

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN NẤM MEN CHỊU NHIỆT LÊN MEN ETHANOL TỪ NGUỒN NGUYÊN LIỆU NÔNG NGHIỆP

ISOLATION AND SELECTION OF THERMO-TOLERANT YEASTS FOR ETHANOL FERMENTATION FROM AGRICULTURAL MATERIAL

Nguyễn Thị Pha Ly*, Võ Duy Hoàng, Hà Huỳnh Hồng Vũ

Trường Đại học Đồng Tháp, Đồng Tháp, Việt Nam¹

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: ntply@dthu.edu.vn

(Nhận bài / Received: 23/8/2023; Sửa bài / Revised: 19/12/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 15/01/2024)

Tóm tắt - Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn một số dòng nấm men có khả năng lên men ethanol và chịu được nhiệt độ cao. Trong nghiên cứu này, tổng cộng có 27 dòng nấm men được phân lập từ các nguồn nguyên liệu như trái cây chín, mùn cưa, bã mía, ri đường, hoa cây ăn quả và mật ong. Tuyển chọn được 14 dòng nấm men có khả năng lên men tốt trong dung dịch đường glucose (2,0% w/v). Trong thử nghiệm lên men ethanol từ dung dịch đường glucose (18,5% w/v), ba dòng MC1, MC2 và BM1 có khả năng lên men mạnh với nồng độ ethanol cao nhất đạt 11,0% (v/v). Trong đó, 2 dòng MC1 và BM1 có thể phát triển ở 40°C và có khả năng lên men glucose, sucrose và galactose. Dựa vào đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý, sinh hóa và giải trình tự vùng D1/D2 trên 26S rDNA, dòng nấm men MC1 và BM1 được tuyển chọn định danh với kết quả là *Saccharomyces cerevisiae* và *Torulasporea globosa*.

Từ khóa - Lên men ethanol; nấm men chịu nhiệt; nấm men phân lập; phụ phẩm nông nghiệp

1. Giới thiệu

Ngày nay, thế giới phụ thuộc quá nhiều vào dầu mỏ và giá dầu biến động liên tục theo chiều tăng và sự cạn kiệt dần nguồn năng lượng hoá thạch và khí đốt dẫn đến việc tìm kiếm các nguồn năng lượng thay thế là việc làm có tính sống còn, trong đó có năng lượng sinh học [1]. Năng lượng sinh học bao gồm các nguồn năng lượng được sản xuất từ các sản phẩm dư thừa khi chế biến nông nghiệp, nước thải, bã phế thải hữu cơ công nghiệp, rác thải [2]. Các dạng năng lượng sinh học chủ yếu là ethanol sinh học và diesel sinh học. Ethanol khi cháy không gây độc hại, giảm lượng CO₂ và giảm lượng khí gây hiệu ứng nhà kính khác [3]. Đại dịch SARCOV-2 (COVID-19) đã dẫn đến gia tăng nhu cầu ethanol trong lĩnh vực y tế và sản xuất dung dịch kháng khuẩn trong cuộc chiến chống đại dịch toàn cầu [4].

Nấm men chịu nhiệt có nhiều tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp làm bánh, bia rượu, đồ uống và công nghệ lên men. Hơn nữa, những dòng nấm men này đáp ứng được nhu cầu cấp thiết trong tình trạng nóng dần lên của trái đất trong tương lai gần. Lên men ở nhiệt độ cao giúp gia tăng tốc độ phản ứng, giảm sự tiêu thụ năng lượng bởi giảm quá trình làm mát thùng lên men và giúp giảm thiểu hàm lượng khí oxy trong thùng này tạo môi trường yếm khí hơn nên quá trình lên men được hiệu quả [5, 6]. Do đó, những vi sinh vật này có ý nghĩa quan trọng đối với các nước nhiệt đới nơi mà phải tốn nhiều chi phí cho hệ thống làm mát [7]. Mục tiêu nghiên cứu là phân

Abstract - This study was carried out to select the yeast strains for ethanol fermentation and thermal tolerance. As a result, 27 yeast strains were isolated from different material resources of ripe fruits, sawdust, bagasse from sugarcane, molasses, fruit tree flowers, and honey. In the fermentation testing, 14 isolated strains performed the rapid fermentation rate in a glucose solution (2.0% w/v). The results of ethanol fermentation from a glucose solution (18.5% w/v) showed that three strains MC1, MC2, and BM1 gave a significantly high fermentative capacity with the highest ethanol content that could reach up to 11.0% (v/v). Two strains MC1 and BM1 could grow well at 40°C and ferment from glucose, sucrose, and galactose. Based on the characteristics of morphology, physiology, biochemistry, and the 26S rDNA gene D1/D2 region sequencing analyses, the selected yeast strains (MC1 and BM1) were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea globosa*, respectively.

Key words - Ethanol fermentation; thermo-tolerant yeast; yeast isolates; agricultural waste

lập và tuyển chọn một số dòng nấm men có khả năng lên men ethanol và chịu được nhiệt độ cao.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phân lập nấm men

Thu thập mẫu trái cây chín (chuối, táo, nho, xoài), mùn cưa, bã mía, ri đường, hoa cây ăn quả (xoài, mận, táo, nhãn) và mật ong ở tỉnh Sóc Trăng, tỉnh Hậu Giang và Thành phố Cần Thơ. Các mẫu được bảo quản trong túi thanh trùng và chuyển về phòng thí nghiệm.

Lấy 2 g mẫu cho vào ống nghiệm chứa 20 mL môi trường yeast extract peptone dextrose (YPD). Môi trường YPD gồm 1% yeast extract, 2% peptone và 2% dextrose (glucose), khử trùng ở 121°C trong 15 phút, bổ sung 3% tetracycline với nồng độ 0,2 mg/mL. Dùng micropipette lấy 0,1 mL từ các ống nghiệm đã pha loãng cho vào đĩa petri có chứa môi trường yeast extract peptone dextrose agar (YPDA) [8], đã khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Cấy trải mẫu, ủ 48 giờ ở 30°C, sau đó cấy chuyển trên môi trường YPDA. Tiếp tục cấy chuyển nhiều lần cho đến khi thu được các dòng thuần. Quan sát dưới kính hiển vi (X100) để xác định độ đồng nhất của tế bào. Trữ mẫu ở 4°C trong ống thạch nghiêng.

2.2. Khảo sát khả năng lên men đường glucose

Với các dòng đã phân lập từ thí nghiệm 1, nuôi sinh khối nấm men trong môi trường YPD đã khử trùng ở 121°C

¹ Dong Thap University, Dongthap, Vietnam (Nguyen Thi Pha Ly, Vo Duy Hoang, Ha Huynh Hong Vu)

trong 15 phút, ủ 24 giờ ở 30°C. Tiến hành lấy 1 mL dung dịch sinh khối cho vào chai Durham có chứa 9 mL dung dịch glucose 2% (w/v) đã được khử trùng ở 115°C trong 10 phút [9]. Lắc thật đều để dung dịch đường tràn đầy vào ống thủy tinh úp ngược nằm bên trong chai Durham, ủ ở 30°C. Đo chiều cao cột khí CO₂ sinh ra trong ống thủy tinh úp ngược tại các thời điểm 12, 24, 36, 48 giờ.

Sau khi sơ tuyển các dòng có khả năng lên men nhanh và mạnh bằng phương pháp đo chiều cao cột khí CO₂. Tiến hành khảo sát khả năng lên men ethanol trên môi trường MF7 gồm 18,5% glucose, 0,65% (NH₄)₂SO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,06% MgSO₄·7H₂O, 0,01% CaCl₂·2H₂O, 0,4% yeast extract và 0,4% peptone, của các dòng nấm men đã sơ tuyển bằng cách chủng 1 mL dịch nấm men (đạt mật số 10⁸ tế bào/mL) vào 99 mL môi trường MF7 (khử trùng ở 115°C, 15 phút), ủ 120 giờ ở 30°C [10, 11]. Nồng độ ethanol được xác định bằng cồn kế (Amarell, Đức) ở 20°C.

2.3. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của nấm men được tuyển chọn

Cấy zigzag các dòng nấm men đã sơ tuyển trên các đĩa petri chứa môi trường YPDA. Ủ các đĩa petri ở các nhiệt độ khác nhau 30, 35, 40, 45 và 50°C. Theo dõi khả năng phát triển thành khuẩn lạc của các dòng nấm men sau 72 giờ trên bề mặt môi trường [12].

2.4. Đánh giá khả năng lên men các loại đường

Nuôi sinh khối các dòng nấm men có khả năng lên men mạnh và phát triển ở nhiệt độ cao trong môi trường YPD. Thực hiện phương pháp lên men trong chai Durham với 6 loại đường glucose, sucrose, lactose, galactose, arabinose và xylose [13]. Kết quả dương tính khi có khí CO₂ trong ống thủy tinh úp ngược sau 48 giờ ở 30°C.

2.5. Khảo sát đặc tính sinh lý và sinh hóa của nấm men

Xác định sự tạo bào tử, tạo màng trên môi trường dịch thể, hình thành hợp chất giống tinh bột, hoạt tính urease và thủy phân gelatine [14, 15].

2.6. Định danh dòng nấm men được tuyển chọn

Ly trích DNA nấm men. Kiểm tra hàm lượng và chất lượng DNA bằng phương pháp quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8%. Khuếch đại vùng D1/D2 26S rDNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi chuyên biệt NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') và NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'). Tinh sạch sản phẩm khuếch đại bằng bộ Kit NucleoSpin® Extract II. Kiểm tra hàm lượng và chất lượng sản phẩm sau tinh sạch bằng phương pháp quang phổ và điện di trên gel agarose 2%. Giải trình tự sản phẩm PCR, so sánh trình tự với dữ liệu trên ngân hàng gene NCBI bằng BLAST và xác định dòng nấm men đã tuyển chọn.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình STATGRAPHICS Plus 5.1.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Phân lập nấm men

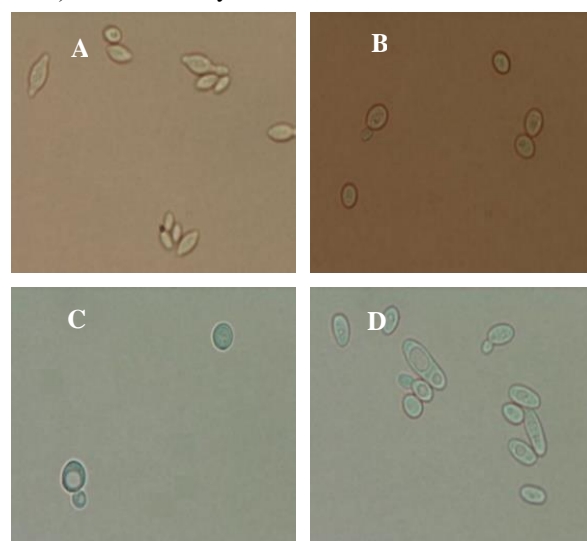
Từ 12 nguồn nguyên liệu gồm trái cây chín, mùn cưa, bã mía, ri đường, hoa cây ăn quả và mật ong, phân lập được 27 dòng nấm men (Bảng 1).

Kết quả quan sát đặc điểm hình thái cho thấy, hình dạng khuẩn lạc chủ yếu của 27 dòng nấm men là hình tròn đều, bìa nguyên, mô và màu trắng đục, với kích thước khoảng 1,0 - 3,0 × 1,0 - 3,0 mm. Tuy nhiên, có 10 dòng nấm men với khuẩn lạc màu trắng sữa là C1, T, N1, MC1, MC2, RD, HM, HT2, HN3 và MO. Đặc biệt, khuẩn lạc của hai dòng C2 và HT3 không đều và bìa răng cưa.

Bảng 1. Kết quả phân lập các dòng nấm men từ 12 nguồn nguyên liệu

STT	Địa điểm thu thập nguyên liệu	Nguồn nguyên liệu	Số dòng nấm men phân lập được
1	Chợ Xuân Khánh,	Chuối	2
2	phường Xuân	Táo	1
3	Khánh, quận Ninh	Nho	3
4	Kiều, TP Cần Thơ	Xoài	1
5	Phường Trà An, quận Bình Thủy, TP Cần Thơ	Mùn cưa	2
6	Nhà máy đường Phụng Hiệp, phường Hiệp Thành, thị xã Tân Hiệp, tỉnh Hậu Giang	Bã mía	4
7		Ri đường	1
8		Hoa xoài	4
9	Phường An Hòa, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ	Hoa mận	1
10		Hoa táo	3
11		Hoa nhãn	4
12	Xã Phong Nẫm, huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng	Mật ong	1

Tế bào nấm men có kích thước 3 - 11 × 2 - 5 μm, các dòng nấm men có 4 hình dạng là ovan kéo dài, ovan, cầu và elip. Hình dạng tế bào nấm men dưới kính hiển vi (X100) được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Hình dạng tế bào nấm men dưới kính hiển vi (X100): Ovan kéo dài (A), ovan (B), cầu (C) và elip (D)

3.2. Khảo sát khả năng lên men đường glucose

Trong quá trình lên men ethanol, 2 sản phẩm chính thu được là ethanol và CO₂, để xác định hoạt lực lên men có thể dựa trên khả năng thoát khí CO₂ trong quá trình lên men [16]. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, tốc độ lên men của các

đồng nắm men còn chậm, chiều cao cột khí CO₂ trung bình cao nhất là 23,7 ± 0,6 mm (MC2 và BM1) và một số dòng vẫn chưa sinh khí CO₂ sau 12 giờ lên men.

Bảng 2. Chiều cao cột khí CO₂ của 27 dòng nắm men phân lập

STT	Ký hiệu dòng	Chiều cao cột khí CO ₂ (mm) sau các thời gian lên men (giờ)			
		12	24	36	48
1	C1	12,7 ± 1,5 ^c	39,0 ± 1,0 ^{ab}	42,0 ± 0,0 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
2	C2	0,0 ^h	2,0 ± 1,0 ^{ij}	7,3 ± 1,4 ^{ghi}	35,7 ± 1,4 ^{abc}
3	T	19,0 ± 0,0 ^b	32,0 ± 0,0 ^{bcd}	40,3 ± 1,4 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
4	N1	7,7 ± 0,6 ^{de}	23,3 ± 1,2 ^{efg}	38,7 ± 0,6 ^a	40,3 ± 0,0 ^{ab}
5	N2	0,0 ^h	0,0 ⁱ	3,0 ± 0,0 ^{ij}	6,7 ± 0,0 ^{hi}
6	N3	0,0 ^h	1,7 ± 0,6 ^{ij}	8,3 ± 0,6 ^{gh}	23,0 ± 0,0 ^{def}
7	X1	9,0 ± 1,0 ^d	33,7 ± 0,6 ^{bcd}	42,0 ± 0,0 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
8	MC1	21,7 ± 1,2 ^{ab}	41,7 ± 0,6 ^a	42,0 ± 0,0 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
9	MC2	23,7 ± 0,6 ^a	38,3 ± 0,7 ^{abc}	42,0 ± 0,0 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
10	BM1	23,7 ± 0,6 ^a	31,0 ± 0,0 ^{cde}	38,7 ± 0,6 ^a	40,0 ± 0,0 ^{ab}
11	BM2	0,7 ± 0,6 ^{gh}	4,3 ± 0,6 ^{ij}	14,3 ± 0,6 ^c	21,3 ± 0,7 ^{fg}
12	BM3	12,3 ± 1,2 ^c	38,7 ± 0,6 ^{abc}	42,0 ± 0,0 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
13	BM4	0,0 ^h	1,7 ± 0,7 ^{ij}	11,7 ± 1,2 ^{efg}	22,0 ± 1,4 ^{efg}
14	RD	1,0 ± 0,0 ^{gh}	17,7 ± 1,2 ^g	41,3 ± 1,2 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
15	HX1	5,0 ± 2,8 ^{ef}	27,3 ± 2,8 ^{def}	38,7 ± 1,5 ^a	40,0 ± 1,4 ^{ab}
16	HX2	0,0 ^h	1,7 ± 0,6 ^{ij}	22,3 ± 2,1 ^{cd}	29,7 ± 3,5 ^{cdef}
17	HX3	1,3 ± 0,6 ^{gh}	3,0 ± 1,0 ^{ij}	12,3 ± 1,5 ^{ef}	25,0 ± 1,4 ^{def}
18	HX4	7,3 ± 0,6 ^{de}	31,3 ± 0,6 ^{bcd}	38,7 ± 0,6 ^a	39,3 ± 0,0 ^{ab}
19	HM	3,3 ± 1,4 ^{fg}	15,7 ± 1,4 ^{gh}	32,3 ± 0,6 ^b	39,7 ± 0,0 ^{ab}
20	HT1	0,0 ^h	0,0 ⁱ	3,7 ± 1,2 ^{hij}	23,3 ± 2,8 ^{def}
21	HT2	2,0 ± 1,0 ^{gh}	8,7 ± 2,3 ^{hi}	26,7 ± 2,1 ^c	31,3 ± 2,1 ^{bcd}
22	HT3	0,0 ^h	0,0 ⁱ	0,0 ⁱ	0,0 ⁱ
23	HN1	0,0 ^h	8,7 ± 0,6 ^{hi}	21,0 ± 1,0 ^d	23,7 ± 0,7 ^{def}
24	HN2	0,0 ^h	2,3 ± 1,2 ^{ij}	8,0 ± 2,6 ^{gh}	32,3 ± 3,5 ^{bcd}
25	HN3	1,7 ± 0,6 ^{gh}	21,7 ± 0,6 ^{fg}	39,7 ± 0,6 ^a	42,0 ± 0,0 ^a
26	HN4	0,0 ^h	2,7 ± 0,6 ^{ij}	11,7 ± 0,6 ^{efg}	13,3 ± 0,7 ^{gh}
27	MO	0,0 ^h	2,7 ± 0,6 ^{ij}	9,7 ± 0,6 ^{efg}	31,3 ± 0,0 ^{bcd}

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị có mẫu tự giống nhau không khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Các dòng nắm men bắt đầu lên men nhanh sau 24 giờ, nhưng chiều cao cột khí CO₂ vẫn chưa đạt giá trị 42 mm. Đồng thời, 3 dòng nắm men N2, HT1 và HT3 chưa tạo được khí CO₂ trong chuông Durham. Có 5 dòng đã đạt chiều cao cột khí CO₂ trung bình là 42 mm sau 36 giờ là C1, X1, MC1, MC2, BM3 và các dòng vẫn còn tiếp tục lên men đến 48 giờ. Đặc biệt, sau 48 giờ lên men, dòng HT3 có chiều cao cột khí là 0.

Kết quả xử lý thống kê cho thấy, chiều cao cột khí CO₂ của 27 dòng nắm men sau 48 giờ có sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$). Trong đó, các dòng C1, C2, T, N1, X1, MC1, MC2, BM1, BM3, RD, HX1, HX4, HM và HN3 có chiều cao cột khí tương đối cao so với các dòng còn lại là do khoảng thời gian 48 giờ thích hợp cho các dòng này lên men với tốc độ nhanh nhất và sản sinh lượng khí CO₂ nhiều nhất.

Tóm lại, tuyển chọn được 14 dòng nắm men có khả năng lên men nhanh bằng phương pháp đo chiều cao cột khí CO₂. Tiếp tục tiến hành khảo sát khả năng lên men của 14 dòng này trong môi trường MF7 với thời gian lên men

là 120 giờ. Bảng 3 trình bày kết quả về nồng độ ethanol ở 20°C của 14 dòng nắm men khi lên men trên môi trường MF7 ở 30°C.

Bảng 3. Nồng độ ethanol của 14 dòng nắm men sau khi lên men

STT	Ký hiệu dòng	Nồng độ ethanol (% v/v) ở 20°C
1	C1	5,0 ± 0,9 ^c
2	C2	2,7 ± 0,6 ^{de}
3	T	2,2 ± 0,3 ^e
4	N1	5,5 ± 0,0 ^{bc}
5	X1	6,3 ± 1,0 ^b
6	MC1	10,2 ± 1,0 ^a
7	MC2	11,0 ± 0,0 ^a
8	BM1	11,0 ± 0,0 ^a
9	BM3	3,5 ± 0,5 ^d
10	RD	2,3 ± 0,6 ^{de}
11	HX1	3,0 ± 1,0 ^{de}
12	HX4	6,2 ± 0,3 ^{bc}
13	HM	6,0 ± 0,0 ^{bc}
14	HN3	2,0 ± 0,0 ^e

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị có mẫu tự giống nhau không khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%.

Như vậy, tất cả các dòng nắm men đều có khả năng lên men chuyển hóa glucose thành ethanol sau 120 giờ. Trong đó, 3 dòng MC1, MC2 và BM1 có nồng độ ethanol lần lượt là 10,2 ± 1,0, 11,0 ± 0,0 và 11,0 ± 0,0% (v/v); đây là giá trị cao nhất trong tổng số 14 dòng nắm men đã tuyển chọn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các dòng còn lại. Tiếp theo, có 5 dòng với nồng độ ethanol từ 5,0 ± 0,9 đến 6,3 ± 1,0% (v/v) là C1, N1, X1, HX4 và HM. Còn lại 6 dòng C2, T, BM3, RD, HX1 và HN3 đều có hàm lượng ethanol thấp hơn 5,0% (v/v). So với các kết quả nghiên cứu đã công bố thì hàm lượng ethanol của 3 dòng MC1, MC2 và BM1 tương đồng với dòng HG1.3 được phân lập từ trái giác và dòng FBY15 được phân lập từ măng cầu xiêm với hàm lượng ethanol lần lượt là 9,9% (v/v) và 10,7 (v/v) [17, 18]. Kết quả cao hơn so với dòng R2B được phân lập từ quả cà na với nồng độ ethanol là 7,4% (v/v) [19].

3.3. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của nắm men được tuyển chọn

Từ 3 dòng nắm men đã tuyển chọn với khả năng lên men mạnh, tiếp tục khảo sát khả năng chịu nhiệt của các dòng này. Bảng 4 trình bày sự phát triển của các dòng nắm men ở các mức nhiệt độ 30, 35, 40, 45 và 50°C.

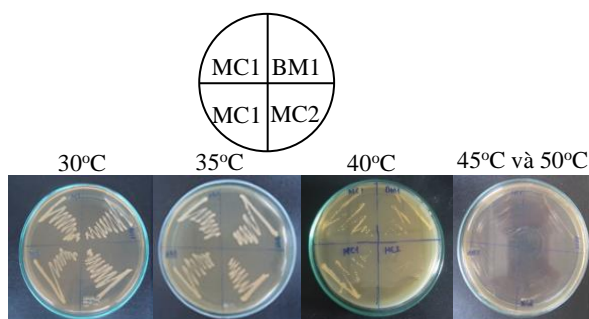
Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, ở 30 và 35°C thì cả 3 dòng nắm men đều phát triển tốt, tạo khuẩn lạc rõ ràng vì đây là khoảng nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của các dòng này. Tuy nhiên, khi gia tăng nhiệt độ lên 40°C chỉ có 2 dòng MC1 và BM1 phát triển sau 72 giờ ủ. Theo Arora và cs., các vi sinh vật chịu được nhiệt độ cao là do chúng có thể tạo ra các loại enzyme hoạt động trong điều kiện khắc nghiệt, vì thế chúng vẫn có khả năng trao đổi chất và sinh trưởng [20]. Dòng MC2 không chịu được nhiệt độ cao hay nói cách khác là bị ức chế ở nhiệt độ cao nên khuẩn lạc không phát triển. Kết quả này tương tự với kết quả của Banat và cs., sự phát triển của dòng *S. cerevisiae* IDY bị

ức chế hoàn toàn ở 40°C [21]. Đồng thời, nhiều nghiên cứu khác chỉ ra rằng nhiệt độ cao hơn 34°C sẽ ảnh hưởng đến biến dưỡng tế bào và làm giảm sự sinh trưởng [22, 23]. Khi nhiệt độ tiếp tục gia tăng thì không có dòng nào phát triển sau 72 giờ (Hình 2).

Bảng 4. Sự phát triển của các dòng nấm men ở nhiệt độ khác nhau

STT	Ký hiệu dòng	Nhiệt độ (°C)				
		30	35	40	45	50
1	MC1	+	+	+	-	-
2	MC2	+	+	-	-	-
3	BM1	+	+	+	-	-

Ghi chú: (+): phát triển; (-): không phát triển.



Hình 2. Kết quả khảo sát khả năng chịu nhiệt của các dòng nấm men

Tuyển chọn được 2 dòng nấm men phát triển tốt ở 40°C là MC1 và BM1.

3.4. Đánh giá khả năng lên men các loại đường

Sau khi đã tuyển chọn được 2 dòng nấm men vừa có khả năng lên men nhanh và mạnh vừa có khả năng chịu nhiệt tốt. Đánh giá khả năng lên men 6 loại đường gồm glucose, sucrose, lactose, galactose, arabinose và xylose của các dòng này, kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả lên men 6 loại đường của nấm men

Ký hiệu dòng	Glucose	Sucrose	Lactose	Galactose	Arabinose	Xylose
MC1	+	+	-	+	-	-
BM1	+	+	-	+	-	-

Ghi chú: (+): Lên men; (-): Không lên men

Cả 2 dòng MC1 và BM1 đều lên men đường glucose, sucrose và galactose. Tuy nhiên, 2 dòng này không thể hiện khả năng lên men đường lactose, arabinose và xylose (không có khí CO₂ trong chuông Durham). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Iticha, 2 dòng nấm men HJ12 và HG33 lên men được đường glucose, galactose và sucrose, nhưng không tăng trưởng trong môi trường đường xylose và lactose [24]. Theo kết quả của Chukwudi và cs. thì dòng nấm men Y4 lên men được đường glucose, galactose, sucrose và không phát triển trên môi trường đường xylose và lactose [25].

3.5. Khảo sát đặc tính sinh lý và sinh hóa của nấm men

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy, cả 2 dòng MC1 và BM1 đều tạo bào tử, không tạo màng trên môi trường dịch thể, không hình thành hợp chất giống tinh bột, không tạo

urease, không thủy phân gelatine. Cả 2 dòng thuộc *Ascomycota* vì chúng có đặc tính tương tự như mô tả của Kurtzman và Fell [26].

Bảng 6. Một số đặc tính cơ bản của 2 dòng nấm men

Ký hiệu dòng	Tạo màng	Lắng cặn	Tạo bào tử	Hoạt tính Urease	Hình thành hợp chất giống tinh bột	Thủy phân Gelatine
MC1	-	+	+(1-2)	-	-	-
BM1	-	+	+(1-2)	-	-	-

Ghi chú: (-): âm tính, (+) dương tính

3.6. Định danh dòng nấm men được tuyển chọn

Đặc điểm hình thái của dòng MC1 và BM1 được trình bày ở Bảng 7.

Kết quả định danh dòng MC1 là *Saccharomyces cerevisiae* và dòng BM1 là *Torulaspora globosa* (Bảng 8). Theo Arachchigea và cs., các dòng *S. cerevisiae* có khả năng phát triển ở nhiệt độ 42°C và có thể lên men ở 40°C [27]. Trong nghiên cứu khác, cho thấy dòng này phát triển trên môi trường glucose và sản sinh ethanol ở khoảng nhiệt độ từ 30 đến 44°C [28]. Hơn nữa, *S. cerevisiae* được ứng dụng rộng rãi cho việc sản xuất ethanol ở qui mô công nghiệp [29]. Đồng thời, *T. globosa* là một trong những dòng nấm men được nghiên cứu có khả năng sinh hàm lượng ethanol cao (khoảng 6,03% v/v) và có khả năng sinh trưởng và lên men trong điều kiện nhiệt độ từ 30 - 40°C [30, 31].

Bảng 7. Đặc điểm hình thái của dòng MC1 và BM1

Đặc điểm	MC1	BM1	
Kích thước (mm)	2,0 x 2,0	2,5 x 2,5	
Đặc điểm khuẩn lạc	Màu sắc	Trắng sữa	Trắng đục
Hình dạng	Cầu đều	Cầu đều	
Bia	Nguyên	Nguyên	
Độ nổi	Mô	Mô	
Đặc điểm tế bào	Hình dạng	Ovan	Cầu
Kích thước (μm)	5,0 x 5,0	3,0 x 3,0	

Bảng 8. Kết quả định danh các dòng nấm men

Ký hiệu dòng	Tên loài	Độ tương đồng (%)	Mã số
MC1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	HQ711330.1
BM1	<i>Torulaspora globosa</i>	100	AB499988.1

4. Kết luận

Phân lập được 27 dòng nấm men từ 12 nguồn nguyên liệu như trái cây chín, mùn cưa, bã mía, rỉ đường, hoa cây ăn quả và mật ong. Trong 14 dòng nấm men được sơ tuyển có khả năng lên men mạnh thì có 3 dòng MC1, MC2 và BM1 lên men tạo nồng độ ethanol cao nhất là 10,2 ± 1,0, 11,0 ± 0,0 và 11,0 ± 0,0% (v/v), nhưng chỉ có 2 dòng nấm men MC1 và BM1 có thể phát triển ở 40°C. Kết quả định danh dòng MC1 là *S. cerevisiae* và dòng BM1 là *T. globosa*.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học của Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Robak and M. Balcerek, "Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks", *Microbiological Research*, vol. 240, pp. 1-16, 2020.
- [2] M. M. Ahmed, M. D. Fakruddin, M. D. A. Islam and M. D. A. Quayum, "Characterization of stress tolerant high potential ethanol producing yeast from agro-industrial waste", *American Journal of BioScience*, vol. 1, no. 2, pp. 24-34, 2013.
- [3] N. N. W. Htet, T. S. Hlaing, S. Z. Yu and S. S. Yu, "Isolation and characterization of xylose-utilizing yeasts for ethanol production", *Journal of Bacteriology & Mycology*, vol. 6, no. 2, pp. 109-114, 2018.
- [4] M. S. Abdulsalami, N. E. Egbe1, U. O. Ozojiofor1 and A. U. Hassan, "Isolation and identification of non-saccharomyces ethanol and thermo-tolerant yeasts strains from fermented carbohydrate wastes", *JCBR*, vol. 3, no. 3, pp. 984-992, 2023.
- [5] N. K. Sree, M. Sridhan, L. V. Rao and A. Pandey, "Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast". *Process Biochemistry*, vol. 34, no. 2, pp. 115-119, 1999.
- [6] R. Ueno, N. Urano and S. Kimura, "Effect of temperature and cell density on ethanol fermentation by a thermotolerant aquatic yeast strain isolated from hot spring environment", *Fisheries Science*, vol. 68, no. 3, pp. 571-578, 2002.
- [7] N. T. P. Dung, P. Thanonkeo and H. X. Phong, "Screening Useful Isolated Yeasts for Ethanol Fermentation at High Temperature", *International Journal of Applied Science and Technology*, vol. 2, no. 4, pp. 65-71, 2012.
- [8] R. Ueno, N. Hamada-Sato and N. Urano, "Fermentation of molasses by several yeasts from hot spring drain and phylogeny of the unique isolate producing ethanol at 55°C", *Journal of Tokyo University of Fisheries*, vol. 90, pp. 23-30, 2003.
- [9] T. Onsoy, P. Thanonkeo, S. Thanonkeo and M. Yamada, "Ethanol production from jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation", *KMITL Science and Technology Journal*, vol. 7, no. S1, pp. 55-60, 2007.
- [10] J. C. Ogbonna, S. Tomiyama, Y. C. Liu and H. Tanaka, "Efficient production of ethanol by cells immobilized in Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 84, no. 3, pp. 271-274, 1997.
- [11] A. W. S. Saeed and Ahlam, *Microbiological conversion of waste fruits and vegetables into ethanol*. Department of Zoology, University of the Punjab, Lahore, 2005.
- [12] A. Techaparin, P. Thanonkeo and P. Klanrit, "High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion", *Brazilian journal of Microbiology*, vol. 48, no. 3, pp. 461-475, 2017.
- [13] P. Warren and L. Shadomy, "Yeast fermentation broth base with carbohydrate and Durham tube", *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 5, pp. 34-39, 1991.
- [14] J. Lodder and N. J. W. Kreger-van Rij, *The Yeasts: A Taxonomic Study*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1952.
- [15] J. A. Barnett, R. W. Payne and D. Yarrow, *Yeasts, characteristics and identification*, 3rd edition. Cambridge University Press, Britain, 2000.
- [16] N. D. Luong, *Microbial Technology - Traditional fermented foods – volume 3*. Vietnam National University Ho Chi Minh Press, 2003.
- [17] D. T. K. Tien, L. H. Nghi, N. N. Thanh, H. X. Phong, H. T. Toan and N. T. P. Dung, "Isolation and selection of thermotolerant yeasts for wine production from three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.)", *Nong Lam University - The Journal of Agriculture and Development*, no. 2, pp. 55-61, 2018.
- [18] N. N. Thanh, H. V. Kiet, L. T. Tin, L. M. Chau, D. T. K. Tien and H. X. Phong, "Isolation and selection of fermentative yeasts for wine production from sourso (*Annona murica* L.)", *Can Tho University - Journal of Science*, vol. 57, no. 4B, pp. 131-138, 2021.
- [19] T. N. Nguyen, N. T. T. Huynh, and D. D. Nguyen, "Isolation, selection of yeast strain (*Saccharomyces* sp.) for *Canarium album* wine fermentation", *Can Tho University - Journal of Science*, vol. 54, no. 1B, pp. 44-49, 2018.
- [20] R. Arora, S. Behera and S. Kumar, "Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: a future perspective", *Renew Sust Energy Rev*, vol. 51, no. 3, pp. 699-717, 2015.
- [21] I. M. Banat, P. Nigam and R. Marchant, "Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C", *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 8, no. 3, pp. 259-263, 1992.
- [22] L. Caspeta and J. Nielsen, "Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses", *Mbio*, vol. 6, pp. 1-9, 2015.
- [23] D. A. Charlebois, K. Hauser, S. Marshall and G. Balázs, "Multiscale effects of heating and cooling on genes and gene networks", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 115, no. 45, pp. 1-10, 2018.
- [24] T. N. Iticha, "Isolation and Screening of Ethanol Tolerant Yeast for Bio-ethanol Production in Ethiopia", *Global Journal of Life Science and Biological Research*, vol. 2, no. 2, pp. 1-7, 2016.
- [25] I. N. Chukwudi, U. N. OkeChukwu, A. N. Ifeanyi and C. A. Onyetugo, "Studies on Bioethanol Production with Thermo Tolerant Yeast Isolates and their Co-Cultures using African Wild Cocoyam as Feedstock", *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, vol. 7, no. 4, pp. 1-10, 2021.
- [26] C. P. Kurtzman and J. W. Fell, *The Yeasts – A Taxonomic Study*, 4th edition. Elsevier Science Publishing Company, 1997.
- [27] M. S. A. Arachchigea, S. Yoshidab and H. Toyama, "Thermo-and salt-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting coconut toddy from Sri Lanka", *Biotechnology & Biotechnological equipment*, vol. 33, no. 1, pp. 937-944, 2019.
- [28] N. K. Sree, M. Sridhan, K. Suresh, I. M. Banat and L. V. Rao, "Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating, *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production", *Bioresource Technology*, vol. 72, pp. 43-46, 2000.
- [29] G. M. Walker and R. S. K. Walker, "Enhancing yeast alcoholic fermentations", *Advances in Applied Microbiology*, vol. 105, pp. 87-129, 2018.
- [30] L. Savitree, N. Srisuk, W. Youngmanitchai, H. Yurimoto, Y. Sakai and M. Yamada, "Diversity of culturable thermotolerant yeast in Thailand: I. Methylophilic yeast and II. Ethanol producing yeasts", *The 1st joint seminar of Asia program*, 2009, pp. 94-95.
- [31] A. Edgardoa, P. Carolinaa, R. Manuela, F. Juanitaa and B. Jaimea, "Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 43, no. 2, pp. 120-123, 2008.