

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CHŨNG NẤM MEN TỪ MEN THUỐC BẮC CÓ KHẢ NĂNG LÊN MEN TẠO DỊCH DƯA HẦU (*Citrullus lanatus*) LÊN MEN CÓ CHẤT LƯỢNG CAO

Đỗ Thị Bích Thủy*, Trần Thanh Quỳnh Anh

Khoa Cơ khí và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: dtbthuy@hueuni.edu.vn

Ngày nhận bài: 19.09.2022

Ngày chấp nhận đăng: 02.03.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh được chủng nấm men có khả năng lên men dịch ép dưa hấu tạo ra sản phẩm có chất lượng tốt. Từ bánh men thuốc bắc, chủng *Saccharomyces cerevisiae* M11 đã được tuyển chọn thông qua sự xác định nồng độ rượu, hàm lượng aldehyde, phenolic tổng số, anthocyanine, khả năng chống oxy hóa dịch lên men và định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, giải trình tự vùng ITS (Internal Transcribed Spacer Regions). Kết quả cho thấy, sản phẩm lên men dịch chiết dưa hấu bởi chủng này có hàm lượng ethanol ($11,6 \pm 0,1^\circ$), phenolic tổng số (0,06mg GAE/ml), anthocyanine ($0,589 \pm 0,012$ mg/l) và khả năng chống oxy hóa ($0,589 \pm 0,012$ mg/l) là cao nhất và hàm lượng aldehyde ($57,7 \pm 2,68$ mg/l ethanol 100°) thấp nhất so với các chủng còn lại (M2, M7 và M14).

Từ khóa: Anthocyanine, dưa hấu, ethanol, lên men, *Saccharomyces cerevisiae*.

Isolation, Screening and Identification of Yeast Strain for Producing a High Quality Fermented Watermelon (*Citrullus lanatus*) Juice

ABSTRACT

This research was conducted to isolate, screen and identify yeast strain capable of producing high quality fermented watermelon juice. The strain *Saccharomyces cerevisiae* M11 was selected based on the content of alcohol, aldehyde, phenolic total, anthocynine, and antioxidant capacity in fermented watermelon juice and identified by sequencing region of ITS (Internal Transcribed Spacer Regions). The results showed that the strain M11 produced highest content of alcohol ($11.6 \pm 0.1^\circ$), phenolic total (0.06mg GAE/ml), anthocynine (0.589 ± 0.012 mg/l), and antioxidant capacity (0.589 ± 0.012 mg/l) while the another strains (M2, M7 and M14) produced lowest content of aldehyde (57.7 ± 2.68 mg/l ethanol 100°) in fermented product.

Keywords: Anthocyanine, ethanol, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, watermelon juice.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưa hấu có chứa nhiều lycopene, vitamin C, β -carotene và phenolic tổng số có tác dụng chống viêm, chống ung thư và chống oxy hóa tốt, làm giảm tỷ lệ mắc các bệnh mãn tính như tăng huyết áp, tiểu đường, ung thư và bệnh về tim mạch. Ngoài ra, dưa hấu còn chứa hàm lượng lớn chất xơ, có tác dụng chống một số bệnh về tiêu hóa như táo bón, trĩ, làm giảm hàm lượng cholesterol và

giảm nguy cơ bị các bệnh tim mạch cho cơ thể (Maoto & cs., 2019). Hiện nay, loại cây này được trồng phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, trong đó quá nửa diện tích được trồng ở vùng Đông Nam Á, Châu Phi, vùng biển Caribe và miền Nam nước Mỹ (Widholm & cs., 2005). Đây là loại quả theo mùa, thời gian bảo quản không dài, dễ hư hỏng làm giảm giá trị dinh dưỡng và giá thành. Do đó, việc chế biến và bảo quản dưa hấu sau thu hoạch là vấn đề đáng quan tâm.

Phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm men từ men thuốc bắc có khả năng lên men tạo dịch dưa hấu (*Citrullus lanatus*) lên men có chất lượng cao

Từ lâu con người đã biết sử dụng nấm men trong tự nhiên để lên men các loại quả. Bánh men thuốc bắc chứa hệ vi sinh vật tự nhiên bao gồm nấm mốc, nấm men và vi khuẩn có khả năng sinh trưởng tổng hợp hệ enzyme đường hóa và lên men rượu. Trong đó, nhóm nấm men chủ yếu là *Saccharomyces cerevisiae* (Lương Đức Phẩm, 2010). Loài này được sử dụng trong lên men rượu. Tùy vào từng loại nguyên liệu khác nhau mà sẽ có các chủng nấm men thích hợp sử dụng trong quá trình lên men để tạo ra được sản phẩm đặc trưng. Sản phẩm rượu được làm từ các loại nước dịch quả được gọi chung là rượu vang. Bản chất của rượu vang là sản phẩm được sản xuất từ nước dịch quả bằng phương pháp lên men với sự tham gia của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có độ cồn 9-15° và những thành phần khác như vitamin, muối khoáng, axit hữu cơ.

Trong những năm gần đây nhu cầu về nước giải khát được chế biến và sản xuất các sản phẩm từ quả ngày một tăng. Nhiều công trình đã công bố phân lập loài nấm men *Saccharomyces cerevisiae* để lên men dịch quả nhằm dễ kiểm soát được chất lượng sản phẩm. Từ dịch quả dâu, Nguyễn Văn Vũ & Nguyễn Văn Thành (2018) phân lập và tuyển chọn chủng nấm men CB1.1 có hoạt tính lên men cao tạo ra sản phẩm nồng độ rượu là 13,76°. Thực hiện nghiên cứu nhằm phân lập và tuyển chọn được dòng nấm men có khả năng lên men dịch quả măng cầu xiêm, Nguyễn Ngọc Thanh & cs. (2021) đã tuyển chọn được 4 dòng nấm men triển vọng trong số 30 chủng phân lập được. Trong đó, chủng *Saccharomyces cerevisiae* FBY015 có khả năng lên men tốt nhất với độ rượu đạt được là 10,7°. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* S6 được phân lập từ quả hồng xiêm và định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA bởi Nguyễn Văn Bá & cs. (2021). Dịch ép hồng xiêm được lên men bởi chủng này tạo ra rượu vang có nồng độ ethanol đạt 10,1°. Trong số 21 chủng nấm men đã được tuyển chọn, chủng SM2 thể hiện hoạt lực lên men rượu tốt nhất được sử dụng để sản xuất rượu vang thốt nốt (Nguyễn Minh Thủy & cs., 2011). Sản phẩm rượu thốt nốt được lên men bởi chủng

này với dịch lên men Bx ban đầu là 22; pH 4,5; mật số tế bào nấm men 10^5 CFU/ml, lên men ở 30°C, cho hàm lượng ethanol 13,67°. Tiến hành nghiên cứu phân lập và tuyển chọn dòng nấm men thuần từ nguồn sơ ri, Lý Thị Thanh Thảo & cs. (2021) đã phân lập được 6 dòng nấm men từ mẫu sơ ri lên men tự nhiên, trong đó dòng nấm men SR4 có khả năng lên men nhanh và cho độ cồn cao (12,33°). Nghiên cứu lên men nước ép dưa hấu bởi *Saccharomyces cerevisiae* phân lập từ rượu cọ được thực hiện bởi Hafsat & cs. (2015). Kết quả cho thấy các thông số thích hợp là Bx 8,3, pH 3,5. Sản phẩm có độ cồn là 9,86°, màu trắng, vị ngọt và hương vị tốt.

Một số công trình khác đã thực hiện nghiên cứu tối ưu hóa quá trình lên men dịch trái cây. Phạm Thị Cẩm Hoa & cs. (2017) đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình lên men rượu vang từ trái chùm ruột, kết quả cho thấy sản phẩm thu được tốt nhất khi bổ sung nấm men với tỷ lệ 0,2% (v/v) từ dịch nấm men đã được hoạt hóa đạt mật độ $11,55 \times 10^7$ tế bào/ml, điều chỉnh dịch ban đầu đạt nồng độ chất khô 20°Bx, pH 3,5 và tiến hành lên men chính trong 5 ngày. Sản phẩm rượu thu được có độ cồn 12,57°, nồng độ chất khô còn lại là 10,4 Bx, axit tổng 0,54%. Nghiên cứu xác định các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men dịch trái trám (*Syzygium cumini* L.), Huỳnh Ngọc Thanh Tâm & cs. (2020) đã sử dụng dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* TN4. Kết quả cho thấy với pH 4,2, 24°Bx và mật số nấm men ban đầu là 6×10^6 tế bào/ml sẽ cho độ cồn cao nhất đạt 10,78% v/v sau 10 ngày lên men. Huỳnh Thị Ngọc Ni & Đoàn Thị Kiều Tiên (2021), đã tiến hành nghiên cứu khảo sát quy trình lên men nước thanh long trắng bằng chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV100, kết quả nghiên cứu cho thấy nước ép thanh long lên men tốt ở 72 giờ với tỷ lệ tiếp giống 2%, 22°Bx và pH 4,6. Djoulde & cs. (2010) đã công bố rằng lên men dưa hấu có hàm lượng ethanol từ 8-13%, tổng độ axit từ 1,2-1,7 g/l. Kết quả của công trình này cho thấy dưa hấu lên men có hàm lượng polyphenol cao và khả năng chống oxy hóa mạnh so với Ginkgo-biloba, bia lúa miến và các loại rượu mẫu khác.

Như vậy, việc phân lập tuyển chọn các chủng nấm men từ dịch lên men các loại quả đã được quan tâm nhiều cả trong và ngoài nước. Một số công trình nghiên cứu để tìm ra các chủng có hoạt lực cao thích hợp cho từng loại quả lên men khác nhau, để đem lại rượu vang có chất lượng cao nhất. Tuy nhiên, chưa có công trình nào phân lập và tuyển chọn nấm men từ bánh men thuốc bắc và sử dụng để khảo sát sự biến đổi của một số hợp chất có được tính của sản phẩm khi lên men dịch dưa hấu. Trong công trình này, để khai thác hệ nấm men từ bánh men thuốc bắc, chúng tôi phân lập tuyển chọn dòng nấm men từ nguồn này có khả năng tạo ra sản phẩm dịch ép dưa hấu lên men có chất lượng tốt trên cơ sở phân tích hàm lượng ethanol, aldehyde, phenolic tổng số, anthocyanine và khả năng chống oxy hóa của dịch lên men. Chủng nấm men tuyển chọn sẽ được ứng dụng làm giống khởi động cho quy trình sản xuất rượu vang từ dưa hấu.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu là dưa hấu kame sweet F1 và bánh men thuốc bắc thu nhận trên thị trường ở Huế

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh nấm men

Phân lập: Bánh men thuốc bắc được ủ với dịch ép dưa hấu có bổ sung saccharose Bx 12, ở 37°C, 3-4 ngày. Chọn những mẫu có lên men rượu để thu sinh khối dùng phân lập nấm men. Sinh khối thu được (1g) sau khi lên men chính được tạo huyền phù trong 9ml nước muối sinh lý (0,9%). Huyền phù này sau đó được tiếp tục pha loãng thập phân. Sau đó, dịch huyền phù với các độ pha loãng phù hợp được cấy trang trên đĩa petri có chứa môi trường Hansen agar (glucose 50 g/l; pepton 10 g/l; KH_2PO_4 3 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g/l; agar 2%; pH 6) và ủ ở 28-32°C trong 24-48 giờ. Khuẩn lạc đơn được tiếp tục cấy chuyển trên petri có chứa môi trường Hansen agar cho đến khi thuần và soi kính hiển vi. Những khuẩn

lạc có hình oval và có nảy chồi được nghi ngờ là nấm men được chọn để định danh.

Định danh nấm men: Nấm men được định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS (Internal Transcribed Spacer Regions) (Leaw & cs., 2007).

Để tách chiết DNA của nấm men, trước hết, sinh khối thu được sau khi ly tâm dịch nuôi cấy khuẩn lạc đơn trong môi trường Hansen lỏng 24 giờ (9.000 vòng/phút, 2 phút) và rửa bằng nước cất vô trùng. Sau đó, sinh khối tế bào được tiếp tục bổ sung 800µl đệm tách (đệm CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) (100mM Tris-HCl, pH 8; 2% CTAB; 1,4M NaCl; 20mM axit ethylenediaminetetraacetic và 0,2% β -mercaptoethanol), trộn đều, rồi thêm 40µl SDS 20%, vortex trong khoảng 2 phút, ủ ở 65°C trong 30 phút. Mẫu sau khi ủ được ly tâm ở 4°C, 13.000 vòng/phút trong 15 phút, thu dịch nổi và cho vào các ống eppendorf (EP) 1,5ml mới. Mỗi ống chứa dịch mẫu được cho thêm một thể tích tương đương PCI (phenol: chloroform: isoamylalcohol với tỷ lệ 25:24:1), trộn đều rồi ly tâm hỗn hợp ở 4°C, 13.000 rpm, 15 phút. Lớp dịch nổi ở lớp trên cùng được hút ra và cho thêm isopropanol đậm đặc với thể tích tương đương tỉ lệ 1:1, trộn đều và ủ mẫu ở nhiệt độ -40°C khoảng 2 tiếng. Sau khi ủ, mẫu được ly tâm 4°C, 13.000rpm trong 10 phút để thu kết tủa genomic DNA và loại bỏ isopropanol. Kết tủa sau đó sẽ được rửa bằng ethanol 70% và làm khô một cách tự nhiên ở điều kiện nhiệt độ phòng để loại bỏ ethanol còn lại trong mẫu và bổ sung vào EP 30µl nước cất vô trùng để thu mẫu dịch genomic DNA. Mẫu dung dịch genomic DNA được chạy điện di trên 1% agarose gel ở 80V, trong 35 phút để kiểm tra genomic DNA. Các mẫu dung dịch DNA đạt chuẩn sau khi được khử RNA bằng cách bổ sung 1µl RNase (100 µg/µl) và ủ ở 37°C trong 30 phút rồi bảo quản ở 4°C.

Mẫu DNA tổng số của các chủng nấm men được sử dụng để tiến hành *phản ứng PCR* với cặp môi ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') - (ITS45'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Thành phần phản ứng PCR gồm 30µl Go Taq Green Master Mix (2X, Promega), 3µl Primer barcode - F (10 pmol/µl, 3µl Primer barcode - R

Phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm men từ men thuốc bắc có khả năng lên men tạo dịch dưa hấu (*Citrullus lanatus*) lên men có chất lượng cao

(10 pmol/μl, 6μl Genomic DNA, 18μl nước cất 2 lần. Quá trình PCR được thực hiện theo 30 chu kỳ gồm: biến tính ở 95°C trong 1 phút, gắn môi ở 53°C trong 1 phút và kéo dài primer ở 72°C trong 1 phút. Sản phẩm PCR hoàn thiện trong 10 phút ở nhiệt độ 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên agarose gel 1% được nhuộm bằng SafeView Classic Nucleic Acid Stains của hãng ABM trong đệm TAE 1x, tiến hành điện di ở 70V trong 30 phút.

Sản phẩm PCR được gửi *phân tích trình tự nucleotide* ở công ty 1st BASE (Apical Scientific Sdn Bhd, Malaysia). Kết quả giải trình tự DNA được xử lý bằng phần mềm Bioedit (v7.2.5). Đánh giá mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA bằng cách đối chiếu với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu nr-nt của NCBI bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) với các tham số mặc định.

2.2.2. Xác định trực tiếp số lượng tế bào bằng buồng đếm hồng cầu

Nguyên tắc: Kiểm tra mật độ tế bào nấm men theo phương pháp đếm tế bào bằng kính hiển vi, sử dụng buồng đếm hồng cầu (Lê Thanh Mai & cs., 2006). Theo đó, mẫu cần xác định được cho vào khe hở giữa buồng đếm và lá kính và đếm số tế bào nấm men dưới kính hiển vi với vật kính x40.

2.2.3. Xác định hàm lượng anthocyanin

Hàm lượng anthocyanin được xác định bằng phương pháp pH theo tiêu chuẩn TCVN 11028:2015 với nguyên tắc là chất tạo màu anthocyanin thay đổi màu sắc theo pH, tại pH 1,0 các anthocyanin tồn tại ở dạng oxonium, tại pH 4,5 chúng chủ yếu ở dạng hemiketal không màu. Chênh lệch độ hấp thụ của các chất màu ở bước sóng 520nm tỷ lệ thuận với nồng độ của chất tạo màu. Các kết quả được biểu thị theo cyanidin-3-glucoside.

Anthocyanin trong mẫu thí nghiệm (2ml) được trích ly trong dung môi ethanol/nước (1:1) có 1% HCl. Quá trình trích ly được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Phần dịch trong được thu nhận sau khi ly tâm 7.000 vòng/phút

trong 15 phút được sử dụng để xác định hàm lượng anthocyanin. Pha loãng mẫu thử với dung dịch đệm pH 1,0 và pH 4,5 cho đến khi độ hấp thụ ở 520nm nằm trong dải tuyến tính của máy đo quang phổ (độ hấp thụ thường có giá trị từ 0,2 đến 1,4). Độ hấp thụ của mẫu đã được pha loãng ở trên được đo ở 2 bước sóng 520nm và 700nm.

Tính kết quả: Nồng độ chất tạo màu anthocyanin tính theo đương lượng cyanidin-3-glucoside, biểu thị bằng miligam trên lít (mg/l), được tính bằng công thức sau đây:

$$\text{Anthocyanin (mg/l)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times L}$$

Trong đó, A là độ hấp thụ của phần mẫu thử, tính được tính như sau:

$$A = (A_{520}^{1,0} - A_{700}^{1,0}) - (A_{520}^{4,5} - A_{700}^{4,5})$$

$A_{520}^{1,0}$ là độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 1,0 đo được ở bước sóng 520nm; $A_{700}^{1,0}$ là độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 1,0 đo được ở bước sóng 700nm; $A_{520}^{4,5}$ là độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 4,5 đo được ở bước sóng 520nm; $A_{700}^{4,5}$ là độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 4,5 đo được ở bước sóng 700nm; DF là hệ số pha loãng; MW là khối lượng phân tử của cyanidin-3-glucoside, bằng 449,2 g/mol. L là chiều dài đường quang (chiều dày của cuvet đựng mẫu) (cm). ϵ là hệ số tắt phân tử (bằng 26900) của cyanidin-3-glucoside ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$); và 10^3 là hệ số chuyển đổi từ gam sang miligam.

2.2.4. Xác định hàm lượng phenolic tổng số

Mẫu thí nghiệm (2ml) được cho vào 20ml dung môi ethanol và nước (80:20, v/v) để trích ly phenolic ở nhiệt độ phòng trong bóng tối trong 2 giờ. Dịch chiết (0,2ml) thu được sau khi ly tâm (7.000 vòng/phút, 15 phút) được cho thêm 1ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% đầy kín và lắc đều để yên 5 phút và tiếp tục cho 1,2ml dung dịch Na_2CO_3 10% lắc đều giữ yên ủ trong vòng 2 giờ ở nhiệt độ thường và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 760nm. Dựa vào đồ thị chuẩn tra được hàm lượng axit gallic trong mẫu phân tích (Hatamian & cs., 2020)..

2.2.5. Xác định khả năng chống oxy hóa

Khả năng chống oxy hoá được thực hiện theo Ghafoor & cs., (2020). Mẫu thí nghiệm (2ml) được bổ sung 20ml dung môi ethanol và nước (80:20, v/v) để ở nhiệt độ phòng trong bóng tối trong 2 giờ. Dịch chiết (0,4ml) thu được sau khi ly tâm với (7.000 vòng/phút trong 15 phút) được trộn với 3,6ml dung dịch DPPH 0,1mM, lắc đều và để trong tối 1 giờ và đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 517nm. Khả năng khử gốc tự do DPPH củ mẫu được tính theo công thức:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{(\text{OD mẫu trắng} - \text{OD mẫu thí nghiệm})}{\text{OD mẫu trắng}} \times 100.$$

2.2.6. Xác định hàm lượng ethanol

Mẫu dịch lên men (200ml) và 100ml nước cất được cho vào bình cầu và tiến hành chưng cất để thu cồn trong khoảng 90 phút. Mẫu rượu thu được sau khi chưng để ở 20°C trong 30 phút và đo độ rượu bằng cồn kế (Lê Thanh Mai & cs., 2006).

2.2.7. Xác định hàm lượng aldehyde

Phương pháp xác định hàm lượng aldehyde được thực hiện theo Lê Thanh Mai & cs. (2006). Theo đó, mẫu rượu đã chưng cất (50ml) được cho vào bình tam giác 250ml cùng với 25ml NaHSO₃ 1,2% lắc đều và để 1 giờ, sau đó tiếp tục bổ sung vào 6ml HCl 1N và sử dụng dung dịch I₂ 0,1N để oxy hóa lượng NaHSO₃ dư với chỉ thị là dung dịch tinh bột 0,5%. Sau đó, 25ml NaHCO₃ được thêm vào bình phản ứng để giải phóng NaHSO₃ và aldehyde. Dung dịch được để yên 1 phút và chuẩn độ lượng NaHSO₃ vừa được giải phóng do kết hợp với aldehyde lúc ban đầu bởi dung dịch I₂ 0,01N. Phản ứng kết thúc khi xuất hiện màu tím nhạt. Mẫu đối chứng được thực hiện bằng cách thay 50ml rượu bằng 50ml nước cất.

Kết quả: hàm lượng andehyde tính theo mg/l được xác định theo công thức:

$$\text{Aldehyde} = \frac{(V - V_0) \times 0,22 \times 1.000 \times 100}{50 \times C}$$

Trong đó: V và V₀: số ml dung dịch I₂ 0,01N trong thí nghiệm thực và kiểm chứng; 0,02: số mg andehyde acetic tương ứng với 1 ml dung dịch I₂ 0,01N.

2.2.8. Tuyển chọn nấm men lên men dịch dưa hấu

Dịch ép dưa hấu trước khi lên men được bổ sung đường saccharose để được Bx 18 và gia nhiệt ở 80°C trong 15 phút. Sau khi làm nguội, các mẫu dịch dưa hấu được lên men bởi các chủng nấm men đã phân lập được. Quá trình lên men được thực hiện ở trong bình tam giác 250ml có chứa 200ml dịch ép dưa hấu, nhiệt độ lên men 25°C, mật độ tế bào ban đầu là 10⁷ CFU/ml, pH ban đầu 4-4,5. Mỗi chủng được lên men lặp lại 3 lần. Quá trình lên men kết thúc khi bọt CO₂ bắt đầu tan. Các mẫu rượu được phân tích các chỉ tiêu như nồng độ ethanol, aldehyde hàm lượng phenolic tổng số, anthocyanin để chọn chủng nấm men tạo ra sản phẩm rượu có chất lượng tốt nhất. Chủng này được định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS (Internal Transcribed Spacer Regions).

2.2.9. Xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng Trung bình ± độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại. ANOVA 1 chiều và kiểm định Duncan được sử dụng để phân tích sự sai khác giữa các nghiệm thức. Toàn bộ các phân tích thống kê được thực hiện trên phần mềm SPSS ver. 20.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm men từ dịch lên men dịch ép dưa hấu

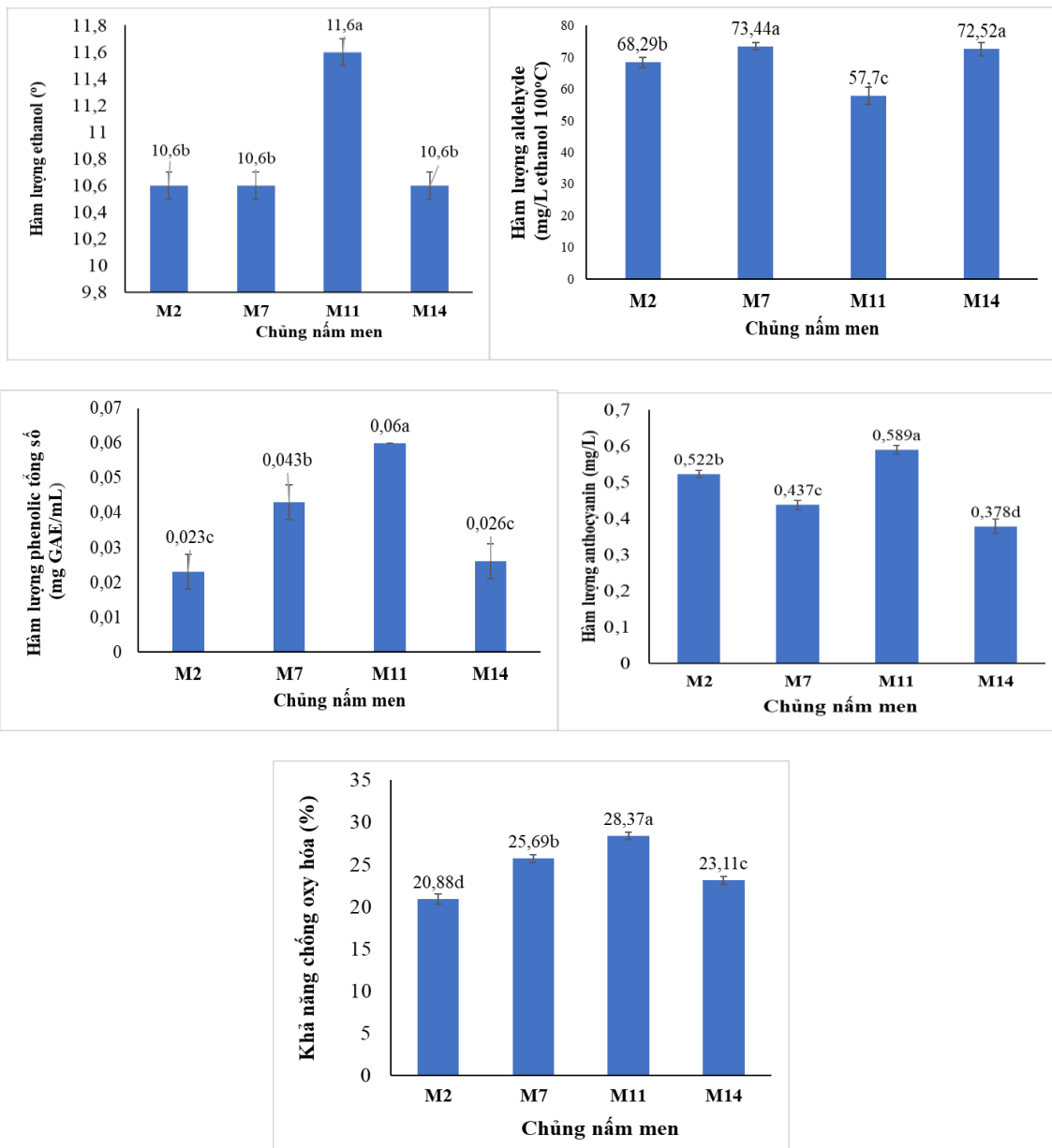
Từ mẫu dịch dưa hấu lên men bởi bánh men thuốc bắc, chúng tôi phân lập được 4 chủng ký hiệu là M2, M7, M11 và M14 có khả năng lên men rượu cao, mùi vị dễ chịu.

Chủng M11 thể hiện khả năng lên men tạo ra lượng ethanol cao nhất (11,6 ± 0,1°), trong khi đó, lượng aldehyde tiết ra là thấp nhất so với các chủng còn lại (57,7 ± 2,68 mg/l ethanol 100°). Hàm lượng ethanol trong môi trường lên men bởi các chủng còn lại thấp hơn, 10,6° và hàm lượng aldehyde lại cao hơn, nằm trong khoảng từ 68,29 mg/l ethanol 100° đến 73,44 mg/l ethanol 100° (Hình 1). Quá trình chuyển hóa đường cùng một số hợp chất khác xảy ra trong tế bào nấm men

Phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm men từ men thuốc bắc có khả năng lên men tạo dịch dưa hấu (*Citrullus lanatus*) lên men có chất lượng cao

để sinh tổng hợp ethanol và một số sản phẩm bậc hai (trong nghiên cứu này là aldehyde) phụ thuộc vào hệ enzyme nội bào (Đỗ Thị Bích Thủy & cs., 2019). Vì thế, đã có một số công bố về phân lập tuyển chọn nấm men với các chủng có khả năng lên men tạo độ rượu khác nhau trong sản phẩm. Chủng nấm men CB1.1 được phân lập và tuyển chọn bởi Nguyễn Văn Vũ & Nguyễn Văn Thành (2018) có khả năng lên men dịch quả dưa tạo ra sản phẩm có 13,76° rượu. Nguyễn Ngọc Thanh & cs. (2021) đã tuyển chọn được chủng

Saccharomyces cerevisiae FBY015 có khả năng lên men dịch quả măng cầu xiêm tạo ra sản phẩm có nồng độ rượu đạt 10,70°. Dịch ép hồng xiêm được lên men bởi *Saccharomyces cerevisiae* S6 phân lập từ quả này tạo ra rượu vang có nồng độ ethanol đạt 10,1° (Nguyễn Văn Bá & cs., 2021). Nghiên cứu lên men nước ép dưa hấu bởi *Saccharomyces cerevisiae* phân lập từ rượu cộ Bx ban đầu 8,3 thu được sản phẩm có nồng độ ethanol 9,86° được thực hiện bởi Hafsat & cs. (2015).



Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

Hình 1. Ảnh hưởng của các chủng nấm men lên chất lượng của dịch ép dưa hấu lên men

```

|AAAGAATTTAATAATTTTCAAATGGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAG
AAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCAGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAATTTT
TTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTTGTTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACA
ACACACTGTGGAGTTTTTCAATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTA
ACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTTCGTAACCTGGAAATTTT
AAAATATTAACAACTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCC
AGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGG
AGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA
GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTG
GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTGACCTCAAATCA

```

Hình 2. Trình tự các nucleotide đoạn ITS của chủng M11

Mỗi tế bào nấm men có hệ enzyme nội bào và hoạt lực của chúng ít nhiều khác nhau. Hoạt lực này không chỉ phụ thuộc vào bản chất của mỗi enzyme mà còn vào điều kiện lên men. Trong nghiên cứu này, chủng M11 có khả năng lên men tốt nhất tạo ra nồng độ cao nhất. Ethanol có khả năng hỗ trợ chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học từ nguyên liệu như các phenolic, anthocyanine từ đó làm tăng khả năng oxy hóa của sản phẩm (Đỗ Thị Bích Thủy & Trần Bảo Khánh, 2022). Có lẽ vì thế mà hàm lượng các hợp chất có được tính trong môi trường nuôi cấy của chủng M11 cũng có giá trị cao hơn so với các chủng còn lại. Kết quả (Hình 1) cho thấy hàm lượng phenolic tổng số, anthocyanin và khả năng chống oxy hóa trong môi trường lên men bởi chủng M11 lần lượt là 0,06mg GAE/ml, $0,589 \pm 0,012$ mg/l và $28,37 \pm 0,429\%$. Trong khi đó, hàm lượng phenolic tổng số, anthocyanin và khả năng chống oxy hóa trong môi trường lên men bởi các chủng còn lại thấp hơn, nằm lần lượt trong các khoảng 0,023-0,043mg GAE/ml, 0,378-0,522 mg/l và 20,88-25,69%. Djoulde Darman & cs. (2010) đã công bố rằng lên men dưa hấu có hàm lượng cồn ethanol từ 8-13%, tổng độ axit từ 1,2-1,7 g/l. Dưa hấu lên men có hàm lượng polyphenol cao và khả năng chống oxy hóa mạnh so với Ginkgo-biloba, bia lúa miến và các loại rượu mẫu khác.

Các kết quả trên cho thấy chủng M11 có khả năng lên men dịch ép dưa hấu cho sản phẩm có chất lượng cao nhất. Chủng này được chọn để định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.2. Định danh chủng nấm men M11 đã tuyển chọn bằng phương pháp sinh học phân tử

Chủng M11 được định danh bằng phương pháp giải trình tự và phân tích trình tự đoạn ITS (Hình 2).

Kết quả cho thấy chủng M11 có độ bao phủ 100% và độ tương đồng trên 99% đối với các chủng *Saccharomyces cerevisiae* trên cơ sở dữ liệu.

Kết quả định danh đã xác định chủng M11 là loài *Saccharomyces cerevisiae*, đây là loài nấm men hữu dụng trong công nghiệp sản xuất rượu, nó không chỉ lên men nước quả hay môi trường chứa hàm lượng đường cao mà còn tạo ra sản phẩm lên men với hương vị đặc trưng. Nguyễn Ngọc Thạch & cs. (2021) đã tuyển chọn được chủng *Saccharomyces cerevisiae* FBY015 có khả năng lên men dịch quả mãng cầu xiêm độ rượu đạt 10,70°. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* S6 được phân lập từ quả hồng xiêm và định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA bởi Nguyễn Văn Bá & cs. (2021).

4. KẾT LUẬN

Từ dịch ép dưa hấu lên men bởi bánh men thuốc bắc, chúng tôi đã phân lập được 4 chủng có khả năng tạo ra sản phẩm có mùi vị dễ chịu là M2, M7, M11 và M14. Trong đó, chủng M11 được lựa chọn do lên men tạo ra dịch ép dưa hấu lên men có hàm lượng rượu, phenolic tổng số, anthocyanine và khả năng chống oxy hóa cao

Phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm men từ men thuốc bắc có khả năng lên men tạo dịch dưa hấu (*Citrullus lanatus*) lên men có chất lượng cao

nhất và hàm lượng aldehyde thấp nhất so với các chủng còn lại. Chủng M11 được định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng ITS và được xác định thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Khoa học và Công nghệ (2015). TCVN 11028:2015 ngày 31/12/2015 về đồ uống - xác định hàm lượng chất tạo màu anthocyanin dạng monomer - phương pháp pH vi sai.
- Đỗ Thị Bích Thủy, Trần Bảo Khánh, Nguyễn Thị Thủy Tiên, Nguyễn Thị Vân Anh, Nguyễn Đan Huyền & Trần Thanh Quỳnh Anh (2019). Giáo trình Công nghệ sản xuất và kiểm soát chất lượng đồ uống. Nhà xuất bản Đại học Huế.
- Đỗ Thị Bích Thủy & Trần Bảo Khánh (2022). Giáo trình kỹ thuật lên men thực phẩm. Nhà xuất bản Đại học Huế.
- Djoulde Darman R., Jean-Justin E.N. & Francois-Xavier E. (2010). Development of Water Melon (*Citrullus vulgaris* L.) Red Wine. *Agrobot. Cluj*. 38(2): 73-77.
- Ghafoor K., Ahmed I.A.M., Özcan M.M., Al-Juhaimi F.Y., Babiker E.E. & Azmi I.U. (2020). An evaluation of bioactive compounds, fatty acid composition and oil quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seed roasted at different temperatures. *Food Chemistry*. 333: 127-531.
- Hafsat B.B., Omar G.P., Yahaya M.M. & Ezeribe A.I. (2015). Wine from Water Melon Juice Using Palm Wine Yeast Isolate. *International Journal of Research in Engineering and Science (IJRES)*. pp. 35-40.
- Hatamian M., Noshad M., Abdanan-Mehdizadeh S. & Barzegar H. (2020). Effect of roasting treatment on functional and antioxidant properties of chia seed flours. *NFS Journal*. 21: 1-8.
- Huỳnh Ngọc Thanh Tâm, Đào Thanh Tâm, Nguyễn Thị Minh Trâm, Văn Thị Hồng Huệ, Dương Thị Mai Thảo & Nguyễn Đức Độ (2020). Xác định điều kiện lên men và hoạt tính kháng oxy hóa của nước lên men trái trám (*Syzygium cumini* L.). *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. (2): 72-79.
- Huỳnh Thị Ngọc Ni & Đoàn Thị Kiều Tiên (2021). Khảo sát quy trình lên men nước thanh long ruột trắng (*Selenicereus undatus*) sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* RV100. *Tạp chí Khoa học và Công Nghệ Đại học Tự nhiên*. 226(14): 137-145.
- Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hằng & Lê Thị Lan Chi (2006). Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Lương Đức Phẩm (2010). Giáo trình Công nghệ lên men. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
- Lý Thị Thanh Thảo & Nguyễn Thị Tường Vi (2021). Phân lập và tuyển chọn nấm men trong lên men rượu vang sơ ri (*Malpighia glabra* L.). *Tạp chí Khoa học Đại học Đồng Tháp*. 10(3): 37-45.
- Leaw S.N., Chang H.C., Sun H.F., Barton R., Jean-Philippe Bouchara & Chang T.C. (2007). Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of clinical microbiology*. 44(3): 693-699.
- Maoto M.M., Beswa D. & Jideani A.I.O. (2019). Watermelon as a potential fruit snack. *International Journal of Food Properties*. 22(1): 355-370.
- Nguyễn Văn Bá, Nguyễn Thị Thu Thảo, Nguyễn Thành Luân, Phạm Thanh Chính, Châu Nhật Thắng & Châu Nhựt Thắng (2021). Phân lập và tuyển chọn các dòng nấm men từ quả hồng xiêm (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) có khả năng chịu được ethanol ở nồng độ cao để lên men rượu vang sáo. *Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô*. (11): 218-227.
- Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Văn Kiệt, Lê Trung Tính, Lưu Minh Châu, Đoàn Thị Kiều Tiên & Huỳnh Xuân Phong (2021). Phân lập và tuyển chọn nấm men ứng dụng trong lên men rượu vang măng cầu xiêm (*Annona muricata* L.). *Tạp Chí Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ*. 57(4): 131-138.
- Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Văn Thành & Bùi Thị Thúy Ngân (2011). *Tuyển chọn các dòng nấm men được phân lập từ nước thối nổi*. *Tạp Chí Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ*. 18(B): 117-126.
- Nguyễn Văn Vũ & 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.
- Phạm Thị Cẩm Hoa, Nguyễn Phan Khánh Hòa, Nguyễn Bảo Toàn & Nguyễn Thị Tố Nga (2017). Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình lên men rượu vang từ trái chùm ruột (*Phyllanthus acidus*). *Kỷ yếu kỷ niệm 35 năm thành lập Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh*. tr. 135-142.
- Widholm J.M.T.N., Managing E.H.L.J.M.W. & Widholm J.M. (2005). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Structure*. 62: 2-17.

EFFECTS OF THE MAIN OPERATING PARAMETERS ON SEED HOLDING IN A SEEDER-PNEUMATIC METERING DEVICE WITH AN INCLINED PLATE FOR MAIZE

Nguyen Xuan Thiet*, Nguyen Chung Thong

*Department of Engineering Mechanics, Faculty of Engineering,
Vietnam National University of Agriculture*

*Correspondence to: nxthiet@vnua.edu.vn

Received: Dec 22, 2022

Published: Mar 2, 2023

ABSTRACT

Today's pneumatic sowing machines often use a seeder-pneumatic metering device with vertical seed discs. The weakness of a seeder-pneumatic metering device with a vertical disc is its low efficiency in receiving and holding seeds. In order to improve the suction and retention of seeds during sowing, the seed disc in a metering device was placed tilted compared to the vertical direction (pneumatic metering device with an inclined disc). The study was carried out according to the single-factor experimental method to determine the main working parameters of the aerodynamic sowing unit combined with the inclined disc. The results showed that an inclined seed disc is more effective than a vertical one in receiving and holding seeds during the sowing process. Specifically, the research focused on determining the effects of the main parameters - suction pressure, seed hole diameter, seed hole velocity, and angle of the seed disc - on the ability of the metering device to receive and hold seeds. The experimental results showed that an effective maize pneumatic metering device with an inclined disc has the following working parameters: 50-100mmHg vacuum pressure; 4-5.5mm seed hole diameter; a seeding hole velocity of less than 0.68 m/s; and the seed disc angled at 20-35 degrees from the vertical direction.

Keywords: Seeder-pneumatic metering device, maize sowing machine, pneumatic metering device with inclined disc.

Ảnh hưởng của một số thông số làm việc chính đối với việc giữ hạt trong bộ phận gieo ngô kiểu khí động kết hợp với đĩa nghiêng

TÓM TẮT

Ngày nay, máy gieo hạt kiểu khí động thường sử dụng bộ phận nhận hạt kiểu đĩa thẳng đứng. Hạn chế của bộ phận gieo hạt này là hiệu suất nhận và giữ hạt thấp. Để nâng cao khả năng hút và giữ hạt trong quá trình gieo, đĩa nhận hạt trong bộ phận gieo được đặt nghiêng so với phương thẳng đứng (bộ phận gieo kiểu khí động kết hợp đĩa nghiêng). Nghiên cứu đã được thực hiện theo phương pháp nghiên cứu thực nghiệm đơn yếu tố nhằm xác định các thông số làm việc chính của bộ phận gieo kiểu khí động kết hợp với đĩa nghiêng. Kết quả cho thấy trong quá trình gieo đĩa nghiêng làm việc hiệu quả hơn đĩa đặt thẳng đứng trong việc nhận và giữ hạt. Cụ thể, các nghiên cứu tập trung xác định ảnh hưởng của các thông số chính như: áp suất hút, đường kính lỗ chứa hạt, vận tốc của lỗ chứa hạt, góc quay của đĩa gieo đến khả năng nhận và giữ hạt. Kết quả thực nghiệm cho thấy bộ phận gieo ngô kiểu khí động kết hợp với đĩa nghiêng làm việc hiệu quả với các thông số làm việc chính như sau: Áp suất chân không 50 mmHg-100 mmHg; đường kính lỗ hạt 4-5,5mm; vận tốc lỗ đĩa gieo hạt nhỏ hơn 0,68 m/s và đĩa gieo tạo với phương thẳng đứng một góc 20-35 độ.

1. INTRODUCTION

A metering device is an important part of a sowing machine, and determines the quality and productivity of sowing. In Vietnam, popular

maize-sowing machines use a disc or finger pick-up metering device. Sowing machines with a pneumatic metering device have also been put into application due to their outstanding advantages in accuracy and productivity. In

these devices, exhaust fans creating pressure in the chamber are driven by the tractor power take-off shaft. These machines are made with 3-6 sowing rows.

Further research has led to the development of a precision pneumatic seed measuring device, and some of studies have focused on optimizing the following parameters: vacuum pressure, seed hole diameter, and velocity of the seed hole (Karayel *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005; Satti *et al.*, 2012; Yu, 2014). Arzu & Adnan (2007) studied the operating variables of a vacuum precision seeder including the vacuum applied to the seed plate, the diameter of the seed holes, and the peripheral speed of the seed plate. The optimum levels of vacuum pressure and the diameter of the holes for the precision seeding of cotton seeds were reported to be 5.5 kPa and 3 mm, respectively. Yasir *et al.* (2013) designed a pneumatic precision metering unit, which had a cylindrical seed plate made up of a 2mm thick and 30mm wide aluminum sheet with a 140mm diameter and 30 equidistant cylindrical holes. Zhao *et al.* (2010) investigated the performance of a vacuum cylinder seeder for the precision sowing of rape seeds. The forces acting on the seeds in free flight were calculated using the computational fluid dynamics (CFD) software FLUENT. Using the differential equation for seed motion, seed falling trajectories using different working parameters were numerically determined. Zeliha & Aziz (2004) analyzed the effects of hole shape, peripheral velocity and hole area of the seed plate, vacuum pressure, and thousand grain weight on the seeding quality of a pneumatic single seed planter with a vertical seed plate for three maize varieties. These analyses showed that the mentioned parameters - pressure, seed hole diameter, seed

hole velocity - are all related to the suctioning and holding of seeds during sowing.

In current pneumatic sowing machines, metering devices often have a vertical seed disc. To increase the ability to attract and hold seeds on the seed disc during the sowing process, a new research direction has been proposed, which is to study pneumatic metering devices with inclined discs. In a pneumatic metering device with an inclined disc, the pressure on seeds consists of the suction pressure of the air and pressure of the seeds on the inclined surface. The seeds' pressure on the inclined surface should improve the holding and dissociating process.

The study was conducted through laboratory experiments with the experimental material being a common maize variety in Vietnam. The aim of this study was to analyze the effects of some of the main technical parameters of a pneumatic metering device with an inclined disc on the abilities to suction and hold seeds. The technical parameters studied were the vacuum pressure, seed hole diameter, seed hold velocity, and inclined angle of the disc.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Because of the demand for varieties, Vietnam has many diverse maize varieties, including LVN10, LVN4, LVN145, and LVN9, among others. The focus, however, is still on hybrid varieties with seeds of a relatively similar size. The mass of 1,000 seeds is about 300 to 350 grams for these varieties. In this study, the LVM10 maize variety was used and details about this variety are shown in Figure 1 and Table 1.

Table 1. Statistics of LVN10 maize seeds used in the experiments

	Length a (mm)	Width b (mm)	Thickness c (mm)	Rate of b/a	Rate of c/a
Average	8.68	7.44	5.40	0.86	0.63
Max	11.00	9.10	8.00	1.01	1.00
Min	7.00	5.50	3.50	0.60	0.35