

TUYỂN CHỌN NẤM MEN CHỊU NHIỆT VÀ ỨNG DỤNG LÊN MEN RƯỢU VANG TRÁI GIÁC (*Cayratia trifolia* L.) TỪ TỈNH HẬU GIANG

Đoàn Thị Kiều Tiên^{1,2}, Viên Thị Hải Yến¹, Huỳnh Xuân Phong^{1*}, Bùi Hoàng Đăng Long¹, Hà Thanh Toàn¹ và Ngô Thị Phương Dung¹

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Công nghệ Thực phẩm và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Xuân Phong (email: hxphong@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/10/2017

Ngày nhận bài sửa: 25/01/2018

Ngày duyệt đăng: 19/06/2018

Title:

Selection of thermotolerant yeasts and application in wine production from three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) in Hau Giang

Từ khóa:

Cayratia trifolia, khả năng chịu ethanol, nấm men chịu nhiệt, rượu vang trái giác, *Saccharomyces sp. HG1.3*

Keywords:

Cayratia trifolia, ethanol tolerance, *Saccharomyces sp. HG1.3*, thermotolerant yeasts, three-leaf cayratia wine

ABSTRACT

The aims of this study were to isolate and to select the potential thermotolerant ethanologenic yeasts for wine production from three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) at high temperature. Fifty yeast isolates were obtained from 16 three-leaf cayratia samples collected from 4 provinces in Mekong Delta region, including Can Tho, Hau Giang, Vinh Long, and Tien Giang. Based on the major classification keys about morphology, physiology, and biochemistry of yeasts, these isolated yeasts characterized belong to three genera of *Saccharomyces*, *Pichia*, and *Hanseniaspora*. By the screening tests of thermo- and ethanol tolerance, twenty-three yeast isolates were selected for their thermotolerant ability (37-43°C) and ethanol tolerant capacity (9-12% v/v). In the experiment of wine fermentation from three-leaf cayratia at 37°C, the isolate *Saccharomyces sp. HG1.3* was found to have the best fermentation ability with the ethanol concentration up to 9.9% (v/v).

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn chủng nấm men chịu nhiệt có khả năng lên men rượu vang trái giác (*Cayratia trifolia* L.). Kết quả phân lập được 50 chủng nấm men từ 16 nguồn trái giác thu thập ở 4 tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long và Tiền Giang thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Dựa vào các khóa phân loại của nấm men như hình thái, sinh lý và sinh hóa, các chủng nấm men phân lập được phân loại gồm 3 giống *Saccharomyces*, *Pichia* và *Hanseniaspora*. Kết quả thử nghiệm khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol đã sơ tuyển được 23 chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol lần lượt trong khoảng 37-43°C và 9-12% (v/v). Từ kết quả lên men dịch trái giác ở 37°C đã tuyển chọn được chủng *Saccharomyces sp. HG1.3* có khả năng lên men tốt nhất với hàm lượng ethanol đạt đến 9,9% (v/v).

Trích dẫn: Đoàn Thị Kiều Tiên, Viên Thị Hải Yến, Huỳnh Xuân Phong, Bùi Hoàng Đăng Long, Hà Thanh Toàn và Ngô Thị Phương Dung, 2018. Tuyển chọn nấm men chịu nhiệt và ứng dụng lên men rượu vang trái giác (*Cayratia trifolia* L.) từ tỉnh Hậu Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(4B): 64-71.

1 GIỚI THIỆU

Trái giác (*Cayratia trifolia* L.) là một loại gia vị đặc biệt trong các món ăn dân gian, bên cạnh đó trái giác còn vị thuốc có tác dụng tốt đối với sức khỏe con người. Trong trái giác có chứa các hợp chất như flavonoid, resveratrol, ... là những hợp chất có khả năng ngăn chặn quá trình oxy hóa (Kumar *et al.*, 2011). Dây giác có nhiều công dụng trong sử dụng làm thuốc dược liệu, trị liệu, thuốc thú y, ngoài ra còn có hoạt tính kháng siêu vi, hoạt tính trị ung thư, bảo vệ thần kinh. Các bộ phận dây giác có chứa dầu sáp màu vàng, steroid/terpenoid, flavonoid, tannin, stilbenes, hydrocyanic acid (Gupta và Shamar, 2007; Kumar *et al.*, 2011). Với khí hậu nhiệt đới gió mùa ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), đặc biệt là ở các tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long, Tiền Giang có đất phù sa ngọt, màu mỡ, phân bố dọc sông Hậu và sông Tiền, ít nhiễm phèn và nhiễm mặn nên thích hợp cho dây giác mọc hoang khắp nơi, dọc các hàng rào, cây bụi, mọc quanh những lùm cây ven sông rạch. Trong đó, trái giác mọc tự nhiên với sản lượng rất lớn ở các khu rừng trồng và rừng tự nhiên thuộc tỉnh Hậu Giang. Đây là nguồn nguyên liệu phong phú cho việc nghiên cứu và chế biến các loại rượu vang trái cây, vừa đa dạng hóa sản phẩm từ trái giác và tạo ra một sản phẩm lên men có lợi cho sức khỏe. Với hàm lượng chất khô của trái giác khoảng 4,0-6,5°Brix, đây cũng là nguồn nguyên liệu có thể được sử dụng để đa dạng hóa các nguồn phân lập nấm men bản địa.

Bản chất của rượu vang trái cây là sản phẩm được sản xuất từ nước dịch trái cây bằng phương pháp lên men với sự tham gia của các chủng nấm men để chuyển hóa đường thành ethanol trong điều kiện kỵ khí (Bùi Ái, 2005). Tuy nhiên, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của nấm men, đặc biệt là nhiệt độ lên men và hàm lượng ethanol trong dịch lên men. Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến quá trình lên men ethanol của nấm men (Banat *et al.*, 1992; Yuangsaard *et al.*, 2013). Nhiệt độ trái đất có xu hướng ngày càng tăng do quá trình biến đổi khí hậu và hiện tượng nóng lên toàn cầu. Do đó, việc sản xuất rượu vang bằng nấm men gặp nhiều khó khăn và thử thách. Chi phí dùng làm lạnh rất tốn kém nên việc chọn lọc các chủng nấm men chịu nhiệt có thể giúp giảm được chi phí này (Limtong *et al.*, 2007; Nonklang *et al.*, 2008). Ngoài ra, quá trình lên men ở nhiệt độ cao còn được ghi nhận với một số ưu điểm như: giảm lượng oxy hòa tan trong dịch lên men nên tạo điều kiện kỵ khí tốt hơn, hoạt động của enzyme tốt hơn và giảm thiểu sự phát triển của vi khuẩn tạp nhiễm (Roehr, 2001). Những chủng nấm men có khả năng phát triển và lên men ethanol

ở nhiệt độ cao, đồng thời kết hợp được đặc tính chịu được nồng độ ethanol cao rất có triển vọng cho việc sản xuất rượu vang.

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân lập và tuyển chọn nấm men từ trái giác có khả năng chịu nhiệt, chịu ethanol và lên men ethanol để ứng dụng trong lên men rượu vang trái giác.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên vật liệu và môi trường

Mười sáu mẫu trái giác được thu thập ở 4 tỉnh vùng ĐBSCL bao gồm Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long và Tiền Giang. Môi trường YPD agar (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L D-glucose và 15 g/L agar).

2.2 Phân lập nấm men

Quy trình phân lập: Trái giác chín → Ép lấy nước → Nuôi tăng sinh trong môi trường YPD ở nhiệt độ 28-30°C sau 24 giờ → Nuôi cấy khuẩn lạc trên môi trường YPD agar → Phân lập (tách rỗng và làm thuần) → Kiểm tra độ thuần dưới kính hiển vi → Trữ giống trên môi trường YPD agar ở 4°C và trong glycerol 50% (v/v) ở -20°C.

2.3 Xác định đặc điểm hình thái và sinh hóa của các chủng nấm men

Các chủng nấm men phân lập được phân loại sơ bộ đến mức độ giống dựa vào các đặc điểm như: hình dạng và kích thước tế bào nấm men, khả năng lên men đường saccharose, maltose và glucose, hoạt tính phân giải urea và gelatin (Kreger-van Rij, 1984; Kurtzman *et al.*, 2011).

2.4 Thử nghiệm khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men

Cấy các chủng nấm men phân lập được lên đĩa petri có chứa môi trường YPD agar. Ở các đĩa petri ở các nhiệt độ khác nhau: 30, 35, 37, 39, 40, 43, 45 và 47°C trong 48 giờ. Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc với đặc điểm đặc trưng (trung tự như khi phát triển ở 30°C) của các dòng nấm men trên môi trường thạch (Phong *et al.*, 2016; Techaparin *et al.*, 2017). Tuyển chọn những chủng nấm men có khả năng phát triển ở nhiệt độ 37°C.

2.5 Thử nghiệm khả năng chịu ethanol của các chủng nấm men

Cấy các chủng nấm men phân lập được lên đĩa petri có chứa môi trường YPD agar có bổ sung ethanol tinh khiết 0, 3, 6, 9, 12 và 15% (v/v) [ethanol 96%, Merck]. Ở các đĩa petri ở 37°C trong 48 giờ (Dung *et al.*, 2012; Phong *et al.*, 2016). Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc với đặc điểm đặc trưng (trung tự như khi phát triển ở 30°C) của các dòng nấm men trên môi trường thạch.

2.6 Khảo sát khả năng lên men ethanol của chủng nấm men tuyển chọn

Trái giắc được thu thập ở tỉnh Hậu Giang và được ép lấy dịch quả, 9 mL dịch trái giắc tự nhiên (pH 3,6 và 6,0°Brix) được lên men trong ống nghiệm 10 mL có ống Durham úp ngược. Để xác định khả năng lên men, dựa vào chiều cao cột khí sinh ra trong ống Durham ở 37°C, ghi nhận chiều cao cột khí CO₂ (mm) trong ống Durham sau 12, 18, 24 và 30 giờ lên men (Dung *et al.*, 2012). Tuyển chọn các chủng nấm men có hoạt tính lên men tốt để thử nghiệm khả năng ứng dụng trong lên men rượu vang trái giắc.

2.7 Thử nghiệm khả năng lên men rượu vang trái giắc

Nuôi cấy nấm men đã được sơ tuyển dựa trên khả năng lên men dịch trái giắc trong môi trường YPD lỏng đến khi mật số tế bào nấm men đạt 10⁸ tế bào/mL (xác định bằng phương pháp đếm trực







tiếp trên buồng đếm hồng cầu). Chủng 1 mL nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác chứa 99 mL dịch trái giắc thu thập từ tỉnh Hậu Giang, được điều chỉnh bằng đường saccharose về 22°Brix (pH 3,6). Dịch quả được thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/L) trong 2 giờ trước khi chủng nấm men, quá trình lên men được tiến hành trong 7 ngày với điều kiện kỵ khí (sử dụng water-lock) ở 37°C. Chưng cất và đo nồng độ ethanol, quy về nồng độ ethanol ở 20°C (Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng, 2005).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập nấm men

Từ 14 mẫu trái giắc thu ở các tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long và Tiền Giang đã phân lập được 50 chủng nấm men. Dựa vào đặc điểm của 50 chủng nấm men phân lập có thể xếp thành 6 nhóm có hình dạng đặc trưng như ở Bảng 1.

Bảng 1: Đặc điểm của các chủng nấm men phân lập được từ dịch quả trái giắc

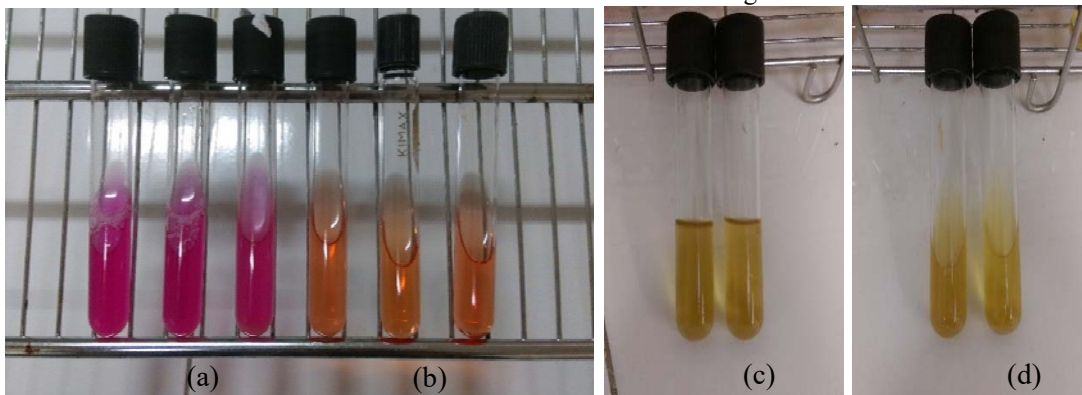
Nhóm tế bào	Chủng nấm men	Tế bào nấm men (độ phóng đại E400)	Đặc điểm tế bào
Nhóm 1: tế bào hình ovan nhỏ	CT1.1, CT1.2, CT1.3, CT2.3, CT3.1, CT4.2, HG1.2, HG2.1, VL4.2, TG2.2, TG4.3, TG4.4		Tế bào hình ovan nhỏ, nang bào tử hình trứng
Nhóm 2: tế bào hình ovan lớn	CT2.1, CT2.2, CT4.4, HG3.1, HG3.3, VL2.2, VL4.4, TG1.2, TG2.3, TG4.2		Tế bào hình ovan lớn, nảy chồi một hướng, bào tử hình cầu
Nhóm 3: tế bào hình cầu nhỏ	CT3.2, CT4.5, HG1.1, HG1.3, HG4.3, VL3.3, TG1.1, TG3.1		Tế bào hình cầu nhỏ, bào tử hình trứng
Nhóm 4: tế bào hình cầu lớn	CT3.3, CT4.1, HG4.4, VL1.2, VL3.1		Tế bào hình cầu lớn, nảy chồi một hướng, nang bào tử hình cầu
Nhóm 5: tế bào hình elip ngắn	CT4.3, HG3.2, HG4.1, VL2.1, VL4.3, TG2.1, TG4.1		Tế bào hình elip ngắn, nảy chồi một hướng, bào tử hình cầu
Nhóm 6: tế bào hình elip dài	HG2.2, HG4.2, HG4.5, VL1.1, VL1.3, VL3.2, VL4.1, TG3.2		Tế bào hình ovan lớn, nảy chồi nhiều hướng, bào tử hình cầu

Ghi chú: CT: Cần Thơ, HG: Hậu Giang, TG: Tiền Giang, VL: Vĩnh Long

3.2 Đặc điểm sinh hóa của các chủng nấm men

Tất cả 50 chủng nấm men phân lập được đều có khả năng lên men đường glucose, trong đó chỉ có 10 chủng không có khả năng lên men saccharose và 11 chủng không có khả năng lên men maltose. Một số chủng không có khả năng lên men đường maltose hoặc saccharose do maltose và saccharose là disaccharide, nên trước khi hấp thụ, nấm men phải sử dụng enzyme đặc hiệu để thủy phân đường này thành đường đơn (maltose được phân hủy

thành glucose bởi enzyme maltase và saccharose phân hủy thành glucose và fructose nhờ enzyme invertase), sau đó mới được vận chuyển vào tế bào, tuy nhiên có thể có một số chủng nấm men không thể tổng hợp các enzyme này trong quá trình lên men. Theo Lương Đức Phẩm (2006), tùy vào đặc tính của từng loại nấm men mà chúng có thể sử dụng các loại đường khác nhau cho quá trình sinh trưởng và lên men, hầu hết nấm men đều sử dụng glucose là nguồn carbon cơ bản, tuy nhiên một số chủng nấm men lại có thể sử dụng trực tiếp đường disaccharide làm nguồn carbon.



Hình 1: Kết quả thử nghiệm hoạt tính urease (a, dương tính và b, âm tính) và gelatinase (c, âm tính và d, dương tính)

Tổng cộng có 9 chủng nấm men có hoạt tính urease, các chủng này chủ yếu thuộc nhóm tế bào hình elip (VL4.2, HG3.1, VL2.2, CT4.1, HG4.1, TG4.1, VL1.1, VL3.2 và TG3.2) và 20 chủng có hoạt tính gelatinase trong tổng số 50 chủng phân lập (Hình 1). Dựa vào khóa phân loại của Kreger-

van Rij (1984), mô tả phân loại sơ bộ đến giống của Kurtzman *et al.* (2011), 50 chủng phân lập có thể được phân loại sơ bộ thuộc 3 giống *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia* như tổng hợp ở Bảng 2.

Bảng 2: Bảng tổng hợp đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa các chủng nấm men

Chủng nấm men	Đặc điểm hình thái			Đặc điểm sinh lý, sinh hóa					Giống (phân loại sơ bộ)
	Hình dạng	Hình thức nảy chồi	Hình dạng bào tử	Khả năng lên men đường			Phân giải urea	Phân giải gelatine	
				Saccharose	Maltose	Glucose			
CT1.1, TG2.2	Ovan nhỏ	Một hướng	Hình trứng	-	+	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
TG4.2	Ovan lớn	Một hướng	Hình cầu	-	+	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
CT3.3	Cầu lớn	Một hướng	Hình cầu	-	+	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
CT1.2, CT4.2	Ovan nhỏ	Một hướng	Hình trứng	-	+	+	-	+	<i>Hanseniaspora</i>
HG4.2	Elip dài	Nhiều hướng	Hình cầu	-	-	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
TG1.1	Cầu nhỏ	Một hướng	Hình cầu	-	-	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
TG4.1	Elip ngắn	Một hướng	Hình cầu	-	-	-	+	-	<i>Hanseniaspora</i>

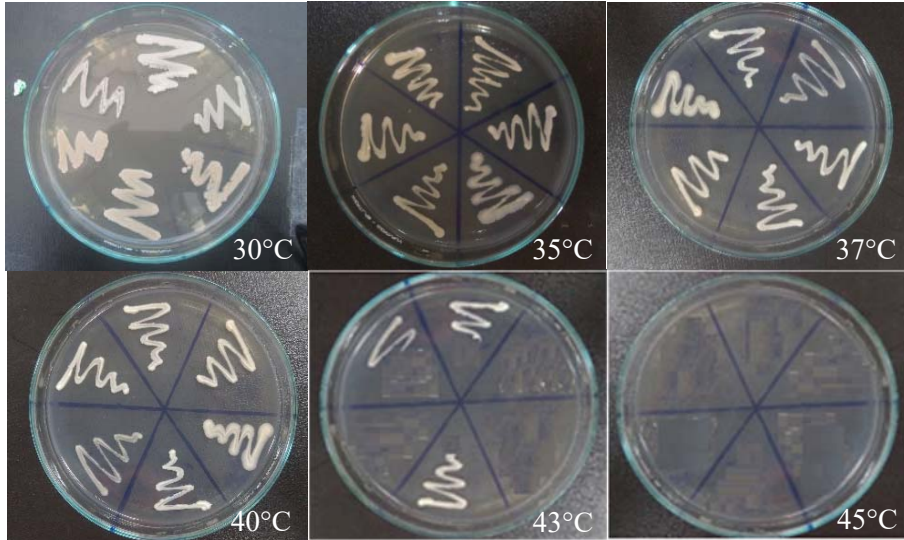
Chủng nấm men	Đặc điểm hình thái			Đặc điểm sinh lý, sinh hóa					Giống (phân loại sơ bộ)
	Hình dạng	Hình thức nảy chồi	Hình dạng bào tử	Khả năng lên men đường			Phân giải urea	Phân giải gelatine	
				Saccharose	Maltose	Glucose			
TG4.2	Ovan nhỏ	Một hướng	Hình trứng	-	+	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
VL4.2	Ovan nhỏ	Một hướng	Hình trứng	+	-	+	+	-	<i>Pichia</i>
VL2.2	Ovan lớn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	+	+	<i>Pichia</i>
CT4.1	Ovan lớn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	+	+	<i>Pichia</i>
HG3.1	Ovan lớn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	+	-	<i>Pichia</i>
TG3.2	Elip dài	Nhiều hướng	Hình cầu	+	+	+	+	-	<i>Pichia</i>
VL1.1, VL3.2	Elip dài	Nhiều hướng	Hình cầu	+	-	+	+	-	<i>Pichia</i>
HG4.1	Elip ngắn	Một hướng	Hình cầu	-	+	+	+	-	<i>Pichia</i>
CT1.3, CT2.3, CT3.1, HG1.2, TG4.4	Ovan nhỏ	Một hướng	Hình trứng	+	+	+	-	+	<i>Saccharomyces</i>
CT2.1, CT2.2, CT4.4, HG3.3, TG2.3	Ovan lớn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	-	+	<i>Saccharomyces</i>
CT3.2, HG4.3	Cầu nhỏ	Một hướng	Hình trứng	+	+	+	-	+	<i>Saccharomyces</i>
VL1.2	Cầu lớn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	-	+	<i>Saccharomyces</i>
HG3.2	Elip ngắn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	-	+	<i>Saccharomyces</i>
HG2.2, VL1.3	Elip dài	Nhiều hướng	Hình cầu	+	+	+	-	+	<i>Saccharomyces</i>
HG2.1, TG4.3	Ovan nhỏ	Một hướng	Hình trứng	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
VL4.4, TG1.2	Ovan lớn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
CT4.5, HG1.3, TG3.1	Cầu nhỏ	Một hướng	Hình trứng	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
VL3.1, HG4.4	Cầu lớn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
CT4.3, VL4.3, VL2.1	Elip ngắn	Một hướng	Hình cầu	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
HG4.5, TG2.1	Elip dài	Nhiều hướng	Hình cầu	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
VL3.3, VL4.1	Cầu nhỏ	Một hướng	Hình trứng	+	-	+	-	+	<i>Saccharomyces</i>

Ghi chú: “-”, âm tính và “+” dương tính.

3.3 Khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men

Sau 48 giờ cấy nấm men trên môi trường YPD agar, tất cả các chủng nấm men đều phát triển ở khoảng nhiệt độ 30-35°C (Hình 2). Ở nhiệt độ 37°C, có 47 chủng phát triển và ở mức 43°C chỉ quan sát được sự phát triển của 3 chủng nấm men HG4.5, VL1.1 và TG2.3. Không có chủng nấm men nào phát triển ở 45-47°C sau 48 giờ ủ. Điều

này chứng tỏ nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các dòng nấm men. Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố, khi nhiệt độ tăng cao làm ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng và lên men của nấm men (Nuanpeng *et al.*, 2016; Phong *et al.*, 2016). Đề tuyển chọn nấm men chịu nhiệt, 47 chủng nấm men phát triển ở mức 37-43°C được sử dụng để tiếp tục thử nghiệm khả năng chịu ethanol.

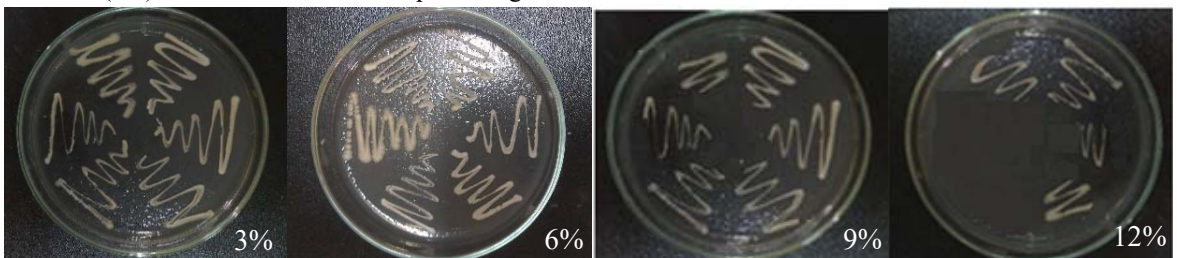


Hình 2: Khuẩn lạc nấm men phát triển ở các nhiệt độ khác nhau

3.4 Khả năng chịu ethanol của các chủng nấm men

Sau 48 giờ cấy nấm men trong môi trường dinh dưỡng YPD agar, tất cả 47 chủng nấm men đều phát triển trong môi trường có bổ sung đến 6% (v/v) ethanol. Ở mức 9% ethanol, có 23 chủng phát triển được và chỉ 10 chủng nấm men phát triển ở mức 12% (v/v) ethanol (Hình 3). Tuy nhiên, không có chủng nấm men nào phát triển ở 15% (v/v) ethanol sau 48 giờ ủ. Nhìn chung, các chủng nấm men này có khả năng chịu ethanol tương đối cao, đến 9% (v/v) ethanol ở 37°C. Kết quả tương tự

cũng được ghi nhận từ một số công bố về khả năng chịu ethanol của nấm men chịu nhiệt (Dung *et al.*, 2012; Nguyễn Hữu Tường *et al.*, 2013; Techaparin *et al.*, 2017). Khả năng chịu ethanol của nấm men được xem là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng ứng dụng của các chủng nấm men trong thực tế sản xuất. Từ kết quả thử nghiệm này đã tuyển chọn được 23 chủng nấm men có khả năng phát triển trên môi trường YPD bổ sung 9-12% (v/v) ethanol. Các chủng này được sử dụng để đánh giá khả năng lên men ethanol từ dịch trái giấm.



Hình 3: Khuẩn lạc nấm men trên môi trường YPD ở các nồng độ ethanol (% v/v)

3.5 Khả năng lên men ethanol của các chủng nấm men

Chiều cao cột khí trong ống Durham ở Bảng 3 cho thấy cường độ lên men của các chủng nấm men ở từng thời điểm lên men là khác nhau. Kết quả cho thấy 22 chủng nấm men có khả năng lên men dịch trái giắc và chỉ có duy nhất một chủng (HG4.2) không có khả năng lên men dịch trái giắc. Chiều cao của cột khí tăng liên tục, đến thời điểm 24 giờ thì hầu hết các chủng nấm men có cột khí chiếm đầy ống (30 mm).

Bảng 3: Chiều cao trung bình của cột khí Durham (mm)

STT	Chủng nấm men	Lên men dịch trái giắc (mm cột khí)			
		12 giờ	18 giờ	24 giờ	30 giờ
1	CT1.1	13,3	25,0	30,0	30,0
2	CT1.2	17,3	25,3	30,0	30,0
3	CT1.3	26,6	30,0	30,0	30,0
4	CT 2.3	18,3	30,0	30,0	30,0
5	CT 3.2	30,0	30,0	30,0	30,0
6	CT 3.3	23,3	30,0	30,0	30,0
7	CT 4.2	5,7	11,7	30,0	30,0
8	HG1.2	17,7	28,3	30,0	30,0
9	HG1.3	28,7	30,0	30,0	30,0
10	HG 2.1	3,7	14,3	25,7	30,0
11	HG 3.3	24,0	30,0	30,0	30,0
12	HG 4.2	0,0	0,0	0,0	0,0
13	HG 4.3	4,3	10,7	26,0	30,0
14	HG 4.5	6,7	21,7	30,0	30,0
15	VL 1.1	3,7	13,3	24,0	30,0
16	VL 3.2	8,3	16,0	26,0	30,0
17	VL 3.3	8,0	16,7	29,3	30,0
18	VL 4.1	4,7	21,7	30,0	30,0
19	TG 1.1	11,7	30,0	30,0	30,0
20	TG 1.2	18,3	30,0	30,0	30,0
21	TG 3.1	17,7	26,7	30,0	30,0
22	TG 4.2	3,3	15,0	23,3	30,0
23	TG 4.3	1,7	14,0	23,3	30,0

Ghi chú: Chiều cao tối đa của cột khí trong ống Durham là 30 mm. Giá trị ghi trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại

3.6 Khả năng lên men rượu vang trái giắc sử dụng nấm men chịu nhiệt

Khả năng lên men được khảo sát với mật số nấm men ban đầu trong dịch lên men là 10⁶ tế bào/mL, thời gian ủ là 7 ngày ở 37°C; pH tự nhiên của dịch ép là 3,6 và điều chỉnh về 22°Brix bằng cách bổ sung đường saccharose. Sau lên men, pH và độ Brix ở các nghiệm thức đều giảm so với pH và độ Brix ban đầu (Bảng 4). Trong quá trình lên men, nấm men sử dụng đường làm nguồn carbon nên làm Brix giảm và sự hình thành các acid hữu

cơ làm pH dịch lên men giảm (Lê Ngọc Tú *et al.*, 2005). Độ rượu là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng lên men rượu của các chủng nấm men. Kết quả thống kê ở Bảng 5 cho thấy trong 22 chủng nấm men lên men rượu vang trái giắc, hàm lượng ethanol trung bình sau lên men trong khoảng 4,1-9,9% (v/v), trong đó hàm lượng ethanol đạt cao nhất với chủng *Saccharomyces* sp. HG1.3 (9,9% v/v).

Bảng 4: Kết quả khảo sát khả năng lên men của các chủng nấm men

STT	Chủng nấm men	°Brix sau lên men	pH sau lên men	Độ rượu (% ở 20°C)
1	CT1.1	14	3,41	8,1 ^b
2	CT1.2	15	3,39	5,8 ^f
3	CT1.3	14	3,42	6,4 ^c
4	CT 2.3	13	3,39	6,4 ^c
5	CT 3.2	15	3,55	5,4 ^g
6	CT 3.3	14	3,42	4,4 ⁱ
7	CT 4.2	13	3,47	8,2 ^b
8	HG1.2	15	3,38	4,3 ^{ij}
9	HG1.3	12	3,51	9,9 ^a
10	HG 2.1	14	3,48	6,1 ^d
11	HG 3.3	13	3,46	6,0 ^{de}
12	HG 4.3	15	3,47	4,1 ^k
13	HG 4.5	14	3,52	4,1 ^k
14	VL 1.1	14	3,46	6,0 ^{de}
15	VL 3.2	16	3,45	5,2 ^h
16	VL 3.3	16	3,41	4,1 ^k
17	VL 4.1	14	3,48	4,2 ^{jk}
18	TG 1.1	14	3,52	6,4 ^c
19	TG 1.2	15	3,36	5,9 ^{ef}
20	TG 3.1	14	3,52	6,4 ^c
21	TG 4.2	12	3,32	6,0 ^{de}
22	TG 4.3	15	3,55	5,8 ^f

Ghi chú: Giá trị ghi trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trung bình có chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%

Từ kết quả đo chiều cao cột khí CO₂ trong ống Durham ở dịch trái giắc, chủng *Saccharomyces* sp. CT3.2 có thời gian làm đầy cột khí trong ống Durham nhanh (sau 12 giờ) nhưng nồng độ rượu sau lên men không cao (5,4% v/v). Ngược lại, chủng *Saccharomyces* sp. HG1.3 có thời gian làm đầy cột khí chậm hơn (sau 18 giờ) nhưng kết quả cho hàm lượng ethanol cao nhất (9,9% v/v). Có thể lý giải do thời gian thí nghiệm trong ống Durham ngắn, các chủng nấm men ban đầu lên men nhanh tạo ra lượng CO₂ nhiều, tuy nhiên chiều cao ống Durham tối đa chỉ có 30 mm nên không thể đánh giá chính xác được khả năng lên men của các chủng nấm men khi trung bình chiều cao cột khí

khi đã đạt mức tối đa. Do đó, khi tiến hành lên men trong bình tam giác, các chủng nấm men có thời gian lên men dài hơn, giúp cho việc đánh giá chủng nấm men có hoạt tính lên men tốt một cách chính xác hơn. Vì vậy, trong thí nghiệm này, chủng *Saccharomyces* sp. HG1.3 có hàm lượng ethanol sinh ra cao nhất (9,9% v/v) được chọn là chủng nấm men có tiềm năng lên men tốt so với các chủng còn lại.

4 KẾT LUẬN

Từ 16 nguồn trái giác thu ở các tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long và Tiền Giang đã phân lập được 50 chủng nấm men thuần chủng. Dựa trên mô tả các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh lý bước đầu đã xác định được 3 giống nấm men là *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia*. Kết quả thử nghiệm khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol đã sơ tuyển được 23 chủng nấm men chịu nhiệt trong khoảng 37-43°C và chịu ethanol ở mức 9-12% (v/v). Từ kết quả lên men rượu vang trái giác từ tỉnh Hậu Giang ở 37°C đã tuyển chọn được chủng *Saccharomyces* sp. HG1.3 có khả năng lên men tốt nhất với nồng độ ethanol đạt 9,9% (v/v).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Banat, I.M., Nigam, P., and Merchant, R., 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8(3): 259-263.

Bùi Ái, 2005. Công nghệ lên men ứng dụng trong Công nghệ thực phẩm. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 234 trang.

Dung, N. T. P., Thanonkeo, P., and Phong, H. X., 2012. Screening useful isolated yeasts for ethanol fermentation at high temperature. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2(4): 65-71.

Gupta, A.K., and Shamar, M., 2007. Review on Indian medical plants. New Delhi: Indian Council of Medical Research, 7: 879-882.

Kreger, van Rij, N.J.W., 1984. *The Yeast, A Taxonomic Study*, 3rd ed., Elsevier, Amsterdam, 2071 pages.

Kumar, D., Kumar, S., Gupta, J., Arya, R., and Gupta, A., 2011. A review on chemical and biological properties of *Cayratia trifolia* Linn. (Vitaceae). *Pharmacognosy Reviews*. 5(10): 184-188.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., and Robert, V., 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5th ed., Vol. 1, pp. 87-110). San Diego: Elsevier B.V.

Lê Ngọc Tú, Lê Văn Chứ, Đặng Thị Thu, Phạm Quốc Thăng, Nguyễn Thị Thịnh, Bùi Đức Hợi, Lưu Duẩn, Lê Doãn Diên, 2005. *Hóa sinh Công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, 389 trang.

Limtong, S., Sringiew, C., and Yongmanitchai, W., 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*. 98(17): 3367-3374.

Lương Đức Phẩm. 2006. *Nấm men công nghiệp*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 331 trang.

Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng, 2005. *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 281 trang.

Nguyễn Hữu Tường, Phạm Hồng Quang, Ngô Thị Phương Dung, Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Minh Đồi, 2013. Thử nghiệm lên men ethanol ở nhiệt độ cao bằng nấm men chịu nhiệt. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 27: 16-23 .

Nonklang, S., Abdel-Banat, B.M.A., Cha-aim, K., Moonjai, N., Hoshida, H., Limtong, S., Yamada, M., and Akada, R., 2008. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(24): 7514-7521.

Nuanpeng, S., Thanonkeo, S., Yamada, M., and Thanonkeo, P., 2016. Ethanol production from sweet sorghum juice at high temperatures using a newly isolated thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y-53. *Energies*. 9(4): 253.

Phong, H.X., Giang, N.T.C., Nitiyon, S., Yamada, M., Thanonkeo, P., and Dung, N.T.P., 2016. Ethanol production from molasses at high temperature by thermotolerant yeasts isolated from cocoa. *Can Tho University Journal of Science*. 3: 32-37.

Roehr, M., 2001. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. Federal Republic of Germany, 232 pages.

Techaparin, A., Thanonkeo, P., and Klanrit, P., 2017. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(3): 461-475.

Yuangsaard, N., Yongmanitchai, W., Yamada, M., and Limtong, S., 2013. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(3): 577-588.