

Phân lập và xác định đặc điểm các dòng nấm men từ men rượu trên địa bàn thành phố Cần Thơ

Huỳnh Quốc Huy^{1*}, Nguyễn Thị Mỹ Trinh¹, Trần Thị Như Ngọc¹, Lưu Minh Châu¹, Nguyễn Ngọc Thạnh¹, Đoàn Thị Kiều Tiên², Huỳnh Xuân Phong^{1,**}

¹Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

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

*huym0522003@gstudent.ctu.edu.vn, **hxphong@ctu.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập các dòng nấm men từ các mẫu men rượu trên địa bàn thành phố Cần Thơ và xác định một số đặc điểm của các dòng nấm men được phân lập như khả năng chịu cồn, khả năng chịu nhiệt, khả năng kết lắng và khả năng sinh H₂S. Từ đó có thể lưu trữ được nguồn nấm men thuần dòng để ứng dụng vào quá trình lên men rượu gạo tại địa phương. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 12 dòng nấm men từ 5 mẫu men rượu. Khi đánh giá hoạt tính chịu cồn, các dòng nấm men này đều chịu được nồng độ cồn ở mức 8 % v/v, trong đó có 10 dòng chịu được nồng độ cồn ở mức 12 % v/v. Tất cả dòng nấm men phân lập được đều có khả năng phát triển ở nhiệt độ 30 °C và 37 °C, 8 dòng có khả năng phát triển ở nhiệt độ 40 °C và 3 dòng có khả năng phát triển ở nhiệt độ 45 °C. Ngoài ra, 12 dòng nấm men phân lập được đều không sinh H₂S và có khả năng kết lắng tốt.

Nhận 04/09/2024
Được duyệt 12/11/2024
Công bố 28/12/2024

Từ khóa
chịu cồn, chịu nhiệt,
lên men ethanol,
men rượu, nấm men

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Rượu được sử dụng như là một nét văn hóa của người Việt đã có từ lâu đời, mang đậm dấu ấn truyền thống, gắn với những tập tục sinh hoạt của cộng đồng. Mỗi vùng miền, tộc người có cách lên men rượu khác nhau, mang bản sắc riêng của từng dân tộc, trong đó phổ biến nhất có thể kể đến đó là rượu gạo. Từ xưa, quá trình sản xuất rượu thường dựa vào hệ vi sinh vật bên ngoài môi trường để ủ và cho lên men tự nhiên. Tuy nhiên, phương pháp này thường cho kết quả không ổn định. Bằng nhiều kinh nghiệm, người ta đã chọn khối ủ tốt nhất và giữ lại một phần để sản xuất cho mẻ sau. Mặc dù phương pháp này ổn định hơn so với việc phụ thuộc vào hệ vi sinh vật tự nhiên, nguồn giống không thể bảo

quản được lâu. Do đó, bánh men đã được tạo ra từ những khối ủ tốt nhất, bằng cách tạo hình chúng với cơ chất, sấy khô và bảo quản để sử dụng dần. Bánh men rượu thường chứa các vi sinh vật như nấm men, nấm mốc và các vi khuẩn khác, có khả năng chuyển hóa đường thành cồn và các sản phẩm phụ khác.

Quá trình sản xuất rượu gạo có thể được thực hiện bằng cách nghiền bánh men thành bột và được trộn vào gạo nấu chín, ủ hiếu khí (1-2) ngày. Sau đó, thêm nước vào và thực hiện quá trình lên men kỵ khí khoảng (3-4) ngày. Sau khi kết thúc quá trình lên men, toàn bộ nguyên liệu lên men được chưng cất để thu sản phẩm. Chất lượng bánh men rượu là một trong những yếu tố quyết định đến sản lượng, chất lượng cũng như đặc

trung của sản phẩm rượu. Do đó, việc sử dụng nguồn giống vi sinh vật thuần dòng có hoạt tính cao và có tính ổn định trong quá trình lên men rượu là rất cần thiết [1]. Chính vì tầm quan trọng của bánh men trong quy trình sản xuất rượu, một số nghiên cứu đã được thực hiện để nâng cao chất lượng của bánh men cũng như chất lượng của rượu làng nghề. Kết quả nghiên cứu quy trình sản xuất men riêng tại phường Quảng Long, thị xã Ba Đồn tỉnh Quảng Bình và kết quả cho thấy rượu thành phẩm có chất lượng tốt hơn so với men truyền thống tại thị trấn Quán Hàu [2]. Trong nghiên cứu phân lập và đánh giá hoạt tính của các dòng nấm men, nấm mốc trong các loại bánh men của các làng nghề sản xuất rượu tại các huyện Hoàng Su Phì và Quán Bạ (tỉnh Hà Giang) đã tuyển chọn được nấm mốc *Aspergillus niger* RLN.218 và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RLN.168 có hiệu suất lên men đạt 93,07 % ở nồng độ đường 18,14 %, độ cồn đạt 11,2 % v/v. Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy, tất cả các mẫu thử nghiệm có điểm cảm quan thị hiếu cao hơn mẫu đối chứng được sản xuất từ loại bánh men truyền thống [3].

Nấm men là vi sinh vật điển hình trong việc lên men chuyển hóa đường thành rượu. Bên cạnh khả năng này, trong sản xuất rượu, người ta còn quan tâm đến một số hoạt tính khác của nấm men như khả năng chịu nhiệt, cồn, khả năng kết lắng và sinh H₂S. 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. Việt Nam có khí hậu nhiệt đới gió mùa, nhiệt độ tăng khá cao vào mùa khô, càng gây khó khăn trong việc sản xuất ethanol bằng nấm men do quá trình lên men thường diễn ra tốt trong khoảng (28-33) °C. Việc 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,..., [4] và giảm được chi phí đầu tư cho thiết bị làm mát, mang lại lợi ích kinh tế [5]. Ngoài ra, nồng độ cồn trong môi trường cũng tác động đáng kể đến hoạt động của nấm men, nấm men không chịu được nồng độ cồn cao sẽ dễ bị ức chế trong quá trình lên men dẫn đến hiệu quả lên men không cao. Hơn nữa, nấm men có khả năng kết lắng sẽ là một lợi thế trong quá trình sản xuất rượu, giúp làm trong sản phẩm và nâng cao chất lượng sản phẩm cuối cùng. Cuối cùng,

cần kiểm tra đặc tính sinh H₂S của nấm men để tránh gây mùi không mong muốn trong rượu.

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân lập và tuyển chọn nấm men từ men rượu có khả năng chịu nhiệt, chịu cồn, lắng tốt và không sinh H₂S để ứng dụng trong lên men và sản xuất rượu nhằm tăng hiệu suất lên men, nâng cao chất lượng sản phẩm, cũng như lưu trữ nguồn gen tốt của bản địa, góp phần làm phong phú thêm sự hiểu biết về đa dạng sinh học.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu và hóa chất

Năm mẫu men rượu được thu thập tại các cơ sở sản xuất rượu tại huyện Phong Điền và quận Ninh Kiều (thành phố Cần Thơ). Các cơ sở thu mẫu bao gồm: cơ sở cô Màng (CM, khu dân cư 91B, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều); cơ sở Mười Lực (ML, ấp Thới Giai, xã Giai Xuân, huyện Phong Điền); cơ sở Út Bình (UB, ấp Thới Giai, xã Giai Xuân, huyện Phong Điền); cơ sở Tư Vũ (TV, ấp Tân Long B, huyện Phong Điền); cơ sở cô Ba (CB, đường Nguyễn Văn Cừ, phường Cái Khế, quận Ninh Kiều).

Hóa chất: môi trường sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: môi trường YPD (yeast extract 0,5 % - peptone 0,5 % - D-glucose 2 %), môi trường Sabouraud, môi trường LA (lead acetate 0,1%, ammonium sulfate 0,02 %, yeast extract 0,5 %, peptone 0,3 %, glucose 4 %). Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ công ty Himedia (India) và Xilong Scientific (China).

2.2 Phương pháp

2.2.1 Phân lập và xác định hình thái của các dòng nấm men từ men rượu

Cho 5 g mẫu men rượu vào bình tam giác có chứa 95 mL môi trường YPD. Ủ lactic ở nhiệt độ phòng (28-32) °C trong (24-48) giờ. Dịch tăng sinh được pha loãng đến nồng độ thích hợp. Sau đó, 0,1 mL dịch pha loãng được trải trên môi trường thạch YPD và ủ ở 30 °C trong (24-48) giờ. Thực hiện cấy chuyển nhiều lần đến khi thu được các dòng nấm men thuần. Ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các dòng nấm men được phân lập.

2.2.2 Khảo sát khả năng chịu cồn của nấm men



Các dòng nấm men được phân lập sẽ được nuôi cấy trong 10 mL môi trường YPD có chứa (8, 12, 16, và 20) % v/v ethanol tinh khiết và ủ ở 30 °C trong (48-72) giờ. Sau đó cấy lên môi trường YPD agar và ủ ở nhiệt độ 30 °C trong (48-72) giờ. Nếu nấm men phát triển trên môi trường YPD agar chứng tỏ có khả năng chịu được nồng độ cồn thử nghiệm [6].

2.2.3 Khảo sát khả năng chịu nhiệt của nấm men

Các dòng nấm men được phân lập sẽ được cấy trên môi trường YPD agar và ủ ở các nhiệt độ khác nhau gồm (30, 37, 40 và 45) °C. Quan sát sự phát triển của nấm men từ 24 giờ đến 96 giờ. Nếu nấm men phát triển trên môi trường YPD agar chứng tỏ có khả năng phát triển ở nhiệt độ thử nghiệm [7].

2.2.4 Khảo sát khả năng kết lắng của nấm men

Các dòng nấm men được phân lập sẽ được nuôi cấy trong 10 mL môi trường Sabouraud được điều chỉnh 18 °Bx bằng đường saccharose và ủ ở 30 °C trong 72 giờ. Sau đó, ống nghiệm lấy ra được lắc đều, rồi bắt đầu đo chiều cao đoạn lắng trong ở các ống nghiệm mỗi ngày. Nếu nấm men có khả năng lắng tốt thì trong 7 ngày sau khi lên men, chiều dài đoạn dịch trong > 75 % chiều cao của khối môi trường lên men. Nấm men có khả năng lắng trung bình, chiều dài đoạn dung dịch trong chiếm (50-75) % chiều cao của khối môi trường lên men. Nấm men có khả năng lắng yếu, chiều dài đoạn dịch trong chiếm (25-50) % chiều cao của khối môi trường lên men, nếu chiều dài đoạn dịch trong nhỏ 25 % chiều cao của khối môi trường lên men, thì nấm men không lắng [8].

2.2.5 Khảo sát khả năng sinh hydrogen sulfide (H₂S) của nấm men

Các dòng nấm men được phân lập sẽ được cấy trên môi trường LA agar và ủ ở 30 °C trong 10 ngày. Nếu nấm men không sinh H₂S thì khuẩn lạc phát triển không biến đổi màu, nấm men sinh H₂S ít thì rìa của khuẩn lạc có màu nâu nhạt hoặc màu nâu đen, nấm men sinh nhiều H₂S toàn bộ khuẩn lạc sẽ có màu đen [8].

2.2.6 Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Kết quả được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA). Số liệu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV (Statpoint

Technologies Inc., USA), khác biệt có ý nghĩa tại giá trị $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả phân lập và xác định hình thái của các dòng nấm men từ men rượu

Trong nghiên cứu này, từ 5 mẫu men rượu khác nhau được thu thập tại 5 cơ sở trên địa bàn thành phố Cần Thơ, tổng cộng 12 chủng nấm men đã được phân lập và kết quả một số đặc điểm hình thái được thể hiện trong Bảng 1. Kết quả cho thấy 12 chủng nấm men thuần đã được phân lập và chia thành 4 nhóm hình dạng tế bào khác nhau, bao gồm hình cầu lớn, cầu nhỏ, oval lớn và oval nhỏ. Tế bào nấm men có các hình dạng phổ biến như hình cầu, hình oval, hình elip, hình trụ và đôi khi kéo dài thành hình sợi. Nấm men có thể thay đổi hình dạng và kích thước tùy thuộc vào giai đoạn phát triển và điều kiện môi trường. Điều này cho thấy sự đa dạng về hình dạng tế bào của các dòng nấm men phân lập từ men rượu. Khi phân lập trên môi trường YPD, khuẩn lạc nấm men đều có hình tròn đều, bề mặt trơn láng hoặc xù xì, bìa nguyên hoặc bìa răng cưa, với màu sắc chủ yếu là trắng sữa hoặc trắng trong. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy tất cả các dòng nấm men này đều nảy chồi theo một hướng.

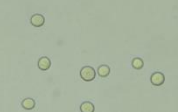

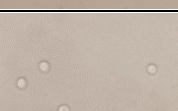
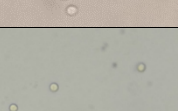

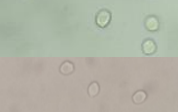
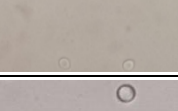

Nghiên cứu trước đây đã tiến hành phân lập các chủng nấm men từ 12 mẫu bánh men và kết quả đã xác định được các loài như *S. cerevisiae*, *Hyphopichia burtonii*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala* và *Candida* sp. dựa vào đặc tính hình thái và sinh lý [9]. Đến năm 2007, trong một nghiên cứu về các loại bánh men ở Việt Nam đã phân lập 119 chủng vi sinh vật từ 29 mẫu bánh men của Việt Nam, bao gồm 53 chủng nấm mốc, 51 chủng nấm men và 15 chủng vi khuẩn. Nghiên cứu đã xác định các dòng này bằng cách giải trình tự, cụ thể gồm *Amylomyces rouxii*, *Amylomyces* aff. *rouxii*, *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *S. cerevisiae*, *C. glabrata* và *P. anomala* [10]. Bên cạnh đó, các dòng nấm men cũng được tìm thấy trong loog-pang-lao (men rượu có nguồn gốc từ Thái Lan) như *P. anomala*, *P. burtonii*, *P. fabianii*, *P. heimii*, *S. cerevisiae*, *S. fibuligera*, *C. rhagii*, *C. glabrata*, *Torulaspora globosa*, *T. delbrueckii*, *Trichosporon asahii*, *Issatchenkia orientalis*, *Rhodotorula philyla*




[11]. Các chủng nấm men được xác định hiện diện trong “hamei”, một loại men khởi động thực hiện quá trình lên men rượu từ gạo nếp của các gia đình tại các làng bộ lạc của Manipur (Ấn Độ) bao gồm *S. cerevisiae*, *P. anomala*, *Trichosporon* sp., *C. tropicalis*, *P. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *T. delbrueckii*, *P. fabianii* và *C. montana* [12]. Một loại men rượu khác của Ấn Độ dùng trong lên men, được gọi là “xaj-pitha”, đã cho thấy sự đa dạng vi sinh vật của cộng đồng vi sinh vật thông qua phương pháp metagenomics đã tìm thấy sự tồn tại nhóm sản xuất ethanol gồm *Meyerozyma*

guilliermondii, *Wickerhamomyces ciferrii*, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *Debaryomyces hansenii*, *Ogataea parapolyomorpha* và *Dekkera bruxellensis* [13].

Nhìn chung, từ kết quả của nghiên cứu này và các nghiên cứu trước đây cho thấy sự đa dạng về vi sinh vật hiện diện trong các “men khởi động” nói chung và bánh men nói riêng. Tuy nhiên, để lưu trữ các nguồn gen có các đặc tính tốt thì việc phân lập là điều cần thiết và tạo tiền đề trong việc chọn lọc những dòng vi sinh nhằm định hướng ứng dụng cho hiệu quả sản xuất cao.

Bảng 1 Đặc điểm của các chủng nấm men được phân lập từ men rượu

Mẫu men rượu	Chủng nấm men	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào	Hình ảnh tế bào nấm men (ở vật kính 40×)
Cô Màng	CM1	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt khô, bìa nguyên	Cầu lớn, nảy chồi một hướng	
	CM2	Tròn, nhỏ, màu trắng sữa, bề mặt khô, bìa nguyên	Oval lớn, nảy chồi một hướng	
Mười Lục	ML1	Tròn, màu trắng đục, bề mặt ướt trơn láng, bìa nguyên	Cầu lớn, nảy chồi một hướng	
	ML2	Tròn, màu trắng trong, bề mặt khô, bìa nguyên	Oval nhỏ, nảy chồi một hướng	
Út Bình	UB1	Tròn, màu trắng trong, bề mặt xù xì, bìa nguyên	Cầu nhỏ, nảy chồi một hướng	
	UB2	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt khô, bìa nguyên	Oval lớn, nảy chồi một hướng	
	UB3	Tròn, màu trắng đục, bề mặt trơn láng, bìa nguyên	Oval nhỏ, nảy chồi một hướng	
Tư Vũ	TV1	Tròn, màu trắng sữa, bề mặt trơn láng, bìa nguyên	Cầu lớn, nảy chồi một hướng	
	TV2	Tròn, màu trắng đục, bề mặt xù xì, bìa nguyên	Oval lớn, nảy chồi một hướng	

	TV3	Tròn, màu trắng trong, bề mặt khô, bìa nguyên	Oval nhỏ, nảy chồi một hướng	
Cô Ba	CB1	Tròn, màu trắng trong, bề mặt trơn láng, bìa nguyên	Cầu lớn, nảy chồi một hướng	
	CB2	Tròn, màu trắng đục, bề mặt khô, bìa nguyên	Oval lớn, nảy chồi một hướng	

3.2 Kết quả đánh giá khả năng chịu cồn của các dòng nấm men phân lập từ men rượu

Khả năng chịu cồn của nấm men quyết định xem chúng có thể tiếp tục phát triển và lên men hiệu quả khi nồng độ cồn trong môi trường tăng cao. Nếu nấm men không chịu được nồng độ cồn cao, quá trình lên men có thể bị dừng lại trước khi hoàn tất, dẫn đến sản phẩm không đạt được nồng độ cồn mong muốn. Chính vì vậy, trong thí nghiệm này tiến hành khảo sát khả năng chịu cồn của 12 dòng nấm men đã phân lập và kết quả được trình bày ở Bảng 2.

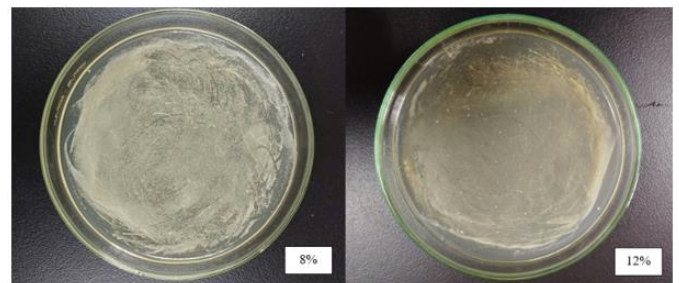
Bảng 2 Khả năng chịu ethanol (% v/v) của các dòng nấm men phân lập

Tên cơ sở	Dòng nấm men	Hàm lượng ethanol (% v/v)				Đặc điểm tế bào
		8	12	16	20	
Cô Màng	CM1	++++	+++	-	-	Hình cầu lớn
	CM2	++++	+++	-	-	Hình oval lớn
Mười Lược	ML1	++++	-	-	-	Hình cầu lớn
	ML2	++++	+++	-	-	Hình oval nhỏ
Út Bình	UB1	++++	+++	-	-	Hình oval lớn
	UB2	++++	+++	-	-	Hình cầu nhỏ
	UB3	++++	+++	-	-	Hình oval nhỏ
Tư Vũ	TV1	++++	+++	-	-	Hình oval nhỏ
	TV2	++++	+++	-	-	Hình oval lớn
	TV3	++++	-	-	-	Hình cầu lớn
Cô Ba	CB1	++++	++	-	-	Hình cầu lớn
	CB2	++++	+++	-	-	Hình oval lớn

Chú thích: Sinh trưởng rất nhiều: +++++, Sinh trưởng nhiều: +++, Sinh trưởng ít: ++, Có sinh trưởng: +, Không sinh trưởng: -

Một trong các phương pháp xác định khả năng chịu cồn của nấm men là theo dõi sự phát triển của nấm men trong môi trường có chứa các nồng độ cồn khác nhau. Nấm men chịu được cồn ở một nồng độ nào đó có nghĩa là nó có thể duy trì hoạt động trao đổi chất trong môi trường lên men và chịu được tới nồng độ cồn đó trong giai đoạn lên men. Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở độ cồn 8 % v/v, tất cả các dòng nấm men đều sinh trưởng và phát triển bình thường. Ở nồng độ cồn cao hơn thì các dòng nấm men bắt đầu có sự phân hóa về khả năng chịu cồn, theo đó ở nồng độ cồn 12 % thì có 10 dòng sinh trưởng được ở nồng độ này. Không có dòng nấm

men nào sinh trưởng được ở mức nồng độ cồn (16 và 20) % v/v.



Hình 1 Chủng nấm men chịu cồn CM1 phát triển trên môi trường thạch YPD

Báo cáo trong một nghiên cứu về dòng nấm men *S. cerevisiae* phân lập từ Toddy (rượu cọ) có thể chịu được tới 15 % cồn trong môi trường [14]. Tuy nhiên, trong một báo cáo kết quả khác cho thấy *S. cerevisiae* phân lập từ rượu cọ chỉ chịu tới 8 % cồn [15]. Ngoài ra, các dòng *S. cerevisiae* (KY1 & KY3) có khả năng chịu đựng tới 15 % cồn và có một dòng *S. cerevisiae* (KY2) chịu được tới 20 % cồn đã dẫn đến sản xuất ethanol tối đa khi kéo dài thời gian lên men [16]. Mỗi giống nấm men có khả năng chịu được nồng độ rượu khác nhau, có giống chịu được cồn ở nồng độ thấp như *Hansenula* spp., *Anomala* spp. và một số men đại chỉ chịu được 3 % nhưng hầu hết các loài *S. cerevisiae* được báo cáo đều chịu được nồng độ cồn cao ở nhiệt độ tăng trưởng bình thường (30 °C), các dòng nấm men này có thể chịu được (9-12) % cồn và lên men đạt tới (14-16) % [17]. Màng tế bào của nấm men là cơ quan đầu tiên tiếp xúc với cồn, các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng sự thay đổi hàm lượng của các thành phần màng như acid béo không bão hòa có thể được xác định để suy ra tính lưu động của màng dưới áp lực của cồn và do đó ảnh hưởng đến khả năng dung nạp của tế bào [18].

Hơn nữa, khả năng chịu cồn của nấm men còn phụ thuộc vào nhiệt độ. Trong thử nghiệm ở nhiệt độ cao về

khả năng chịu cồn, *S. cerevisiae* phân lập từ trái cây được ghi nhận là chịu được nồng độ cồn cao lên tới 13 % ở 35 °C [19]. Nhìn chung, việc sử dụng các dòng nấm men có khả năng dung nạp ethanol cao hơn để cải thiện sản lượng ethanol trong quá trình lên men sẽ làm giảm chi phí chưng cất và do đó mang lại lợi nhuận cho toàn bộ quy trình. Trong nghiên cứu này, với 12 dòng nấm men phân lập, tất cả đều chịu được nồng độ cồn ở mức 8 % v/v, trong đó có 10 dòng chịu được nồng độ cồn ở mức 12 % v/v và không có dòng nào chịu được cồn ở mức (16 và 20) % v/v.

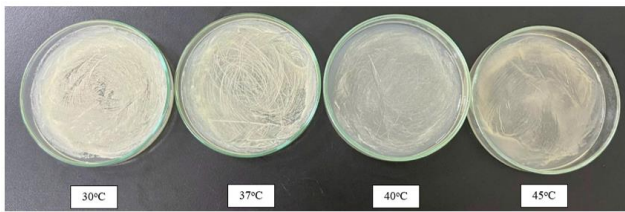
3.3 Kết quả đánh giá khả năng chịu nhiệt của các dòng nấm men phân lập từ men rượu

Trong các quy trình sản xuất ethanol, nhiệt độ là một trong những yếu tố chính quyết định chi phí vận hành của các quy trình lên men công nghiệp và chất lượng của sản phẩm có cồn vì nó ảnh hưởng đến hoạt động của các tế bào trong tế bào nấm men. Mỗi loại nấm men sẽ có sự khác biệt lớn về nhiệt độ tối ưu do sự khác nhau về mặt địa lý của môi trường sống. Bên cạnh việc đánh giá khả năng chịu cồn, khả năng chịu nhiệt của 12 dòng nấm men được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3 Khả năng chịu nhiệt của các dòng nấm men phân lập

Tên cơ sở	Dòng nấm men	Nhiệt độ (°C)			
		30	37	40	45
Cô Màng	CM1	++++	+++	++	+
	CM2	++++	+++	++	+
Mười Lục	ML1	++++	+++	+	-
	ML2	++++	+++	++	-
Út Bình	UB1	++++	+++	-	-
	UB2	++++	+++	-	-
	UB3	++++	+++	+	-
Tư Vũ	TV1	++++	+++	+	-
	TV2	++++	+++	-	-
	TV3	++++	+++	-	-
Cô Ba	CB1	++++	+++	+	+
	CB2	++++	+++	++	-

Chú thích: Sinh trưởng rất nhiều: +++++, Sinh trưởng nhiều: +++, Sinh trưởng ít: ++, Có sinh trưởng: +, Không sinh trưởng: -



Hình 2 Chủng nấm men chịu nhiệt CM1 phát triển trên môi trường thạch YPD

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, cả 12 dòng nấm men phân lập được đều chịu được nhiệt độ 30 °C và 37 °C do nhiệt độ môi trường vùng Đồng bằng sông Cửu Long phổ biến ở (30-32) °C nên tất cả các dòng nấm men phân lập được đều có khả năng phát triển ở nhiệt độ 30 °C và 37 °C, 8 dòng có khả năng chịu được nhiệt độ 40 °C và 3 dòng có khả năng chịu được nhiệt độ ở 45 °C. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của Guimaraes phân lập nấm men *S. cerevisiae* tại các vùng sản xuất rượu nho ở Brazil chỉ có 2 dòng nấm men chịu nhiệt ở 45 °C trong 15 dòng thử nghiệm [12]. Một nghiên cứu khác đã đánh giá khả năng chịu đựng của 66 dòng *S. cerevisiae* trong điều kiện căng thẳng (nhiệt độ, thẩm thấu, khả năng chịu đựng sulfite và ethanol). Kết quả cho thấy trong các điều kiện tăng trưởng khác nhau, chẳng hạn như nhiệt độ khác nhau (30 °C, 37 °C, và 42 °C), nồng độ NaCl (0,5, 0,7 và 1) mol/L, nồng độ sulfite (0,02 và 0,04) % w/v, nồng độ ethanol (0, 6, 12 và 18) % thì 66 chủng nấm men được phân thành hai nhóm lớn. Trong đó, 1 nhóm có khả năng chịu được các điều kiện khắc nghiệt nhất như có thể phát triển ở 42 °C, trong NaCl 1 M, sulfite 0,04 % (w/v) và chịu được 12 % cồn [20].

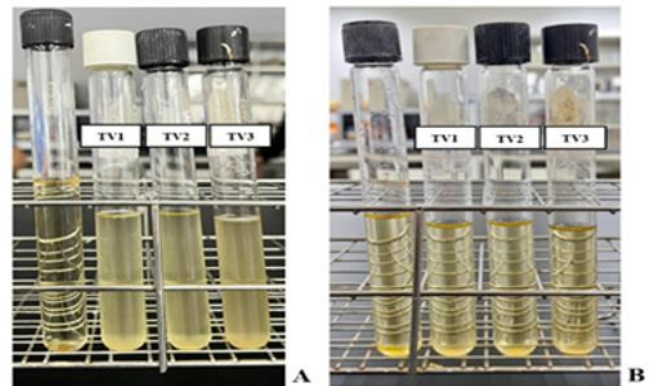
Nhìn chung, các nghiên cứu cho thấy mỗi dòng nấm men thì có nhiệt độ phát triển khác nhau nhưng hầu hết nấm men có nhiệt độ phát triển tối ưu nằm trong khoảng (28-33) °C. Khả năng chịu nhiệt là một đặc điểm đa gen chịu ảnh hưởng của một nhóm gen không biểu hiện gen nên cần tìm hiểu sâu hơn về tác động của nhiệt độ nuôi cấy lên sinh lý của nấm men.

3.4 Kết quả đánh giá khả năng kết lắng của các dòng nấm men phân lập từ men rượu

Ngoài việc khảo sát khả năng chịu cồn và chịu nhiệt, các dòng nấm men còn được khảo sát khả năng kết lắng. Cả 12 dòng nấm men đều có khả năng kết lắng tốt, dịch lên men trong (phần dịch trong có độ cao lớn

hơn 75 % chiều cao của dịch lên men) sau 7 ngày lên men trên môi trường Sabouraud lỏng có bổ sung đường saccharose đến hàm lượng chất khô hòa tan bằng 18 %, các dòng nấm men được khảo sát lắng nhanh làm cho dịch môi trường lên men trong suốt, khả năng kết lắng của 12 dòng nấm men khảo sát đều tốt khi so với nghiên cứu đã công bố 18 dòng men khảo sát chỉ có 1 dòng có khả năng kết lắng tốt [8].

Khả năng kết lắng là một đặc tính rất tốt dùng để sản xuất rượu vang, vì nấm men kết lắng tốt thuộc nhóm nấm men lên men chìm, nhóm nấm men lên men chậm, nên khả năng giữ mùi hương cao, kết lắng tốt làm cho rượu trong nên trong quá trình lắng sẽ không tốn thêm các phụ gia cũng như thiết bị lọc. Mặt khác, nếu nấm men thuộc nhóm nấm men lên men bề mặt hoạt lực lên men mạnh, CO₂ sinh ra nhiều mang theo các chất thơm, làm mất mùi thơm của rượu, cho nên trong sản xuất rượu vang người ta không sử dụng nấm men thuộc nhóm lên men bề mặt. Điều đó cho thấy trong bánh men có khả năng chứa các nấm men có đặc tính lắng tốt.



A: Sau 1 ngày lên men

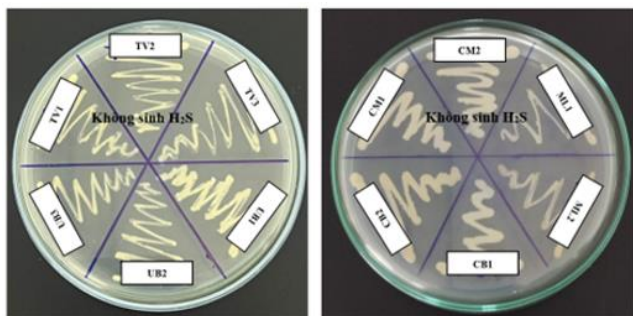
B: Sau 7 ngày lên men

Hình 3 Khả năng kết lắng sau 7 ngày lên men của một số dòng nấm men

3.5 Kết quả đánh giá khả năng sinh hydrogen sulfide của các dòng nấm men phân lập từ men rượu

Trong môi trường LA, có chứa chì acetate, nếu nấm men sản xuất H₂S, thì H₂S sẽ phản ứng với chì acetate tạo PbS có màu đen, H₂S sinh ra càng nhiều thì càng nhiều PbS được tạo ra, nồng độ PbS càng cao sẽ làm cho môi trường càng đen, các dòng không sinh H₂S sẽ không làm thay đổi màu môi trường, các giống nấm men sinh nhiều H₂S sẽ làm cho rượu có mùi trứng thối không thích hợp cho sản xuất rượu. Do vậy, khả năng sinh H₂S của 12 dòng nấm men phân

lập đã được khảo sát. Trong 12 dòng khảo sát thì tất cả các dòng đều không sinh H_2S , không làm đen môi trường LA như Hình 3. Trong một nghiên cứu về khả năng sinh H_2S của nấm men được phân lập ở Brazil thì số dòng có khả năng sinh H_2S chiếm đến 53,33 % (8/15). Hơn nữa, trong nghiên cứu về các dòng nấm men được phân lập từ bánh men rượu ở Đồng bằng sông Cửu Long cho thấy có đến 66,66 % dòng có khả năng sản xuất H_2S (20/30) [8].



Hình 4 Khả năng sinh H_2S và không sinh H_2S trên môi trường LA của các dòng nấm men

4 Kết luận

Mười hai chủng nấm men được phân lập từ 5 mẫu men rượu được sử dụng trên địa bàn thành phố Cần Thơ đã được nhận diện và mô tả. Trong đó, tất cả các chủng nấm men phân lập được đều có khả năng chịu được cồn ở nồng độ 8 % v/v, 10 chủng có khả năng chịu được cồn ở nồng độ 12 % v/v. Tất cả chủng nấm men phân lập đều có khả năng phát triển ở 37 °C, 8 chủng nấm men có khả năng phát triển ở 42 °C và 3 chủng có khả năng phát triển ở 45 °C, qua đó cho thấy nấm men từ men rượu trên địa bàn thành phố Cần Thơ có khả năng phát triển ở nhiệt độ cao. Bên cạnh đó, 12 chủng nấm men này đều không sinh H_2S , lắng tốt (chiều cao đoạn dịch trong lớn hơn 75 % chiều cao đoạn dịch lên men).

Lời cảm ơn Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về cơ sở vật chất và kinh phí thực hiện của Trường Đại học Cần Thơ và Sở Khoa học và Công nghệ TP. Cần Thơ.

Tài liệu tham khảo

1. Ngô Thị Phương Dung. (2009). Sản xuất và ứng dụng men thuần trong lên men rượu nếp than. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 11B, 392-403.
2. Nguyễn Đức Vượng, Phạm Nam Giang, Trần Thanh Hằng, Trần Hữu Trung, Nguyễn Thị Mỹ Hằng, Đinh Thị Hồng. (2015). Làm men riêng lên men rượu từ riêng tại phường Quảng Long, thị xã Ba Đồn, tỉnh Quảng Bình. *Tạp chí Thông tin Khoa học và Công nghệ Quảng Bình*, 4, 43-45.
3. Phạm Anh Tuấn, Hoàng Văn Đạt, Hồ Tuấn Anh. (2017). Tuyển chọn dòng nấm men, nấm mốc từ bánh men lá ứng dụng trong nâng cao chất lượng rượu làng nghề tại Hà Giang. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6(79), 73-79.
4. Roehr, M. (2001). The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. *Federal Republic of Germany*, 6(12), 1019-1020.
5. 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.
6. Benítez, T., Del Castillo, L., Aguilera, A., Conde, J., & Cerdáolmedo, E. (1983). Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5), 1429-1436.
7. 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.

8. Guimarães, T. M., Moriel, D. G., Machado, I. P., Picheth, C. M. T. F., & Bonfim, T. M. B. (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1), 119-126.
9. Lee, A. C., & Fujio, Y. (1999). Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(1), 51-55.
10. Dung, N. T. P., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2007). Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men). *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 130-135.
11. Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P. & Longtong, N. (2002). Yeast diversity in Thai traditional alcoholic starter. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 36(2), 149-158.
12. Jeyaram, K., Singh, W. M., Capece, A., & Romano, P.(2008). Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' - A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 115-125.
13. Bora, S. S., Keot, J., Das, S., Sarma, K., & Barooah, M. (2016). Metagenomics analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (Xaj-pitha) of Assam, India. *3 Biotech*, 6(2), 1-13.
14. Kumar, R. S., Shankar, T., & Anandapandian, K. T. K. (2011). Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. *International Research Journal of Microbiology*, 2(10), 399-405.
15. Zainab, A., Amos, Y., Datsugwai, M. S. S., & Mathew, B. (2018). Quality assessment of water melon (*Citrullus lanatus*) wine produced using *Saccharomyces cerevisiae* isolated from palm wine. *Journal of Biomaterials*, 2(2), 65-73.
16. Khaing, T. W., Weine, N., & Mya, M. O. (2008). Isolation, characterization and screening of thermo tolerant, ethanol tolerant indigenous yeasts and study on the effectiveness of immobilized cell for ethanol production. *Journal of Science and Technology*, 1, 12-14.
17. Stanley, D., Fraser, S., Chambers, P. J., Rogers, P., & Stanley, G. A. (2010). Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(2), 139-149.
18. Niu, Y. P., Lin, X. H., Dong, S. J., Yuan, Q. F., & Li, H. (2016). Indentation with atomic force microscope, *Saccharomyces cerevisiae* cell gains elasticity under ethanol stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 79, 337-344.
19. 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.
20. Ramos, C. L., Duarte, W. F., Freire, A. L., Dias, D. R., Eleutherio, E. C. A., & Schwan, R. F. (2013). Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 935-944.

Isolation and characterization of yeast strains from alcoholic starters in Can Tho City

Huynh Quoc Huy^{1,*}, Nguyen Thi My Trinh¹, Tran Thi Nhu Ngoc¹, Luu Minh Chau¹,
Nguyen Ngoc Thanh¹, Doan Thi Kieu Tien², Huynh Xuan Phong^{1,**}

¹Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University

²Faculty of Biochemical and Food Technology, Can Tho University of Technology

*huym0522003@gstudent.ctu.edu.vn, **hxphong@ctu.edu.vn

Abstract Rice wine is generally popular in Viet Nam and Mekong Delta region in particular. For traditional village-made rice wine, the quality of the fermentation starter is one of the key factors that determines the yield and quality of the wine. This study was conducted to isolate yeast strains from fermentation starter samples in Can Tho City and determine several characteristics of the isolated yeast strains, such as ethanol tolerance, heat tolerance, sedimentation ability, and H₂S production. The aim was to preserve pure yeast strains and to apply them in the local rice wine fermentation process. The results showed that 12 yeast strains were isolated from 5 alcoholic starter samples. When assessing alcohol tolerance, all these yeast strains could withstand alcohol concentrations of 8 % v/v, with 10 strains tolerating 12 % v/v. All isolated yeast strains could grow at temperatures of 30 °C and 37 °C, 8 strains could grow at 40 °C, and 3 strains could grow at 45 °C. Additionally, none of the 12 isolated yeast strains produced H₂S, and they all had good sedimentation ability.

Keywords Ethanol tolerance, heat tolerance, alcoholic fermentation, alcoholic starter, yeast.