

TUYỂN CHỌN NẤM MEN CHỊU NHIỆT LÊN MEN RƯỢU VANG TRÁI GIÁC (*Cayratia trifolia* L.) CỦA TỈNH KIÊN GIANG

Đoàn Thị Kiều Tiên^{1,2}, Huỳnh Thị Hoàng Anh¹, Nguyễn Ngọc Thanh¹,
Huỳnh Xuân Phong¹, Hà Thanh Toàn¹, Ngô Thị Phương Dung¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn nấm men chịu nhiệt có khả năng lên men rượu vang trái giác (*Cayratia trifolia* L.). Kết quả phân lập được 46 chủng nấm men từ 17 mẫu trái giác được thu thập ở 4 tỉnh vùng đồng bằng sông Cửu Long gồm Kiên Giang, An Giang, Đồng Tháp và Long An. Dựa vào các khóa phân loại của nấm men như hình thái, sinh lý và sinh hóa, đã xác định các chủng nấm men phân lập được thuộc ba giống *Saccharomyces*, *Pichia* và *Hanseniaspora*. Kết quả đã sơ tuyển được 17 chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt trong khoảng 37-45°C và chịu cồn ở mức 9-12% (v/v). Các chủng nấm men sơ tuyển bao gồm 15 chủng thuộc giống *Saccharomyces* (KG1.1, KG2.1, KG2.3, KG3.1, KG3.2, KG5.1, AG1.2, AG1.3, AG2.1, AG3.1, AG4.2, DT1.2, DT3.1, DT3.2 và LA1.3) và 2 chủng thuộc giống *Pichia* (AG2.3 và LA3.4). Qua kết quả khảo sát khả năng lên men rượu vang từ dịch trái giác ở 37°C, chủng *Saccharomyces* sp. AG2.1 được tuyển chọn do có hoạt lực lên men cao nhất với hàm lượng ethanol đạt được là 8,0% (v/v).

Từ khóa: *Cayratia trifolia*, ethanol, nấm men chịu nhiệt, rượu vang trái giác, *Saccharomyces* sp. AG2.1.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rượu vang trái cây được xem là thức uống tự nhiên có lợi cho sức khỏe và đã trở thành thức uống truyền thống ở các nước phương Tây. Ngày nay, rượu vang trái cây đang có xu hướng phát triển ngày càng đa dạng trên toàn thế giới. Bên cạnh đó, với điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm như ở nước ta, việc bảo quản trái cây tươi là rất khó, dễ bị thối, hỏng sau khi thu hoạch và vận chuyển làm giảm phẩm chất ban đầu của trái cây. Do đó, từ lâu chúng ta đã chế biến trái cây bằng nhiều phương pháp tạo ra các sản phẩm khác nhau nhưng vẫn giữ được giá trị dinh dưỡng của trái cây: sản phẩm trái cây ướp đường, trái cây nấu chín, mứt trái cây sấy khô, dịch trái cây lên men để tạo ra các sản phẩm rượu, đặc biệt là rượu vang trái cây. Mỗi loại trái cây sau khi lên men đều có hương vị thơm ngon riêng biệt. Rượu vang trái cây có thể được sản xuất từ nhiều nguồn trái cây nhau như: nho, cam, nhãn, chuối, mơ, táo, xoài,...

Một số công trình nghiên cứu gần đây cho thấy dây giác có nhiều công dụng trong việc sử dụng làm thuốc dược liệu, trị liệu, thuốc thú y, ngoài ra còn có

hoạt tính chống oxy hóa, kháng siêu vi, hoạt tính trị ung thư, bảo vệ thần kinh. Các bộ phận dây giác (*Cayratia trifolia* L.) có chứa dầu sáp màu vàng, steroid/terpenoid, flavonoid, tanin, stilbenes, axit hydrocyanic (Gupta, 2007). Dây giác sấy khô dạng bột tinh chất kết hợp axetat và metanol có kết quả thử nghiệm cho thấy hoạt tính sinh học về tính chất chống oxy hóa do khả năng vô hoạt DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydraryl) rất hiệu quả (Shela *et al.*, 2003). Đồng thời, trong trái giác còn chứa các hợp chất có lợi cho sức khỏe như hợp chất cyanogenic và alkaloid (36-37 mg/g) (Kumar *et al.*, 2011). Hơn nữa, trái giác là một trong những nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất rượu vang vì dây giác thường mọc hoang ở vùng đồng bằng sông Cửu Long như các tỉnh Kiên Giang, An Giang, Đồng Tháp và Long An. Trong đó, trái giác mọc tự nhiên và rất phong phú ở các khu vực rừng tự nhiên thuộc tỉnh Kiên Giang. Trong những năm gần đây, việc gia tăng nhiệt độ toàn cầu đã gây ra những thách thức nghiêm trọng trong việc lên men với quy mô công nghiệp vì những hệ thống làm lạnh lớn tiêu tốn nhiều năng lượng để giữ ở nhiệt độ tối ưu. Nhiệt độ lên men thích hợp cho nấm men trong khoảng 30°C, tuy nhiên trong các hệ thống lên men, nhiệt độ có thể tăng đến 40°C do nhiệt sinh ra từ hạt động trao đổi chất của nấm men (Sree *et al.*, 2000; Limtong *et al.*, 2007). Vì vậy, việc phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men chịu

¹ Viện NC & PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

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

nhệt có thể mang lại hiệu quả kinh tế cao cho nhà sản xuất do giảm chi phí làm mát trong quá trình lên men (Banat *et al.*, 1992; Limtong *et al.*, 2007; Nonklang *et al.*, 2008). Đồng thời, việc phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men cũng góp phần làm phong phú thêm nguồn đa dạng sinh học, đặc biệt là nguồn vi sinh vật bản địa. Từ đó, có thể tuyển chọn các chủng nấm men có đặc tính tốt và tiến tới sản xuất giống thuần chủng phục vụ cho nhu cầu lên men rượu vang trái giắc. Do vậy, mục tiêu nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men chịu nhiệt ở các tỉnh Kiên Giang, An Giang, Đồng Tháp và Long An có hoạt tính lên men cao và ứng dụng vào quá trình lên men rượu vang trái giắc.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên vật liệu

Mười bảy mẫu trái giắc được thu hoạch ngẫu nhiên tại 17 huyện khác nhau ở các tỉnh Kiên Giang, An Giang, Đồng Tháp và Long An (Bảng 1). Trái giắc được thu thập có độ chín đồng đều với màu đỏ sậm, mọng nước. Mẫu được thu hái trực tiếp, tránh làm dập, giữ trong bọc ni lông để vận chuyển về phòng thí nghiệm và trữ trong ngăn mát tủ lạnh (khoảng 4°C) đến khi sử dụng.

Bảng 1. Danh sách các địa điểm thu mẫu trái giắc

TT	Địa điểm
1	Thị trấn Kiên Lương, huyện Kiên Lương, tỉnh Kiên Giang
2	Xã Mỹ Đức, thị xã Hà Tiên, tỉnh Kiên Giang
3	Phường An Hòa, thành phố Rạch Giá, tỉnh Kiên Giang
4	Xã Long Thạnh, huyện Giồng Riềng, tỉnh Kiên Giang
5	Xã An Biên, huyện U Minh Thượng, tỉnh Kiên Giang
6	Xã Mỹ Hòa, huyện Đồng Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp
7	Xã Hòa Bình, huyện Tam Nông, tỉnh Đồng Tháp
8	Thị trấn Lai Vung, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp
9	Thành phố Cao Lãnh, huyện Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp
10	Xã Vọng Thê, huyện Thoại Sơn, tỉnh An Giang
11	Thị trấn Ba Chúc, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang
12	Xã An Cư, huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang
13	Thị trấn Chợ Mới, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang
14	Xã Tân Tây, huyện Thanh Hóa, tỉnh Long An
15	Xã Thuận Mỹ, huyện Châu Thành, tỉnh Long An
16	Xã Thạnh Phú, huyện Bến Lức, tỉnh Long An
17	Xã Vũng Thượng, huyện Cần Giuộc, tỉnh Long An

2.2. Phân lập nấm men

Quy trình phân lập: Trái giắc chín → Nuôi trong môi trường YPD lỏng (yeast extract 5 g/l, pepton 5

g/l, D-glucoza 20 g/l, tetracyclin 10%) → Ủ lactic 24 giờ ở nhiệt độ 28-30°C → Cấy trái trên môi trường YPD aga (yeast extract 5 g/l, pepton 5 g/l, D-glucoza 20 g/l, tetracyclin 10%, aga 20 g/l) → Tách rỗng và làm thuần bằng cách cấy ria → Kiểm tra độ thuần dưới kính hiển vi.

Phân loại sơ bộ

Các chủng nấm men được định danh sơ bộ đến mức độ giống dựa vào các đặc điểm như: hình dạng khuẩn lạc, hình dạng tế bào, sự nảy chồi, sự hình thành bào tử, hoạt tính phân giải urê và gelatin, khả năng lên men đường của nấm men (Kreger-van Rij, 1984; Kurtzman *et al.*, 2011). Khả năng lên men được thực hiện thông qua phương pháp lên men dung dịch đường 2% (w/v) trong ống nghiệm có chuông Durham úp ngược. Khả năng phân giải urê được thực hiện với môi trường Christensen có chứa chất chỉ thị màu phenol đỏ và hoạt tính phân giải gelatin được kiểm tra thông qua khả năng hóa lỏng môi trường chứa gelatin (Phong *et al.*, 2016).

2.3. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men

Cấy ria các chủng nấm men phân lập lên môi trường YPD aga và ủ ở các nhiệt độ khác nhau (30, 35, 37, 39, 41, 43, 45 và 47°C) trong 48 giờ. Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các chủng nấm men khác nhau trên đĩa thạch (Phong *et al.*, 2016; Techaparin *et al.*, 2017). Tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng phát triển mạnh trên môi trường ở nhiệt độ cao.

2.4. Khảo sát khả năng chịu ethanol của các chủng nấm men

Cấy ria các nấm men phân lập trên môi trường YPD aga có bổ sung ethanol tinh khiết (3, 6, 9, 12 và 15% v/v). Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24-48 giờ và quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các chủng nấm men (Dung *et al.*, 2012; Phong *et al.*, 2016).

2.5. Sơ tuyển các chủng nấm men có khả năng lên men ethanol

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố và 3 lần lặp lại. Dịch trái giắc được điều chỉnh đến 22° Brix bằng đường sucroza và lên men ở giá trị pH tự nhiên của dịch trái giắc, thanh trùng bằng NaHSO₃ (140 mg/l) trong 2 giờ và sau đó bổ sung các chủng nấm men đã được tuyển chọn. Thử nghiệm được thực hiện ở 30°C và ghi nhận chiều cao cột khí CO₂ (mm) (phương pháp ống Durham) ở 12,

18, 24, 30, 36, 42 và 48 giờ. Tuyển chọn những chủng nấm men có khả năng lên men trong ống Durham cao thông qua khả năng hình thành khí CO₂ trong quá trình lên men.

2.6. Thử nghiệm khả năng lên men dịch trái giác

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố (các chủng nấm men đã sơ tuyển) với 3 lần lặp lại. Mẫu trái giác được thu thập trực tiếp từ Kiên Giang và chuyển về phòng thí nghiệm để ép lấy dịch quả. Dịch trái giác được điều chỉnh đến 22° Brix bằng đường sucroza và lên men ở giá trị pH tự nhiên, thanh trùng NaHSO₃ (140 mg/l) trong thời gian 2 giờ. Tiến hành chủng giống và lên men ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5-7 ngày. Mẫu lên men được thu thập để xác định các chỉ tiêu sau lên men như pH, độ Brix và hàm lượng ethnaol (% v/v).

2.7. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Giá trị pH được xác định bằng pH kế (Sartorius, PB-20, Đức). Brix được xác định bằng khúc xạ kế (Hand Refractometer, FG103/113, Euromex-Hà Lan), hàm lượng ethanol được xác định bằng phương

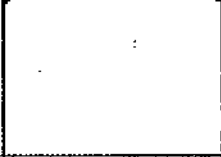



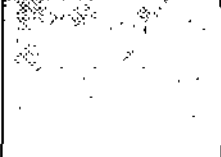
pháp chung cất (Nguyễn Đình Thương và Nguyễn Thanh Hằng, 2005). Mật số tế bào được xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu (Hemocytometer HBG German Chamber). Kết quả thí nghiệm được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphics Centurion XV ver 15.1.02 (Statpoint Technologies, Inc., USA).

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các chủng nấm men từ trái giác

Kết quả phân lập được 46 chủng nấm men từ 17 mẫu trái giác được thu thập từ 17 huyện ở 4 tỉnh Kiên Giang, An Giang, Đồng Tháp, Long An (Bảng 2). Trong đó, số lượng chủng nấm men được phân lập từ Kiên Giang là 12 chủng, từ An Giang là 11 chủng, từ Đồng Tháp là 11 chủng và từ Long An là 12 chủng. Tế bào các chủng nấm men phân lập được ghi nhận với 5 hình dạng bao gồm: ovan lớn, ovan nhỏ, elip nhọn, elip ngắn và elip dài.

Bảng 2. Kết quả phân lập các chủng nấm men

Nhóm tế bào	Chủng nấm men	Hình thức nảy chồi	Tế bào nấm men (X100)
Nhóm 1: Oval nhỏ	KG1.1, KG1.3, KG2.1, AG1.3, AG2.1, AG4.1, DT1.3, DT3.1, LA2.1	Nhiều hướng	
Nhóm 2: Oval lớn	KG1.2, KG2.2, KG2.3, KG3.1, KG4.2, KG5.1, KG5.2, AG1.1, AG2.4, AG3.2, DT1.1, DT1.2, DT2.1, DT2.3, DT3.2, LA1.1, LA1.2, LA1.3, LA3.1, LA3.2, LA3.3	Nhiều hướng	
Nhóm 3: Elip dài	KG3.2, AG1.2, AG2.3, AG3.1, AG4.2, DT2.2, LA2.2, LA2.3, LA3.4	Nhiều hướng	
Nhóm 4: Elip ngắn	DT4.2, DT4.3, LA4.1	Nhiều hướng	
Nhóm 5: Elip nhọn	KG4.1, AG2.2, DT4.1, LA4.2	Lưỡng cực	

Hình thức nảy chồi của các chủng nấm men: Kết quả quan sát đặc điểm nảy chồi của 46 chủng nấm men phân lập cho thấy có hai hình thức nảy chồi chính bao gồm nảy chồi nhiều hướng và nảy chồi lưỡng cực (Bảng 2).

Khả năng tạo bào tử: Khả năng tạo bào tử là một trong những yếu tố để phân loại nấm men. Hình thành bào tử là một hình thức sinh tồn của nấm men khi gặp điều kiện bất lợi cho hoạt động sống. Kết quả cho thấy hầu hết các chủng nấm men phân lập đều có khả năng hình thành 1-2 hoặc 1-4 bào tử, riêng các chủng LA4.1, DT4.1, KG4.2, AG2.2 và LA4.2 không có khả năng hình thành bào tử (Bảng 3).

Khả năng lên men đường glucoza, maltoza và sacaroza: Kết quả ở bảng 2 cho thấy tất cả 46 chủng nấm men phân lập đều sử dụng được đường glucoza, tuy nhiên có một số chủng không có khả năng lên men đường maltoza hoặc sacaroza hoặc cả hai loại đường này. Với các chủng nấm men có cùng hình dạng nhưng một số chủng không có khả năng lên men đường maltoza và sacaroza. Như vậy, chứng tỏ các chủng nấm men thuộc hình elip dài có hình dạng bên ngoài giống nhau nhưng khả năng lên men đường khác nhau.

Khả năng đông hóa urê và phân giải gelatin: Kết quả cho thấy trong 46 chủng nấm men được phân lập, có 3 chủng nấm men thuộc nhóm elip dài (AG2.3, LA2.2 và LA3.4) có khả năng làm thay đổi màu sắc môi trường Christensen từ màu vàng sang màu đỏ tím và có khả năng hóa lỏng gelatin. Hai chủng thuộc nhóm elip ngắn (DT4.2 và DT4.3) có khả năng phân giải urê nhưng không có khả năng phân giải gelatin.

Dựa vào khóa phân loại của Kreger-van Rij (1984), mô tả phân loại sơ bộ đến giống của Kurtzman *et al.* (2011), có thể phân loại sơ bộ như sau (Bảng 2).

- Các chủng nấm men thuộc nhóm 1 (hình oval nhỏ), nhóm 2 (hình oval lớn), một chủng hình elip dài (KG3.2, AG1.2, AG3.1, AG4.2, DT2.2 và LA2.3) và elip ngắn (LA4.1) thuộc giống *Saccharomyces*.

- Ba chủng nấm men thuộc nhóm 3 hình elip dài (AG2.3, LA2.2 và LA3.4) và 2 chủng thuộc nhóm 4 có hình elip ngắn (DT4.1 và DT4.2) là giống *Pichia*.

- Năm chủng nấm men thuộc nhóm 5 hình elip nhọn (DT4.1, KG4.1, AG2.2 và LA4.2) thuộc giống *Hanseniaspora*.

Bảng 3. Tổng hợp kết quả phân loại sơ bộ của 46 chủng nấm men phân lập

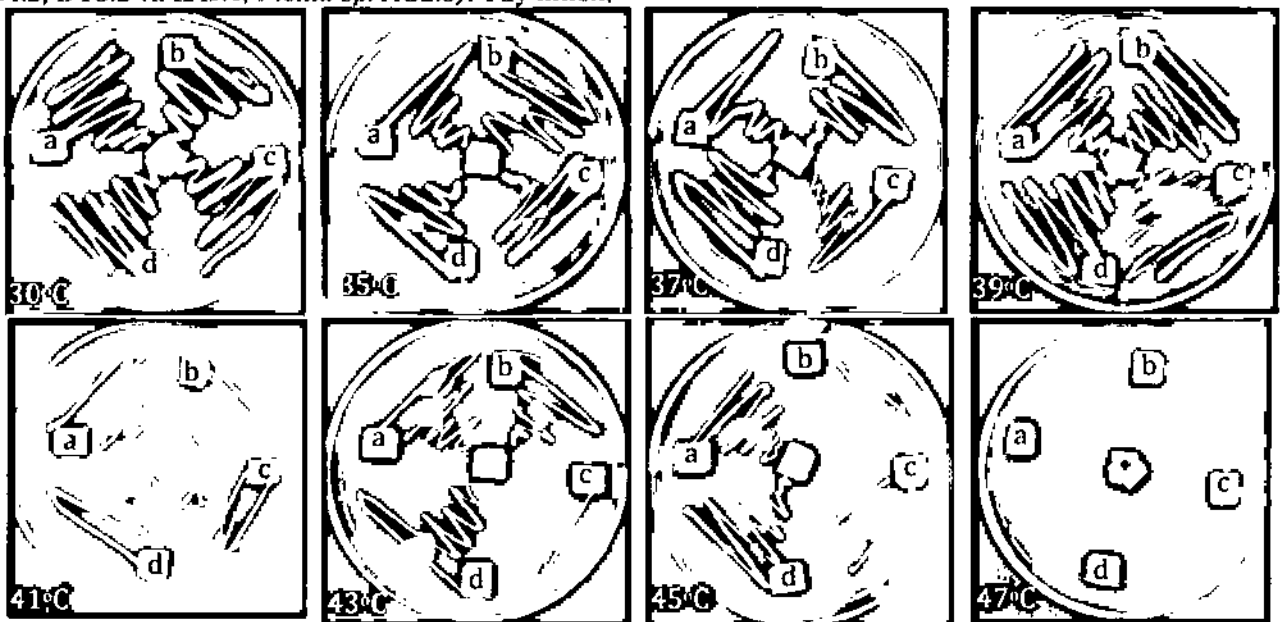
Chủng nấm men	Đặc điểm hình thái			Đặc điểm sinh lý, sinh hóa					Giống (phân loại sơ bộ)
	Hình dạng tế bào	Hình thức nảy chồi	Số lượng bào tử	Khả năng lên men đường			Phân giải urê	Phân giải gelatin	
				Glucoza	Sacaroza	Maltoza			
KG1.3, AG1.3, AG2.1, DT1.3, DT3.1	oval nhỏ	nhiều hướng	1-2	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
KG1.1, LA2.1	oval nhỏ	nhiều hướng	1-2	+	-	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
KG2.1, AG4.1	oval nhỏ	nhiều hướng	1-2	+	-	-	-	-	<i>Saccharomyces</i>
KG1.2, KG2.2, KG2.3, KG3.1, KG4.1, KG5.1, KG5.2, AG1.1, AG2.4, AG3.1, DT1.1, DT1.2, DT2.1, DT2.3	oval lớn	nhiều hướng	1-4	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
DT3.2, LA1.1, LA1.3	oval lớn	nhiều hướng	1-4	+	-	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>
AG3.2, LA1.2, LA3.1, LA3.2, LA3.3	oval lớn	nhiều hướng	1-4	+	-	-	-	-	<i>Saccharomyces</i>
KG3.2, AG1.2, AG4.2, DT2.2	elip dài	nhiều hướng	1-4	+	+	+	-	-	<i>Saccharomyces</i>

LA2.3	elip dài	nhiều hướng	1-4	+	-	-	-	-	<i>Saccharomyces</i>
AG2.3, LA2.2, LA3.4	elip dài	nhiều hướng	1-4	+	-	-	+	+	<i>Pichia</i>
DT4.2, DT4.3	elip ngắn	nhiều hướng	1-4	+	-	-	+	-	<i>Pichia</i>
LA4.1	elip ngắn	nhiều hướng	0	+	-	-	-	-	<i>Saccharomyces</i>
DT4.1	elip nhọn	lượng cực	0	+	-	+	-	-	<i>Hanseniaspora</i>
KG4.2, AG2.2, LA4.2	elip nhọn	lượng cực	0	+	-	-	-	-	<i>Hanseniaspora</i>

3.2. Khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men

Các chủng nấm men có thể phát triển ở các mức nhiệt độ 30, 35, 37, 39, 41, 43 và 45°C. Tuy nhiên, ở các mức nhiệt độ cao hơn, các chủng nấm men có xu hướng phát triển yếu hoặc không phát triển (hình 1). Cụ thể, trong 46 chủng nấm men đã được phân lập, hầu hết các chủng nấm men đều phát triển tốt ở 30, 35, 37°C (trừ *Hanseniaspora* sp. AG2.2; *Saccharomyces* sp. LA1.2, LA3.2 và LA4.1) nhưng chỉ có 16 chủng có thể phát triển ở 43°C và 6 chủng phát triển được ở 45°C (*Saccharomyces* sp. AG2.1, AG3.1, AG4.2, DT3.2 và LA1.1; *Pichia* sp. AG2.3). Tuy nhiên,

không có chủng nấm men nào có thể phát triển ở 47°C. Điều này cho thấy, khi nhiệt độ lên càng cao thì khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm men càng giảm xuống. Kết quả về khả năng chịu nhiệt cũng tương đồng với một số công trình công bố gần đây trên nấm men chịu nhiệt được phân lập từ đất, ca cao, trái cây, phụ phẩm nông nghiệp... (Dung *et al.*, 2012; Phong *et al.*, 2016; Techaparin *et al.*, 2017). Như vậy, tổng cộng có 42 chủng nấm men phân lập có khả năng chịu nhiệt trong khoảng 37-45°C và các chủng này được chọn để khảo sát khả năng chịu ethanol.

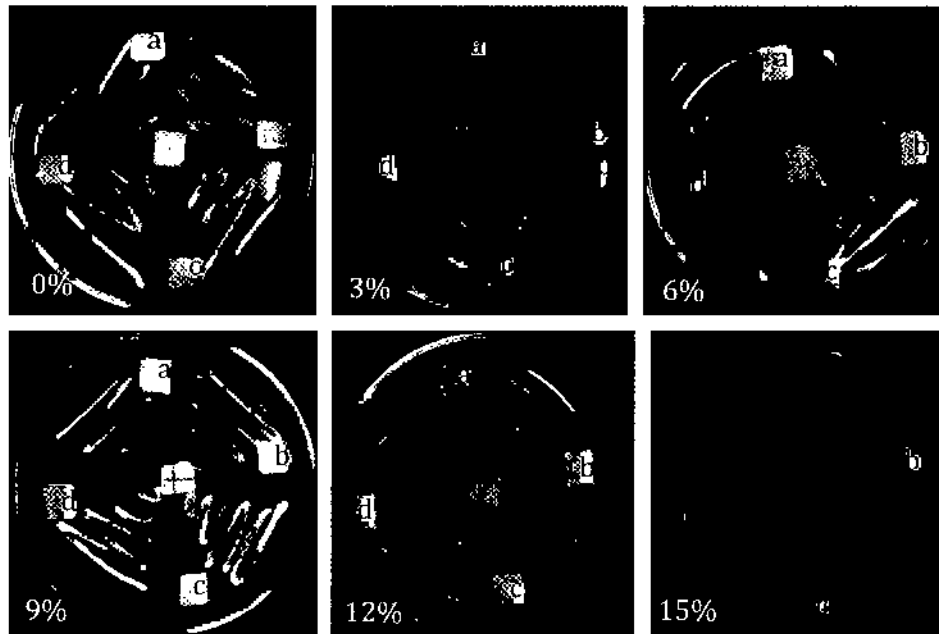


Hình 1. Khuẩn lạc nấm men phát triển ở các nhiệt độ khác nhau
(a) DT3.2, (b) KG5.1, (c) LA1.3, (d) AG3.1

3.3. Khả năng chịu ethanol của các chủng nấm men

Kết quả thử nghiệm khả năng chịu ethanol của các chủng nấm men phân lập cho thấy ở các mức

nồng độ ethanol cao hơn, khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng nấm men giảm dần (hình 2).



Hình 2. Khuẩn lạc nấm men phát triển ở các nồng độ ethanol khác nhau

(a) KG5.1, (b) LA1.3, (c) DT3.2, (d) AG3.1

Hầu hết tất cả các chủng nấm men có thể phát triển ở 3% (v/v) ethanol (trừ *Saccharomyces* sp. LA4.1) và 6% (trừ *Saccharomyces* sp. AG3.2 và LA3.3). Chỉ có 20 chủng có thể phát triển ở mức 9% ethanol, 13 chủng nấm men (*Saccharomyces* sp. KG4.1, KG5.1, AG1.2, AG1.3, AG2.1, AG3.2, AG4.2, DT1.2, DT3.1 DT3.2, LA1.3; *Hanseniaspora* sp. KG4.2; *Pichia* sp. AG2.3) có thể phát triển ở mức 12% ethanol và không có chủng nào có thể phát triển ở 15% ethanol. Khả năng chịu ethanol của các chủng nấm men được xem là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng phát triển của các chủng nấm men. Kết quả này cũng tương tự như công bố của Dung *et al.* (2012) và Phong *et al.* (2016) khi đánh giá khả năng chịu ethanol của nấm men chịu nhiệt.

Từ kết quả khảo sát khả năng chịu ethanol của 42 chủng nấm men, có thể tuyển chọn được 22 chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt từ chịu ethanol ở mức 9-12% (v/v) trở lên để khảo sát khả năng lên men bao gồm: *Saccharomyces* sp. KG1.1, KG1.2, KG2.1, KG2.2, KG2.3, KG3.1, KG3.2, KG4.1, KG5.1, AG1.2, AG1.3, AG2.1, AG3.1, AG3.2, AG4.2, DT1.2, DT3.1, DT3.2, LA1.3; *Hanseniaspora* sp. KG4.2; *Pichia* sp. AG2.3, LA3.4.

3.4. Khả năng lên men dịch trái giac của các chủng nấm men phân lập

Trong quá trình lên men rượu có hai sản phẩm chính là ethanol và CO₂, để xác định hoạt lực lên

men của nấm men có thể dựa trên khả năng thoát khí CO₂ trong quá trình lên men (Nguyễn Đức Lượng *et al.*, 2003). Hai mươi hai chủng nấm men có khả năng phát triển ở 37-45°C và 9-12% (v/v) ethanol men được khảo sát khả năng lên men dịch trái giac bằng phương pháp lên men trong chai Durham và kết quả được trình bày ở bảng 4.

Chiều cao cột khí sinh ra trong ống Durham tăng theo thời gian và thay đổi tùy theo khả năng lên men của các chủng nấm men khác nhau. Trong đó, 4 chủng nấm men (*Saccharomyces* sp. KG1.1, AG1.3, DT1.2 và DT3.1) có thời gian lên men nhanh nhất, chiều cao cột khí đạt 20-30 mm trong 6 giờ lên men. Chủng *Saccharomyces* sp. AG1.2 và AG2.1 có khả năng lên men khá cao, làm đầy cột khí trong ống Durham sau 18 giờ lên men. Tiếp theo, các chủng *Saccharomyces* sp. KG5.1, AG3.1 và DT3.2 có trung bình chiều cao cột khí đạt 30 mm sau 30 giờ lên men. Các chủng *Saccharomyces* sp. KG2.3, KG3.1, KG3.2, AG4.2 và *Pichia* sp. AG2.3, LA3.4 có trung bình chiều cao cột khí đạt được 20-30 mm khi lên men trong 48 giờ. Các chủng còn lại có khả năng lên men yếu, cụ thể là chủng *Saccharomyces* sp. KG2.1, KG2.2, KG4.1, KG4.3 và AG3.2 có trung bình chiều cao cột khí thấp hơn 20 mm sau 48 giờ lên men.

Từ đó, có thể tuyển chọn được 17 chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt 37-45°C, chịu ethanol 9-12% (v/v) và có khả năng lên men tốt với trung bình chiều cao cột khí 20-30 mm sau 48 giờ lên men, trong

đó 15 chủng thuộc giống *Saccharomyces* (KG1.1, AG2.1, AG3.1, AG4.2, DT1.2, DT3.1, DT3.2 và LA1.3) KG2.1, KG2.3, KG3.1, KG3.2, KG5.1, AG1.2, AG1.3, và 2 chủng thuộc giống *Pichia* (AG2.3 và LA3.4).

Bảng 4. Chiều cao cột khí CO₂ (mm) trong ống Durham sau 48 giờ lên men

STT	Chủng nấm men	Thời gian lên men (giờ)							
		6	12	18	24	30	36	42	48
1	KG1.1	26,67	28,00	30,00	-	-	-	-	-
2	KG1.2	0	0,33	3,67	6,33	8,67	10,67	14,00	17,33
3	KG2.1	8,67	14,33	18,33	19,00	29,00	30,00	-	-
4	KG2.2	0	3,00	4,00	4,67	6,00	6,33	6,67	7,00
5	KG2.3	5,00	5,67	16,00	18,00	21,00	26,00	30,00	-
6	KG3.1	0	2,00	5,67	9,67	13,67	25,33	26,67	28,00
7	KG3.2	0	0	4,67	8,00	18,67	19,67	25,67	27,33
8	KG4.1	0	0	0	0	0,33	2,33	5,00	5,00
9	KG4.2	0	0	0,33	3,00	4,33	6,33	8,00	8,00
10	KG5.1	0	2,00	8,67	14,00	30,00	-	-	-
11	AG1.2	11,00	20,00	30,00	-	-	-	-	-
12	AG1.3	30,00	-	-	-	-	-	-	-
13	AG2.1	10,67	14,67	30,00	-	-	-	-	-
14	AG2.3	0	5,00	13,67	18,00	20,67	22,00	26,67	30,00
15	AG3.1	2,00	4,33	23,00	27,33	30,00	-	-	-
16	AG3.2	0	0	0	0	0	0	0	0
17	AG4.2	5,67	8,33	17,67	20,67	23,33	25,00	26,67	30,00
18	DT1.2	30,00	-	-	-	-	-	-	-
19	DT3.1	20,00	30,00	-	-	-	-	-	-
20	DT3.2	12,00	18,67	27,33	29,33	30,00	-	-	-
21	LA1.3	8,00	10,67	16,67	17,33	18,33	18,67	19,33	20,00
22	LA3.4	0	0	0	0	4,67	10,00	20,67	21,67

*Ghi chú: “-” thể hiện chiều cao cột khí trong ống Durham đạt mức tối đa là 30 mm. Giá trị ghi trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp.

3.5. Kết quả thử nghiệm khả năng lên men dịch trái giắc

Giá trị pH và độ brux sau lên men ở các nghiệm thức đều giảm so với pH và độ brux ban đầu (pH 3,47 và 22° Brux) do trong quá trình lên men, nấm men sử dụng đường làm nguồn các bon. Vì vậy, đường bị chuyển hóa qua một chuỗi phản ứng enzym để tạo thành sản phẩm cuối cùng của sự lên men là ethanol và CO₂. Kết quả thử khả năng lên men của 17 chủng nấm men sơ tuyển được trình bày ở bảng 5.

Kết quả cho thấy, hàm lượng ethanol là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng lên men rượu của các chủng nấm men. Trong 17 chủng nấm men lên men rượu vang giắc thì hàm lượng ethanol trung bình sau lên men của chủng *Saccharomyces* sp. AG2.1 là cao nhất (8,0% v/v). Các chủng *Saccharomyces* sp. KG1.1, LA1.3,

DT3.2, KG5.1, KG2.1, DT1.2, AG3.1, KG3.2 và *Pichia* sp. AG2.3, có hàm lượng ethanol trong khoảng 6,08-7,12% (v/v). Các chủng nấm men còn lại lên men tạo thành độ rượu thấp khoảng 2,74-5,79% (v/v). Chủng *Saccharomyces* sp. AG2.1 cho sản phẩm rượu giắc có hàm lượng ethanol cao nhất với nồng độ rượu là 8,0% (v/v) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với các chủng nấm men còn lại.

Kết quả đo chiều cao cột khí CO₂ trong ống Durham (Bảng 3) cho thấy chủng nấm men AG2.1 có thời gian làm đầy cột khí trong ống Durham trong dịch trái giắc khá nhanh (sau 18 giờ) và có kết quả cho độ rượu cao (8,0% v/v). Tuy nhiên, ở dịch trái giắc, các chủng nấm men *Saccharomyces* sp. AG1.3, DT1.2 và DT3.1 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% - 6,18% v/v). Điều này có thể là 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 chuông 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, qua thí nghiệm này, chủng *Saccharomyces* sp. AG2.1 có độ cồn cao nhất trong 17 chủng khảo sát được chọn là chủng nấm men có khả năng lên men tốt so với các chủng còn lại.

Bảng 5. Kết quả khả năng lên men của các chủng nấm men

TT	Chủng nấm men	pH sau lên men	Độ brix sau lên men	Ethanol (% v/v ở 20°C)
1	KG1.1	3,38	14,33	7,12 ^b
2	KG2.1	3,37	14,84	6,25 ^{def}
3	KG2.3	3,41	15,67	5,23 ^h
4	KG3.1	3,40	15,00	5,65 ^{gh}
5	KG3.2	3,41	15,67	6,08 ^{efg}
6	KG5.1	3,43	13,30	6,49 ^{cde}
7	AG1.2	3,33	15,00	5,64 ^{gh}
8	AG1.3	3,34	14,30	5,40 ^h
9	AG2.1	3,45	10,33	8,00 ^a
10	AG2.3	3,43	14,67	6,23 ^{def}
11	AG3.1	3,44	12,17	5,64 ^{gh}
12	AG4.2	3,42	13,33	6,16 ^{defg}
13	DT1.2	3,41	14,00	6,19 ^{defg}
14	DT3.1	3,35	14,17	5,79 ^{fgh}
15	DT3.2	3,41	12,50	6,68 ^{bcd}
16	LA1.3	3,78	13,33	6,84 ^{bc}
17	LA3.4	3,34	17,33	2,74 ⁱ

*Ghi chú: Các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các ký hiệu trên các số liệu giống nhau, khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5%.

4. KẾT LUẬN

Kết quả đã phân lập được 46 chủng nấm men từ 17 mẫu trái giắc thu thập ở 17 địa điểm thuộc 4 tỉnh vùng đồng bằng sông Cửu Long (Kiên Giang, An Giang, Đồng Tháp và Long An). Dựa trên mô tả các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh lý đã xác định được 3 giống nấm men gồm *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia*. Mười bảy chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu cồn lần lượt trong

khoảng 37-45°C và 9-12% (v/v), trong đó bao gồm 15 chủng thuộc giống *Saccharomyces* (KG1.1, KG2.1, KG2.3, KG3.1, KG3.2, KG5.1, AG1.2, AG1.3, AG2.1, AG3.1, AG4.2, DT1.2, DT3.1, DT3.2 và LA1.3) và 2 chủng thuộc giống *Pichia* (AG2.3 và LA3.4) đã được tuyển chọn để thử nghiệm khả năng lên men rượu vang trái giắc. Tuyển chọn được chủng *S. cerevisiae* sp. AG2.1 có hoạt lực lên men cao nhất với hàm lượng ethanol đạt được 8,0% (v/v) từ dịch trái giắc khi lên men ở 37°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Banat, I. M., P. Nigam and R. Merchant, 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: 259-263.
2. 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.
3. Gupta, A. K., M. Shamar, 2007. Review on Indian medical plant. *New Delhi: Indian Council of Medical Research*, 7: 879-882.
4. Kreger-van Rij N. J. W., 1984. The yeast, a taxonomic study. 3th ed., Elsevier, Amsterdam.
5. Kumar D., S. K., 2011. A review on chemical and biological properties of *Cayratia trifolia* Linn. (Vitaceae). *Pharmacognosy Reviews*, 10:184-188.
6. 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.
7. Limtong, S., C. Sringiew and W. Yongmanitchai, 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 98: 3367-3374.
8. 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.
9. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết, 2003. Thí nghiệm công nghệ

sinh học tập 2. Thí nghiệm vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, trang 260-291.

10. Nonklang S., B. M. A. Abdel-Banat, K. Cha-aim, N. Moonjai, H. Hoshida, S. Limtong, M. Yamada and R. Akada, 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.

11. Phong H. X., Giang N. T. C., Nitiyon S., Yamada M., Thanonkeo P., & 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.

12. Shela G., Olga M. B., Elena K., Antonin L., Nuria G. M, Ratiporn H., Yong-Seo P., Soon-Teck J., Simon T., 2003. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(3): 154-159.

13. Sree, K. N., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I. M., & Venkateswar Rao, L., 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource Technology*, 72(1), 43-46.

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

SELECTION OF THERMOTOLERANT YEASTS FOR PRODUCTION OF THREE-LEAF CAYRATIA (*Cayratia trifolia* L.) WINE IN KIEN GIANG

Doan Thi Kieu Tien^{1,2}, Huynh Thi Hoang Anh¹, Nguyen Ngoc Thanh¹,
Huynh Xuan Phong¹, Ha Thanh Toan¹, Ngo Thi Phuong Dung¹

¹Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

²Khoa Faculty of Food Technology and Biotechnology, Can Tho University of Technology

Summary

The aim of this study was to isolate and to select the thermotolerant yeasts having the fermentation ability for the production of three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) wine. A total of forty-six thermotolerant yeast isolates was purified from 17 samples of three-leaf cayratia that were collected from 4 provinces in Mekong delta region, including Kien Giang, An Giang, Dong Thap and Long An. Based on the classification keys of yeasts about morphology, physiology, and biochemistry, the isolated yeasts were generally characterized belonged to three genera as follow: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, and *Pichia*. By the screening results, seventeen isolates of yeasts were selected for their thermotolerant ability (37-45°C) and ethanol tolerant capacity (9-12% v/v). These selected yeasts included 15 strains of *Saccharomyces* (KG1.1, KG2.1, KG2.3, KG3.1, KG3.2, KG5.1, AG1.2, AG1.3, AG2.1, AG3.1, AG4.2, DT1.2, DT3.1, DT3.2 and LA1.3) and 2 strains of *Pichia* (AG2.3, LA3.4). In the experiment of wine fermentation from three-leaf cayratia at 37°C, a strain of *Saccharomyces* sp. AG2.1 was found to have the best fermentation ability with the ethanol concentration produced at 8% (v/v).

Keywords: *Cayratia trifolia*, ethanol, *Saccharomyces* sp. AG2.1, thermotolerant yeast, three-leaf cayratia wine.

Người phản biện: TS. Nguyễn Mạnh Dũng

Ngày nhận bài: 20/9/2017

Ngày thông qua phản biện: 20/10/2017

Ngày duyệt đăng: 27/10/2017