giá khả năng lên men của các dòng nấm men [1]. Do hoạt tính sinh học, nấm men sử dụng đường trong dịch quả làm nguồn carbon, đường bị chuyển hóa theo phản ứng enzyme tạo ra sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men là rượu và CO<sub>2</sub>. Vì vậy sau khi lên men, độ Brix giảm so với ban đầu. Theo kết quả bảng 3, các dòng nấm men TC2.1, TC4.2, CD1.1, CD1.2 có độ Brix thấp tương ứng (5,67; 6,00; 6,33 và 6,50°), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với các dòng còn lại nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các dòng này với nhau. Độ rượu cao và hàm lượng đường sót thấp sau khi lên men là những chỉ số quan trọng, phản ánh khả năng chuyển hóa và hiệu suất lên men rượu vượt trội của nấm men [6].

Do đó, từ kết quả cho thấy dòng nấm men TC4.2 là dòng cho độ rượu cao nhất (11,62%v/v) trong 18 dòng đã khảo sát và độ Brix thấp nhất (5,67°) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Bên cạnh đó, theo khảo sát khả năng lên men trong ống Durham, dòng nấm men TC4.2 cũng là một trong các dòng có khả năng làm đầy cột khí trong ống Durham nhanh nhất (8 giờ). Kết quả là trong các dòng nấm men được phân lập, TC4.2 được chọn là dòng có khả năng lên men mạnh nhất (hình 2). Dòng TC4.2 được chọn để tiếp tục bố trí thí nghiệm và định danh sinh học phân tử đến mức độ loài.



**Hình 2.** Hình dạng khuẩn lạc (A) và hình dạng tế bào (B) của dòng nấm men TC4.2.

### 3.9. Định danh dòng nấm men TC4.2 bằng phương pháp giải trình tự

Dòng nấm men TC4.2 được định danh bằng sinh học phân tử và phân tích trình tự gen 28S rRNA. Trình tự gen được giải có kích thước 449 bp với trình tự nucleotide như sau:

```
GTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGA
AGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCGCGCTTAAGTG
CGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAA
ACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAAC
CGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGC
AACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAA
CAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAA
CAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAACACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTG
AATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCCCTT
```

Đoạn gen này được so sánh với các gen 28S rRNA của nấm men trong ngân hàng gen trên NCBI sử dụng công cụ BLASTN. Kết quả, đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men TC4.2 có độ tương đồng 100% so với trình tự gen 28S rRNA của *Saccharomyces cerevisiae*, số đăng ký trên GenBank là ON782648.1 (hình 3). Như vậy, kết quả định danh chứng tỏ rằng dòng nấm men TC4.2 là dòng *Saccharomyces cerevisiae*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Saccharomyces sp. AF145-1-1 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete s...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	771	LC361436.1
Saccharomyces cerevisiae isolate SDF5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	790	ON782648.1
Saccharomyces cerevisiae strain HB14561012 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	802	ON691717.1
Saccharomyces cerevisiae strain HB14561011 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	803	ON681716.1
Saccharomyces cerevisiae strain HB14561010 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	806	ON681715.1
Saccharomyces cerevisiae strain HB14561009 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	805	ON681714.1
Saccharomyces cerevisiae strain HB14561008 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	804	ON691713.1
Saccharomyces cerevisiae strain HB14561006 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	805	ON681711.1
Saccharomyces cerevisiae strain RFD-1106 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Saccharomyces	830	830	100%	0.0	100.00%	784	ON651687.1

Hình 3. So sánh trình tự gen 28S rRNA của dòng nấm men TC4.2 cho thấy tương đồng 100% với chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* ON782648.1.

Kết quả giải trình tự phù hợp với nghiên cứu phân lập và tuyển chọn nấm men lên men rượu vang dịch quả cóc chín (*Spondias dulcis* Forst.) của T.T.T. Hoa (2020) [13], dòng nấm men tuyển chọn được là MCN2 so sánh trình tự gen được kết quả tương đồng 98,74% với dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (số đăng ký KP998094.1). H.V. Kiet (2021) [14] nghiên cứu phân lập và tuyển chọn được dòng nấm men FBY015 lên men rượu vang măng cầu xiêm (*Annona murica* L.) so sánh trình tự tương đồng 99,37% với trình tự nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với số đăng ký KX434760.1. *Saccharomyces cerevisiae* là một trong những loài nấm men hữu dụng, chiếm 80% trong nước quả lên men, có khả năng tạo cồn lên tới 16°(v/v) [1]. Loài nấm men này được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp sản xuất rượu, không chỉ bởi khả năng lên men hiệu quả trên dịch quả hoặc môi trường chứa hàm lượng đường cao mà còn nhờ vào việc tạo ra các sản phẩm lên men với hương vị đặc trưng [15].

#### 4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 34 dòng nấm men từ các mẫu khóm tại 3 tỉnh Kiên Giang, Hậu Giang, Tiền Giang thuộc 7 nhóm hình dạng tế bào: cầu nhỏ, cầu lớn, oval lớn, oval nhỏ, elip ngắn, elip dài và elip nhọn. Kết quả nhận diện sơ bộ cho thấy 34 dòng nấm men thuộc 3 chi *Pichia*, *Hanseniaspora* và *Saccharomyces*.

Từ 18 dòng nấm men thuộc chi *Saccharomyces*, tuyển chọn được dòng nấm men TC4.2 có hoạt lực lên men mạnh nhất tạo ra độ rượu 11,62% v/v.

Nấm men TC4.2 được phân loại thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.D. Pham (2009), *Industrial Yeasts*, Science and Technics Publishing House, 331pp (in Vietnamese).
- [2] C.P. Kurtzman, J.W. Fell (1998), *The Yeast: A Taxonomic Study*, Elsevier Science, 1076pp.
- [3] N.D. Luong, P.T. Huyen, N.A. Tuyet (2006), *Biotechnological Experiments, Vol.2- Microbiological Experiments*, Ho Chi Minh National University Publishing House, 524pp (in Vietnamese).
- [4] N.L. Dung, D.X. Muou, N.P. Tien, et al. (1972), *Some Methods of Microbiological Research, Volume 1*, Science and Technics Publishing House, 428pp (in Vietnamese).
- [5] N.V. Thanh, N.M. Thuy, T.T. Que, et al. (2013), "Isolation, selection and identification of yeast in pineapple wine fermentation", *Journal of Biotechnology and Fishery*, **25**, pp.27-35 (in Vietnamese).
- [6] T.M. Tam (2000), *Applied Microbiology*, Ho Chi Minh City Agricultural Publishing House, 223pp (in Vietnamese).
- [7] M. Korabecna (2007), "The Variability in The fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): Its biological meaning and application in medical mycology, Communicating current", <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=2261725>, accessed 20 January 2022.
- [8] N.X. Thanh, N.B. Hien, V.T. Hoan (2005), *Industrial Microbiology Textbook*, Education Publishing House, 252pp (in Vietnamese).
- [9] H.T. Toan, H.N.T. Tam (2017), *Mycology Textbook I (Yeasts)*, Can Tho University Publishing House, 359pp (in Vietnamese).
- [10] A. Boondaeng, S. Kasemsumran, K. Ngowsuwan (2021), "Fermentation condition and quality evaluation of pineapple fruit wine", *Fermentation*, **8**(1), DOI: 10.3390/fermentation8010011.
- [11] Q. Ningli, L. Ma, L. Li, et al. (2017), *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 100pp.
- [12] H.X. Phong, D.M. Loi, N.N. Thanh, et al. (2017), "Selection of heat-resistant yeast and study of fermentation conditions for pineapple wine", *Journal of Agriculture, Fisheries and Biotechnology*, **51**, pp.7-15 (in Vietnamese).
- [13] T.T.T. Hoa (2020), *Isolation, Selection and Identification of Yeast in The Fermentation of Ambarella Wine*, Master's thesis in Biotechnology, Can Tho University (in Vietnamese).
- [14] H.V. Kiet (2021), *Selection and Application of Yeast Isolated from Soursop (Annona murica L.) for Wine Production*, Master's thesis in Biotechnology, Can Tho University (in Vietnamese).
- [15] C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, et al. (2011), "Chapter 7 - Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts", *The Yeasts* (Fifth Edition), Elsevier, DOI: 10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0.