



DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.073

## TUYỂN CHỌN NẤM MEN CHỊU NHIỆT VÀ NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN LÊN MEN RƯỢU VANG KHÓM

Huỳnh Xuân Phong<sup>1</sup>, Danh Minh Lợi<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Thạnh<sup>1</sup>, Lê Phan Đình Quý<sup>1</sup>, Bùi Hoàng Đăng Long<sup>1</sup>, Pornthap Thanonkeo<sup>2</sup>, Mamoru Yamada<sup>3</sup> và Ngô Thị Phương Dung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ*

<sup>2</sup>*Khoa Công nghệ, Trường Đại học Khon Kaen, Khon Kaen, Thái Lan*

<sup>3</sup>*Khoa Nông nghiệp, Đại học Yamaguchi, Yamaguchi, Nhật Bản*

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/12/2016

Ngày nhận bài sửa: 17/03/2017

Ngày duyệt đăng: 30/08/2017

### Title:

*Selection of thermotolerant yeasts and study on fermentation conditions for pineapple wine production*

### Từ khóa:

*Khóm, lên men ethanol, nấm men chịu nhiệt, rượu vang khóm, S. cerevisiae*

### Keywords:

*Ethanol fermentation, pineapple, pineapple wine, Saccharomyces cerevisiae, thermotolerant yeast*

### ABSTRACT

*The objectives of this study were to select and to identify thermotolerant yeasts for their application in pineapple fermentation at high temperature, and to study the optimum conditions for pineapple wine production. Seven isolates of thermotolerant yeasts (Y8, Y32, Y34, Y54, Y80, and Y81) were selected based on their high fermentative capacity with the ethanol content produced ranging from 4.17% to 7.45% (v/v) at 37°C. The isolate Y8 was a target selected yeast strain as having the highest ethanol contents at 37°C and 40°C of 7.45% (v/v) and 4.18% (v/v), respectively. The strains of Y8, Y32, Y34, Y54, Y80, and Y81 were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and YVN7 was recognized as *Candida glabrata*. The optimum fermentation conditions for pineapple wine production by *S. cerevisiae* Y8 at 37°C were as follows: 5 days of fermentation, 18.6°Brix of initial sugar and yeast inoculum density of 10<sup>7</sup> cells/mL, with ethanol content of 10.03% (v/v) and fermentative yield of 80.85% were achieved.*

### TÓM TẮT

*Mục tiêu của nghiên cứu là tuyển chọn và định danh các dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt, chịu cồn và khảo sát các điều kiện lên men rượu vang khóm. Kết quả đã tuyển chọn được 7/23 dòng nấm men (Y8, Y32, YVN7, Y81, Y34, Y54 và Y80) có khả năng lên men tốt từ dịch khóm ở 37°C, hàm lượng ethanol sinh ra trong khoảng 4,17-7,45% (v/v). Bảy dòng này được định danh thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* (Y8, Y32, Y34, Y54, Y80 và Y81) và loài *Candida glabrata* (YVN7). Dòng nấm men *S. cerevisiae* Y8 được tuyển chọn do có khả năng lên men tốt nhất, với lượng ethanol sinh ra cao nhất ở 37°C và 40°C lần lượt là 7,45% (v/v) và 4,18% (v/v). Điều kiện lên men rượu vang khóm thích hợp của dòng *S. cerevisiae* Y8 ở 37°C với thời gian lên men 5 ngày, hàm lượng đường 18,6°Brix và mật số nấm men 10<sup>7</sup> tế bào/mL, hàm lượng ethanol đạt 10,03% (v/v) với hiệu suất lên men đạt 80,85%.*

Trích dẫn: Huỳnh Xuân Phong, Danh Minh Lợi, Nguyễn Ngọc Thạnh, Lê Phan Đình Quý, Bùi Hoàng Đăng Long, Pornthap Thanonkeo, Mamoru Yamada và Ngô Thị Phương Dung, 2017. Tuyển chọn nấm men chịu nhiệt và nghiên cứu điều kiện lên men rượu vang khóm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 51b: 7-15.

## 1 GIỚI THIỆU

Nấm men có tiềm năng rất lớn trong việc lên men chuyển hóa đường thành ethanol (một thành phần quan trọng trong rượu vang nói riêng và sản phẩm lên men ethanol nói chung). Tuy nhiên, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của nấm men như nguồn carbon, nguồn nitơ, pH, đặc biệt là nhiệt độ và hàm lượng ethanol (Keating *et al.*, 2006). Do đó, đặc tính chịu nhiệt và chịu ethanol của nấm men rất quan trọng trong việc tổng hợp ethanol thông qua quá trình lên men được thực hiện bởi nấm men. Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sự lên men tạo ethanol của nấm men (Heard và Fleet, 1988). Hiện nay, hiệu ứng nhà kính đang làm cho trái đất ấm dần lên và nhiệt độ vẫn tiếp tục tăng dần trong tương lai (Isaac và Soden, 2000). Việt Nam có khí hậu nhiệt đới gió mùa, nhiệt độ tăng khá cao vào mùa khô, nhiệt độ trung bình ở miền Nam có thể đến 33-35°C, càng gây khó khăn trong việc sản xuất ethanol bằng nấm men. Hơn nữa, sử dụng nấm men chịu nhiệt độ cao có thể giúp cho quá trình lên men diễn ra nhanh, nguy cơ nhiễm vi sinh vật giảm, giảm nồng độ oxy, chất khí khác,... (Roehr, 2001) và giảm được chi phí đầu tư cho thiết bị làm mát mang lại lợi ích kinh tế (Limtong *et al.*, 2007; Abdel-Banat *et al.*, 2010).

*Saccharomyces cerevisiae* là chủng nấm men truyền thống được ứng dụng trong lên men rượu và được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp lên men ethanol (Radecka *et al.*, 2015). Hầu hết các chủng *S. cerevisiae* chịu được giá trị pH thấp, hàm lượng đường và nồng độ ethanol cao nhưng hiệu suất lên men ở nhiệt độ trên 35°C khá thấp (Nevoigt, 2008). *Kluyveromyces marxianus* có thể phát triển ở nhiệt độ 47°C, thậm chí là 52°C (Banat *et al.*, 1992) và sản sinh ethanol ở nhiệt độ cao trên 40°C (Fonseca *et al.*, 2008). Hơn nữa, *K. marxianus* còn có thuận lợi là tốc độ phát triển nhanh và khả năng sử dụng rộng rãi các cơ chất trong công nghiệp như đường mía, bắp, nước trái cây, ri đường,... (Nonklang *et al.*, 2008). Chủng nấm men *K. marxianus* DMKU 3-1042 được phân lập từ đất trồng mía có khả năng lên men và chịu nhiệt đến 45°C (Limtong *et al.*, 2007) và được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng lên men của nấm cả về cơ chế sinh hóa và sinh học phân tử (Nonklang *et al.*, 2008; Rodrussamee *et al.*, 2011; Lertwattanasakul *et al.*, 2015).

Trái cây tươi không những là sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao mà còn là thực phẩm tươi phục vụ trực tiếp trong đời sống hằng ngày như cung cấp vitamin, acid hữu cơ, muối khoáng cho con người. Trái cây được sử dụng chủ yếu ở dạng tươi, bên cạnh đó phát triển các sản phẩm từ trái cây cũng có

ý nghĩa hết sức quan trọng nhằm nâng cao giá trị sử dụng của các loại trái cây và phù hợp với nhu cầu, thị hiếu của người tiêu dùng, đồng thời tạo ra ngành sản xuất mới góp phần tạo việc làm ổn định và tăng thu nhập làm cho người dân. Từ lâu trái cây đã được chế biến để tạo ra các sản phẩm khác nhau nhưng vẫn giữ được giá trị dinh dưỡng và cung cấp năng lượng cho con người như: làm mứt, trái cây sấy khô, dịch trái cây lên men để tạo ra các sản phẩm rượu, rượu vang trái cây,... Một số sản phẩm rượu vang trái cây đã được nghiên cứu như rượu vang nho (Heard và Fleet, 1988); cam (Selli *et al.*, 2003), xoài (Akubor, 1996), dưa hấu (Ngô Thị Phương Dung và *ctv.*, 2011),...

Khóm là loại trái cây có dịch quả rất giàu dinh dưỡng và rất tốt cho sức khỏe con người. Trong các năm qua, khóm đã trở thành một loại hoa quả có giá trị xuất khẩu cao, được nhiều thị trường trong và ngoài nước ưa chuộng nhất là thị trường các nước châu Âu, các nước thuộc vùng khí hậu ôn đới. Việt Nam là một trong những nước trồng khóm chủ yếu ở khu vực Đông Nam Á và trên thế giới, sản lượng năm 2013 đạt đến 590.000 tấn/năm, chiếm 2,38% sản lượng khóm trên thế giới (FAO, 2014). Sản lượng khóm tăng trong những năm qua đã đặt ra những tiềm năng và thách thức mới cho ngành công nghiệp bảo quản và chế biến từ nguồn nguyên liệu quý báu này. Sản xuất rượu vang khóm nhằm đa dạng hóa sản phẩm cũng như tăng hiệu quả đối với loại cây trồng này, đặc biệt trong trường hợp vào mùa thu hoạch chính và chưa có đầu ra bền vững.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tuyển chọn, định danh các chủng nấm men chịu nhiệt triển vọng có khả năng lên men ethanol từ dịch ép khóm và xác định các điều kiện lên men rượu vang khóm ở nhiệt độ cao.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Nguyên vật liệu và hóa chất

Nguyên liệu: Khóm (giống Queen) chín được mua ở chợ Cái Răng, thành phố Cần Thơ.

Hai mươi ba (23) dòng nấm men chịu nhiệt đã được phân lập từ nhiều nguồn nguyên liệu (ca cao, trái cây, mía và đất trồng mía, men rượu,...) và sơ tuyển dựa vào đặc tính chịu nhiệt, khả năng lên men ethanol được lưu trữ ở phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ (Ngô Thị Phương Dung *et al.*, 2015) và chủng *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 (Trường Đại học Yamaguchi, Nhật Bản).

Hóa chất: yeast extract, malt extract, peptone, D-glucose, agar, ethanol, NaOH,... được mua từ các sản phẩm thương mại của Merck (Đức) và HiMedia Laboratories (Ấn Độ).

Môi trường YPD (yeast extract 0,5%; peptone 0,5%; D-glucose 2,0%) và môi trường YPD agar (môi trường YPD bổ sung 1,5 g/L agar) (Limtong *et al.*, 2007).

## 2.2 Thử nghiệm khả năng lên men rượu vang khóm ở 37°C

Nấm men được tăng sinh khối trong 100 mL môi trường tăng sinh YPD đã được khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Ủ lactic 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng (28-32°C) trong 24 giờ (mật số đạt  $10^8$  tế bào/mL). Nước ép khóm được thanh trùng bằng  $\text{NaHSO}_3$  (140 mg/L trong 2 giờ). Chủng 1 mL (mật số  $10^8$  tế bào/mL) các dòng nấm men và chủng *K. marxianus* vào 99 mL nước ép khóm trong bình tam giác 250 mL, đậy kín bằng water-lock và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 ngày. Kiểm tra dịch lên men với các chỉ tiêu như pH, Brix, hàm lượng đường và hàm lượng ethanol để tính toán hiệu suất lên men.

## 2.3 Thử nghiệm khả năng lên men rượu vang khóm ở 40°C

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với các dòng nấm men được tuyển chọn từ kết quả lên men ở 37°C. Thử nghiệm được thực hiện ở 40°C và lặp lại 3 lần. Nước ép khóm và dịch sinh khối nấm men được chuẩn bị và thực hiện tương tự như thử nghiệm ở 37°C với các dòng nấm men đã được tuyển chọn. Ủ lactic 150 vòng/phút trong 5 ngày lên men ở nhiệt độ 40°C trong tủ ủ lactic (Incucell 111, Đức).

## 2.4 Định danh các chủng nấm men chịu nhiệt được tuyển chọn

Các dòng nấm men chịu nhiệt tuyển chọn được tăng sinh trong 10 mL môi trường YPD ở 37°C trong 24 giờ. Nấm men được trích DNA và khuếch đại trình tự vùng D1/D2 trên 26S rDNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') và NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC GG-3') (O'Donnell, 1993). Sản phẩm PCR được giải trình tự bằng hệ thống giải trình tự ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA). Dựa trên trình tự 26S rDNA để phân tích và so sánh với trình tự các chủng nấm men trên ngân hàng dữ liệu NCBI. Xây dựng cây phả hệ dựa trên trình tự đoạn gene 26S rDNA bằng cách so sánh multiple alignment theo chương trình CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) và thiết lập theo phương pháp neighbor-joining trong chương trình MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) với chỉ số bootstrap 1.000 lần lặp lại.

## 2.5 Khảo sát điều kiện lên men rượu vang khóm bằng nấm men chịu nhiệt

Sử dụng 1 dòng nấm men có khả năng lên men mạnh nhất từ thử nghiệm lên men ở 37°C và 40°C.

Nấm men được tăng sinh khối trong môi trường YDP đến khi mật số đạt  $10^8$  tế bào/mL. Ly tâm để thu sinh khối nấm men, mật số đạt  $10^9$  tế bào/mL. Pha loãng dịch nấm men với các mật số  $10^9$ ,  $10^8$  và  $10^7$  tế bào/mL (mật số nấm men sau khi chủng vào bình tam giác lần lượt đạt  $10^7$ ,  $10^6$  và  $10^5$  tb/mL). Thí nghiệm được tiến hành với 3 nhân tố: mật số giống chủng ( $10^5$ ,  $10^6$  và  $10^7$  tb/mL), hàm lượng đường theo Brix (14,2; 18,6; 22,8°Brix) và thời gian lên men (5, 7 và 9 ngày). Nước ép khóm được thanh trùng bằng  $\text{NaHSO}_3$  (140 mg/L trong 2 giờ). Mỗi thí nghiệm thực hiện được thực hiện với 99 mL nước ép khóm trong bình tam giác 250 mL ở 37°C. Các chỉ tiêu phân tích như pH, Brix, hàm lượng đường và ethanol sau khi lên men ở các mốc thời gian bố trí thử nghiệm.

## 2.6 Phân tích và xử lý kết quả

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 đường khử được phân tích thông qua phản ứng với acid dinitrosalicylic (phương pháp DNS, Bennett, 1971) và hàm lượng ethanol được xác định bằng phương pháp chưng cất (Nguyễn Đình Thường 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 VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Khả năng lên men rượu vang khóm ở 37°C

Kết quả khả năng lên men của 23 dòng nấm men chịu nhiệt và chủng *K. marxianus* DMKU 3-1042 (đối chứng) trong môi trường dịch khóm với pH 4,5, hàm lượng đường ở 20°Brix được thể hiện ở Bảng 1. Sau 5 ngày lên men, pH và Brix của dịch khóm giảm, pH kết thúc lên men trong khoảng 3,75-4,24 (pH ban đầu là 4,5) và Brix ở mức 10,0-16,5% (Brix ban đầu là 20%). Hàm lượng ethanol dao động khá lớn giữa các dòng nấm men, trong khoảng 1,71-7,40% (v/v). Hiệu suất lên men dao động trong khoảng 30,82-74,56%, tương ứng với lượng đường tiêu thụ 83,41-178,03 g. Dòng nấm men Y8 (được phân lập từ ca cao) có khả năng với hàm lượng ethanol đạt cao nhất là 7,45% (v/v), khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%, so với các chủng còn lại, tiếp đến là dòng Y32 với hàm lượng ethanol đạt 7,01% (v/v). Hiệu suất lên

men của chủng Y8 là 74,56% (v/v) khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với hầu hết các dòng nấm men còn lại (trừ dòng Y32, Y34 và Y80 có hiệu suất là 61,9%, 60,55% và 59,77%). Ngoài ra, các chủng nấm men có khả năng lên men

khá tốt như dòng YVN7, Y81, Y34, Y54 và Y80 với hàm lượng ethanol sinh ra tương đối cao lần lượt là 6,06%; 5,11%; 5,11%; 4,60% và 4,37% (v/v) với hiệu suất lên men tương ứng 56,62%; 51,30%; 55,57% và 59,77%.

**Bảng 1: Kết quả sau lên men của các dòng nấm men trong dịch khóm ở 37°C**

Chủng nấm men	pH sau lên men	Brix sau lên men	Ethanol (% v/v)	Đường sử dụng (g/L)	Hiệu suất lên men (%)
Y8	4,01	10,00	7,45 <sup>a1</sup>	154,48	74,56 <sup>a</sup>
Y29	4,12	15,57	3,07 <sup>fg</sup>	96,86	51,74 <sup>bcdefg</sup>
Y31	4,10	15,37	3,37 <sup>efg</sup>	130,07	40,97 <sup>defgh</sup>
Y32	4,08	11,87	7,01 <sup>ab</sup>	178,03	61,90 <sup>ab</sup>
Y33	4,09	15,47	2,99 <sup>g</sup>	119,12	39,42 <sup>fgh</sup>
Y34	4,11	14,00	5,11 <sup>cd</sup>	130,42	60,55 <sup>abc</sup>
Y35	4,13	15,53	3,21 <sup>fg</sup>	112,56	44,21 <sup>bcdefgh</sup>
Y37	4,14	15,73	2,96 <sup>g</sup>	115,75	39,40 <sup>fgh</sup>
Y38	4,08	15,43	3,45 <sup>efg</sup>	130,50	41,10 <sup>defgh</sup>
Y39	4,09	15,33	3,28 <sup>fg</sup>	95,91	56,16 <sup>bcdef</sup>
Y42	4,06	15,53	3,25 <sup>fg</sup>	105,14	47,95 <sup>bcdefgh</sup>
Y47	4,14	15,70	3,23 <sup>fg</sup>	119,98	41,51 <sup>defgh</sup>
Y53	4,14	15,47	3,31 <sup>fg</sup>	125,24	40,71 <sup>efgh</sup>
Y54	3,75	14,40	4,60 <sup>de</sup>	128,43	55,57 <sup>bcdef</sup>
Y80	4,09	14,20	4,37 <sup>def</sup>	112,99	59,77 <sup>abcd</sup>
Y81	4,02	12,63	5,11 <sup>cd</sup>	153,88	51,30 <sup>bcdefg</sup>
Y88	4,11	15,47	3,10 <sup>fg</sup>	138,27	34,62 <sup>gh</sup>
Y104	4,04	15,50	3,27 <sup>fg</sup>	116,10	43,48 <sup>bcdefgh</sup>
YVN3	4,12	15,57	3,37 <sup>efg</sup>	126,11	41,89 <sup>cdefgh</sup>
YVN7	4,24	12,07	6,06 <sup>bc</sup>	164,49	56,62 <sup>bcdef</sup>
YVN8	4,09	17,07	3,55 <sup>efg</sup>	100,57	55,14 <sup>bcdef</sup>
YVN12	4,12	17,97	1,71 <sup>h</sup>	86,77	30,82 <sup>j</sup>
YVN30	4,16	16,50	2,95 <sup>g</sup>	83,41	56,94 <sup>bcdef</sup>
<i>K.marxianus</i>	3,94	11,83	6,60 <sup>ab</sup>	174,93	58,32 <sup>abcde</sup>
CV (%)			16,67		19,21

<sup>1</sup> Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% (p<0,05)

Theo nghiên cứu của Santoshkumar và Patil (2006), hầu hết các dòng nấm men được phân lập từ trái khóm và lên men trong dịch khóm ở 37°C đạt hàm lượng ethanol từ 5,20-7,40% (v/v) và dòng *S. ellipsoideus* 101 đạt cao nhất đến 8,33% (v/v). Hiệu suất lên men ở 37°C trong cơ chất dịch khóm của các dòng nấm men khá thấp, theo nghiên cứu của Alain *et al.* (1987), khi lên men ethanol từ dịch khóm, hiệu suất lên men ethanol thay đổi đáng kể theo nhiệt độ, khảo sát lên men ở các mức nhiệt độ 25°C, 30°C, 32°C và 35°C thu được hiệu suất lên men ethanol lần lượt là 59%, 83%, 69% và 89%. Hàm lượng ethanol đạt được ở mức 2,72-4,70% và 3,10-5,50% (w/v) khi lên men ở 30°C và 35°C bởi dòng *S. cerevisiae* CMI. Khi đạt được hiệu suất lên men cực đại ở nhiệt độ nhất định nếu càng tăng nhiệt độ, hiệu suất sẽ theo chiều hướng giảm.

Dựa vào kết quả phân tích thống kê, 7 dòng có khả năng lên men ethanol cao ở 37°C trong dịch

khóm là Y8, Y32, Y34, Y54, Y80, Y81 và YVN7, với hàm lượng ethanol sau lên men trong khoảng 4,37-7,45% (v/v) và hiệu suất lên men đạt 54,30-74,56%. Bảy dòng này được tuyển chọn để tiếp tục thử nghiệm khả năng lên men ở 40°C trong dịch khóm.

**3.2 Khả năng lên men rượu vang khóm ở 40°C**

Kết quả lên men ở 40°C trong dịch khóm của 7 dòng nấm men và chủng *K. marxianus* với pH 4,5 và hàm lượng đường là 215 g/L được thể hiện ở Bảng 2. Kết quả cho thấy khi các dòng nấm men lên men trong cơ chất dịch khóm ở điều kiện nhiệt độ cao (40°C) tạo ra độ cồn khá thấp vì nhiệt độ ức chế lên khả năng hoạt động của chúng. Dòng nấm men Y8 lên men với hàm lượng ethanol và hiệu suất lên men cao nhất lần lượt là 4,18% (v/v) và 56,38%, lượng đường tiêu thụ 116,40 g. Kết quả thống kê cho thấy lượng ethanol và hiệu suất lên

men của dòng nấm men Y8 khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các dòng nấm men còn lại (trừ chủng Y34 với hiệu suất lên men đạt 42,8%). Các dòng nấm men Y34, Y54, Y80, Y81,

YVN7 và *K. marxianus* sinh ra độ cồn khá thấp, trong khoảng 1,14-2,78% (v/v) và hiệu suất chỉ đạt 23,95-42,78%. Riêng dòng nấm men Y32 không có khả năng lên men ở nhiệt độ 40°C.

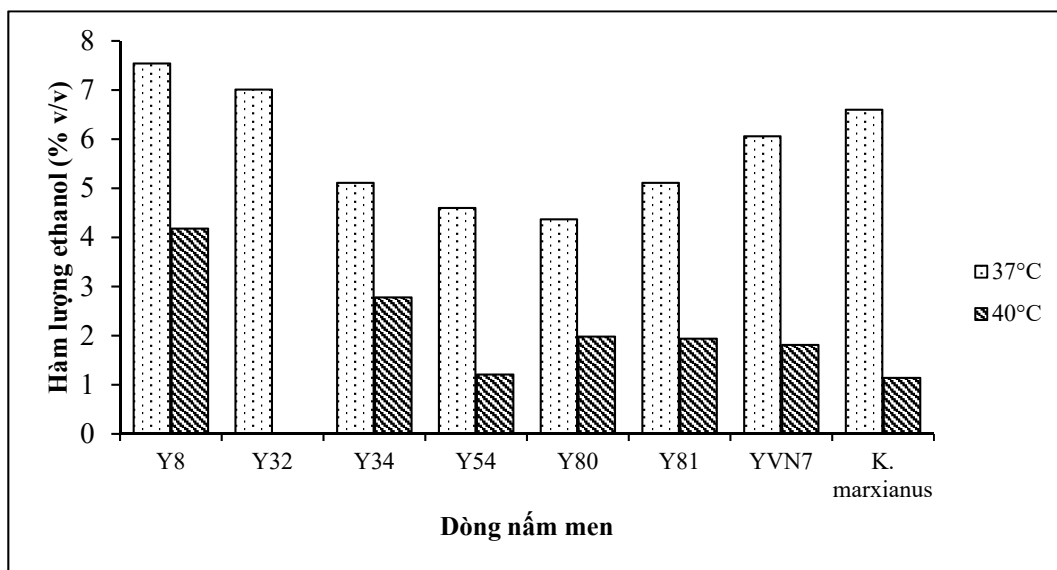
**Bảng 2: Kết quả sau lên men của các dòng nấm men trong dịch khóm ở 40°C**

Chủng nấm men	pH sau lên men	Brix sau lên men	Ethanol (% v/v)	Đường sử dụng (g/L)	Hiệu suất lên men (%)
Y8	4,04	15,60	4,18 <sup>a 1</sup>	116,40	56,38 <sup>a</sup>
Y32	4,17	20,00	0 <sup>d</sup>	74,91	0 <sup>d</sup>
Y34	4,12	17,30	2,78 <sup>b</sup>	98,21	42,78 <sup>ab</sup>
Y54	4,10	18,73	1,21 <sup>cd</sup>	78,28	23,95 <sup>c</sup>
Y80	4,10	18,27	1,98 <sup>bc</sup>	82,51	35,11 <sup>bc</sup>
Y81	4,08	18,23	1,94 <sup>bc</sup>	89,75	33,44 <sup>bc</sup>
YVN7	4,06	18,57	1,81 <sup>bc</sup>	87,77	31,50 <sup>bc</sup>
<i>K.marxianus</i>	4,10	19,17	1,14 <sup>cd</sup>	64,39	29,12 <sup>bc</sup>
CV (%)			11,77		19,80

<sup>1</sup> Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% (p<0,05)

Kết quả cho thấy sự ảnh hưởng rất lớn của nhiệt độ đến khả năng lên men của nấm men (Hình 1). Nhiệt độ tối ưu để lên men ethanol khoảng 25-30°C và hàm lượng ethanol giảm ở 40°C, nhiệt độ càng cao nấm men càng bị ức chế và giảm hoạt tính lên men (Tahir *et al.*, 2010). Kết quả nghiên cứu của Limtong *et al.* (2007) trên dịch ép nước mía cũng thấy rằng có sự thay đổi hàm lượng ethanol khi thay đổi nhiệt độ lên men như dòng *K. marxianus*

DKMU 3-1042 ở 37°C có ethanol là 8,70% (v/v) và ở 40°C thì hàm lượng ethanol giảm xuống 6,78% (v/v). Kết quả nghiên cứu trên 2 dòng nấm men *S. cerevisiae* và *S. paradoxus* phân lập từ ca cao có khả năng chịu nhiệt cho thấy khi lên men trong ri đường với hàm lượng ethanol đạt 7,36% và 7,40% (v/v) ở 30°C nhưng giảm xuống còn 4,15% và 3,92% (v/v) ở 40°C (Phong *et al.*, 2016).



**Hình 1: So sánh hàm lượng ethanol (% v/v) khi lên men ở nhiệt độ 37°C và 40°C**

Kết quả lên men ở 37°C cũng như ở 40°C được tổng hợp và so sánh ở Hình 1 cho thấy dòng nấm men Y8 có khả năng lên men tốt ở cả nhiệt độ 37°C (hàm lượng ethanol đạt 7,45% (v/v) với hiệu suất

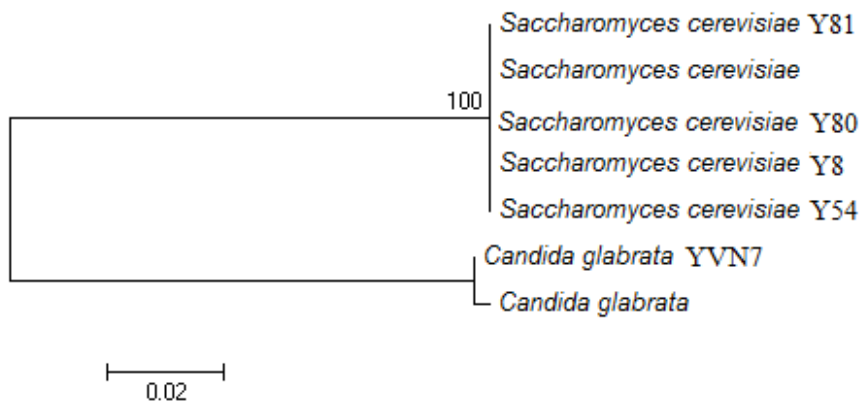
lên men 74,56%) và 40°C (ethanol đạt 4,18% (v/v) với hiệu suất 56,38%) nên được chọn để xác định điều kiện lên men tối ưu rượu vang khóm ở 37°C.

### 3.3 Định danh nấm men chịu nhiệt được tuyển chọn

Các dòng nấm men Y8, Y32, Y34, Y54, Y80 và Y81 được xác định là loài *S. cerevisiae* với mã số và độ tương đồng lần lượt là Y8 (mã số: KR014240.1; độ tương đồng 100%), Y32 (mã số: KF442632.1; độ tương đồng 96%), Y34 (mã số: KP998094.1; độ tương đồng 97%), Y54 (mã số: CP011558.1; độ tương đồng 100%), Y80 (mã số: KR014239.1; độ tương đồng 100%) và Y81 (mã

số: KR014239.1; độ tương đồng 100%) và YVN7 được xác định là loài *C. glabrata* (mã số: JN032660.1; độ tương đồng 100%).

Mối quan hệ di truyền của các dòng nấm men chịu nhiệt được xác định bằng cách vẽ cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen vùng D1/D2 trên 26S rDNA. Kết quả cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6 (theo thông số Neighbor – Joining) của 7 dòng nấm men chịu nhiệt tuyển chọn được thể hiện ở Hình 2.



Hình 2: Mối quan hệ di truyền của các chủng nấm men chịu nhiệt

Dựa vào sự phân nhánh trên cây phát sinh loài cho thấy cây phát sinh loài phân ra thành 2 nhánh riêng biệt, nhánh thứ nhất bao gồm các dòng nấm men *S. cerevisiae* Y8, Y54, Y80 và Y81 có mối quan hệ gần gũi với nhau vì có mức độ tin cậy cao (chỉ số bootstrap 100%) và nhánh thứ hai là dòng *C. glabrata* YVN7.

### 3.4 Kết quả thử nghiệm các điều kiện lên men rượu vang khóm

Dòng *S. cerevisiae* Y8 được sử dụng cho thử nghiệm các điều kiện lên men rượu vang khóm với 3 nhân tố: mật số nấm men ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  tb/mL), Brix (14,2; 18,6; 22,8%) và thời gian lên men (5, 7 và 9 ngày). Kết quả cho thấy có sự ảnh hưởng rõ rệt của hàm lượng đường đối với kết quả lên men (Bảng 3). Ở những nghiệm thức có lượng đường thấp, hàm lượng ethanol sinh ra thấp, cụ thể nghiệm thức 1 (5 ngày - 14,2°Brix -  $10^5$  tb/mL), 4 (7 ngày - 14,2°Brix -  $10^5$  tb/mL) và 7 (9 ngày - 14,2°Brix -  $10^5$  tb/mL) với hàm lượng ethanol lần lượt là 2,50%, 3,48% và 2,71% (v/v). Hàm lượng đường càng cao thì hàm lượng ethanol càng cao

như nghiệm thức 12 (5 ngày - 18,6°Brix -  $10^7$  tb/mL) và 15 (7 ngày - 18,6°Brix -  $10^7$  tb/mL), hàm lượng ethanol tương ứng là 10,03% (v/v) và 9,74% (v/v), hiệu suất lần lượt là 80,05% và 78,9%. Trong đó, nghiệm thức 12 (5 ngày - 18,6°Brix -  $10^7$  tb/mL) có hàm lượng ethanol khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95% so với các nghiệm thức còn lại. Trong lên men, hàm lượng ethanol có liên quan đến nồng độ đường trong môi trường. Hàm lượng đường thấp, nấm men bị thiếu nguồn dinh dưỡng dẫn đến giảm số lượng sản phẩm nhưng nếu tăng hàm lượng đường quá cao nồng độ ethanol cũng bị giảm vì hàm lượng đường quá cao sẽ làm tăng áp suất thẩm thấu, mất cân bằng trạng thái sinh lý của nấm men (Tahir *et al.*, 2010). Kết quả thực nghiệm cho số liệu phù hợp như trong trường hợp của các nghiệm thức 22 (7 ngày - 22,8°Brix -  $10^5$  tb/mL), 23 (7 ngày - 22,8°Brix -  $10^6$  tb/mL) và 25 (7 ngày - 22,8°Brix -  $10^7$  tb/mL), hàm lượng ethanol chỉ đạt 4,59%, 5,89% và 4,05% (v/v) là các nghiệm thức có lượng đường ban đầu cao nhất trong 3 mức bố trí thử nghiệm.

**Bảng 3: Kết quả điều kiện lên men tối ưu rượu vang khóm ở 37°C**

Nghiệm thức	Ngày-Brix-Mật số	Brix sau lên men	Ethanol (% v/v)	Đường sử dụng (g/L)	Hiệu suất lên men (%)
1	5-14,2-10 <sup>5</sup>	10,5	2,50 <sup>i</sup> 1	93,02	41,35 <sup>no</sup>
2	5-14,2-10 <sup>6</sup>	8,0	4,10 <sup>hi</sup>	106,74	59,15 <sup>hijk</sup>
3	5-14,2-10 <sup>7</sup>	6,6	5,66 <sup>g</sup>	108,81	80,30 <sup>ab</sup>
4	7-14,2-10 <sup>5</sup>	9,5	3,48 <sup>i</sup>	98,72	54,40 <sup>jkl</sup>
5	7-14,2-10 <sup>6</sup>	8,5	4,18 <sup>hi</sup>	107,13	60,20 <sup>ghijk</sup>
6	7-14,2-10 <sup>7</sup>	5,3	6,01 <sup>g</sup>	108,16	85,75 <sup>a</sup>
7	9-14,2-10 <sup>5</sup>	10,0	2,71 <sup>j</sup>	99,24	39,50 <sup>o</sup>
8	9-14,2-10 <sup>6</sup>	8,0	4,41 <sup>h</sup>	103,76	64,10 <sup>efghi</sup>
9	9-14,2-10 <sup>7</sup>	6,7	6,20 <sup>g</sup>	105,06	86,05 <sup>a</sup>
10	5-18,6-10 <sup>5</sup>	11,3	5,70 <sup>g</sup>	168,42	52,10 <sup>klm</sup>
11	5-18,6-10 <sup>6</sup>	9,2	7,35 <sup>f</sup>	185,11	61,25 <sup>fghij</sup>
12	5-18,6-10 <sup>7</sup>	7,3	10,03 <sup>a</sup>	191,19	80,85 <sup>ab</sup>
13	7-18,6-10 <sup>5</sup>	11,0	6,41 <sup>g</sup>	167,90	58,95 <sup>hijk</sup>
14	7-18,6-10 <sup>6</sup>	9,2	7,99 <sup>ef</sup>	184,47	66,80 <sup>defgh</sup>
15	7-18,6-10 <sup>7</sup>	7,1	9,74 <sup>ab</sup>	190,29	78,90 <sup>ab</sup>
16	9-18,6-10 <sup>5</sup>	11,3	6,27 <sup>g</sup>	164,28	58,85 <sup>hijk</sup>
17	9-18,6-10 <sup>6</sup>	9,5	8,70 <sup>cde</sup>	182,27	73,65 <sup>bcd</sup>
18	9-18,6-10 <sup>7</sup>	7,15	9,51 <sup>ab</sup>	189,00	77,55 <sup>abc</sup>
19	5-22,8-10 <sup>5</sup>	18,3	4,40 <sup>h</sup>	121,19	56,10 <sup>ijkl</sup>
20	5-22,8-10 <sup>6</sup>	16,3	7,68 <sup>f</sup>	172,82	68,55 <sup>defg</sup>
21	5-22,8-10 <sup>7</sup>	13,3	9,40 <sup>abc</sup>	192,88	75,40 <sup>bcd</sup>
22	7-22,8-10 <sup>5</sup>	18,0	4,59 <sup>h</sup>	143,19	49,45 <sup>lmn</sup>
23	7-22,8-10 <sup>6</sup>	16,1	5,89 <sup>g</sup>	162,47	56,00 <sup>ijkl</sup>
24	7-22,8-10 <sup>7</sup>	13,1	9,19 <sup>bcd</sup>	195,59	72,50 <sup>bcd</sup>
25	9-22,8-10 <sup>5</sup>	18,5	4,1 <sup>hi</sup>	136,72	45,60 <sup>mno</sup>
26	9-22,8-10 <sup>6</sup>	16,6	5,89 <sup>g</sup>	167,77	54,15 <sup>jkl</sup>
27	9-22,8-10 <sup>7</sup>	14,0	8,54 <sup>de</sup>	190,80	69,00 <sup>cdef</sup>
CV (%)			5,58		5,97

<sup>1</sup>Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5% (p<0,05)

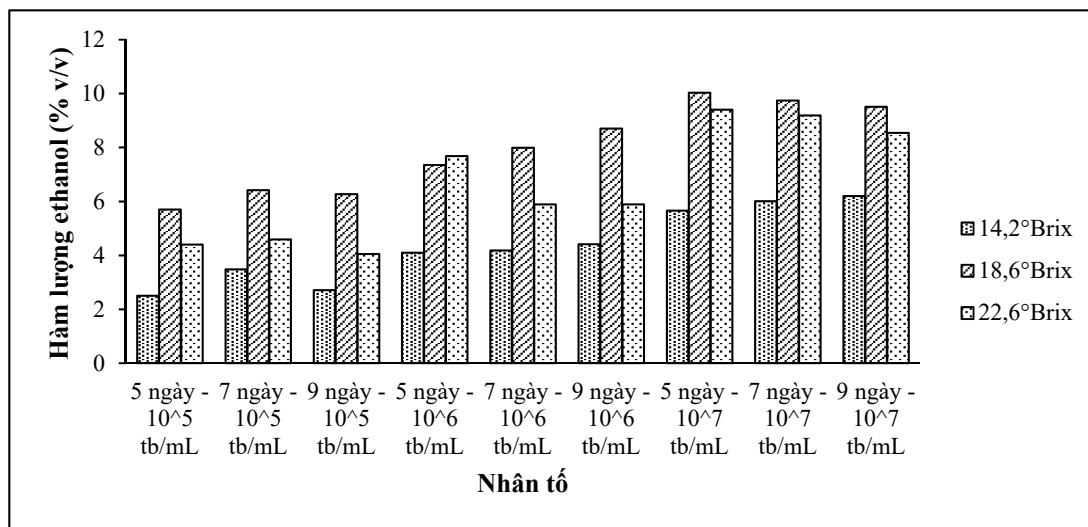
Mật số nấm men và thời gian lên men cũng là những yếu tố ảnh hưởng đến sự lên men. Mật số nấm men thấp khi vào môi trường mới cần có thời gian thích nghi, phát triển đến mật số thích hợp và khi thời gian lên men ngắn sẽ làm hạn chế khả năng lên men tối đa của nấm men như nghiệm thức 1 (5 ngày - 14,2°Brix - 10<sup>5</sup> tb/mL) và 19 (5 ngày - 22,8°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL), hàm lượng ethanol chỉ đạt 2,5% (v/v) và 4,40% (v/v) (Hình 3). Nếu mật số nấm men thấp nhưng kéo dài thời gian lên men sẽ làm ảnh hưởng đến tiến độ, tổn chi phí, thời gian cho việc lên men. Ban đầu, nồng độ ethanol khá thấp, sau đó mật số nấm men tăng lên và nồng độ ethanol bắt đầu tăng, hàm lượng đường giảm, nhưng khi qua giai đoạn tối ưu cho lên men nếu kéo dài thời gian lên men khi hàm lượng còn lại quá thấp thì hàm lượng ethanol không tăng mà bắt đầu giảm (Tahir *et al.*, 2010).

Với độ Brix ban đầu là 18,6°Brix và 22,6°Brix, các nghiệm thức mật số tế bào giống chủng 10<sup>6</sup> tb/mL cho hàm lượng ethanol trong khoảng 5,89-

8,70% (v/v), hiệu suất trong khoảng 54,15-73,65% (Hình 3). Nghiệm thức 17 (9 ngày - 18,6°Brix - 10<sup>6</sup> tb/mL) có hàm lượng ethanol đạt cao nhất là 8,70% (v/v) và hiệu suất lên men đạt 73,65%. Ở các nghiệm thức có mật số 10<sup>7</sup> tb/mL, hàm lượng ethanol đạt cao hơn. Các nghiệm thức 12 (5 ngày - 18,6°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL), 15 (7 ngày - 18,6°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL), 18 (9 ngày - 18,6°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL), 21 (5 ngày - 22,8°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL), 24 (7 ngày - 22,8°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL) và 27 (9 ngày - 22,8°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL) có hàm lượng ethanol đạt 10,03%, 9,74%, 9,51%, 9,40%, 9,19% và 8,54% (v/v), hiệu suất lần lượt đạt 80,85%, 78,90%, 77,55%, 75,40%, 72,5% và 69,0%. Trong đó, nghiệm thức 12 (5 ngày - 18,6°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL) có hàm lượng ethanol cao nhất, đạt 10,03% (v/v) tương ứng với hiệu suất lên men là 80,85%. Theo Nguyễn Xuân Ra (2014), nồng độ ethanol trong rượu vang đạt từ 8-15% (v/v), do đó với điều kiện độ Brix ban đầu là 18,6°Brix và mật số giống chủng 10<sup>7</sup> tb/mL đều tạo sản phẩm có độ cồn đạt yêu cầu. Kết quả cũng cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa về hàm

lượng ethanol khi tăng hàm lượng đường ban đầu, thậm chí hàm lượng ethanol thu được còn có khuynh hướng giảm do sự tác động đồng thời của

hiệt độ và áp suất thẩm thấu lên nấm men (Tahir *et al.*, 2010).



Hình 3: So sánh hàm lượng ethanol sau lên men giữa các nghiệm thức ở 37°C

Trong cùng điều kiện về mật số giống chủng 10<sup>7</sup> tb/mL, nghiệm thức 12 (5 ngày - 18,6°Brix - 10<sup>7</sup> tb/mL) cũng là nghiệm thức có thời gian lên men ngắn nhất (5 ngày) so với thời gian lên men 7 và 9 ngày ở các nghiệm thức khác. Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy rượu không có mùi lạ, không bị vẩn đục, màu sáng, vị vừa phải, mùi đặc trưng. Kết quả cho thấy nấm men *S. cerevisiae* Y8 là dòng chịu nhiệt có hoạt lực cao và có khả năng ứng dụng trong lên men sản xuất rượu vang khóm.

Như vậy, từ kết quả thử nghiệm trên đã xác định được các điều kiện lên men rượu vang khóm bao gồm hàm lượng đường ban đầu là 18,6°Brix, mật số giống chủng 10<sup>7</sup> tb/mL và thời gian lên men 5 ngày ở 37°C cho sản phẩm có hàm lượng ethanol đạt cao nhất là 10,03% (v/v) và hiệu suất lên men là 80,85%.

#### 4 KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được 7 dòng nấm men (Y8, Y32, Y34, Y54, Y80, Y81 và YVN7) có khả năng lên men ethanol ở 37°C trong dịch khóm với hàm lượng ethanol đạt 4,37-7,45% (v/v). Dòng nấm men Y8 có khả năng lên men rượu vang khóm tốt ở cả 37°C và 40°C, hàm lượng ethanol đạt lần lượt là 7,45% và 4,18% (v/v). Các dòng nấm men tuyển chọn được định danh là *S. cerevisiae* và *C. glabrata*. Các điều kiện lên men rượu vang khóm được xác định với hàm lượng đường ban đầu là 18,6°Brix, mật số giống chủng 10<sup>7</sup> tb/mL, lên men trong 5 ngày ở 37°C cho sản phẩm có hàm lượng ethanol đạt cao nhất là 10,03% (v/v) và hiệu suất lên men là 80,85%.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Nghị định thư của Bộ Khoa học và Công nghệ (09/2014/HĐ-NĐT), một phần hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học trong Chương trình Công nghệ Sinh học Tiên tiến (Trường Đại học Cần Thơ) và Chương trình CCP (Core-to-Core Program, 2014-2019).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdel-Banat, B.M., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., Akada, R., 2010. High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(4): 861-867.

Akubor, P.I., 1996. The suitability of African bush mango juice for wine production. *Plant Foods and Human Nutrition*. 49(3): 213-219.

Alain, K., A.N. Georges, Aka, Y., 1987. Ethanol production from pineapple juice in Côte d'Ivoire with preselected yeast strains. *Journal of Fermentation Technology*. 65(4): 475-481.

Banat, I.M., P. Nigam and R. Marchat, 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.

Bennett, C., 1971. Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol. *The American Journal of Medical Technology*. 37(6): 217.



- FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 2014. FAO Statistical Yearbook 2014: Asia and the Pacific Food and Agriculture. Bangkok, Thailand.
- Fonseca, Á. and Inácio J., 2006. Phylloplane yeasts. In: G. Péter and C.A. Rosa (Editors). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer. Berlin, pp.263-301.
- Heard, G.M and G.H Fleet, 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Microbiology*. 65(1): 23-28.
- Isaac, M.H., and B.J. Soden, 2000. Water vapor feedback and global warming. *Annual Review of Energy the Environment*. 25: 441-475.
- Keating, J.D., Panganiban, C., and Mansfield, S.D., 2006. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnology and Bioengineering*. 93(6): 1196-1206.
- Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A., Suzuki, Y., Rodrussamee, N., Matsutani, M., Yamada, M., 2015. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnology for Biofuels*. 8: 47.
- Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W., 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresources Technology*. 98(17): 3367-3374.
- Nevoigt E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72(3): 379-412.
- Ngo Thi Phuong Dung, Huynh Xuan Phong, Pornthap Thanonkeo, Preekamol. Klanrit, Toshiharu Yakushi, Kazunobu Matsushita, Mamoru Yamada (2015). The diversified collection of thermotolerant microorganisms isolated in Vietnam for fermentation of ethanol, acetic acid and lactic acid. In Proceedings of International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization (p.27). JR Hakata City, Fukuoka, Japan.
- Ngô Thị Phương Dung, Lý Huỳnh Liên Hương, Huỳnh Xuân Phong, 2011. Phân lập, tuyển chọn nấm men và xác định điều kiện ảnh hưởng quy trình lên men rượu vang dưa hấu. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 18b: 137-146.
- Nguyễn Đình Thương và Nguyễn Thanh Hằng, 2005. Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic. NXB Khoa học Kỹ thuật. Hà Nội, Việt Nam.
- Nguyễn Xuân Ra, 2014. Tìm hiểu rượu vang và nho. Nhà xuất bản thông tin và truyền thông. Hà Nội, Việt Nam.
- 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.
- O'Donnell, K., 1993. *Fusarium* and its near relatives. In D. R. Reynolds & J. W. Taylor (Eds.), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (225-233). Wallingford: CAB International.
- 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: 21-26.
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M., 2015. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*. 15(6), fov053. <http://doi.org/10.1093/femsyr/fov053>.
- Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Suprayogi, Limtong, S., Kosaka, T., & Yamada, M., 2011. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(4): 1573-1586.
- Roehr, M. 2001. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim, 232 pages.
- Santoshkumar, Pati, and Patil, A.B., 2006. Isolation and Characterization of wine yeast from pineapple fruits. *Karnataka Journal of Agricultural Science*. 19(3): 558-561.
- Selli, S., Cabaroglu, T. & Canbas, A. 2003. Flavour components of orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *International Journal of Food Science and Technology*. 38(5): 587-592.
- Tahir, A., M. Aftab and Farasat, T., 2010. Effect of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *Saccharomyces cerevisiae* bio-07. *Journal of Applied Pharmaceutical*. 3(2): 72-78.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25(24): 4876-4882.