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

*DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.137*

# PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH NẤM MEN TRONG LÊN MEN RƯỢU VANG DÂU HẠ CHÂU (*Baccaurea ramiflora* L.)

Nguyễn Văn Vũ[1] và Nguyễn Văn Thành[2*]

[1]*Học viên cao học ngành Công nghệ Sinh học*

[2]*Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ*

**Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Văn Thành (email: nvthanh@ctu.edu.vn)*

***Thông tin chung:***
*Ngày nhận bài: 01/03/2018*
*Ngày nhận bài sửa: 02/05/2018*
*Ngày duyệt đăng: 29/10/2018*

***Title:***
*Isolation, selection and identification of yeast strain for Baccaurea ramiflora wine fermentation*

***Từ khóa:***
*Nấm men, phân lập, rượu vang dâu Hạ Châu, Saccharomyces cerevisiae*

***Keywords:***
*Baccaurea ramiflora wine, identification, isolation, Saccharomyces cerevisiae, yeast*

## ABSTRACT

*The study was to isolate and select high active yeast train from fermented Baccaurea juice to produce high quality Baccaurea ramiflora wine (high alcohol, low aldehyde and methanol content, good sensory evaluation, good taste and smell). The reasult showed that 48 yeast strains were isolated from Baccaurea ramiflora fruit juices in Can Tho and Hau Giang. Based on the classification keys of yeasts (morphology, physiology, and biochemistry), the isolated yeast strains were generally characterized as three genera: Saccharomyces, Hanseniaspora, and Pichia. Results of selective experiment from yeasts belong to Saccharomyce show that the yeast strain CB1.1 isolated from Baccaurea ramiflora (Bon bon) fruit juice in Phong Dien (Can Tho) has the best fermented activities such as the fastest fermentation by Durham test (24 hours), the highest ethanol content (12.71% v/v) and low remained sugar (7.83°Brix). Baccaurea ramiflora wine fermented by the yeast CB1.1 with optimal parameters: Brix = 24.70, pH = 4.20, and $10^7$ CFU/mL of yeast cell density in 10 days providing the highest ethanol content (13,76% v/v). Result of the identification of yeast by DNA sequencing showed that the superior yeast strain CB1.1 belong to Saccharomyces cerevisiae.*

## TÓM TẮT

*Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn nấm men có hoạt tính lên men cao từ quả dâu, từ đó ứng dụng lên men rượu vang dâu Hạ Châu chất lượng cao (hàm lượng rượu cao, rượu tạp và aldehyde thấp, cảm quan tốt). Kết quả nghiên cứu đã được phân lập được 48 dòng nấm men từ dịch quả dâu tại thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Dựa vào khóa phân loại nấm men (hình thái, sinh lý, sinh hóa) ba giống được phân lập gồm: Saccharomyces, Hanseniaspora, và Pichia. Thí nghiệm thực hiện trên các dòng thuộc giống Sacharomyces và đã tuyển chọn dòng nấm men CB1.1. Kết quả dòng CB1.1 được phân lập từ dịch quả dâu bòn bon tại huyện Phong Điền (Cần Thơ) có các đặc tính tốt như khả năng lên men nhanh (24 giờ), cho hàm lượng rượu cao nhất (12,71% v/v) và đường sót thấp nhất (7,83°Brix). Rượu vang dâu Hạ Châu lên men từ nấm men CB1.1 với dịch phối chế từ các thông số tối ưu Brix = 24,70, pH = 4,20, mật số tế bào nấm men $10^7$ tế bào/mL và lên men ở nhiệt độ phòng trong 10 ngày cho kết quả độ rượu tối ưu 13,76% v/v. Kết quả định danh dòng nấm men CB1.1 bằng phương pháp giải trình tự DNA đã xác định được CB1.1 tương đồng với Saccharomyces cerevisiae.*

Trích dẫn: Nguyễn Văn Vũ và 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.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Dâu Hạ Châu là tên gọi của một giống dâu đặc sản của huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ. Đây là một loại cây mới được người dân địa phương đưa vào canh tác trong thời gian gần đây do có nhiều tiềm năng rất lớn bên cạnh các loại cây trồng khác trong việc phát triển huyện Phong Điền trở thành một đô thị du lịch sinh thái. Chính vì hương vị thơm ngọt đặc trưng, dâu Hạ Châu đã được đăng ký bảo hộ thương hiệu. Dâu Hạ Châu không chỉ nổi tiếng ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, các tỉnh Đông Nam Bộ mà còn được xuất khẩu sang các nước trên thế giới như Campuchia, Thái Lan, Trung Quốc. Tuy nhiên, dâu Hạ Châu chủ yếu được sử dụng với dạng tươi, thời gian bảo quản tương đối ngắn nên thị trường tiêu thụ chưa rộng và giá cả chưa ổn định. Vì vậy, để tận dụng nguồn nông sản dồi dào này, góp phần nâng cao giá trị kinh tế và đáp ứng nhu cầu đa dạng của người tiêu dùng thì việc nghiên cứu đưa loại trái cây này vào chế biến các sản phẩm thực phẩm là vấn đề cấp thiết. Nghiên cứu nâng cao chất lượng rượu vang là vấn đề rất được quan tâm hiện nay. Một trong những phương pháp cải tiến chất lượng là sử dụng nguồn nấm men tự nhiên được phân lập từ nguyên liệu cho quá trình sản xuất rượu vang sẽ cho rượu có độ rượu cao, chất lượng rượu ổn định và mùi vị đặc trưng (Lương Đức Phẩm, 2009). Do vậy, mục tiêu nghiên cứu là phân lập và tuyển chọn các dòng nấm men có hoạt lực cao từ dịch quả dâu để sử dụng hiệu quả cho tiến trình lên men rượu vang dâu Hạ Châu chất lượng cao, góp phần đa dạng hóa sản phẩm, nâng cao giá trị kinh tế của dâu Hạ Châu, loại quả đặc sản của huyện Phong Điền, thành phố Cần thơ.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

#### *2.1.1 Nguyên liệu*

Mẫu dâu phân lập nấm men gồm: dâu bòn bon (Hình 1a), dâu Gia Bảo (Hình 1b), dâu Xiêm (Hình 1c), dâu Hạ Châu (Hình 1d) được thu tại vườn ở Cần Thơ và Hậu Giang.

Mẫu dâu lên men rượu là dâu Hạ Châu được thu tại huyện Phong Điền. Nấm men đối chứng *Saccharomyces cerevisiae* (Hoa Kỳ)- kí hiệu ĐC, được lưu giữ ở 4°C tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

(a) (b) (c) (d)

**Hình 1: Hình ảnh các loại dâu sử dụng để phân lập và lên men**

*(a) dâu bòn bon; (b) dâu Gia Bảo; (c) dâu Xiêm; (d) dâu Hạ Châu*

#### *2.1.2 Địa điểm thực hiện*

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

#### *2.1.3 Thiết bị và dụng cụ*

Các thiết bị được sử dụng gồm: Kính hiển vi Olympus BH-2, máy ly tâm Hettich-Zentrifligen 4810, pH kế Sartorius PB-20, Brix kế Euromex FG103/113, tủ cấy Telstar AV-100, nồi khử trùng nhiệt ướt PBI – 19L, máy ép nguyên liệu, cồn kế 0-30$^0$C, cân điện tử, tủ ủ, buồng đếm hồng cầu, nồi chưng cất rượu và một số dụng cụ khác.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### *2.2.1 Phân lập và tách ròng nấm men tự nhiên từ dịch quả dâu lên men (4 loại dâu)*

Dâu thu tại vườn mang về không rửa, không lột bỏ vỏ, loại bỏ những quả hư, nhiễm vi sinh vật. Đem đi ép khoảng 10 trái bằng máy ép nguyên liệu thu dịch quả và cho khoảng 10 mL vào bình tam giác 100 mL có môi trường YPD (Yeast extract - Peptone-D-glucose) tăng sinh ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành phân lập trên môi trường YPDA (Yeast extract -Peptone-D-glucose-Agar) đến khi có được những dòng nấm men thuần chủng và định danh sơ bộ các dòng nấm men này bằng phương pháp hình thái học kết hợp với phương pháp sinh hóa dựa vào khóa phân loại nấm men

của Kurtzman and Fell (1998), Nguyễn Đức Lượng *và ctv.* (2006) và Lương Đức Phẩm (2009).

*2.2.2 Tuyển chọn nấm men có hoạt lực lên men cao từ các dòng nấm men phân lập*

Nghiên cứu được thực hiện nhằm so sánh khả năng lên men và chọn ra dòng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất để lên men rượu dâu Hạ Châu. Phối chế dịch quả dâu Hạ Châu (nước ép dâu Hạ Châu điều chỉnh pH = 4,0 và 22 $^oBrix$) sau đó thanh trùng với $NaHSO_3$, (140 mg/L) trong 2 giờ. Nuôi cấy tế bào nấm men trong môi trường tăng sinh khối đến khi mật số tế bào nấm men đạt $10^6$ tế bào/mL dịch lên men. Cho 9 mL dịch quả vào ống nghiệm có chuông Durham, tiếp tục cho vào 1 mL dung dịch các dòng nấm men, vặn chặt nắp lại và lắc ngang phân tán đều (quan sát thấy hết sủi bọt khí).

Song song đó, tiến hành thí nghiệm trong bình tam giác. Cho vào bình tam giác 1 mL dịch nấm men + 99 mL dịch quả phối chế (nước ép dâu Hạ Châu điều chỉnh pH = 4,0; 22 $^oBrix$ và sau đó thanh trùng với $NaHSO_3$, (140 mg/L) trong 2 giờ), lên men 10 ngày ở nhiệt độ 30$^o$C. Tiến hành đo độ rượu (bằng phương pháp chưng cất), độ Brix (bằng Brix kế). Tuyển chọn được dòng nấm men có hoạt lực lên men tốt nhất dựa vào thời gian lên men nhanh nhất và cho độ rượu cao nhất.

*2.2.3 Khảo sát sự ảnh hưởng của các nhân tố đến quá trình lên men rượu vang dâu Hạ Châu*

Nghiên cứu sự ảnh hưởng của các nhân tố chính: mật số nấm men (MSNM), độ Brix, pH đến quá trình lên men rượu vang dâu Hạ Châu nhằm tìm ra nghiệm thức/tổ hợp thích hợp nhất cho lên men rượu vang dâu Hạ Châu.

Thí nghiệm được bố trí theo phương thức thừa số với 3 nhân tố, 3 mức độ và 3 lần lặp lại. Nhân tố A: Độ Brix: 22, 24, 26 ($A_1$, $A_2$,$A_3$); nhân tố B: pH dịch lên men: 3,5; 4,0; 4,5 ($B_1$, $B_2$, $B_3$); nhân tố C: Mật số nấm men (tế bào/mL): $10^3$, $10^5$, $10^7$ ($C_1$, $C_2$, $C_3$).

*2.2.4 Định danh nấm men bằng phương pháp giải trình tự gen*

Dòng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất được chọn để giải trình tự đoạn gen bằng phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Korabecna, 2007) và sử dụng chương trình Nucleotide Blast để so sánh mức độ tương đồng của trình tự được giải với trình tự của các dòng nấm men trong ngân hàng gen trên NCBI với phần mềm BLASTN.

### 2.3 Các chỉ tiêu phân tích và xử lý thống kê

Các chỉ tiêu phân tích: xác định pH bằng pH kế, xác định độ Brix bằng khúc xạ kế và xác định hàm lượng ethanol sinh ra qua hệ thống chưng cất và hiệu chỉnh về 20$^o$C (Nguyễn Đình Thưởng và Nguyễn Thanh Hằng, 2007). Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV.I.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập và định danh sơ bộ các dòng nấm men từ quả dâu lên men

Theo Nguyễn Đức Lượng (2003), có thể định danh sơ bộ các dòng nấm men dựa vào đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh lý sinh hóa của nấm men. Đặc điểm hình thái nấm men bao gồm: mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường YPDA sau 2 – 3 ngày, hình thái tế bào, kiểu nảy chồi của tế bào nấm men, sự hình thành bào tử trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Đặc điểm sinh lý sinh hóa bao gồm: khả năng lên men đường glucose, sucrose và khả năng phân giải urea của nấm men.

*3.1.1 Đặc điểm hình thái của 48 dòng nấm men phân lập được*

Theo Lương Đức Phẩm (2009), tế bào nấm men có hình dạng phổ biến như hình cầu, hình oval, hình elip, hình trụ hoặc đôi khi kéo dài thành hình sợi.

**Bảng 1: Số lượng và hình dạng nấm men được phân lập ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang**

| Địa điểm | Loại dâu | Số dòng theo loại dâu | Hình dạng | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Cầu lớn | Cầu nhỏ | Oval lớn | Oval nhỏ | Elip dài | Elip ngắn | Elip nhọn |
| Cần Thơ | Vàng (B) | 7 | - | + | + | + | + | - | - |
| | Xiêm (X) | 6 | - | + | + | + | + | + | - |
| | Gia Bảo (D) | 7 | + | - | + | + | + | - | + |
| | Hạ Châu (C) | 6 | + | - | + | + | - | + | - |
| Hậu Giang | Vàng (B) | 5 | - | - | + | + | + | + | - |
| | Xiêm (X) | 5 | + | - | + | + | + | - | - |
| | Gia Bảo (D) | 6 | - | + | + | - | + | + | + |
| | Hạ Châu (C) | 6 | - | + | + | + | - | + | - |
| Tổng số dòng theo hình dạng | | | 3 | 6 | 13 | 11 | 8 | 9 | 2 |

*(+) có xuất hiện; (-) không xuất hiện*

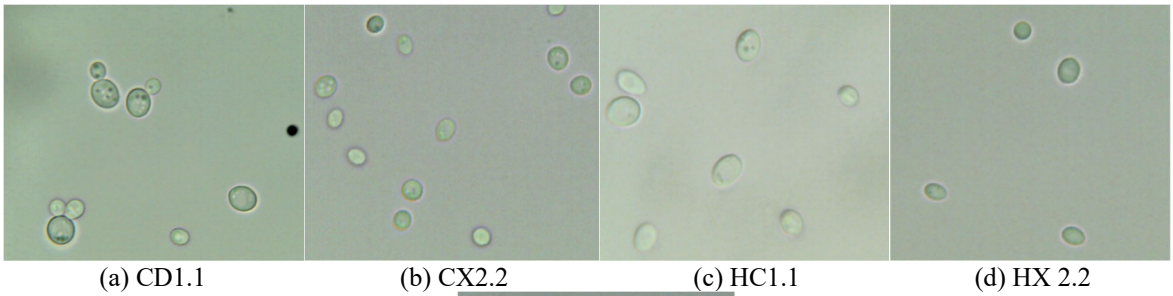
Nấm men có thể thay đổi hình dạng và kích thước trong các giai đoạn phát triển và điều kiện môi trường xung quanh.

Kết quả phân lập được 48 dòng nấm men từ nguồn quả dâu ban đầu. Dựa vào hình dạng tế bào, 48 dòng nấm men phân lập có thể được xếp thành 7 nhóm thể hiện ở Bảng 1 và Hình 2.

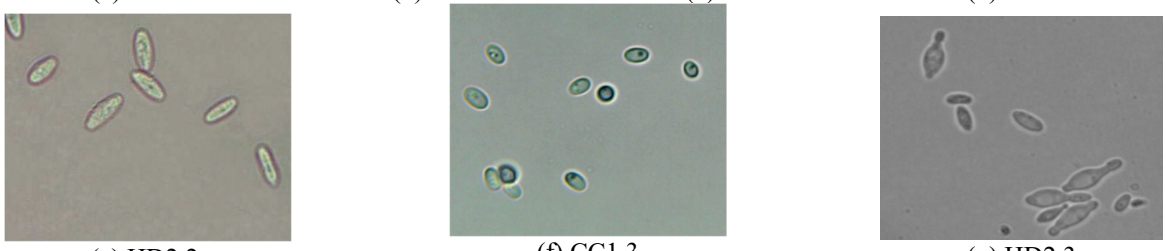
Các dòng nấm men phân lập được ký hiệu như sau: chữ cái đầu tiên C (Cần Thơ) và H (Hậu Giang); chữ cái thứ hai B (dâu bòn bon), D (Dâu Gia Bảo), X (dâu Xiêm) và C (dâu Hạ Châu); chữ số thứ ba với số 1 (huyện Phong Điền và huyện Châu Thành) và số 2 (quận Bình Thủy và huyện Châu Thành A); chữ số thứ 4 là thứ tự số lượng dòng nấm men cho mỗi địa điểm tương ứng mỗi loại dâu. Dòng nấm men phân lập cụ thể được kí hiệu mã hóa cho 3 kí tự chữ và số đầu tiên thể hiện ở Bảng 2.

**Bảng 2: Mô tả kí hiệu các dòng nấm men phân lập ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang**

| Kí tự thứ 1 | Kí tự thứ 2 | Kí tự thứ 3 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Huyện Phong Điền (1) | Quận Bình Thủy (2) | Huyện Châu Thành (1) | Huyện Châu Thành A (2) |
| Cần Thơ (C) | Vàng (B) | CB1 | CB2 | HB1 | HB2 |
| | Xiêm (X) | CX1 | CX2 | HX1 | HX2 |
| Hậu Giang (H) | Gia bảo (D) | CD1 | CD2 | HD1 | HD2 |
| | Hạ châu (C) | CC1 | CC2 | HC1 | HC2 |



(a) CD1.1 (b) CX2.2 (c) HC1.1 (d) HX 2.2



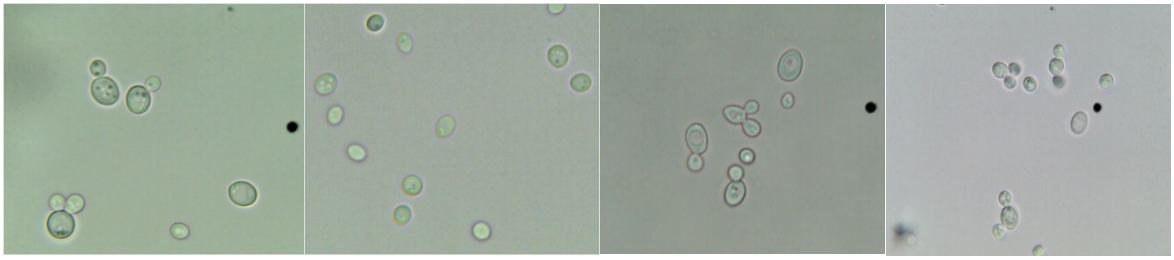
(e) HD2.2 (f) CC1.3 (g) HD2.3

**Hình 2: Hình dạng tế bào của 7 dòng nấm men tiêu biểu của 7 nhóm**

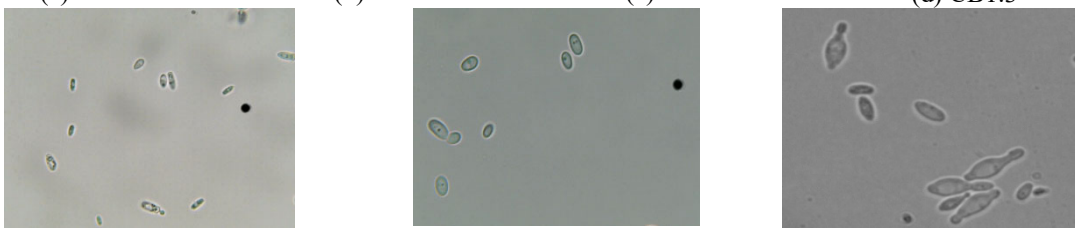
*(a) Tế bào hình cầu lớn (CD1.1); (b) Tế bào hình cầu nhỏ (CX2.2); (c) Tế bào hình oval lớn (HC1.1); (d) Tế bào hình oval nhỏ (HX2.2); (e) Tế bào hình elip dài (HD2.2); (f) Tế bào hình elip ngắn (CC1.3); (f) Tế bào hình elip nhọn (HD2.3)*

*3.1.2 Đặc điểm nảy chồi của 48 dòng nấm men phân lập*

Theo Lương Đức Phẩm (2009), nảy chồi là hình thức sinh sản vô tính điển hình của nấm men. Chồi có thể mọc ra theo bất kỳ hướng nào (nảy chồi đa cực) hoặc nảy chồi lưỡng cực hoặc chỉ nảy chồi ở một cực nhất định (nảy chồi một cực). Quan sát nảy chồi của 48 dòng nấm men, đại diện là 7 nhóm hình dạng như đã trình bày ở trên, kết quả cho thấy có 2 hình thức nảy chồi là nảy chồi nhiều hướng và nảy chồi lưỡng cực. Kết quả quan sát sự nảy chồi của các nhóm được thể hiện ở Hình 3 và Bảng 3.



(a) CD1.1 (b) CX2.2 (c) CD1.2 (d) CB1.3



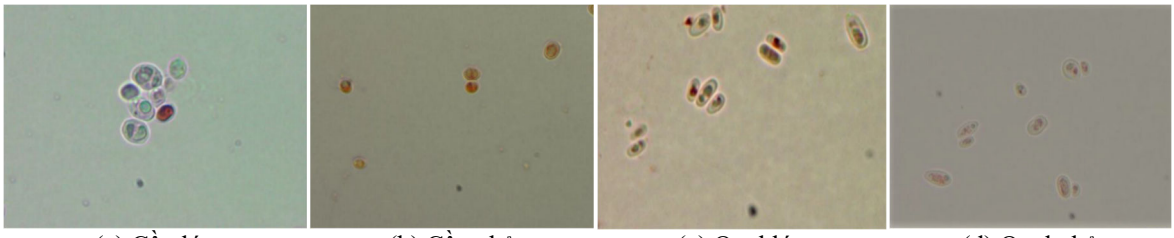
(e) HD2.2 (f) CC1.3 (g) HD2.3

**Hình 3: Đặc điểm nảy chồi của 7 nhóm nấm men phân lập được**

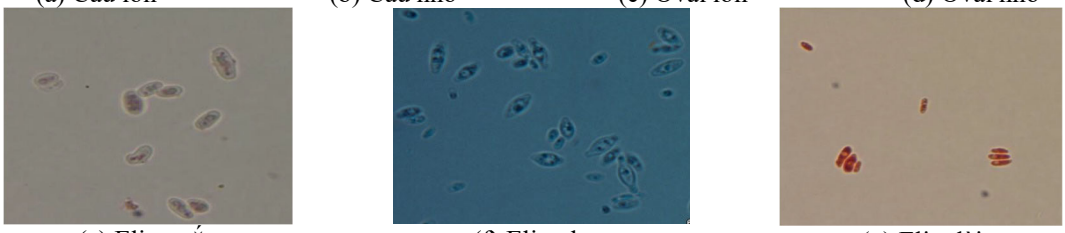
*Nảy chồi nhiều hướng: (a), (b), (c), (d); Nảy chồi lưỡng cực: (e), (f), (g)*

*3.1.3 Đặc điểm hình thành bào tử của 48 dòng nấm men phân lập*

Theo Lương Đức Phẩm (2009), khả năng tạo bào tử và hình dạng của bào tử là dấu hiệu loài của nấm men. Nấm men chỉ hình thành bào tử trong môi trường nghèo chất dinh dưỡng. Kết quả hình thành bào tử của các dòng nấm men phân lập được trong môi trường thạch nước cho thấy sau 6 tuần nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, có 6 nhóm nấm men hình thành bào tử và 1 nhóm nấm men không hình thành bào tử được mô tả ở Hình 4 và Bảng 3.



(a) Cầu lớn (b) Cầu nhỏ (c) Oval lớn (d) Oval nhỏ



(e) Elip ngắn (f) Elip nhọn (g) Elip dài

**Hình 4: Đặc điểm hình thành bào tử của 7 nhóm nấm men phân lập được**

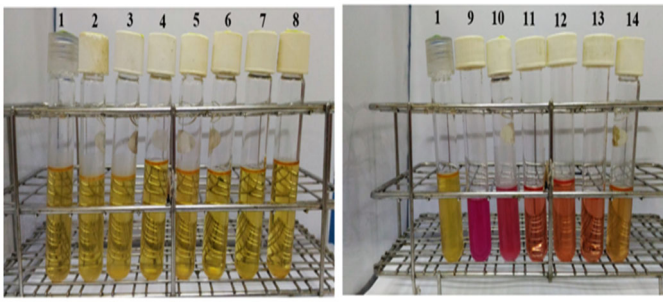
*Hình thành bào tử: (a), (b), (c), (d), (e) và (f); Không hình thành bào tử: (g)*

*3.1.4 Khả năng lên men đường glucose, sucrose trong chuông Durham và phân giải urê của 48 dòng nấm men trên*

Khả năng lên men các loại đường là một trong những chỉ tiêu quan trọng được sử dụng để phân loại nấm men. Khả năng lên men đường của 48 dòng nấm men phân lập được nuôi cấy trên các loại đường glucose và sucrose (2%) trong ống nghiệm 10 mL có chuông Durham (theo phương pháp của Kurtzman and Fell (1998) được thể hiện ở Bảng 3, Hình 6a và Hình 6b.

Sự thay đổi màu sắc của môi trường Christensen khi nuôi cấy nấm men phân lập sau thời gian ủ 7 ngày thể hiện hoạt tính phân giải urea của các dòng nấm men được thể hiện qua Hình 5. Theo phương pháp định danh của Nguyễn Lân Dũng *và ctv*. (1972), nếu nấm men có khả năng sinh enzyme urease để phân giải urea, môi trường

sẽ chuyển sang màu đỏ sẫm. Nguyên nhân là do môi trường Christensen có chứa chất chỉ thị màu phenol red, môi trường có màu vàng ở pH = 6,8. Khi nấm men có enzyme urease để phân giải urea thành $CO_2$ và $NH_3$, lượng $NH_3$ tăng lên làm pH tăng khiến môi trường chuyển sang màu đỏ. Kết quả quan sát sự chuyển màu được thể hiện ở Bảng 3.

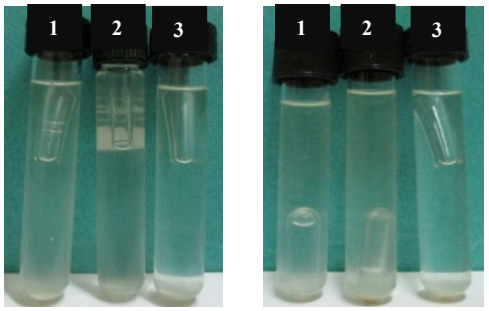



(a) (b)

**Hình 5: Test urease các dòng nấm men trên môi trường Christensen sau 7 ngày**

*(a) ống nghiệm 1: đối chứng (không chủng nấm men); ống nghiệm 2-8: có chủng nấm men nhưng không phản ứng (không chuyển màu đỏ sẫm);*

*(b) ống nghiệm 1: đối chứng (không chủng nấm men); ống nghiệm 9-14: có phản ứng (chuyển màu đỏ sẫm)*




(a) (b)

**Hình 6: Khả năng lên men đường glucose và sucrose của các dòng nấm men**

*(a) lên men đường glucose (ống nghiệm 1, 2, 3 đều lên men làm chuông Durham bị đẩy lên);*

*(b) lên men đường sucrose (ống nghiệm 1, 2 không lên men chuông Durham chìm; ống nghiệm 3 lên men làm chuông Durham bị đẩy lên)*

Kết quả có 5 nhóm tế bào nấm men (hình cầu lớn, cầu nhỏ, oval lớn, oval nhỏ, elip nhọn) đều có các dòng nấm men không có khả năng phân giải urea. Riêng dòng nấm men có hình elip dài (CB1.2, CB2.1, CD2.2, CD2.3, CX2.3, HB2.1, HD2.2, HX2.1) và nhóm tế bào nấm men có hình elip ngắn (CC1.3, CX1.1, HB2,3, HC2.3, HD2.1) có khả năng phân giải urea, làm cho môi trường chuyển thành màu đỏ sẫm. Tổng hợp kết quả từ khóa phân loại có thể xếp các dòng nấm men thuộc 7 nhóm này thuộc các giống như sau:

**Bảng 3: Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân loại của các dòng nấm men đã phân lập**

| Dòng nấm men | Đặc điểm hình thái | | | Đặc điểm sinh lý, sinh hóa | | | Giống (phân loại sơ bộ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hình dạng nấm men | Tế bào nảy chồi | Hình thành bào tử | Khả năng lên men đường | | Phân giải urea | |
| | | | | Glucose | Saccharose | | |
| CC1.1, CD1.1, HX1.1 | Cầu lớn | Nhiều hướng | 1 – 3 bào tử hình tròn | + | + | - | *Saccharomyces* |
| CB1.4, CB2.2, CX2.2, HC2.2, HD1.2, HD2.4 | Cầu nhỏ | Nhiều hướng | 1 – 2 bào tử hình tròn | + | + | - | *Saccharomyces* |
| CB1.1, CC2.2, CD1.2, CX1.3, CX2.1, HB1.1, HB2.2, HC1.1, HC2.1, HC2.4, HD1.1, HX1.2, HX2.3 | Oval lớn | Nhiều hướng | 1 – 3 bào tử hình tròn | + | + | - | *Saccharomyces* |
| CB1.3, CB2.3, CC2.3, CX1.2, CC2.1, CD1.3, CD2.1, CC1.2, HB1.2, HC1.2, HX2.2 | Oval nhỏ | Nhiều hướng | 1 – 2 bào tử hình tròn | + | + | - | *Saccharomyces* |
| CB1.2, CB2.1, CD2.2, CD2.3, CX2.3, HB2.1, HD2.2, HX2.1 | Elip dài | Lưỡng cực | Không có bào tử | + | - | + | *Pichia* |
| CC1.3, CX1.1, HB2,3, HC2.3, HD2.1 | Elip ngắn | Lưỡng cực | 1 – 2 bào tử hình tròn | + | - | + | *Pichia* |
| CD1.4, HD2.3 | Elip nhọn | Lưỡng cực | 1 – 2 bào tử hình tròn | + | - | - | *Hanseniaspora* |

Theo mô tả hình thái, phân loại sơ bộ về giống nấm men *Saccharomyces* của Kurtzman and Fell (1998), Nguyễn Đức Lượng (2003), Lương Đức Phẩm (2009), giống nấm men *Saccharomyces* có tế bào sinh dưỡng nảy chồi nhiều hướng, hình cầu, hình trứng, hình val hoặc elip kéo dài, tạo thành 1 – 4 bào tử hình tròn, hình trứng, bề mặt trơn láng, sử dụng đường lên men và không có hoạt tính phân giải urea. Các dòng nấm men thuộc nhóm tế bào nấm men có hình cầu lớn, cầu nhỏ, oval lớn, oval nhỏ có đặc điểm giống như mô tả nên có thể kết luận rằng các dòng nấm men trên là giống *Saccharomyces.*

Dòng nấm men CD1.4 và HD2.3 tế bào có hình elip nhọn, sinh dưỡng nảy chồi lưỡng cực, 1 – 2 bào tử, có khả năng lên men đường glucose và không phân giải urea. Những đặc điểm trên phù hợp với miêu tả của Lương Đức Phẩm (2009) về giống nấm men *Hanseniaspora*: tế bào nấm men giống này khá nhỏ, hình elip hoặc quả chanh. Sinh sản bằng nảy chồi một hoặc hai cực, hiếm khi tạo bào tử, có khả năng sử dụng đường lên men và không đồng hóa urea. Như vậy, có thể kết luận dòng nấm men trên là giống *Hanseniaspora*.

Theo mô tả hình thái, phân loại sơ bộ về giống nấm men *Saccharomyces* của Nguyễn Đức Lượng (2003), Kurtzman and Fell (1998), *Pichia* là giống nấm men sinh sản hữu tính bằng bào tử, lên men glucose yếu, có khả năng phân giải urea. Như vậy, có thể kết luận các dòng nấm men thuộc nhóm có hình elip dài và elip ngắn là giống *Pichia* do sinh dưỡng nảy chồi lưỡng cực, hình thành bào tử với 1 – 2 bào tử hình tròn, lên men yếu hoặc không có khả năng lên men đường glucose, đồng thời không có khả năng sinh enzyme urease.

Như vậy, 48 dòng nấm men phân lập ở 4 địa điểm: huyện Phong Điền (Cần Thơ), quận Bình Thủy (Cần Thơ), huyện Châu Thành A (Hậu Giang) và huyện Châu Thành (Hậu Giang) thuộc 3 giống nấm men là *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia.*

### 3.2 Hoạt tính lên men của các dòng nấm men phân lập thuộc giống Sacharomyces

Ba mươi ba dòng nấm men thuộc giống *Saccharomyces* được chọn để tiến hành khảo sát và so sánh với khả năng lên men với dòng nấm men đối chứng. Thí nghiệm được tiến hành đồng thời trong chuông Durham và bình tam giác.

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

Chiều cao cột khí $CO_2$ trong chuông Durham thể hiện cường độ lên men của các dòng nấm men ở từng thời điểm lên men khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy có sự khác biệt về khả năng lên men giữa các dòng nấm men. Ba dòng nấm men CB1.1, CC2.2 và CX1.3 đều lên men nhanh nhất (làm đầy cột khí trong 3 giờ). Các dòng còn lại có thời gian lên men dài hơn từ 8-72 giờ. Phương pháp đo chiều cao cột khí $CO_2$ trong chuông Durham chỉ thực hiện tối đa là 72 giờ, trong khi quá trình lên men rượu có thời gian dài hơn (10 - 12 ngày) nên kết quả Durham này chỉ là cơ sở ban đầu cần phải kết hợp với phương pháp lên men trong bình tam giác mới có thể xác định dòng nấm men có hoạt lực lên men cao nhất.

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

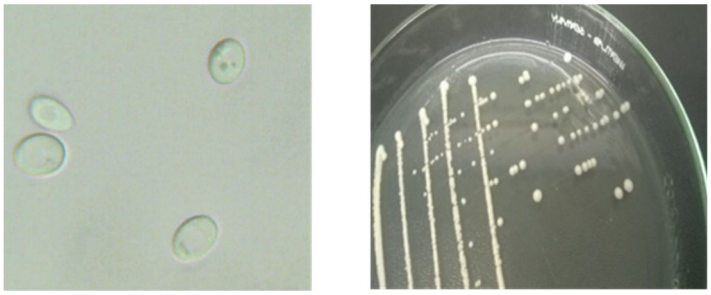
Thí nghiệm khảo sát khả năng lên men được tiến hành với mật số nấm men $10^6$ tế bào/mL, thời gian ủ là 10 ngày ở 30°C; pH 4,0 và 22°Brix. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

**Bảng 4: Các chỉ tiêu pH, độ Brix và độ rượu sau lên men của 19 dòng nấm men**

| STT | Dòng nấm men | pH | Độ Brix | Độ rượu ở 20°C |
|---|---|---|---|---|
| 1 | CB1.1 | 3,75 | $7,83^{a}$ | $12,71^{a}$ |
| 2 | CB1.4 | 3,64 | $10,5^{fg}$ | $10,66^{bcde}$ |
| 3 | CB2.3 | 3,65 | $11,27^{h}$ | $8,28^{hi}$ |
| 4 | CC1.1 | 3,83 | $8,67^{b}$ | $11,26^{b}$ |
| 5 | CC2.2 | 3,75 | $8,83^{bc}$ | $10,89^{bcde}$ |
| 6 | CC2.3 | 3,74 | $12,67^{ij}$ | $8,39^{hi}$ |
| 7 | CD1.1 | 3,72 | $10,17^{efg}$ | $9,98^{efg}$ |
| 8 | CX1.2 | 3,73 | $9,33^{bcd}$ | $11,57^{b}$ |
| 9 | CX1.3 | 3,75 | $9,83^{def}$ | $11,34^{bc}$ |
| 10 | CX2.1 | 3,69 | $10,67^{gh}$ | $9,05^{gh}$ |
| 11 | CX2.2 | 3,76 | $12,33^{i}$ | $11,15^{bc}$ |
| 12 | HB1.2 | 3,75 | $13,33^{j}$ | $10,4^{cdef}$ |
| 13 | HC1.1 | 3,76 | $9,5^{cde}$ | $11,44^{b}$ |
| 14 | HC1.2 | 3,73 | $12,67^{ij}$ | $9,43^{fg}$ |
| 15 | HC2.1 | 3,71 | $10,17^{fg}$ | $10,72^{bcde}$ |
| 16 | HD1.1 | 3,74 | $10,0^{defg}$ | $11,02^{bcd}$ |
| 17 | HD2.4 | 3,65 | $13,33^{j}$ | $9,65^{fg}$ |
| 18 | HX1.2 | 3,75 | $12,50^{i}$ | $10,08^{def}$ |
| 19 | ĐC | 3,72 | $11,33^{h}$ | $7,90^{i}$ |
| CV (%) | | | 5,61 | 12,30 |

*Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ số mang các chữ cái khác nhau trong cùng một cột khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (P<0,05). CV: hệ số biến thiên*

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy dòng nấm men CB1.1 có khả năng lên men cho độ rượu cao nhất (12,71% v/v) và độ Brix giảm thấp (7,83 °Brix), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với các dòng nấm men đã phân lập còn lại và có độ rượu cao hơn độ rượu thu được của dòng nấm men đối chứng (7,9% v/v). Mặt khác, CB1.1 cũng là dòng nấm men lên men nhanh nhất trong chuông Durham.



(a) (b)

**Hình 7: Hình dạng tế bào (a) và khuẩn lạc (b) của dòng nấm men CB1.1 (Hình vật kính 100X)**

Theo Lương Đức Phẩm (2009), độ Brix biểu thị hàm lượng đường tổng số của một dung dịch. Sự biến đổi của hàm lượng đường trong quá trình lên men là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng lên men của các dòng nấm men. Trong quá trình lên men, nấm men sử dụng đường trong điều kiện kỵ khí tạo thành rượu etylic. Sau lên men rượu, hàm lượng đường sót còn lại nhiều sẽ ảnh hưởng đến mùi vị sản phẩm, vì đường sót sẽ được vi khuẩn lactic sử dụng sẽ tạo thành acid lactic, làm chua dịch lên men. Độ rượu là một trong những chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng lên men rượu của nấm men. Vì thế, độ rượu càng cao và hàm lượng đường sót lại thấp sau khi lên men thể hiện năng lực chuyển hóa đường thành rượu và hiệu suất lên men rượu của nấm men cao. Do đó, dòng nấm men CB1.1 được chọn là dòng nấm men tốt nhất để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo và cũng sẽ được định danh bằng phương pháp giải trình tự.

### 3.3 Ảnh hưởng của các nhân tố pH, độ Brix, mật số nấm men ban đầu đến quá trình lên men rượu vang dâu Hạ Châu

Thí nghiệm được bố trí với 3 nhân tố: pH ( 3,5; 4,0; 4,5), độ Brix (22, 24, 26) và mật số nấm men ($10^3$, $10^5$, $10^7$ tế bào/mL) để tìm ra nghiệm thức tốt nhất. Sau 10 ngày lên men, kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của pH, độ Brix và mật số nấm men đến khả năng lên men rượu vang dâu Hạ Châu được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả Bảng 5 cho thấy các nghiệm thức có độ Brix ban đầu là 22 nhìn chung cho độ rượu thấp hơn so với nghiệm thức ở độ Brix 24 và độ Brix 26. Kết quả này chứng tỏ rằng những nghiệm thức được bố trí với độ Brix cao sẽ có độ rượu tương đối cao hơn so với những nghiệm thức được bố trí với độ Brix thấp. Tuy nhiên, các nghiệm thức với độ Brix (22, 24, 26) không có sự khác biệt thống kê. Bên cạnh đó, khi quan sát về sự tác động của mật số nấm men lên quá trình lên men rượu, những nghiệm thức có mật số nấm men $10^3$ tế bào/mL lên men không tốt bằng những nghiệm thức có mật số nấm men $10^5$ tế bào/mL và nghiệm thức có mật số nấm men $10^7$ tế bào/mL.

Mặt khác, những nghiệm thức dịch phối chế ban đầu trong cùng độ Brix và mật số nấm men, ở các giá trị pH ban đầu là 4,0, nấm men hoạt động tốt hơn và cho độ rượu cao các nghiệm thức ở pH = 3,5 và pH = 4,5. Kết quả ở Bảng 5 cho thấy ở tất cả các nghiệm thức, pH có giảm so với ban đầu. Theo Nguyễn Công Hà (2000), nấm men phát triển tốt ở pH từ 3,8 đến 4,0. Nguyên nhân là do sự hoạt động của nấm men trong quá trình lên men kỵ khí sinh ra $CO_2$ và một số acid hữu cơ làm giảm pH của dịch phối chế ban đầu (Lương Đức Phẩm, 2009). Như vậy, pH ở các nghiệm thức mặc dù giảm vẫn phù hợp cho nấm men phát triển.

Theo Lương Đức Phẩm (2009), độ rượu là chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá khả năng lên men rượu của nấm men. Độ rượu cao cũng là điều kiện tốt trong quá trình bảo quản vì ở độ rượu cao có thể ức chế vi khuẩn phát triển. Kết quả trình bày ở Bảng 5 cho thấy nghiệm thức 18 (với pH= 4, $^o$Brix = 26 và MSNM = $10^7$ tế bào/mL) cho độ rượu cao nhất là 13,66 %v/v, không khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức 15 cũng cho độ rượu cao (13,62%v/v) và khác biệt có ý nghĩa với những nghiệm thức còn lại với điển hình như: 12, 21, 24, 27 có độ rượu lần lượt là: 12,22%v/v, 12,3%v/v, 12,25%v/v, 11,74%v/v. Hàm lượng đường sau lên men của nghiệm thức 18 từ 26$^o$Brix còn 7,17$^o$Brix, khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% so với nghiệm thức 15 (9,23$^o$Brix) và các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, nghiệm thức 18 cho độ rượu cao nhất là 13,66 % (v/v), vẫn còn thấp hơn nghiệm thức cao nhất trong nghiên cứu rượu vang mít của Nguyễn Phú Hơn (2017) là 15,08% (v/v). Nguyên nhân có thể là nguồn nguyên liệu mít có độ đường cao và có một số chất thích hợp hơn cho nấm men trong quá trình sản xuất rượu vang.

Kết quả thể hiện ở Bảng 5 là kết quả thực nghiệm với nghiệm thức 18 (pH = 4, 26 $^o$Brix và MSNM $10^7$ tế bào/mL) cho độ rượu cao nhất 13,66% v/v. Để đạt được kết quả tốt hơn thì các

thông số pH, độ Brix, và mật số nấm men tối ưu đã được tìm ra thông qua phân tích hồi quy dựa trên số liệu thu thập được bằng chương trình Statgraphics XVI.I với độ tin cậy 95%.

**Bảng 5: Giá trị pH, độ Brix và độ rượu trung bình sau lên men của dòng nấm men CB1.1**

| Nghiệm thức | °Brix- pH- MSNM (tế bào/mL) | pH sau lên men | °Brix sau lên men | Độ rượu (%) ở 20°C |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 3,5-22-$10^3$ | 3,34 | $12,17^{ij}$ | $7,26^{o}$ |
| 2 | 3,5-22-$10^5$ | 3,38 | $10,17^{fgh}$ | $8,46^{m}$ |
| 3 | 3,5-22-$10^7$ | 3,40 | $10,00^{fgh}$ | $9,29^{kl}$ |
| 4 | 3,5-24-$10^3$ | 3,28 | $18,17^{m}$ | $8,17^{mn}$ |
| 5 | 3,5-24-$10^5$ | 3,32 | $14,17^{l}$ | $9,37^{jk}$ |
| 6 | 3,5-24-$10^7$ | 3,35 | $13,33^{jkl}$ | $10,36^{ghi}$ |
| 7 | 3,5-26-$10^3$ | 3,28 | $20,33^{n}$ | $7,71^{no}$ |
| 8 | 3,5-26-$10^5$ | 3,35 | $13,77^{kl}$ | $9,74^{ijk}$ |
| 9 | 3,5-26-$10^7$ | 3,32 | $13,0^{jkl}$ | $10,42^{fgh}$ |
| 10 | 4,0-22-$10^3$ | 3,63 | $11,33^{hi}$ | $8,7^{lm}$ |
| 11 | 4,0-22-$10^5$ | 3,75 | $7,5^{abc}$ | $10,01^{hij}$ |
| 12 | 4,0-22-$10^7$ | 3,77 | $7,33^{ab}$ | $12,22^{b}$ |
| 13 | 4,0-24-$10^3$ | 3,62 | $13,17^{jkl}$ | $9,57^{jk}$ |
| 14 | 4,0-24-$10^5$ | 3,77 | $8,5^{bcd}$ | $10,96^{defg}$ |
| 15 | 4,0-24-$10^7$ | 3,73 | $9,23^{def}$ | $13,62^{a}$ |
| 16 | 4,0-26-$10^3$ | 3,63 | $12,67^{jk}$ | $9,44^{jk}$ |
| 17 | 4,0-26-$10^5$ | 3,74 | $9,83^{efg}$ | $11,48^{cd}$ |
| 18 | 4,0-26-$10^7$ | 3,74 | $7,17^{a}$ | $13,66^{a}$ |
| 19 | 4,5-22-$10^3$ | 3,9 | $7,83^{abc}$ | $9,87^{hijk}$ |
| 20 | 4,5-22-$10^5$ | 3,97 | $7,33^{ab}$ | $10,82^{efg}$ |
| 21 | 4,5-22-$10^7$ | 4,00 | $7,5^{abc}$ | $12,3^{b}$ |
| 22 | 4,5-24-$10^3$ | 3,9 | $9,17^{def}$ | $10,01^{hij}$ |
| 23 | 4,5-24-$10^5$ | 3,99 | $8,33^{abcd}$ | $11,27^{cde}$ |
| 24 | 4,5-24-$10^7$ | 4,01 | $8,17^{abcd}$ | $12,25^{b}$ |
| 25 | 4,5-26-$10^3$ | 3,88 | $11,0^{ghi}$ | $9,47^{jk}$ |
| 26 | 4,5-26-$10^5$ | 4,00 | $8,67^{cde}$ | $11,01^{def}$ |
| 27 | 4,5-26-$10^7$ | 4,01 | $8,17^{abcd}$ | $11,74^{bc}$ |
| CV (%) | | | 2,28 | 4,87 |

*Ghi chú: Số liệu là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột các số có mang số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5 % (P < 0.05). CV: hệ số biến thiên.*

Phương trình hồi quy như sau: $H = -135,742 + 5,25343Y – 4,93833Z + 38,0332X – 0,105556Y^2 + 0,236389YZ - 0,0386806YX - 4,38889X^2 + 1,26528XZ - 0,00236111Z^2 - 0,0517083YZX$ (1)

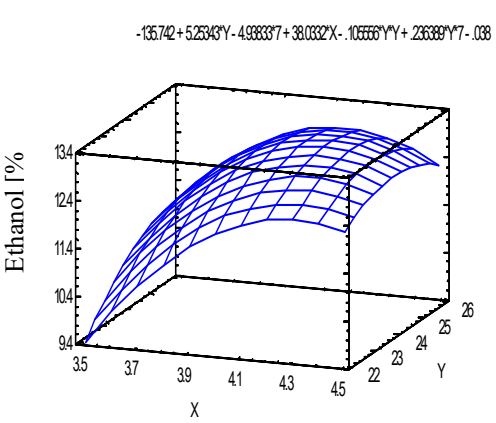
(Với H: độ rượu tính toán; X là độ pH; Y là độ $^0$Brix và Z là mật số nấm men)

Kết quả phân tích thống kê cho thấy mật số nấm men ($10^3$, $10^5$, $10^7$ tế bào/mL) khác biệt không ý nghĩa, vì vậy cố định Z. Chọn mật số nấm men chủng vào ban đầu là $10^7$ tế bào/mL vì mật số nấm men $10^7$ tế bào/mL cũng nằm trong tổ hợp nghiệm thức 18 cho độ rượu cao nhất (13,66% v/v).

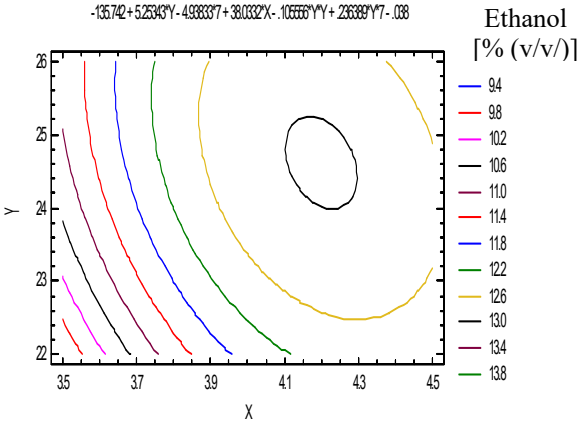
Từ đó có phương trình:

$H = -135.742 + 5.25343Y - 34.56831 + 38.0332X - 0.105556Y^2 + 1.654723Y - 0.0386806YX - 4.38889X^2 + 8.85696X - 0.115694 - 0.3619581YX$ (2)

Vẽ biểu đồ mặt đáp ứng (Hình 11) và biểu đồ đường đồng mức (Hình 12) từ phương trình hồi quy:




**Hình 8: Biểu đồ mặt đáp ứng thể hiện sự tương quan giữa độ Brix và pH ban đầu đến quá trình tạo ethanol**




**Hình 9: Biểu đồ đường đồng mức thể hiện sự tương quan giữa độ Brix và pH đến quá trình tạo ethanol**

Giải phương trình hồi quy (2) bằng cách lấy đạo hàm H' lần lượt theo X, Y ta được:

H'(X) = 46,89016 – 8,77778X – 0,4006387Y (3)

H'(Y) = 6,908153 – 0,211112Y – 0,4006387X (4)

Cho H'(X) = 0 và H'(Y) = 0, giải hệ phương trình thu được giá trị: X = 4,2 và Y = 24,7.

Thay các giá trị X, Y và Z vào phương trình hồi quy ta tìm được giá trị độ rượu H = 13,76.

Như vậy, với kết quả giải phương trình hồi quy cho thấy độ rượu tính toán được là 13,76%v/v với độ mật số nấm men cố định $10^7$ thì pH tối ưu là 4,2 và độ Brix tối ưu là 24,7. Các thông số tối ưu này cho sản phẩm có độ rượu là 13,76% v/v hơn không nhiều so với độ rượu thực nghiệm ở nghiệm thức 18 (13,66%v/v). Điều này đã nói lên rằng bố trí thí nghiệm đã gần tối ưu với nghiệm thức 18 (pH = 4, $^o$Brix = 26 và MSNM = $10^7$ tế bào/mL) và lượng rượu đạt được xem như tối ưu 13,66% v/v.

### 3.4 Định danh bằng phương pháp giải trình tự gen

Dòng nấm men CB1.1 được định danh bằng phương pháp giải trình tự và phân tích trình tự gen 28S rRNA. Kết quả giải trình tự trên đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men CB1.1 như sau:

CSCSGGGATTTTATATTTTTGAATGGWT
TTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTT
ACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGT
CCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTC
TTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTAT
TCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTG
TTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACA
ACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAA
CTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGG
CCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTAT
TTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAGA
ATTTTCGTAACTGGAAATTTTAAAATATTA
AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTG
AGCGTCATTTCCTTCTCAAACATTCTGTTTG
GTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTT
GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTT
TTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTG
AGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGT
TTTACCAMCTGCGGCTAATCTTTTTTATACT
GASCGTATTTGGAACGYTATCGATAAGAAG
AGAGCGTCTAGGGCKAACAATGTTCTTAAA
GWTTGACCTCAAATCAGGWAGGAAKTACC
CCGCTGAACTTYAASCATATCAWTTAAASC
GGGAGGGARGGWT

Trình tự đoạn gen được giải gồm 823 base nitrogen và đoạn gen này được so sánh với các gen 28S rRNA của nấm men trong ngân hàng gen trên NCBI với phần mềm BLASTN. Kết quả nhận được cho thấy đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men CB1.1 có độ tương đồng đến 99% so với trình tự gen 28S rRNA của *Saccharomyces cerevisiae* (KF728798.1) (Hình 10).

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Saccharomyces cerevisiae isolate B-NC-12-OZ18 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete se | 1414 | 1414 | 92% | 0.0 | 99% | KF728798.1 |
| Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete se | 1409 | 1409 | 97% | 0.0 | 98% | KC544499.1 |
| Saccharomyces cerevisiae isolate B-NC-12-OM12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s | 1407 | 1407 | 92% | 0.0 | 99% | KF728774.1 |
| Saccharomyces cerevisiae isolate B-WHX-12-48 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete se | 1407 | 1407 | 92% | 0.0 | 99% | KC544501.1 |
| Saccharomyces cerevisiae strain CEN.PK113-7D chromosome XII, complete sequence | 1405 | 8226 | 91% | 0.0 | 99% | CP022977.1 |

**Hình 10: So sánh trình tự gen 28S rRNA của CB1.1 và của chủng *Saccharomyces cerevisiae* với số đăng ký KF728798.1**

gb KF728798.1 Saccharomyces cerevisiae isolate B-NC-12-OZ18 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Dài=814 ; Điểm = 1414 bits (725), Kỳ vọng = 0.0, Danh tính = 3/766 (0%).

Kết quả định danh đã xác định dòng CB1.1 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. Loài *Saccharomyces cerevisiae* có thể lên men ở nồng độ rượu cao, *S. cerevisae* được phân lập từ rượu vang thốt nốt có thể lên men rượu có nồng độ 15% v/v rượu (alcohol) trong môi trường (Kumar *et al.,* 2011).

## 4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 48 dòng nấm men từ quả dâu thu tại vườn ở thành phố Cần Thơ (huyện Phong Điền và quận Bình Thủy) và tỉnh Hậu Giang (huyện Châu Thành và huyện Châu Thành A). Dựa trên mô tả đặc điểm hình thái và sinh lý sinh hóa bước đầu đã xác định được chúng thuộc 3 giống nấm men *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* và *Pichia*. Dòng nấm men CB1.1 phân lập từ dịch dâu bòn bon (Phong Điền - Cần Thơ) lên men tự nhiên (được tuyển chọn từ 33 dòng nấm men phân lập thuộc giống *Saccharomyces*) là dòng nấm men có hoạt lực lên men cao nhất (độ rượu đạt được 13,66% v/v). Thực hiện định danh bằng phương pháp giải trình tự đã xác định dòng CB1.1 là loài *Saccharomyces cerevisiae.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Korabecna, M., 2007. The Variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application in medical mycology. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. 2: 783-787.

Kumar, R.S., Shankar, T., and Anandapandian, K.T.K., 2011. Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. International Research Journal of Microbiology. 2(10): 399-405.

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

Lương Đức Phẩm, 2009. Nấm men công nghiệp. Nhà xuất bản khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội, 331 trang.

Nguyễn Đình Thưởng và Nguyễn Thanh Hằng, 2007. Công nghệ sản xuất và kiểm tra rượu ethylic. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội, 281 trang.

Nguyễn Đức Lượng, 2003. Công nghệ vi sinh vật - Tập 3. Thực phẩm lên men truyền thống. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 178 trang.

Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền và Nguyễn Ánh Tuyết, 2006. Thí nghiệp công nghệ sinh học tập 2 – Thí nghiệm vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. 524 trang.

Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Thạch và Phạm Văn Ty, 1972. Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật tập 1. Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật Hà Nội. 428 trang.

Nguyễn Phú Hơn, 2017. Phân lập và tuyển chọn nấm men tự nhiên lên men rượu vang mít lá bàng tại tỉnh An Giang. Luận văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.