

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH NẤM MEN LÊN MEN ETHANOL TỪ TRÁI CHÙM RUỘT (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels)

Lâm Thảo Nhi¹, Nguyễn Ngọc Phương Trang², Trần Thị Mai Thi²,
Nguyễn Thanh Thảo Nguyễn², Huỳnh Ngọc Thanh Tâm^{3*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trên cơ sở phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt lực lên men ethanol cao từ trái chùm ruột tại các tỉnh/thành phố: Cần Thơ, An Giang, Bạc Liêu. Từ nguồn trái chùm ruột ban đầu, 35 chủng nấm men đã được phân lập xếp thành 7 nhóm: hình cầu lớn, hình cầu nhỏ, hình oval lớn, hình oval nhỏ, hình elip dài, hình elip ngắn, hình elip nhọn dựa vào khóa phân loại nấm men (hình thái, sinh lý, sinh hóa) đã xác định các dòng nấm men phân lập được bao gồm 3 giống *Saccharomyces*, *Pichia* và *Hanseniaspora*. Trong đó, dòng nấm men GX2 hình cầu lớn được phân lập từ trái chùm ruột tại Giai Xuân (Phong Điền, Cần Thơ) đã được tuyển chọn do có khả năng lên men cho nồng độ ethanol cao. Với điều kiện lên men ban đầu pH 4,5, độ Brix 20 và số lượng tế bào nấm men 10^6 tế bào/mL, hàm lượng ethanol đạt 5,74% v/v và độ Brix biểu kiến đo bằng khúc xạ kế còn thấp (độ Brix 6,83) sau 14 ngày lên men. Kết quả của phương pháp giải trình tự ADN đã xác định được nấm men GX2 thuộc loài *Candida*, ứng dụng cho lên men sản xuất cồn công nghiệp.

Từ khóa: *Candida*, nấm men rượu, hoạt lực, lên men ethanol, phân lập, trái chùm ruột.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ethanol là một trong những hợp chất hữu cơ quan trọng và có nhiều ứng dụng nhất trong đời sống con người cũng như trong công nghiệp. Ethanol được sử dụng để làm thức uống, chất sát trùng, chất chống đông, chất ức chế, dung môi và làm nguyên liệu sản xuất các hợp chất khác như: Diethyl ether, acetic acid, ethyl acetate, ethyl acrylate, ethyl chloride... Ethanol còn là nguyên liệu thô chủ yếu trong quá trình sản xuất dược phẩm, nhựa, sơn mài, nước hoa và mỹ phẩm. Hiện nay, nhu cầu về ethanol công nghiệp với độ tinh sạch cao ngày càng cấp thiết, bởi ethanol đã được chứng minh là một loại nhiên liệu sinh học có tiềm năng thay thế những nguồn nhiên liệu hóa thạch đang dần cạn kiệt [1]. Có thể pha trộn hợp lý một lượng vừa phải ethanol với xăng để làm nhiên liệu nhằm tăng tính thân thiện với môi trường đồng thời hạ giá thành.

Ethanol có thể được sản xuất bằng hóa tổng hợp và sinh tổng hợp. Trong sinh tổng hợp, nấm men có

tiềm năng rất lớn cần được sử dụng trong việc chuyển hóa đường thành ethanol trong điều kiện kỵ khí. Đặc biệt, Việt Nam có nguồn trái cây đa dạng và phong phú có thể tận dụng trong việc sản xuất ethanol từ nguồn nấm men tự nhiên có trong dịch quả. Chùm ruột (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) là loài cây nhiệt đới và cận nhiệt đới có nguồn gốc từ Madagascar (đảo quốc ở Ấn Độ Dương) [8]. Ở Việt Nam, cây chùm ruột trồng phổ biến ở miền Nam, cho trái vào tháng giêng và có thể cho những đợt trái khác (ít rõ hơn) trong năm. Tuy nhiên, giá trị kinh tế của trái chùm ruột không cao do đó việc phân lập những dòng nấm men nội sinh trong trái chùm ruột có khả năng lên men ethanol cao có thể ứng dụng trong việc sản xuất cồn công nghiệp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Trái chùm ruột được thu tại 5 địa điểm, gồm: xã Giai Xuân và xã Tân Thới (Phong Điền, Cần Thơ), thị trấn Phú Hòa và xã Vĩnh Trạch (Thoại Sơn, An Giang), huyện Vĩnh Lợi (Bạc Liêu). Trái chùm ruột được đóng gói, bảo quản trong từng bao PE (polyetylen) riêng biệt và trữ lạnh trong các thùng xốp để tránh ánh sáng mặt trời trực tiếp. Cuối cùng là vận chuyển ngay đến phòng thí nghiệm để giảm thiểu tối đa sự thay đổi tính chất, trạng thái ban đầu của mẫu.

¹ Học viên cao học ngành Công nghệ sinh học K26, Trường Đại học Cần Thơ

² Sinh viên ngành Công nghệ sinh học K43, Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: hnttam@ctu.edu.vn

Nấm men đối chứng *Saccharomyces cerevisiae* 2.1 - kí hiệu ĐC, được lưu giữ ở 4°C tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm men từ trái chùm ruột lên men

Trái chùm ruột thu về rửa sạch, tách hạt (không nghiền) cho vào bình tam giác 100 mL có môi trường YPD (Yeast extract -Peptone-D-glucose), tăng sinh ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành phân lập trên môi trường YPDA (Yeast extract -Peptone-D-glucose-Agar) đến khi có được những khuẩn lạc nấm men thuần chủng và định danh sơ bộ các dòng nấm men này bằng phương pháp hình thái học dựa vào khóa phân loại nấm men của Kurtzman và Fell (1998) [5], Lương Đức Phẩm (2006) [7], Nguyễn Đức Lượng (2006) [11] kết hợp với phương pháp sinh hóa (khả năng lên men đường glucose và sucrose, khả năng phân giải urea).

2.2.2. Tuyển chọn dòng nấm men có hoạt lực lên men ethanol cao từ các dòng nấm men phân lập

Nghiên cứu được thực hiện nhằm so sánh khả năng lên men và chọn ra dòng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất cho hàm lượng ethanol cao.

- Lên men trong ống Durham

Cách tiến hành: Chuẩn bị dịch nấm men và kiểm tra số lượng tế bào nấm men bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu để có số lượng nấm men 10^6 tế bào/mL. Tiến hành ép trái chùm ruột để lấy nước. Tiếp theo là điều chỉnh các thông số về 20°Brix và pH=4,5 và thanh trùng bằng NaHSO_3 (140 mg/L) trong 2 giờ thì có thể tiêu diệt được vi sinh vật tạp nhiễm. Theo Phạm Trần Ngọc Diễm (2007) [14], trước khi lên men cần tiến hành thanh trùng bằng NaHSO_3 nhằm mục đích tiêu diệt vi sinh vật có hại, nấm mốc, nấm men dại, chống oxy hoá nước quả. Bổ sung NaHSO_3 , khuấy đều và để yên trong 2 giờ để NaHSO_3 bay hơi đi hết. Sau đó, cho 1 mL dịch nấm men vào 9 mL dịch phối chế đã chuẩn bị sẵn trong ống nghiệm vô trùng đã chứa ống Durham. Đậy nắp ống nghiệm lại và lắc ngược ống nghiệm xuống để dung dịch tràn vào ống Durham, sao cho không còn bọt khí trong chuông Durham và chìm hoàn toàn trong dung dịch. Tiến hành đo cột khí CO_2 ở các thời điểm 6 giờ, 12 giờ, 18 giờ, 24 giờ, 30 giờ, 36 giờ, 42 giờ, 48 giờ và 54 giờ.

Chỉ tiêu theo dõi: Tiến hành theo dõi cột khí CO_2 trong ống Durham ở các thời điểm (6 giờ, 12 giờ, 18 giờ, 24 giờ, 30 giờ, 36 giờ, 42 giờ, 48 giờ và 54 giờ) cho đến khi CO_2 đầy trong ống Durham.

- Lên men trong bình tam giác

Cách tiến hành: Chuẩn bị dịch nấm men và kiểm tra số lượng tế bào nấm men bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu để có mật số nấm men 10^6 tế bào/mL. Trái chùm ruột được ép lấy nước và thanh trùng bằng NaHSO_3 (140 mg/L) trong 2 giờ để tiêu diệt vi sinh vật có trong dịch trái. Tiếp theo là điều chỉnh các thông số về 20°Brix, pH = 4,5. Sau đó, cho 1 mL dịch nấm men đã tăng sinh vào 99 mL dịch quả phối chế đã chuẩn bị sẵn trong bình tam giác, lắc đều bình tam giác để tế bào nấm men phân bố đều trong dịch phối chế. Cuối cùng là đem ủ ở nhiệt độ phòng. Sau 14 ngày, tiến hành chưng cất để thu cồn. Độ cồn thu hồi được đo bằng cồn kế.

Chỉ tiêu theo dõi: Sự thay đổi pH, °Brix, độ cồn thu hồi ở 20°C sau thời gian lên men 14 ngày.

2.2.3. Định danh bằng phương pháp giải trình tự

Qua thí nghiệm ở mục 2.2.2 đã xác định được dòng nấm men có khả năng lên men chùm ruột cho hàm lượng ethanol cao nhất. Dòng nấm men này được chọn để định danh đến mức độ loài bằng phương pháp sinh học phân tử, kết hợp với đặc điểm hình thái và thí nghiệm sinh hóa. Dòng nấm men được chọn giải trình tự đoạn gen bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 [6] và sử dụng chương trình Nucleotide Blast để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với trình tự của các dòng nấm men trong ngân hàng gen trên NCBI với phần mềm BLASTN.

2.3. Các chỉ tiêu phân tích và xử lý thống kê

Các chỉ tiêu phân tích: xác định pH bằng pH kế, xác định độ Brix bằng khúc xạ kế và xác định hàm lượng ethanol sinh ra qua hệ thống chưng cất và hiệu chỉnh về 20°C [12].

Số liệu được thu thập, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft excel 2013. Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 20.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm men từ trái chùm ruột

Theo Nguyễn Đức Lượng (2003) [10], có thể định danh sơ bộ các dòng nấm men dựa vào đặc

điểm hình thái và đặc điểm sinh lý, sinh hóa của nấm men. Đặc điểm hình thái nấm men bao gồm: mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường YPDA sau 2 ngày - 3 ngày, hình thái tế bào, kiểu nảy chồi của tế bào nấm men, sự hình thành bào tử trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa bao gồm: khả năng lên men đường glucose, sucrose và khả năng phân giải urea của nấm men.

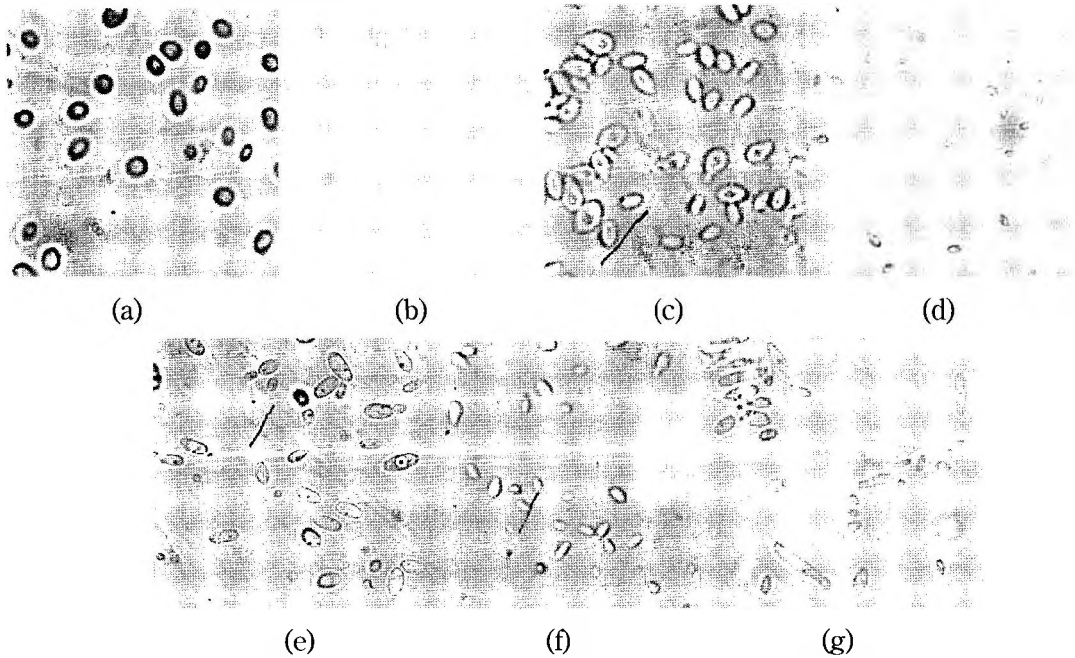
Kết quả phân lập được 35 chủng nấm men từ nguồn trái chùm ruột tại 5 địa điểm. Dựa vào hình

dạng tế bào, 35 chủng nấm men phân lập có thể được xếp thành 7 nhóm hình dạng tế bào (cầu lớn, cầu nhỏ, oval lớn, oval nhỏ, elip ngắn, elip dài và elip nhọn) (Hình 1 và bảng 1).

Các dòng nấm men phân lập được kí hiệu như sau: tên viết tắt của mỗi địa điểm thu mẫu: Giai Xuân (GX), Tân Thới (TT), Phú Hòa (PH), Vinh Trạch (VT), Vinh Lợi (VL) và kèm theo số thứ tự của các dòng nấm men.

Bảng 1. Số lượng và hình dạng các nhóm nấm men được phân lập tại các địa điểm

Địa điểm	Số dòng nấm men	Hình dạng nấm men						
		Cầu lớn	Cầu nhỏ	Oval lớn	Oval nhỏ	Elip dài	Elip ngắn	Elip nhọn
Giai Xuân	7	1	1	4	1	0	0	0
Tân Thới	7	0	0	1	1	2	3	0
Vinh Trạch	7	0	0	2	1	0	2	2
Phú Hòa	3	0	0	0	1	0	1	1
Vinh Lợi	11	0	0	2	3	1	4	1
Tổng	35	1	1	9	7	3	10	4

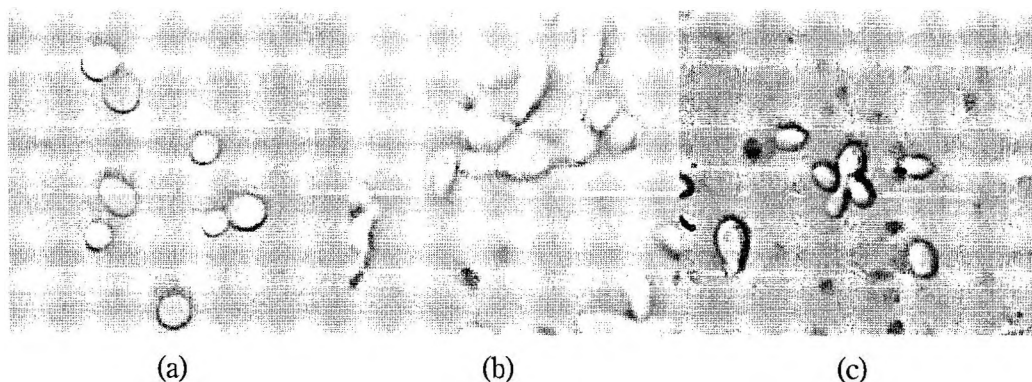


Hình 1. Hình dạng tế bào của các dòng nấm men phân lập được từ trái chùm ruột

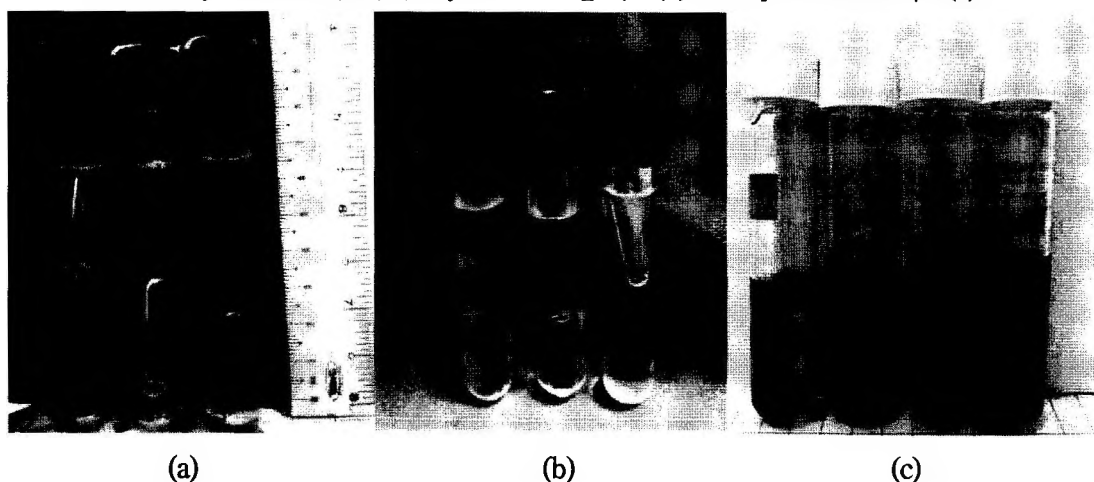
(a) Cầu lớn-GX2; (b) Cầu nhỏ-GX4.1; (c) Oval lớn-VT6; (d) Oval nhỏ-BL9; (e) Elip dài-TT6; (f) Elip ngắn-PH2; (g) Elip nhọn-VT2.1

Quan sát hình thức nảy chồi dưới kính hiển vi cho thấy, 35 dòng nấm men đều có khả năng nảy chồi, với 3 hình thức gồm đơn cực, lưỡng cực và đa cực. Nhóm tế bào hình cầu lớn, cầu nhỏ, oval lớn, oval nhỏ là nảy chồi đơn cực, nhóm tế bào hình elip ngắn và elip dài là

nảy chồi lưỡng cực, nhóm tế bào hình elip nhọn là nảy chồi đa cực hoặc lưỡng cực (Hình 2). Đồng thời, kết quả các thí nghiệm sinh hóa như khả năng phân giải đường glucose, saccharose và khả năng phân giải urea được thể hiện qua bảng 2 và hình 3.



Hình 2. Nấm chồi đa cực (a), nấm chồi lưỡng cực (b) và nấm chồi đơn cực (c)



Hình 3. Các thử nghiệm sinh hóa của các dòng nấm men đã phân lập

(a) Khả năng lên men đường glucose; (b) Khả năng lên men đường sucrose; (c) Sự thay đổi màu sắc của môi trường Christensen

Bảng 2. Đặc điểm hình thái và sinh hóa của các dòng nấm men phân lập

Dòng nấm men	Đặc điểm hình thái			Đặc điểm sinh hóa			Phân loại sơ bộ
	Hình dạng tế bào	Đặc điểm nảy chồi	Đặc điểm sinh bào tử	Glucose	Sucrose	Urea	
GX2.1	Cầu lớn	Đơn cực	1-2 bào tử hình tròn	+	+	-	<i>Saccharomyces</i>
GX4.1	Cầu nhỏ	Đơn cực	1-2 bào tử hình tròn	+	+	-	
GX1, GX2, GX3, GX5, BL8.1, BL7, VT5, VT6, TT4	Oval lớn	Đơn cực	1-2 bào tử hình tròn	+	+	-	
GX1.2, BL8, BL8.2, BL9, VT2, TT6.2, PH1	Oval nhỏ	Đơn cực	1-2 bào tử hình tròn	+	+	-	
BL5.2, TT6, TT6.1	Elip dài	Lưỡng cực	1-2 bào tử hình tròn	+	-	+	<i>Pichia</i>
BL5.1, BL3.2, BL5, BL6, VT3, VT7, TT1, TT3, TT5, PH2	Elip ngắn	Lưỡng cực	1-2 bào tử hình tròn	+	-	+	
BL3.1, VT2, VT4, PH2.1	Elip nhọn	Đa cực, lưỡng cực	1-2 bào tử hình tròn	+	-	+	<i>Hanseniaspora</i>

Chú thích: (+) phân giải hoặc lên men; (-) không phân giải hoặc không lên men

Kết quả phân lập dựa vào hình dạng, sinh hóa của nấm men và căn cứ vào khóa phân loại nấm men của Kurtzman và Fell (1998) [5], Lương Đức Phẩm (2006) [7] và Nguyễn Đức Lượng (2006) [11]: 35 dòng nấm men phân lập từ nguồn trái chùm ruột ban đầu được xếp thành 7 nhóm và định danh sơ bộ gồm 3 giống *Hanseniaspora*, *Pichia* và *Saccharomyces*. Kết quả của nghiên cứu này tương tự như kết quả của Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và cs. (2019) [4], Nguyễn Văn Vũ và cs. (2018) [13] cũng định danh sơ bộ gồm 3 giống nấm men này.

3.2. Tuyển chọn dòng nấm men có hoạt lực lên men ethanol cao từ các dòng nấm men phân lập

Mười tám dòng nấm men thuộc giống *Saccharomyces* được chọn để tiến hành khảo sát và so sánh với khả năng lên men với dòng nấm men đối chứng. Thí nghiệm được tiến hành đồng thời trong ống Durham và bình tam giác.

3.2.1. Tuyển chọn các dòng nấm men trong ống Durham

Chiều cao cột khí CO₂ trong ống nghiệm chứa ống Durham ở bảng 3 cho thấy cường độ lên men của các dòng nấm men ở từng thời điểm lên men khác nhau từ 6 giờ, 12 giờ, 18 giờ, 24 giờ, 30 giờ, 36 giờ, 42 giờ, 48 giờ và 54 giờ. Dòng ĐC, GX2 và VT2 có thời gian đẩy hết khí CO₂ trong ống Durham sớm nhất (30 giờ), tiếp đến là các dòng GX1, GX1.2, GX5, VT5 và VT6 đẩy hết cột khí CO₂ trong 36 giờ. Những dòng còn lại thì đẩy hết cột khí trong 42 giờ.

Quá trình lên men rượu sẽ tạo ra hai sản phẩm chính là rượu ethylic và CO₂, vì vậy có thể dựa vào thời gian đẩy hết ống Durham sớm nhất để xác định có hoạt lực lên men mạnh nhất. Tuy nhiên, do thời gian lên men trong chuông Durham ngắn, vì vậy, phương pháp đo chiều cao cột khí CO₂ bằng ống Durham chỉ là cơ sở ban đầu để xác định khả năng lên men của các dòng nấm men.

Bảng 3. Chiều cao cột khí CO₂ trung bình của các dòng nấm men (đơn vị: cm)

STT	Dòng nấm men	Thời gian quan sát (giờ)								
		6	12	18	24	30	36	42	48	54
1	GX1	0	0	0,57	1,53	2,57	3,0	-	-	-
2	GX1.2	0	0,3	0,53	1,13	2,2	3,0	-	-	-
3	GX2	0	0,3	0,87	1,93	3,0	-	-	-	-
4	GX2.1	0	0	0,1	0,33	0,83	1,7	3,0	-	-
5	GX3	0	0	0	0,33	1,13	2,1	3,0	-	-
6	GX4.1	0	0	0,23	0,43	1,0	1,7	3,0	-	-
7	GX5	0	0	0,4	0,77	1,37	3,0	-	-	-
8	BL7	0	0	0	0,33	0,97	1,77	3,0	-	-
9	BL8	0	0	0	0,5	1,07	2,1	3,0	-	-
10	BL8.1	0	0	0	0,17	0,47	1,0	3,0	-	-
11	BL8.2	0	0	0	0,13	0,73	2,77	3,0	-	-
12	BL9	0	0	0	0	0,27	1,13	3,0	-	-
13	VT2	0	0	0,07	0,47	3,0	-	-	-	-
14	VT5	0	0	0	0,43	0,83	3,0	-	-	-
15	VT6	0	0	0,07	0,6	1,33	3,0	-	-	-
16	TT4	0	0	0	0,13	0,8	1,6	3,0	-	-
17	TT6.2	0	0	0	0,1	0,37	1,6	3,0	-	-
18	PH1	0	0	0	0	0,2	0,83	3,0	-	-
19	ĐC	0	0,33	0,8	1,57	3,0	-	-	-	-

(Ghi chú: - : 0 cm, chiều cao cột khí CO₂ tối đa là 3 cm và số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại).

3.2.2. Tuyển chọn các dòng nấm men trong bình tam giác

Khả năng lên men được khảo sát với mật số nấm men là 10⁶ tế bào/mL dịch lên men, thời gian

ủ 14 ngày ở 30°C; pH=4,5 và độ Brix điều chỉnh 20°Brix. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

Sau 14 ngày lên men, kết quả cho thấy, các chủng nấm men đã tuyển chọn từ bình tam giác chia làm hai nhóm: (1) Các dòng nấm men có độ cồn trên

5% v/v gồm các dòng ĐC (5,84% v/v), GX2 (5,74% v/v), GX1 (5,52% v/v), GX1.2 (5,52% v/v) và VT2 (5,32% v/v); (2) các dòng nấm men cho độ cồn thấp

hơn 5% v/v gồm 14 dòng còn lại, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Bảng 4. Các chỉ tiêu pH, độ Brix và độ cồn sau lên men của 19 dòng nấm men

STT	Dòng nấm men	pH trung bình	Brix trung bình	Ethanol (% v/v)
1	GX1	4,72	7,00 ^a	5,52 ^{ab}
2	GX1.2	4,62	7,00 ^a	5,52 ^{ab}
3	GX2	4,56	6,83 ^a	5,74 ^a
4	GX2.1	4,69	7,00 ^a	4,19 ^{abcd}
5	GX3	4,44	7,67 ^{ab}	4,18 ^{abcd}
6	GX4.1	4,52	11,33 ^e	2,74 ^{bcd}
7	GX5	4,62	10,67 ^{de}	2,40 ^{cde}
8	BL7	4,51	11,33 ^e	2,74 ^{bcd}
9	BL8	4,66	7,17 ^a	4,55 ^{abcd}
10	BL8.1	4,59	9,33 ^{cd}	3,53 ^{abcde}
11	BL8.2	4,62	10,00 ^{cde}	1,30 ^e
12	BL9	4,46	13,33 ^g	1,78 ^{de}
13	VT2	4,68	7,17 ^a	5,32 ^{ab}
14	VT5	4,51	13,00 ^{fg}	2,75 ^{bcd}
15	VT6	4,54	11,17 ^e	3,17 ^{abcde}
16	TT4	4,64	7,00 ^a	3,74 ^{abcde}
17	TT6.2	5,30	9,00 ^{bc}	4,65 ^{abc}
18	PH1	4,52	11,50 ^{ef}	2,67 ^{bcd}
19	Đối chứng	4,82	7,17 ^a	5,84 ^a

Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ số mang các chữ cái khác nhau trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (p<0,05).

Dựa vào độ cồn sẽ lựa chọn 5 dòng nấm men ở nhóm 1 có độ cồn trên 5% v/v. So với dòng nấm men ĐC thì 4 dòng còn lại cho độ cồn khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, dòng nấm men GX2 có độ Brix thấp nhất (6,83°Brix) cho thấy lượng đường sót lại thấp và có khả năng đẩy cột khí trong ống Durham nhanh nhất.

Trong quá trình lên men, bình lên men của dòng nấm men GX2 có xuất hiện 1 lớp màng phía trên dịch lên men khác so với dòng ĐC. Có thể thấy rằng GX2 có thể thuộc dòng nấm men khác với *Saccharomyces cerevisiae*. Do đó, lựa chọn dòng nấm men GX2 để định danh bằng phương pháp giải trình tự với mong muốn tìm ra một dòng nấm men mới có khả năng lên men cho nồng độ ethanol cao.

Kết quả lên men ethanol của dòng nấm men GX2 có độ cồn cao hơn so với nghiên cứu của Mishra (2012) [9]. Mishra và cs (2012) [9] đã sử dụng *Saccharomyces cerevisiae* và *Candida albicans* để lên men vỏ khóm và chỉ thu lần lượt là 1,56% v/v và 1,08% v/v ethanol. Bên cạnh đó, đối với nghiên cứu của Itelima và cs (2013) [3]

cũng trên vỏ khóm sử dụng hai dòng nấm men *Aspergillus niger* và *Saccharomyces cerevisiae* thu được hàm lượng ethanol 8,34% v/v cao hơn so với kết quả trong nghiên cứu này.

3.2.3. Định danh bằng phương pháp giải trình tự gene

Dòng nấm men GX2 được định danh bằng phương pháp giải và phân tích trình tự gen 28S rRNA với cặp mồi ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' và ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' do Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (thành phố Cần Thơ) thực hiện. Kết quả giải trình tự trên đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men GX2 như sau:

```
AAAGAAAGACAAATAGGAATTTGTCTGAGCT
CGGAGAGAGACATCTCTGGGGAGGACCAGTGTA
GACACTCAGGAGGCTCCTAAAATATTTTCTCTGC
TGTGAATGCTATTTCTCCTGCCTGCGCTTAAGTG
CGCGGTTGGTGGGTGTTCTGCAGTGGGGGGAG
GGAGCTGACAAAGACCTGGGAGTGTGCGTGGAT
CTCTCTATTCAAAGGAGGTGTTTTATCACACGA
CTCGACACTTTCTAATTACTACACACAGTGGAGT
```

TTACTTACTACTATTCTTTTGTTCGTTGGGGGA
 AAGCTCTCTTTTCGGGGGGGAGTTCTCCCAGTGG
 ATGCAAACACAAACAAATATTTTTTATTTTAACTA
 ATTCAAGTCAACACAAGATTTCTTTTAGTAGAAAA
 CAACTTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGT
 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCCA
 TACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCAT
 CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTAT
 TCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCC
 TTCTCAAACACGTTGTGTTTGGTAGTGAGTGATA
 CTCTCGTTTTTGAGTTAACTTCAAATTGTAGGCC
 ATATCAGTATGTGGGACACGAGCGCAAGCTTCT
 CTATTAATCTGCTGCTCGTTTGC GCGAGCGGCG

GGGGTTAATACTGTATTAAGGTTTTACCAACTCGG
 TGTTGATCTAGGGAGGGATAAGTGAGTGTTTTG
 TGCGTGCTGGGCAGACAGACGTCTTTAAGTTTG
 ACCTCAAATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACCT
 AAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAGG

Trình tự đoạn gen được giải gồm 862 base nitrogen và đoạn gen này được so sánh với các gen 28S rRNA của nấm men trong ngân hàng gen trên NCBI với phần mềm BLASTN. Kết quả nhận được cho thấy đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men GX2 có độ tương đồng đến 99,88% so với trình tự gen 28S rRNA của *Candida glabrata*.

[*Candida*] *glabrata* strain FC6848 small subunit ribosomal RNA gene. partial sequence: internal transcribed spacer 1. 5.8S ribosomal RNA gene. and internal transcribed spacer 2. complete sequence: and large subunit ribosomal RNA gene. partial sequence

Sequence ID: MH628213.1 Length: 884 Number of Matches: 1

Range: 1: 45 to 884

Query	Expect	Identical+	Gaps	Str. 1
1546 bits (837)	0.0	840/841 (99%)	1/841 (0%)	Plus Plus
Query 19	ATTTGCTGAGCTCGGAGAGAGACATCTCTGGGGAGGACACAGTGTAGACACTCAGGAGGC	78		
Subject 45	ATTTGCTGAGCTCGGAGAGAGACATCTCTGGGGAGGACACAGTGTAGACACTCAGGAGGC	104		
Query 79	TCCTAAAATATTTTCTCTCTCTGTAATGCTATTTCTCTGCTGCGCTTAACTGCGCGGT	138		
Subject 105	TCCTAAAATATTTTCTCTCTCTGTAATGCTATTTCTCTGCTGCGCTTAACTGCGCGGT	164		
Query 139	TGTTGGGTGTTCTGCACTGGGGGAGGGAGCTGACAAAGACCTGGGATGTGCTGGATC	188		
Subject 165	TGTTGGGTGTTCTGCACTGGGGGAGGGAGCTGACAAAGACCTGGGATGTGCTGGATC	224		

Hình 4. So sánh trình tự gen 28S rRNA của GX2 với *Candida glabrata* (MH628213.1)

Candida glabrata trước đây được gọi là *Torulopsis glabrata*. *Candida glabrata* cũng được tìm thấy trong thức ăn và đồ uống lên men và có thể sản xuất ethanol. Phân tích trình tự cho thấy *Candida glabrata* có độ tương đồng cao nhất với *Saccharomyces cerevisiae* và ít tương đồng hơn với *Candida albicans*. Vì *Saccharomyces cerevisiae* được biết đến là nguồn nấm men chủ yếu sử dụng trong lên men thực phẩm hoặc đồ uống, nên cần nghiên cứu những điểm tương đồng với *Candida glabrata*. Hiện tại, đã biết rằng hai loài nấm men này có mối liên hệ với nhau về các protein quan trọng [2].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cho thấy có 35 dòng nấm men được phân lập từ trái chùm ruột thu tại các xã Giai Xuân và Tân Thới (Phong Điền, Cần Thơ), thị trấn Phú Hòa và xã Vĩnh Trạch (Thới Sơn, An Giang), huyện Vĩnh Lợi (Bạc Liêu). Dựa trên mô tả đặc điểm hình thái và sinh hóa bước đầu đã xác định được 3 giống nấm men *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia*. Kết quả tuyển chọn từ 18 dòng nấm men

phân lập từ trái chùm ruột, trong đó dòng nấm men GX2 (Giai Xuân - Cần Thơ) có hoạt lực lên men cho nồng độ ethanol cao nhất (5,74% v/v) và tiến hành giải trình tự đã xác định là loài *Candida glabrata*. Dòng nấm men này có tiềm năng ứng dụng vào quy trình sản xuất ethanol cho những nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alfenore, S., C. Molina-Jouve, S.E. Guillouet, J. L. Uribebarrea, G. Goma and L. Benbadis. (2002). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 67-72.
- Bialkova, A., J. Šubík. (2006). Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiol*, pp 51, 3-20.
- Itelima, J. et al. (2013). Bioethanol production from banana, plantain and pineapple peels by simultaneous saccharification and fermentation process. *International Journal of Environmental Science and Development*, 4(2), P.213-216.

4. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Đào Thanh Tâm, Nguyễn Thị Minh Trâm, Văn Thị Hồng Huệ, Dương, Thị Mai Thảo (2019). Phân lập và tuyển chọn dòng nấm men (*Sacharomyces* sp.) lên men rượu vang trái trám (*Syzygium cumini*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 2019, số 18 tr.59-66.

5. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (1998). *The Yeast: A Taxonomic study*. 4th ed. Elsevier Science, 1076 pages.

6. Korabecna, M. (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 Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.), 783-787.

7. Lương Đức Phẩm (2006). *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 332 trang.

8. Morton, J., Morton, J. F., Miami, F. L. (1987). Otaheite Gooseberry. In *Fruits of Warm Climates*, pp. 217-219.

9. Mishra, J. *et al.* (2012). A comparative study of ethanol production from various agro residues by

using *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 3(2), p.12-17.

10. Nguyễn Đức Lượng (2003). *Công nghệ vi sinh vật - Tập 3. Thực phẩm lên men truyền thống*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 178 trang.

11. Nguyễn Đức Lượng (2006). *Thí nghiệm công nghệ sinh học*. Tập 2. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia thành phố Hồ Chí Minh, 461 trang.

12. Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng (2007). *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn ethylic*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 284 trang.

13. Nguyễn Văn Vũ và Nguyễn Văn Thành (2018). Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang dâu Hạ Châu (*Baccaurea ramiflora* L.). *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*: 54 7B : 22-32.

14. Phạm Trần Ngọc Diễm (2007). *Nghiên cứu chế biến rượu vang từ phụ phẩm khóm*. Luận văn kỹ sư. Khoa Nông nghiệp & TNTN, Trường Đại học An Giang.

ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF YEAST STRAIN FOR (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) ETHANOL FERMENTATION

Lam Thao Nhi, Nguyen Ngoc Phuong Trang, Tran Thi Mai Thi,

Nguyen Thanh Thao Nguyen, Huynh Ngoc Thanh Tam

Summary

The study was carried out on the basis of isolation and selection of high ethanol fermented yeast from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels fruit in Can Tho, An Giang, Bac Lieu. The research results showed that 35 yeast strains were isolated from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels fruit. Based on the classification keys of yeasts (morphology, physiology, and biochemistry), they were divided into 7 groups: big spherical, small spherical, big oval, small oval, long elliptical, short elliptical and pointed elliptical. The yeast strains were generally characterized as three genera: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* and *Pichia*. The isolated yeast strain from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels fruit in Giai Xuan (Phong Dien - Can Tho) (GX2) which had the best ethanol fermented activity was selected. The highest ethanol content (5.74% v/v) and low apparent refractometer Brix (ARB) (6.83°Brix) were obtained after 14 days of fermentation with initial parameters: 20°Brix, pH 4.5 and 10⁶ cell/mL of yeast cell density. The results of DNA sequencing have identified the yeast strain GX2 being belong to *Candida* family and application for industrial alcohol production fermentation.

Keywords: *Activity, candida, ethanol fermentation isolation, Phyllanthus acidus (L.) Skeels fruit, yeast strain.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Việt Anh

Ngày nhận bài: 11/8/2021

Ngày thông qua phản biện: 11/9/2021

Ngày duyệt đăng: 18/9/2021