Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
website: sj.ctu.edu.vn

DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.007

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN DÒNG NẤM MEN (*Saccharomyces* sp.) LÊN MEN RƯỢU CÀ NA (*Canarium album*)

Nguyễn Thị Niềm, Huỳnh Ngọc Thanh Tâm* và Nguyễn Đức Độ

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ
**Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Ngọc Thanh Tâm (hnttam@ctu.edu.vn)*

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 24/07/2017
Ngày nhận bài sửa: 18/09/2017
Ngày duyệt đăng: 27/02/2018

Title:
Isolation, selection of yeast strain (Saccharomyces sp.) for Canarium album wine fermentation

Từ khóa:
Dòng nấm men, hoạt lực, phân lập, rượu cà na, quả cà na, Saccharomycetaceae

Keywords:
Activity, Canarium album fruit, Canarium album wine, isolation, Saccharomycetaceae, yeast strain

ABSTRACT

The study was carried out on the basis of isolation and selection of high fermented yeast from Canarium album fruit in An Giang, Dong Thap, Vinh Long, Can Tho, Hau Giang, Soc Trang (Vietnam) and Kandal (Cambodia). The research results showed that 50 yeast strains were isolated from Canarium album fruit. Based on the shape of cell and biochemical characteristics, they were divied into 6 groups: spherical, small spherical, oval, small oval, elliptical, and pointed elliptical. The isolated yeast strain from Canarium album fruit in Binh Minh (Vinh Long) (R2B) which had the best fermented activity was selected. The highest ethanol content (7,44% v/v) and low apparent refractometer Brix (ARB) (10,8°Brix) were obtained after 10 days of fermentation with initial parameters: 20°Brix, pH 3,5 and 10^6cell/mL of yeast cell density. The results of DNA sequencing have identified the yeast strain R2B being belong to Saccharomycetaceae family.

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện trên cơ sở phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt tính lên men cao từ quả cà na tại các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Hậu Giang, Sóc Trăng (Việt Nam) và Kandal (Campuchia). Từ nguồn quả cà na ban đầu, 50 dòng nấm men đã được phân lập thành 6 nhóm: hình cầu, hình cầu nhỏ, hình oval, hình oval nhỏ, hình elip, hình elip nhọn dựa vào hình dạng tế bào và đặc điểm sinh hóa. Trong đó, dòng nấm men R2B hình cầu được phân lập từ quả cà na tại Bình Minh (Vĩnh Long) đã được tuyển chọn do có khả năng lên men mạnh. Với điều kiện lên men ban đầu pH 3,5, độ Brix 20 và mật số nấm men 10^6 tế bào/mL, dịch lên men kết quả đạt được hàm lượng ethanol 7,44% v/v và độ Brix biểu kiến đo bằng khúc xạ kế còn lại thấp (độ Brix 10,8) sau 10 ngày lên men. Kết quả của phương pháp giải trình tự DNA đã xác định được dòng nấm men R2B thuộc họ Saccharomycetaceae.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Niềm, Huỳnh Ngọc Thanh Tâm và Nguyễn Đức Độ, 2018. Phân lập và tuyển chọn dòng nấm men (*Saccharomyces* sp.) lên men rượu cà na (*Canarium album*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(1B): 44-49.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà na (*Canarium album*) là loại cây trồng phổ biến ở vùng nhiệt đới châu Phi và Nam Á (Võ Văn Chi, 2003). Tại Việt Nam, cà na là loại cây trồng địa phương, thu hoạch vào tháng 8 đến tháng 10 hàng năm. Nhờ vị chua chát và thơm đặc trưng của cà na nên khi đem chế biến sẽ cho ra nhiều món ngon và hấp dẫn như cà na muối, cà na ngào đường… nhưng không mang lại giá trị kinh tế dẫn đến một lượng quả không tiêu thụ được bị hư hỏng. Các sản phẩm được chế biến từ cà na còn khá ít, chưa được nghiên cứu nhiều gây nên sự lãng phí nguồn nguyên liệu. Vì vậy, nghiên cứu làm đa dạng sản phẩm từ cà na là vấn đề cấp thiết.

Theo Lương Đức Phẩm (1998), yếu tố quyết định năng suất và hiệu quả quá trình lên men rượu ngoài quy trình lên men hợp lí còn đòi hỏi nguồn giống nấm men tốt. Do vậy, nghiên cứu phân lập và tuyển chọn dòng nấm men có hoạt lực cao từ cà na để sử dụng hiệu quả cho quá trình sản xuất rượu cà na là vấn đề có tính cấp thiết.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

2.1.1 Nguyên liệu

Quả cà na (Hình 1) được thu tại các tỉnh ở Việt Nam: An Giang (huyện An Phú, huyện Thoại Sơn), Đồng Tháp (huyện Cao Lãnh, huyện Lấp Vò), Vĩnh Long (Bình Minh), Cần Thơ (phường Xuân Khánh, phường An Khánh), Hậu Giang (huyện Vị Thủy, huyện Châu Thành), Sóc Trăng (huyện Ngã Năm, thành phố Sóc Trăng), và ở Campuchia: tỉnh Kandal.

Nấm men đối chứng *Saccharomyces cerevisiae* (Hoa Kỳ)- kí hiệu ĐC, được lưu giữ ở 4^{o}C tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Hình 1: Quả cà na

2.1.2 Địa điểm thực hiện

Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1.3 Thiết bị và dụng cụ

Kính hiển vi Olympus BH-2, máy ly tâm Hettich-Zentrifligen 4810, pH kế Sartorius PB-20, Brix kế Euromex FG103/113, tủ cấy Telstar AV-100 và một số dụng cụ, thiết bị khác.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm men từ quả cà na lên men

Cho 2-3 quả cà na loại bỏ hạt để nguyên không nghiền 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 dòng 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 and Fell (1998), Lương Đức Phẩm (2006) và Nguyễn Đức Lượng (2006) kết hợp với phương pháp sinh hóa (khả năng lên men đường glucose và sucrose, khả năng phân giải urea).

2.2.2 Khảo sát các hoạt tính lên men của các dòng nấm men phân lập

Nghiên cứu được thực hiện nhằm so sánh khả năng lên men chọn ra dòng nấm men thích hợp để lên men rượu cà na trong bình tam giác.

Phối chế dịch quả cà na (nước ép cà na điều chỉnh pH=3,5 và 20 ^{o}Brix) sau đó thanh trùng trong 2 giờ với $NaHSO_3$ nồng độ 140 mg/L. Nuôi cấy tế bào nấm men trong môi trường tăng sinh khối đến khi mật số tế bào nấm men đạt 10^6 tế bào/mL dịch lên men. Cho vào bình tam giác (1 mL dịch nấm men + 99 mL dịch quả phối chế), sau 10 ngày lên men, đo độ cồn bằng phương pháp chưng cất nhằm tuyển chọn được dòng nấm men có hoạt tính lên men tốt cho độ cồn cao.

2.2.3 Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen

Dòng nấm men được chọn giải trình tự đoạn gen bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Korabecna, 2007) 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^{o}C (Nguyễn Đình Thưởng và Nguyễn Thanh Hằng, 2007).

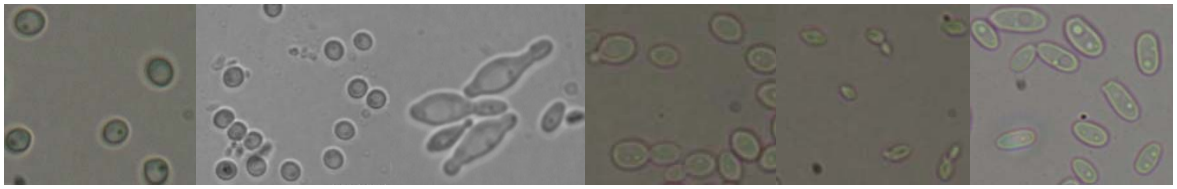
Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 20.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm men từ quả cà na lên men

Kết quả phân lập được 50 dòng nấm men từ nguồn quả cà na ban đầu. Dựa vào hình dạng, sinh hóa của nấm men, 50 dòng nấm men phân lập có thể được xếp thành 6 nhóm. Đặc điểm của các nhóm nấm men được mô tả trong Bảng 1. Hình dạng tế bào (ở vật kính X40) của 6 dòng nấm men tiêu biểu của 6 nhóm được trình bày trong Hình 2 và đặc điểm sinh hóa thể hiện ở Hình 3.

Các dòng nấm men phân lập được ký hiệu: A và B (nồng độ pha loãng ở 10^{-4}), C và D (nồng độ pha loãng ở 10^{-5}). An Giang: AG1 (An Phú), AG2 (Thoại Sơn); Đồng Tháp: ĐT1 (Cao Lãnh), ĐT2 (Lấp Vò); Hậu Giang: HG1 (Vị Thủy), HG2 (Châu Thành); Cần Thơ: CT1 (Xuân Khánh), CT2 (Tân Lộc); Sóc Trăng: ST1 (Ngã Năm), ST2 (Thành phố Sóc Trăng); Vĩnh Long: R1, R2, R3 (Bình Minh); Campuchia: CPC1 và CPC2 (Kandal, nồng độ pha loãng ở 10^{-4}), CPC3 và CPC4 (Kandal, nồng độ pha loãng ở 10^{-5}).



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Hình 2: Hình dạng tế bào của 6 dòng nấm men tiêu biểu của 6 nhóm (a) Tế bào hình cầu (AG1A); (b) Tế bào hình cầu nhỏ (HG1A); (c) Tế bào hình elip nhọn (ĐT2B); (d) Tế bào hình oval (CT2A); (e) Tế bào hình oval nhỏ (CT1B); (f) Tế bào hình elip (CPC4)

(a) **(b)** **(c)**

Hình 3: Các thử nghiệm sinh hóa của các dòng nấm men đã phân lập (a) Sự thay đổi màu sắc của môi trường Christensen; (b) Khả năng lên men đường glucose; (c) Khả năng lên men đường sucrose

Bảng 1: 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 (giống)
	Hình dạng tế bào	Tế bào nảy chồi	Hình thành bào tử	Lên men đường glucose	Lên men đường sucrose	Phân giải urea	
AG1A, AG1D, AG2B, AG2D, CT1A, CT1C, CT1D, CT2B, R2B	Tròn	Nhiều hướng	1-2 bào tử hình tròn	+	+	-	*Saccharomyces*
HG1A, HG1B	Tròn nhỏ	Nhiều hướng	1-2 bào tử hình tròn	+	+	-	*Saccharomyces*
AG1B, AG1C, AG2A, AG2C, CPC2, CT2A, CT2C, CT2D, HG1C, HG1D, HG2A, HG2B, HG2C, HG2D, R1A, R1B, R2A, R3A, R3B, ST1A, ST1B, ST2A, ST2B, ST2D	Oval	Nhiều hướng	1-2 bào tử hình tròn	+	+	-	*Saccharomyces*
CT1B	Oval nhỏ		1-2 bào tử hình tròn	+		-	*Saccharomyces*
CPC1, CPC3, CPC4, ĐT1B, ĐT1C, ST2C	Elip	Nhiều hướng	1-2 bào tử hình tròn	+	-	+	*Pichia*
ĐT1A, ĐT1D, ĐT2A, ĐT2B, ĐT2C, ĐT2D, ST1A, ST1D	Elip nhọn	Lưỡng cực	1-2 bào tử hình tròn	+	-	-	*Hanseniaspora*

Kết quả phân lập dựa vào hình dạng, sinh hóa của nấm men và căn cứ vào khóa phân loại nấm men của Kurtzman and Fell (1998), Lương Đức Phẩm (2006) và Nguyễn Đức Lượng (2006): 50 dòng nấm men phân lập từ nguồn quả cà na ban đầu được xếp thành 6 nhóm và định danh sơ bộ

gồm 3 giống *Hanseniaspora*, *Pichia* và *Saccharomyces*. Kết quả đạt được từ nghiên cứu này tương tự như kết quả của Nguyễn Minh Thủy *và ctv.* (2013), Nguyễn Văn Thành *và ctv.* (2013) cũng định danh sơ bộ gồm 3 giống nấm men này.

3.2 Khảo sát hoạt tính lên men của các dòng nấm men phân lập thuần chủng và so sánh với nấm men đối chứng

Nấm men đóng vai trò quan trọng trong quá trình lên men rượu trái cây. Sử dụng dòng nấm men thích hợp sẽ cho sản phẩm có độ rượu cao. Theo Lương Đức Phẩm (2006) các dòng nấm men thuộc *Hanseniaspora*, *Pichia* sẽ làm giảm chất lượng rượu trái cây. Vì vậy, từ 50 dòng nấm men được phân lập, đã chọn ra 36 dòng nấm men thuộc *Saccharomyces* 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 chai Durham và bình tam giác (Hình 4).

3.2.1 Hoạt tính lên men dịch quả của các dòng nấm men phân lập trong chai Durham

Chiều cao cột khí CO_2 trong chai Durham ở Bảng 2 cho thấy cường độ lên men của các dòng nấm men ở từng thời điểm lên men khác nhau.

Kết quả cho thấy có sự khác biệt về khả năng lên men giữa các dòng nấm men. Chiều cao của cột khí CO_2 tăng liên tục, đến thời điểm 24 giờ thì dòng nấm men R2B và dòng nấm men đối chứng đẩy hết cột khí CO_2 (3 cm). Trong khi đó, có dòng nấm men còn lại (trừ AG2C, CT2D, HG2A) đến 48 giờ chưa đẩy hết cột khí CO_2.

(a) **(b)**

Hình 4: Khả năng lên men dịch quả trong (a) chai Durham và (b) bình tam giác của các dòng nấm men đã phân lập

Bảng 2: Chiều cao cột khí CO_2 (cm) của 36 dòng nấm men theo thời gian lên men

STT	Dòng nấm men	Thời gian quan sát (giờ)					STT	Dòng nấm men	Thời gian quan sát (giờ)				
		6	12	18	24	48			6	12	18	24	48
1	AG1A	-	0,60	1,0	1,2	2,30	20	HG1C	-	-	-	0,20	0,77
2	AG1B	0,07	0,50	0,97	1,6	2,80	21	HG1D	-	0,07	0,27	0,50	0,90
3	AG1C	-	0,13	0,27	0,67	1,47	22	HG2A	0,10	0,8	1,20	2,50	3,00
4	AG1D	0,03	0,10	0,50	0,83	1,20	23	HG2B	0,07	0,10	0,50	0,80	1,80
5	AG2A	0,20	0,80	1,20	2,00	2.97	24	HG2C	-	0,07	0,57	1,50	2,70
6	AG2B	-	-	0,03	0,10	0,20	25	HG2D	0,10	0,47	0,83	1,37	2,07
7	AG2C	0,10	1,00	1,50	2,30	3,00	26	R1A	0,33	0,73	1,23	1,70	2,80
8	AG2D	0,10	0,50	0,90	1,30	1,97	27	R1B	0,10	0,9	1,30	2,20	2,90
9	CPC2	-	0,20	0,80	1,70	2,50	28	R2A	-	0,03	0,13	0,47	1,20
10	CT1A	0,10	0,10	0,70	0,70	1,10	29	R2B	0,53	1,70	2,60	3,00	3,00
11	CT1B	0,10	0,50	1,00	1,40	2,33	30	R3A	0,23	0,50	0,90	1,20	2,30
12	CT1C	-	0,10	0,13	0,60	1,10	31	R3B	0,50	1,00	1,20	1,70	2,60
13	CT1D	-	0,10	0,50	1,00	2,20	32	ST1A	-	-	-	0,27	0,97
14	CT2A	-	0,10	0,50	1,27	2,20	33	ST1B	-	0,20	0,80	1,20	2,40
15	CT2B	-	0,10	0,30	0,50	1,30	34	ST2A	-	-	-	0,07	0,60
16	CT2C	0,07	0,20	0,30	0,47	1,00	35	ST2B	-	-	0,10	0,33	0,70
17	CT2D	0,07	0,93	1,70	2,20	3,00	36	ST2D	-	-	-	0,50	1,40
18	HG1A	0,17	0,50	0,80	1,30	2,60	37	ĐC	0,27	1,50	2,47	3,00	3,00
19	HG1B	0,10	0,20	0,30	0,70	1,70							

Ghi chú: -: chiều cao cột khí CO_2 không lên men, chiều cao cột khí CO_2 tối đa là 3 cm và số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại

3.2.2 Hoạt tính lên men dịch quả của các dòng nấm men phân lập trong bình tam giác

Khả năng lên men được khảo sát với mật số nấm men là 10^6 tế bào/mL dịch lên men, thời gian ủ là 10 ngày ở 30°C; pH=3,5 và độ Brix điều chỉnh 20°Brix. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3: Các chỉ tiêu pH, độ Brix và độ cồn sau lên men của 37 dòng nấm men

STT	Dòng nấm men	pH	Độ Brix	Độ cồn 20°C (% v/v)	STT	Dòng nấm men	pH	Độ Brix	Độ cồn 20°C (% v/v)
1	AG1A	3,19	$14,67^{CDE}$	$4,15^{hijkl}$	20	HG1C	3,10	$14,33^{CDE}$	$2,50^{a}$
2	AG1B	3,09	$14,33^{CDE}$	$4,42^{ijklm}$	21	HG1D	3,18	$14,00^{CD}$	$3,12^{abcd}$
3	AG1C	3,04	$14,00^{CD}$	$3,91^{defghij}$	22	HG2A	3,21	$14,67^{CDE}$	$4,99^{mno}$
4	AG1D	3,10	$14,33^{CDE}$	$4,02^{fghij}$	23	HG2B	3,12	$16,67^{F}$	$3,02^{abc}$
5	AG2A	3,08	$12,00^{AB}$	$5,26^{nop}$	24	HG2C	3,12	$14,33^{CDE}$	$4,61^{jklmn}$
6	AG2B	3,09	$14,33^{CDE}$	$3,39^{bcdefgh}$	25	HG2D	3,11	$14,00^{CD}$	$3,83^{cdefghij}$
7	AG2C	3,10	$13,67^{CD}$	$4,14^{hijkl}$	26	R1A	3,08	$11,00^{A}$	$4,84^{klmn}$
8	AG2D	3,13	$15,00^{CDEF}$	$3,96^{efghij}$	27	R1B	3,08	$14,00^{CD}$	$5,85^{pq}$
9	CPC2	3,10	$16,00^{EF}$	$3,76^{cdefghi}$	28	R2A	3,16	$14,00^{CD}$	$4,89^{lmn}$
10	CT1A	4,21	$11,33^{A}$	$3,45^{bcdefgh}$	29	R2B	3,08	$10,67^{A}$	$7,51^{r}$
11	CT1B	3,15	$15,00^{CDEF}$	$3,58^{bcdefgh}$	30	R3A	3,15	$14,00^{CD}$	$5,12^{mnop}$
12	CT1C	3,19	$16,00^{EF}$	$4,61^{jklmn}$	31	R3B	3,04	$11,00^{A}$	$5,72^{opq}$
13	CT1D	3,13	$14,67^{CDE}$	$3,69^{bcdefghi}$	32	ST1A	3,13	$14,67^{CDE}$	$2,93^{ab}$
14	CT2A	3,16	$14,33^{CDE}$	$4,43^{ijklm}$	33	ST1B	3,11	$14,33^{CDE}$	$4,07^{ghijk}$
15	CT2B	3,15	$14,00^{CD}$	$4,04^{fghij}$	34	ST2A	3,11	$15,00^{CDEF}$	$2,90^{ab}$
16	CT2C	3,15	$15,33^{DEF}$	$3,23^{abcdef}$	35	ST2B	3,16	$14,33^{CDE}$	$3,27^{abcdefg}$
17	CT2D	3,10	$15,33^{DEF}$	$6,40^{q}$	36	ST2D	3,12	$13,33^{BC}$	$3,30^{bcdefg}$
18	HG1A	3,10	$14,67^{CDE}$	$5,02^{mno}$	37	ĐC	3,08	$11,33^{A}$	$7,20^{r}$
19	HG1B	3,14	$16,00^{EF}$	$3,18^{abcde}$		CV (%)		6,5	9,8

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 của dịch lên men ứng với 36 dòng nấm men sau thời gian lên men rượu cà na 10 ngày, so với dòng nấm men đối chứng các dòng này được chia thành hai nhóm: nhóm lên men mạnh cho sản phẩm có độ cồn cao hơn 5% v/v (AG2A, CT2D, HG1A, R1B, R2B, R3A, R3B), nhóm lên men thấp cho sản phẩm có độ cồn thấp hơn 5% v/v (các dòng nấm men còn lại). Kết quả cho thấy dòng nấm men R2B trong nhóm lên men mạnh có độ cồn trung bình cao nhất, kế đến là dòng nấm men đối chứng. Các dòng nấm men còn lại cho sản phẩm có độ cồn khá thấp. Dòng nấm men R2B có khả năng lên men nhanh và cho sản phẩm có độ cồn cao (7,51% v/v) và độ Brix biểu kiến đo bằng khúc xạ kế giảm (10,67°Brix). Dòng nấm men đối chứng lên men nhanh và có độ cồn (7,2% v/v) và độ Brix biểu kiến đo bằng khúc xạ kế (11,33 °Brix). Dòng nấm men R2B khác biệt không có ý nghĩa thống kê với dòng nấm men đối chứng nhưng có sự khác biệt ý nghĩa thống kê với những dòng nấm men còn lại ở độ tin cậy 95%. Kết quả đạt được từ thí nghiệm này cho sản phẩm rượu có độ cồn cao 7,51% v/v, cho sản phẩm có mùi thơm đặc trưng, màu sắc đẹp. Do đó, dòng nấm men R2B được chọn định danh bằng phương pháp giải trình tự.

Tuy nhiên, hàm lượng rượu cao (7,51% v/v) của dòng nấm men được chọn so với các dòng nấm men khác trong các nghiên cứu lên men khác ở các loại dịch quả khác thấp hơn như MK1 13,08% v/v (Nguyễn Minh Thủy *và ctv.,* 2013*)*, VK1 13,26% v/v (Nguyễn Văn Thành *và ctv.,* 2013), *Saccharomyces cerevisiae* 11,59% v/v (Maragatham. C và Panneerselvam. A, 2011). Theo Jackisch (1985), khả năng đạt được hàm lượng rượu khác nhau từ quá trình lên men có thể thay đổi theo nguồn nguyên liệu lên men, chủng nấm men và môi trường lên men.

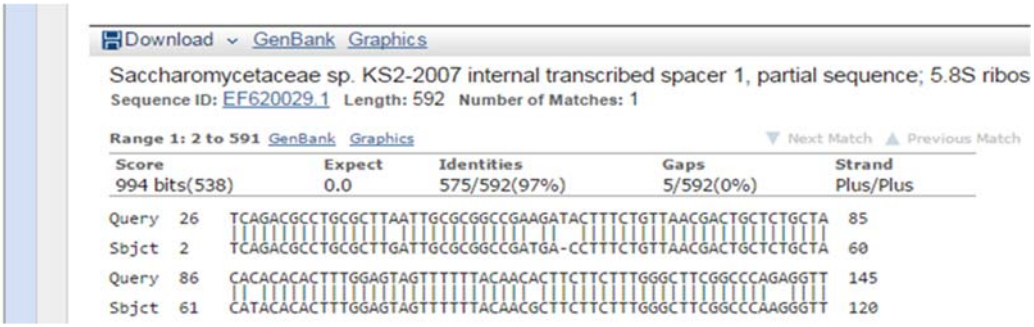
3.3 Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen

Dòng nấm men R2B được định danh bằng phương pháp giải và phân tích trình tự gen 28S rRNA. Kết quả giải trình tự trên đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men R2B như sau:

TRAATGTTTAGAGCAGCCGGGAAGGTC
AGACGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCGAAG
ATACTTTCTGTTAACGACTGCTCTGCTACAC
ACACACTTTGGAGTAGTTTTTTACAACACT
TCTTCTTTGGGCTTCGGCCCAGAGGTTACA
AACACAAACAACTTTTGTATTATATCATAG
TCAAGAATTTTTCATTAGAAAAAAATATTC
AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCG
ATAAGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTG
AGCGTCATTTCCTTCTCAAACCTTAGGGTTT
GGTAGTGAGTGATACTCTTTCTAGGGTTAA
CTTGAAAATGCTGGCCATCTGGCTGTTGCT
GGCTGAGGCTTTAGTCCAGTCTGCTGATAC

TCTGCGTATTAGGTTTTACCAACTCGTGGG
GGGCTTGAGCGGACGCTACAAGACTTTTGC
TAAAGTACAGACACCTGGCGAACAGTATTC
ACTAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATT
ACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAGSSGG
AGGGAARAYTWGAGRATKGTCWMRRWSM
SCCCGGSSCRWGGCRSAMSCWSGCCTTART
GKGGSGGGCGSRYRKCCTTYKSKTAMGCW
GGGSGYTTCGTACMACSKTGCGCARCACTC
WYGTGAMMGTYTCCTKGGGGCTTTSGCCA
AKSTYMACCWSGTYGSKSKWSKRMKCART
MGGMGAATTTCRTWAAAAARYRKSKSRSK
AWGTCMASGASWCTCTGKGGGTSYSKAGY
RTAAAACAASGSRMAMGKSGGMCKAGTW
GGASKG

Trình tự đoạn gen được giải gồm 895 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.



Hình 5: So sánh trình tự gen 28S rRNA của R2B với Saccharomycetaceae sp. (EF620029.1)

Kết quả nhận được cho thấy đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men R2B có độ tương đồng đến 97% so với trình tự gen 28S rRNA của Saccharomycetaceae sp. (Hình 5).

Kết quả định danh đã xác định dòng nấm men R2B thuộc họ *Saccharomycetaceae*, đây là họ nấm men được sử dụng lên men dịch quả có thể tạo độ cồn cao và hương vị đặc trưng cho sản phẩm (Pretorius, 2000; Lương Đức Phẩm, 2006).

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cho thấy có 50 dòng nấm men được phân lập từ quả cà na thu tại các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ, Hậu Giang, Sóc Trăng (Việt Nam) và Kandal (Campuchia). 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 36 dòng nấm men phân lập từ quả cà na, trong đó dòng nấm men R2B (Bình Minh-Vĩnh Long) có hoạt lực lên men cao nhất (7,51% v/v) và tiến hành giải trình tự đã xác định thuộc họ *Saccharomycetaceae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Jackisch, P., 1985. Modern Winemaking. Cornell University Press, 288 pages.

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

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

Maragatham, C. and Panneerselvam, A., 2011. Isolation, identification and characterization of wine yeast from rotten papaya fruits for wine production. Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research. 2 (2): 93-98.

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.

Nguyễn Đình Thưởng 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.

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.

Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành và Phạm Thị Ngọc Ánh. 2013. Phân lập và tuyển chọn nấm men từ sim rừng ở Phú Quốc (Kiên Giang) và Măng Đen (Kontum). Kỷ yếu Hội thảo Công nghệ sinh học vùng Đồng bằng sông Cửu Long 2013. 1: 47-53.

Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Minh Thủy, Trần Thị Quế và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, 2013. Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang khóm. Tạp chí khoa học - Đại học Cần Thơ. 25: 27-35.

Pretorius, I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium, novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast. 16: 675–729.

Võ Văn Chi, 2003. Từ điển thực vật thông dụng. Tập 1. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1250 trang.