

KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ ĐỊNH DANH NẤM MEN ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ BÁNH MEN RƯỢU Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Characterization of Yeast Isolated from Rice Wine Starter Cakes in Mekong Delta

Nguyễn Hữu Thanh¹, Nguyễn Thị Kỳ Duyên¹, Bằng Hồng Lam¹, Nguyễn Quang Thạch²

¹Bộ môn Công nghệ Sinh học, Đại học An Giang,

²Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Địa chỉ email tác giả liên lạc: nhthanh@agu.edu.vn.

Ngày gửi bài: 06.03.2012; Ngày chấp nhận: 21.04.2012

TÓM TẮT

Bánh men được sản xuất ở đồng bằng sông Cửu long (ĐBSCL) phần lớn ở dạng thủ công nên chứa nhiều: nấm men, vi khuẩn, nấm mốc. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có trong bánh men có vai trò chính trong quá trình lên men rượu. Việc phân lập các chủng nấm men tại ĐBSCL phục vụ cho sản xuất rượu rất quan trọng vì các chủng này phù hợp với điều kiện khí hậu, đất, nước... Từ bánh men rượu ở ĐBSCL đã phân lập được 128 chủng, trong đó phát hiện được 30 chủng chịu nhiệt ở 50°C đồng thời chịu cồn 17ml/L, sinh bào tử và lắng tốt, 10 trong số đó không sinh H₂S. Giải mã trình tự 10 chủng, 7 chủng xác định là *Saccharomyces cerevisiae*, 3 chủng là *Clavispora lusitaniae*.

Từ khóa: *Saccharomyces cerevisiae*, sinh H₂S, rượu gạo.

SUMMARY

As a source of inoculation starters in the manufacture of alcohol from rice varieties from the Mekong River Delta, Vietnam, *Banh men* has been produced since the ancient time. These starters, which normally combine three groups of microorganisms, viz. yeasts, bacteria and moulds convert the starchy materials into fermentable sugar and subsequently to alcohol and organic acids. Yeasts are significant in the production of traditional beverage because they play the main role in alcoholic fermentation. Of 128 strains of yeasts isolated from rice fermenting starters in the Mekong River delta, 30 yeast strains were identified to be thermo-resistant at 50 °C and ethanol tolerance at 17% (v/v) in the challenge test with added ethanol with good flocculation and sporulation. From characterization of 10 yeast strains, 7 yeasts strains were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and 3 others as *Clavispora lusitaniae*.

Keywords: Alcohol tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*, starter cakes, thermo-resistant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghề sản xuất rượu từ gạo, nếp đã xuất hiện ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) từ rất lâu đời. Theo truyền thống, cư dân địa phương dùng bánh men rượu để lên men gạo đã được nấu chín, từ 5-7 ngày sau khi lên men tạo thành rượu non và mang đi chưng cất thì thu được rượu gạo. Bánh men rượu chứa rất nhiều hệ vi sinh vật trong đó có các

nhóm nấm men có vai trò sản xuất rượu như: *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia* sp., *Pichia anomala*, *Candida tropicalis*, *P. ranongensis*, *Clavispora lusitaniae* (Vũ nguyên Thành & cs., 2008). *Saccharomyces cerevisiae* phân lập từ các bánh men cổ truyền ở vùng ĐBSCL sử dụng lên men rượu nếp than ở nhiệt độ 30°C trong 03 ngày thu được hàm lượng cồn là 9.6% (v/v) (Ngô Thị Phương Dung & cs., 2005). Vấn đề được đặt

ra là tại sao hàm lượng cồn đạt được luôn thấp hơn khả năng nấm men có thể sản xuất trong điều kiện hàm lượng đường trong dịch lên men đầy đủ? Theo Đồng Thị Thanh Thu (2003) trong quá trình lên men, lượng cồn tích lũy và nhiệt độ của dịch lên men tăng, tùy thuộc vào kiểu lên men có khả năng lên đến 45 °C-50 °C. Ở nhiệt độ này, phần lớn nấm men bị chết nên trong công nghiệp sản xuất cồn và rượu, thường phải sử dụng nước để làm nguội nồi lên men, gây tăng chi phí sản xuất.

Nhằm giải quyết vấn đề trên, nhiều nghiên cứu của Brasil, trong đó có công trình của Guimarães & cs. (2006) đã tiến hành phân lập các chủng nấm men, chọn lọc các chủng có khả năng chịu nhiệt, chịu cồn, có khả năng lắng, khả năng sinh kềm hoặc không sinh H₂S. Trong 61 chủng tác giả phân lập được có 14 chủng được định danh là *Saccharomyces cerevisiae*, 3 chủng chịu cồn ở nồng độ 150 g/L, 2 chủng chịu nhiệt ở 45°C, 1 chủng có khả năng kết lắng, 7 chủng không sinh H₂S. Oliveira & cs. (2007) đã tuyển chọn được 02 chủng *S.cerevisiae* từ men tự nhiên ở Minas Gerais, Brasil ứng dụng sản xuất cachaca từ nước mía.

Khí hậu vùng ĐBSCL nóng ẩm quanh năm, rất thích hợp cho sự phát triển của nấm men, quần thể nấm men chắc chắn sẽ rất phong phú và đa dạng. Khả năng thu được nhiều chủng nấm men có các đặc tính mong muốn làm giống gốc cho sản xuất công nghiệp và các nghiên cứu về khả năng lên men rượu trong điều kiện nhiệt độ cao là hoàn toàn có tính khả thi.

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định được các chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt, chịu cồn góp phần nâng cao hiệu quả và giảm chi phí sản xuất rượu gạo địa phương, mặt khác đánh giá tính đa dạng

sinh học của các chủng nấm men của đồng bằng sông Cửu Long.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy sử dụng là môi trường YPG (10 g/l cao nấm men, 10 g/l Pepton, 20 g/l agar, 20 g/l glucose). Môi trường YPG bổ sung 6 g/L tartaric acid, 30mg/mL erythromycin hoặc 30 mg/mL chloramphenicol cho phân lập nấm men, môi trường LA có thành phần như sau: 40 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 3 g/L peptone, 0.2 g/L ammonium sulfate, 1 g/L lead acetate và 20 g/L agar.

2.2. Thu thập mẫu và phân lập

Mẫu bánh men được thu thập từ các cơ sở sản xuất rượu tại các địa phương như Đồng Tháp, Long An, Bến Tre, An Giang, Kiên Giang trong năm 2009 - 2010 ở dạng viên và dạng bột, có nhãn hiệu hàng hóa và đã được cơ sở sử dụng trong quá trình sản xuất rượu. Mẫu sau khi thu thập được giữ trong túi nilon hàn kín miệng, bảo quản ở 4°C và tiến hành phân lập.

Lấy 1g bánh men pha loãng trong 100 ml nước pepton thanh trùng, và cấy trên môi trường YPG ủ ở 30°C trong 72h giờ bằng tủ ủ Memmert INB 400 (Đức). Sau khi khuẩn lạc phát triển chọn các khuẩn lạc điển hình cấy sang môi trường YPG có chứa 30 mg/mL Erythromycin và ủ cùng điều kiện. Lấy khuẩn lạc nấm men đã phát triển trên môi trường này cấy sang môi trường YPG có bổ sung 6g/L tartaric acid và ủ. Khuẩn lạc xuất hiện, cấy sang môi trường YPG có bổ sung 30 mg/mL Chloramphenicol ủ ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ. Khi khuẩn lạc phát triển tốt và thuần cấy sang ống thạch nghiên chứa môi trường YPG và bảo quản ở 4°C.

2.3. Chuẩn bị giống nấm men

Nấm men được chuẩn bị và nuôi cấy trong môi trường YPG lỏng ở 30°C và trong 12 giờ, mật số nấm men tương ứng với OD = 0,1 ở bước 650 nm và nuôi cấy trên môi trường đặc hiệu cho các nghiên cứu về khả năng chịu nhiệt, chịu cồn, sinh H₂S, kết lắng, mật số nấm men tương ứng với OD = 0,2 cho nghiên cứu về sinh học phân tử.

2.4. Khả năng chịu cồn

Nấm men được nuôi cấy trong 10 mL môi trường YPG lỏng có bổ sung 130, 150 và 170 ml/L ethanol và nuôi cấy ở 30°C trong 72 giờ. Sau đó cấy lên môi trường thạch YPG rồi nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 48-72h, nếu nấm men phát triển trên môi trường thạch YPG chứng tỏ chúng có khả năng chịu được nồng độ cồn thử nghiệm.

2.5. Khả năng chịu nhiệt

Nấm men được nuôi cấy trên môi trường thạch YPG ở 30°C, 40°C, 45°C và 50°C trong 72 giờ. Đánh giá khả năng phát triển của nấm men trên môi trường thạch YPG ở các nhiệt độ thử nghiệm.

2.6. Thử nghiệm khả năng kết lắng

Theo Guimarães & cs. (2006) nấm men được nuôi cấy trong ống nghiệm chứa 10 mL môi trường Sabouraud lỏng, điều chỉnh nồng độ chất khô đến 18 độ Brix bằng đường saccharose và ủ ở 30°C trong 72 giờ. Sau khi ủ lấy ống nghiệm ra 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.

2.7. Khả năng sinh Hydrogen sulfide

Theo Guimarães & cs. (2006) và ONO & cs. (1991) Nấm men được nuôi cấy trên môi trường LA ủ ở 30°C trong 10 ngày. Nếu nấm men không sinh H₂S thì khuẩn lạc phát triển không biến đổi màu, nấm 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.

2.8. Định danh bằng giải mã trình tự

Tách chiết DNA của nấm men: Cho 1,5 ml dịch nuôi nấm men trong môi trường YPG lỏng (1% yeast extract, 2% peptone, 2% Glucose) trong 20 - 24 giờ ở 30 °C vào ống eppendorf. Ly tâm ở 15.000 vòng /phút trong thời gian 4 phút. Loại bỏ huyền phù thêm 200 µl đệm Harju, ngâm trong hỗn hợp đá-ethanol trong 2 phút, ngâm trong nước nóng ở 95 °C trong 1 phút thực hiện 2 lần. Vortex trong 30 giây. Thêm 200 µl chloroform và vortex trong 2 phút. Ly tâm 3 phút, tốc độ 15.000 vòng /phút. Chuyển pha lỏng vào ống eppendorf khác có chứa 400µl ice-ethanol. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm 5 phút với vận tốc 15.000 vòng /phút. Rửa kết tủa bằng 0,5 ml ethanol 70%, ly tâm 5 phút với vận tốc 15.000 vòng /phút. Sấy khô bằng không khí ở nhiệt độ phòng. Hòa tan DNA trong 25 - 50 ml TE (pH 8,0). Đo nồng độ DNA bằng máy Biophotometer sao cho nồng độ DNA đặc (25- 500ng/ reaction) (Ralsler, 2009).

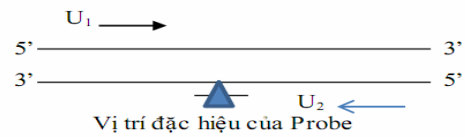
Phương pháp PCR: Lấy 5µl mẫu cho vào phản ứng PCR để nhân đặc hiệu đoạn DNA dài 260 bp trên vùng gen 28rDNA của nấm men bằng hệ thống máy PCR Thermal Cycler của Bio-Rad. Cặp mồi U1, U2 có trình

tự: U1 (GTGAAATTGT TGAAAGGGAA), U2 (GACTCCTTGG TCCGTGTT) (Sandhu 1995) Buffers: PCR Mastermix, 0,5 ml Taq polymerase (5 U / ml), 2,5 ml 10x đệm: 1 ml 25x dNTP (5 mM); 0,5ml mỗi mỗi (100 pmol / ml); 20 ml H₂O

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2%, chụp hình bằng hệ thống máy Gel Doc của Bio-Rad. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ clean up của Promega. Điện di sản phẩm đã tinh sạch bằng hệ thống máy Agilent 2100 Bioanalyzer. PCR SEQ sản phẩm đã tinh sạch trước khi giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3103XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm sequencing analysis 5.3, và so với kết quả trên ngân hàng gen bằng kỹ thuật BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Định danh nấm men *Saccharomyces cerevisiae* sử dụng primers là U1, U2 theo mô tả của Sandhu (1995): Primer U1, U2 khuếch đại 1 đoạn gen có kích thước 260 bp trên gen 28 sRNA, hai khu vực này có trình tự mang tính bảo tồn cao cho loài, mỗi U1 (GTGAAATTGTTGAAAGGGAA) gắn vào trình tự 403 đến 422, và mỗi U2 (GACTCCTTGG TCCGTGTT) gắn tương ứng trình tự 645 đến

662 của gen 28S RNA tham chiếu trên nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Mỗi U1 và U2 đã được sử dụng để khuếch đại đoạn DNA độc lập được ly trích từ nấm men. Mỗi U1, U2 được gắn vào gen theo sơ đồ được miêu tả theo hình 1.

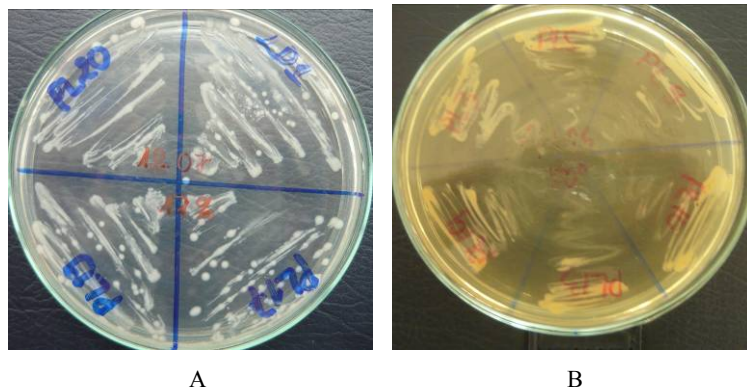


Hình 1. Sơ đồ được miêu tả mỗi U1, U2 được gắn vào gen

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và thử nghiệm khả năng chịu nhiệt chịu cồn của các chủng nấm men thu thập

Qua nhiều lần phân lập trên môi trường YPG có bổ sung kháng sinh và acid tartaric đã thu được 128 chủng nấm men thuần và trữ ở 4°C để làm cơ sở cho nghiên cứu này. Khảo sát khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men vừa phân lập và quan sát hình thái kết quả ở bảng 1.



A : Các chủng nấm men phát triển trên môi trường YPG sau khi test cồn với nồng độ 170 ml/L
B : Các chủng nấm men phát triển trên môi trường YPG sau khi ủ ở nhiệt độ 50 °C

Hình 2. Các chủng nấm men chịu cồn, chịu nhiệt phát triển trên môi trường thạch YPG

Bảng 1 cho thấy cả 128 chủng nấm men phân lập được đều có khả năng chịu nhiệt 30 °C và 40°C do nhiệt độ môi trường vùng ĐBSCL phổ biến ở 30 °C-32 °C nên tất cả các chủng nấm men thu được đều có khả năng phát triển ở nhiệt độ 30 °C và 40 °C, 61 dòng có khả năng chịu được nhiệt độ 45 °C và 30 dòng có khả năng chịu được ở 50 °C, các chủng nấm men này vẫn phát triển khi cấy lên môi trường thạch YPG và ủ ở nhiệt độ 50°C kết quả xem ở Hình 2B, Khuẩn lạc của các chủng nấm men xuất hiện trên môi trường thạch YPG. Chúng tỏ rằng các dòng nấm men này có khả năng chịu nhiệt ở nhiệt độ 50°C. Nếu so với kết quả nghiên cứu của Guimaraes & cs. (2006) phân lập nấm men *Saccharomyces cerevisiae* tại các vùng sản xuất rượu nho ở Brasil chỉ có 2 chủng nấm men chịu nhiệt ở 45 °C trong 15 dòng thử nghiệm, thì nấm men trong bánh men rượu vùng ĐBSCL có khả năng chịu nhiệt cao hơn so ở Brasil. Bên cạnh đó khả năng chịu được nồng độ cồn của các dòng nấm men cũng được khảo sát, vì sản phẩm của quá trình lên men rượu là cồn, nồng độ cồn tăng lại là độc

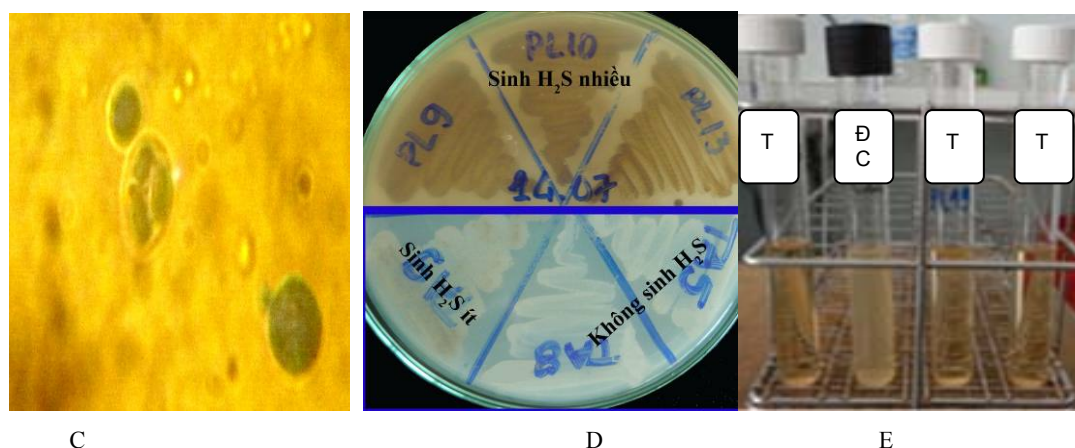
tố giết chết nấm men. Với 30 dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt ở 50°C được mang đi thử nghiệm khả năng chịu cồn kết quả cho ở Bảng 2 Từ đó cho thấy cả 30 dòng đều có khả năng sống trong môi trường có nồng độ cồn lên đến 170 ml/L các dòng nấm men sau khi nuôi trong môi trường có bổ sung 170 ml/L vẫn có khả năng phát triển khuẩn lạc trên môi trường thạch YPG (Hình 2A) nếu so với kết quả nghiên cứu của Guimaraes & cs. (2006) các dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được phân lập tại các vùng sản xuất rượu ở Brasil chỉ có 3 chủng nấm men chịu cồn ở 170 ml/L trong 15 dòng thử nghiệm. Qua đó nói lên rằng trong bánh men rượu của ĐBSCL có các chủng nấm men chịu được nhiệt độ cao và chịu được nồng độ cồn cao thích hợp để tuyển chọn giống nấm men cho công nghệ sản xuất cồn trong tương lai. Bên đó hình dạng nấm men cũng được quan sát và ghi nhận kết quả ở Bảng 1, trong 128 dòng nấm men quan sát thấy có 30 chủng hình cầu và 98 chủng hình elip, như vậy nấm men được phân lập từ bánh men cũng có sự đa dạng về hình dạng tế bào.

Bảng 1. Khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men thu thập được

STT	Khả năng chịu nhiệt				Hình dạng tế bào	
	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	Hình cầu	Hình elip
Số chủng	128	128	61	30	30	98

Bảng 2. Các đặc điểm sinh học của các chủng nấm men chịu nhiệt

STT	Khả năng chịu cồn (ml/L)			Khả năng sinh H ₂ S			Lắng	Sinh bào tử
	130	150	170	Không	Ít	Nhiều		
Số dòng	30	30	30	10	16	4	30	30



C : Bào tử nấm men

D : Các dòng nấm men phát triển trên môi trường thạch LA, Nếu nấm men không sinh H₂S có màu trắng, sinh H₂S ít, khuẩn lạc có rìa màu nâu nhạt đến nâu đen, nấm men sinh nhiều H₂S, khuẩn lạc sẽ có màu nâu đen đến màu đen

E: Khả năng kết lắng của các dòng nấm men sau 7 ngày lên men, ĐC: Đối chứng, khả năng lắng kém, T: các chủng test khả năng kết lắng tốt

Hình 3. Khả năng sinh bào tử sau 72h, sinh H₂S và không sinh H₂S trên môi trường LA, khả năng kết lắng sau 7 ngày lên men của 1 số dòng nấm men

Ngoài việc khảo sát khả năng chịu cồn, 30 chủng nấm men chịu nhiệt còn được khảo sát khả năng kết lắng và khảo sát khả năng sinh hydrogen sulfide (H₂S) và khả năng sinh bào tử trên môi trường có chứa potassium acetate.

Cả 30 chủng khảo sát đều có khả năng kết lắng tốt, dịch lên men trong (phần dịch trong có độ cao lớn 75% chiều cao của dịch lên men) sau 7 ngày lên men trên môi trường sabouraud lỏng bổ sung đường saccharose đến nồng độ chất khô bằng 18 so với giống nấm men đối chứng là men bánh mì, các chủng nấm men khảo sát lắng nhanh xuống đáy ống nghiệm làm cho môi trường dịch lên men trong suốt (Bảng 2, Hình 3E), khả năng kết lắng của 30 chủng nấm men khảo sát đều tốt nếu so với nghiên cứu của Guimaraes & cs. (2006), trong 18 chủng men khảo sát chỉ có 1 chủng có khả năng kết lắng tốt, 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 tổn 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, bên cạnh đó khả năng sinh bào tử của nấm men cũng được thể hiện làm tăng khả năng sản xuất giống của nấm men đó (Hình 3C).

Khả năng đồng hóa các acid amin có chứa lưu huỳnh trong thành phần tạo ra H₂S cũng được ghi nhận ở 1 số chủng nấm men *Saccharomyces* sp. Trong nguyên liệu sản xuất rượu và cồn ma nhất là trong gạo và trong bánh men vẫn tồn tại protein dù hàm lượng không lớn lắm. Song song đó, khả năng sinh H₂S của 30 dòng nấm men khảo

sát cũng được ghi nhận, trong 30 chủng khảo sát có 4 chủng sinh nhiều H_2S làm đen môi trường LA, và 10 dòng không sinh H_2S không làm đen môi trường LA, 16 dòng sinh ít H_2S chỉ tạo các vệt đen và nâu trên rìa đường cấy nấm men trên môi trường LA như Hình 3D, trong môi trường LA, có chứa chì acetat, nếu nấm men sản xuất H_2S , H_2S sẽ phản ứng với chì acetate tạo PbS có màu đen, H_2S sinh ra càng nhiều thì PbS tạo ra càng nhiều, nồng độ PbS càng cao sẽ làm cho môi trường càng đen, các chủng không sinh H_2S sẽ không làm thay đổi màu môi trường, các giống nấm men sinh nhiều H_2S sẽ làm cho rượu có mùi trứng thối không thích hợp cho sản xuất rượu, nếu lượng H_2S cao có thể sẽ gây ngộ độc cho người sử dụng (Amoore và Hautala, 1983). Nếu so sánh với nghiên cứu của Guimaraes & cs. (2006) thì số chủng nấm men được phân lập từ bánh men rượu ở ĐBSCL có khả năng sinh H_2S là 66,66% (20/30) cao hơn các chủng nấm men được phân lập ở Brasil 53,33% (8/15). Theo Amoore and Hautala (1983) con người có khả năng phát hiện H_2S ở ngưỡng 11 mg/l, trong 30 dòng khảo sát có 6 dòng không sinh H_2S thích hợp cho sản xuất rượu vang. Ngoài ra, khi nuôi cấy nấm men trên môi trường có chứa kali acetate cả 30 chủng nấm men đều

sinh bào tử, mỗi tế bào hình thành từ 1-4 bào tử. Chúng tỏ rằng các dòng nấm men đều có khả năng sinh bào tử và khả năng sinh sản tốt. Mười chủng nấm men có khả năng phát triển tốt trên môi trường thạch và khả năng lên men mạnh, 10 chủng không sinh H_2S được mang định danh bằng giải mã trình tự.

3.2. Định danh nấm men bằng cách giải mã trình tự

Trước khi mang đi giải mã trình tự, các chủng nấm men được nuôi cấy trên môi trường YPG lỏng và được pha loãng đến OD=0,2. Nấm men được mang đi tách chiết DNA (Ralser, 2009), DNA được mang đi điện di, sản phẩm sau quá trình PCR được đem đi điện di, sản phẩm điện di thể hiện ở hình 4.

Các chủng nấm men PL20, PL19, PL17, TA16, TA11, TA2 cho sản phẩm điện di có kích thước khoảng 260 bp, trong khi đó các dòng MC, MC9 sản phẩm PCR có kích thước khoảng 280 bp (Hình 4). Điều này phù hợp với lý thuyết khi sử dụng primer U1, U2 khuếch đại đoạn gen có kích thước 266 bp như vậy cho thấy quá trình PCR tạo sản phẩm chính xác. Sau quá trình giải mã trình tự và tiến hành so sánh trình tự trên NCBI kết quả trình bày ở bảng 3.



Hình 4. Băng điện di các chủng nấm men

Bảng 3. Kết quả giải mã trình tự và định danh của các chủng nấm men

Số thứ tự	Tên chủng nghiên cứu	Đoạn trình tự được giải mã	Kết quả khi so sánh trên NCBI
1	MC5	TGACTTACGTCGCAGTCCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATTC CCACAGGCTATAATACTTACCGAGGCAAGCTACATTCCTA TGGATTTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGGCCAGTGA AATGCGAGATTCCCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGCACA AAACACCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTTCA	gb HQ262392.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain IMAU2Y014 (WM12-1) 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=577
2	MC9	CCTTGACTTACGTCGCAGTCCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTA TTCCACAGGCTATAATACTTACCGAGGCAAGCTACATTC CTATGGATTTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGGCCAG TGAAATGCGAGATTCCCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGC ACAAAACACCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTT	> gb HQ262392.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain IMAU2Y014(WM12-1) 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=577
3	PL17	TCGGGCGCGCTGTTATAGCTCGTGTGACACCTCCATCC CTTTTCGAGGCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTAATGGT TGCAAGCCGCCGCTTTGAAACAC	gb GU460176.1 <i>Clavispora lusitaniae</i> strain IMAU5Y028(G-1) 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=541
4	PL19	TCGCAGGCTCGAAAAGGATGAGGGCGTCAACACGAGC TATAACACGCGCGCCGAAGGTGCGCGCCACATTCGGA GTTCTTGTTCTCCCCCTTTTCGACGCTGGCCGGTAAA ACCGTGTCTGCTTGCAAGCCCTTCCCTT	dbj AB617983.1 <i>Clavispora lusitaniae</i> genes for 26S rRNA, partial sequence, strain: LM083 Length=517
5	PL20	AGGGGGGAGGAACAAGAAGTTCGAGAATGTGGCGCGCAC CTTGGGCGCGCTGTTATAGCTCGTGTGACGCCTCCAT CCCTTTTCGAGGCTGCGATTCTAGGACGCTGGCGTAATG GTTGCAAGCCGCCGCTTTGAAACAC	gb GU460176.1 <i>Clavispora lusitaniae</i> strain IMAU5Y028(G-1) 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=541
6	TA2	TACGTCGCAGTCCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATCCACA GGCTATAATACTTACCGAGGCAAGCTACATTCCTATGGAT TTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGGCCAGTGAAATGC GAGATTCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGCACAAAACA CCATGTCTGATCAAATGCCCTTC	gb HQ443693.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CEC LFA711-1. 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=589
7	TA11	GCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTACTGGGCCA GCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTA GCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCC AGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTG GCATAATGGTTATATGCCGCCGCTTTGAAACACGGACC AAGGAGTCA	> gb HQ443693.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CEC LFA711-1. 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=589
8	TA16	TACGTCGCAGTCCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATCCACA GGCTATAATACTTACCGAGGCAAGCTACATTCCTATGGAT TTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGGCCAGTGAAATGC GAGATTCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGCACAAAACA CCATGTCTGATCAAATGCCCTTC	> gb HQ262392.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain IMAU2Y014(WM12-1) 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=577
9	TV5	TGTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACAT GGTGTGTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCT CGCATTCAGTGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATA AATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGC CTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACG TAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCGCT CTTGAACACGGACCAAGGAGTC	gi 312166124 gb HQ199210.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain NY08 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=544
10	TV2	GTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATG GTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTC GCATTCAGTGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAA ATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCC TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGT AAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCGCT CTTGAACACGGACCAAGGAGTC	gi 301070346 gb HM627121.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain D53 26S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=831

Qua bảng 3 cho thấy khi giải mã trình tự đoạn DNA đã tinh sạch, kết quả trình tự được so sánh và định danh dựa vào kỹ thuật Blast của NCBI nhằm xác định mức định tương đồng về tên chủng so với cơ sở dữ liệu từ NCBI. Trong 10 chủng được giải mã trình tự thì có 7 chủng là *Saccharomyces cerevisiae* chiếm 70% trong 7 chủng này thì 2 dòng là *Saccharomyces cerevisiae* strain CEC LFA711-1 là chủng TA2, TA11, 3 chủng là *Saccharomyces cerevisiae* strain IMAU2Y014 (WM12-1) là các chủng MC5, MC9, TA16. 1 chủng là *Saccharomyces cerevisiae* strain D53, là chủng TV2, 1 chủng *Saccharomyces cerevisiae* strain NY08 là chủng TV5 (với độ tương đồng giữa chủng nghiên cứu và chủng đối chứng trong NCBI hơn 98%) và 3 chủng PL17, PL19, PL 20 có trình tự đoạn DNA đặc thù tương đồng với *Clavispora lusitaniae*, chiếm tỷ lệ 30% trong đó *Clavispora lusitaniae* strain IMAU5Y028 (G-1) có 2 chủng và *Clavispora lusitaniae* 1 chủng (với độ tương đồng trình tự giữa chủng nghiên cứu và chủng đối chứng trong NCBI hơn 98%). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Vũ nguyên Thành và cộng sự, 2008.

4. KẾT LUẬN

Qua 128 dòng men được thu thập từ các loại bánh men: dạng viên và dạng bột được các hộ sản xuất sử dụng trên địa bàn được nhận diện và mô tả trong đó tất cả có khả năng phát triển ở 40°C, 60 dòng có khả năng phát triển ở 45 °C và 30 dòng có khả năng phát triển ở 50°C qua đó cho thấy nấm men từ bánh men rượu có khả năng phát triển ở nhiệt độ cao.

30 chủng chịu nhiệt ở 50°C được khảo sát các đặc tính sinh học: Trong đó có 30 dòng có khả năng lắng tốt, 10 dòng không sinh H₂S, 16 dòng sinh ít sinh H₂S, và 4 dòng sinh H₂S nhiều, 30 dòng có khả năng

chịu cồn 17%, cả 30 dòng có khả năng sinh 1-4 bào tử.

Qua định danh 10 chủng nấm men bằng phương pháp định danh bằng giải mã trình tự thì có 7 dòng là *Saccharomyces cerevisiae* là các chủng: TA2, TA11, MC5, MC9, TA16, TV5, TV2. Các chủng này có khả năng chịu nhiệt ở 50°C, chịu cồn ở nồng độ 170 ml/L, không sinh H₂S, lắng tốt (chiều cao đoạn dịch trong lớn 75% chiều cao đoạn dịch lên men), có khả năng sinh bào tử các chủng này có thể ứng dụng để sản xuất rượu hoặc dùng trong công nghiệp sản xuất cồn. 03 chủng còn lại là *Clavispora lusitaniae* là các chủng MC5, MC9, TA16.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm tạ, Ban quản lý dự án TRIG đã tài trợ kinh phí, Ban giám hiệu Trường Đại học An Giang, đã giúp chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amoore, J.E and E. Hautala (1983). Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *Journal of Applied Toxicology* 3, 272-290.
- Đồng Thị Thanh Thu (2003). Sinh hóa ứng dụng, TP HCM, NXB Đại học Quốc gia.
- Guimarães Thais M., G. Moriel Danilo, P. Machado Iara, M.T. Cyntia, Fadel Picheth, M. Tania and B. Bonfim (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 42. n. 1. Jan. /Mar.
- Ngô Thị Phương Dung, Rombouts and Nout (2005). Development of defined mixed-culture fungal fermentation starter granulates for controlled production of rice wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 6, Issue 4, 1 December 2005, Pages 429-441.

- Oliveira VA, M.A. Vicente, L.G. Fietto, I.M. Castro, M.X. Coutrim, D. Schüller, R.L.Brandão and al (2008). Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their impact in Cachaca Production. Appl. Environ. Microbiol, vol. 74. p. 3693-3701.
- Ono, B. I, N. Ishi, S. Fujino, I. Aoyama (1991). I. Role of hydrosulfide ions (HS-) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol.v. 57, p. 3183-3186.
- Ralser (2010). Quick and Easy Isolation of Genomic DNA from Yeast. Access online ngày 17/10/2010. <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Quick-and-Easy-Isolation-of-Genomic-DNA-from-Yeast-3451.html>.
- Sandhu, G.S., B.C. Kline, L. Stockman and G.D. Roberts (1995). Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J. Clin. Microbiol. 33:2913-2919.
- Vu Nguyen Thanh, Le Thuy Mai and Duong Anh Tuan (2008). Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE. International Journal of Food Microbiology. Volume 128, Issue 2, 10 December 2008, Pages 268-273.