

# PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN NẤM MEN TỪ QUẢ LÊKIMA (*Pouteria lucuma*) CÓ KHẢ NĂNG LÊN MEN RƯỢU VANG

Nguyễn Phúc Huy, Trần Thị Thúy An, Vi Nhã Trân và Nguyễn Ngọc Trang Thùy

Trường Đại học Kỹ thuật – Công nghệ Cần Thơ

Email:nphuy@ctuet.edu.vn

## Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12.01.2024  
Ngày nhận bài sửa: 05.4.2024  
Ngày duyệt đăng: 08.4.2024

## Từ khóa:

Chịu cồn, lêkima, nấm men,  
*Saccharomyces cerevisiae*.

## TÓM TẮT

Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn nấm men và ứng dụng trong lên men rượu vang lêkima được thực hiện với các nội dung: Phân lập và khảo sát các đặc điểm sinh lý, sinh hóa các dòng nấm men phân lập được; khảo sát khả năng chịu cồn; khảo sát khả năng lên men rượu để tuyển chọn dòng nấm men triển vọng có khả năng lên men tốt; định danh tên loài dòng nấm men triển vọng bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 17 dòng nấm men từ 4 mẫu lêkima thu tại Sóc Trăng. Kết quả khảo sát khả năng chịu cồn có 9/17 chủng có khả năng chịu cồn cao nhất ở nồng độ 12% vẫn sinh trưởng và phát triển tốt. Kết quả khảo sát khả năng lên men rượu, chủng ST9 cho hàm lượng cồn cao nhất đạt 12,67% (v/v) sau 7 ngày lên men. Kết quả định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử đã xác định chủng ST9 là *Saccharomyces cerevisiae* (CP024006.1) với độ tương đồng 100%.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lêkima có tên khoa học là *Pouteria lucuma*, thuộc họ Sapotaceae. Lêkima được ghi nhận và báo cáo lần đầu tiên bởi người châu Âu ở Ecuador vào năm 1531. Lêkima có nguồn gốc và được trồng phổ biến ở Chile, Peru, Ecuador...(Morton, 1987; Yahia và Gutierrez-Orozco, 2011). Ngoài ra, lêkima cũng được trồng phổ biến ở Việt Nam và thường được gọi là quả trứng gà vì khi chín thịt quả giống như lòng đỏ trứng gà luộc (Lợi, 2004). Thành phần bên trong quả lêkima chủ yếu là nước và carbohydrate. Bên cạnh đó, lêkima chứa hàm lượng protein cao, được xem là “vàng của người Inca”. Quả lêkima rất giàu khoáng chất,  $\beta$ -carotene, vitamin B và

các chất có lợi cho sức khỏe như phosphor, sắt, calci, vitamin... (Yahia và Gutierrez-Orozco, 2011). Theo nghiên cứu của Silva và cộng sự (2012), quả lêkima có chứa các hợp chất phenol, flavonoid với hàm lượng cao nên được xem như các chất chống oxy hóa tự nhiên cũng như hỗ trợ phòng ngừa các bệnh gây ra do căng thẳng, hạ đường huyết. Trong quả lêkima còn chứa gallic acid có công dụng kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, ngăn ngừa tế bào ung thư.

Nấm men là tác nhân chính trong lên men rượu vang, trong tự nhiên nấm men phân bố rất đa dạng, đặc biệt là trên bề mặt vỏ quả chín. Tùy vào đặc điểm của từng loại nguyên liệu khác nhau mà sẽ có các chủng nấm men

thích hợp để tạo ra được sản phẩm rượu vang với hàm lượng ethanol cao và có mùi vị đặc trưng. Do đó, đã có nhiều nghiên cứu phân lập, tuyển chọn và ứng dụng chủng nấm men thích hợp cho lên men với từng loại nguyên liệu trái cây cụ thể để tạo nên sản phẩm rượu vang đặc trưng như rượu vang khóm (Thành và cộng sự, 2013), rượu vang trái giắc (Tiên và cộng sự, 2018). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào liên quan đến việc phân lập, tuyển chọn nấm men từ quả lêkima và ứng dụng vào lên men rượu vang. Qua nghiên cứu này, góp phần tận dụng nguồn nấm men tự nhiên trên bề mặt quả và ứng dụng vào quy trình lên men tạo ra sản phẩm rượu vang lêkima thơm ngon, chất lượng. Chính vì vậy, nghiên cứu “Phân lập và tuyển chọn nấm men từ quả lêkima (*Pouteria lucuma*) có khả năng lên men rượu vang” được thực hiện, góp phần tuyển chọn nấm men tự nhiên từ quả lêkima có hoạt lực lên men cao ứng dụng trong sản xuất rượu vang góp phần đa dạng hóa sản phẩm từ quả lêkima và nâng cao hiệu quả kinh tế.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương tiện nghiên cứu

Quả lêkima được sử dụng trong nghiên cứu phải đảm bảo độ tươi, trái chín, được thu hái trực tiếp tại vườn. Sử dụng nguồn nguyên liệu tại 4 địa điểm khác nhau tại huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng (xã Xuân Hòa, xã An Lạc Thôn, xã Phong Nẫm và xã An Lạc Tây) nhằm phân lập được đa dạng các chủng nấm men.

### 2.2. Phân lập nấm men

Cân 3-5 g vỏ quả cắt nhỏ cho vào bình tam giác 250 mL có chứa sẵn 100 mL môi trường YPD (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g D-glucose) lỏng đã được thanh trùng và để nguội, đậy kín bằng nút gòn. Tiến hành ủ lắc 120 vòng/phút ở 30°C trong 24 - 48 giờ. Các

dòng nấm men tự nhiên có sẵn trên vỏ lêkima sẽ tăng sinh khối. Dịch tăng sinh được pha loãng và cấy trải trên môi trường YPD bổ sung agar 2%, sau đó được tách rỗng và làm thuần, kiểm tra độ thuần, cấy vào ống thạch nghiêng và bảo quản ở 4°C (Thảo và cộng sự, 2019).

#### 2.2.1. Khảo sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào nấm men

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (hình dạng, màu sắc, kích thước) và tế bào (hình dạng tế bào, hình thức nảy chồi) nấm men đã phân lập được quan sát bằng tiêu bản giọt ép dưới kính hiển vi quang học vật kính X100.

#### 2.2.2. Thử nghiệm khả năng sử dụng đường của các dòng nấm men phân lập

Các dòng nấm men đã phân lập được tăng sinh trong bình tam giác có chứa 100 mL môi trường YPD ở nhiệt độ phòng với vận tốc máy lắc 120 vòng/phút trong 48 giờ, đến khi mật số tế bào nấm men đạt  $10^7$  tế bào/mL. Hút 1 mL dịch nấm men đã tăng sinh cho vào các ống nghiệm chứa 9 mL dung dịch glucose 2% hoặc sucrose 2% cùng với chuông Durham đã được khử trùng ở 115°C/1 atm trong 15 phút. Các ống nghiệm được cho lên men ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 48 giờ. Đo chiều cao cột khí  $\text{CO}_2$  sinh ra trong chuông Durham sau 6 giờ kể từ khi bắt đầu thí nghiệm và mỗi lần đo cách nhau 6 giờ.

#### 2.3. Khảo sát khả năng chịu cồn của các dòng nấm men đã phân lập

Cấy ria các chủng nấm men phân lập được trên đĩa petri có chứa môi trường YPD agar có bổ sung ethanol 96°: 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15% và 18% (v/v). Ủ các đĩa petri ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ (Phong và cộng sự, 2016). Tuyển chọn các chủng nấm men phát triển mạnh trên môi trường có nồng độ ethanol cao.

## 2.4 Tuyển chọn các chủng nấm men có hoạt lực lên men tốt

Thực hiện lên men dịch quả trong chai thủy tinh: Cho 99 mL dịch quả lêkima (tỷ lệ pha loãng 1:1, điều chỉnh về 24°Brix, pH 4,5) vào chai thủy tinh. Tiến hành chủng 1 mL (mật số  $10^7$  tế bào/mL) dịch tăng sinh của các dòng nấm men vào mỗi chai thủy tinh. Thực hiện lên men ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Sản phẩm sau lên men được phân tích độ pH, độ brix và độ rượu (% v/v).

## 2.5. Định danh dòng nấm men có hoạt lực lên men cao

Định danh nấm men được tuyển chọn bằng phương pháp giải trình tự gen: chủng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất được chọn để giải trình tự đoạn gen 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). Mức độ tương đồng của trình tự được giải được so sánh với trình tự của dòng nấm men trên cơ sở dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) sử dụng chương trình Nucleotide Blast.

## 2.6. Các chỉ tiêu phân tích và xử lý thống kê

Độ pH được xác định bằng pH kế (Đức), độ brix được xác định bằng khúc xạ kế (Nhật Bản), hàm lượng ethanol sinh ra được xác định

bằng hệ thống chưng cất và hiệu chỉnh về 20°C (Tiên và cộng sự, 2018). Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và phần mềm thống kê Minitab 17.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

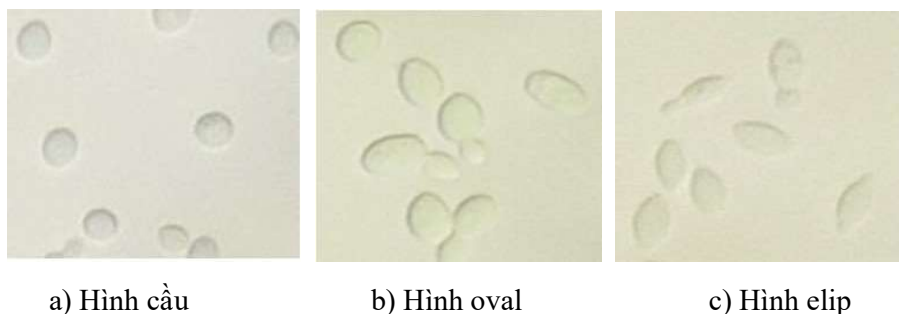
### 3.1. Kết quả phân lập và đặc điểm các chủng nấm men từ quả lêkima

#### 3.1.1. Kết quả phân lập

Mười bảy dòng nấm men khác nhau được phân lập từ 4 mẫu lêkima thu tại vườn ở các địa điểm khác nhau của huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng. Mười bảy dòng nấm men đã phân lập được đặt tên lần lượt là ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8, ST9, ST10, ST11, ST12, ST13, ST14, ST15, ST16 và ST17.

#### 3.1.2. Xác định đặc điểm của các chủng nấm men

Kết quả từ bảng 1 và hình 1 cho thấy, có sự đa dạng về hình dạng tế bào bao gồm hình oval 8/17 chủng (ST3, ST5, ST8, ST9, ST11, ST13, ST14 và ST16), hình cầu 6/17 chủng (ST1, ST2, ST4, ST7, ST12 và ST17) và elip 3/17 chủng (ST6, ST10 và ST15). Đặc điểm hình dạng tế bào các chủng nấm men phân lập được khá phù hợp với những mô tả trước đây của Dung và cộng sự (2011) về đặc điểm tế bào nấm men phân lập từ dưa hấu và từ quả khóm của Thành và cộng sự (2013).



Hình 1. Hình dạng tế bào nấm men

**Bảng 1. Đặc điểm hình thái của 17 chủng nấm men phân lập được**

| Chủng<br>nấm<br>men | Đặc điểm tế bào |                       | Đặc điểm khuẩn lạc                                              |           | Kích<br>thước<br>(mm) | Khả năng<br>sử dụng đường |         |
|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------|---------------------------|---------|
|                     | Hình<br>dạng    | Hình thức<br>nảy chồi | Hình dạng                                                       | Màu sắc   |                       | Glucose                   | Sucrose |
| ST1                 | Cầu             | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt sần và khô                  | Trắng sữa | 2,0                   | +                         | +       |
| ST2                 | Cầu             | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 1,5                   | +                         | +       |
| ST3                 | Oval            | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 2,0                   | +                         | +       |
| ST4                 | Cầu             | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 2,0                   | +                         | +       |
| ST5                 | Oval            | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 2,0                   | +                         | +       |
| ST6                 | Elip            | Lưỡng cực             | Tròn, bìa nguyên, mô<br>thấp, bờ hơi lồi, bề mặt<br>nhẵn và ướt | Trắng ngà | 2,0                   | +                         | -       |
| ST7                 | Cầu             | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 2,0                   | +                         | +       |
| ST8                 | Oval            | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 2,0                   | +                         | +       |
| ST9                 | Oval            | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 1,5                   | +                         | +       |
| ST10                | Elip            | Lưỡng cực             | Tròn, bìa nguyên, mô<br>thấp, bờ hơi lồi, bề mặt<br>nhẵn và ướt | Trắng ngà | 2,5                   | +                         | -       |
| ST11                | Oval            | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 1,5                   | +                         | +       |
| ST12                | Cầu             | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 1,5                   | +                         | +       |
| ST13                | Oval            | Đa hướng              | Tròn, bìa nguyên, mô<br>cao, bề mặt nhẵn và ướt                 | Trắng sữa | 2,0                   | +                         | +       |

|      |      |           |                                                           |           |     |   |   |
|------|------|-----------|-----------------------------------------------------------|-----------|-----|---|---|
| ST14 | Oval | Đa hướng  | Tròn, bìa nguyên, mô cao, bề mặt nhẵn và ướt              | Trắng sữa | 2,0 | + | + |
| ST15 | Elip | Lưỡng cực | Tròn, bìa nguyên, mô thấp, bờ hơi lồi, bề mặt nhẵn và ướt | Trắng ngà | 1,5 | + | - |
| ST16 | Oval | Đa hướng  | Tròn, bìa nguyên, mô cao, bề mặt nhẵn và ướt              | Trắng sữa | 2,0 | + | + |
| ST17 | Cầu  | Đa hướng  | Tròn, bìa nguyên, mô cao, bề mặt nhẵn và ướt              | Trắng sữa | 2,0 | + | + |

*Ghi chú: “+” là có khả năng sử dụng, “-” là không có khả năng sử dụng.*

Đặc điểm khuẩn lạc được trình bày trong bảng 1 cho thấy tất cả các dòng nấm men phân lập được đều có khuẩn lạc dạng tròn, bìa nguyên, độ nổi mô, kích thước dao động từ 1,5 đến 2,5 mm. Kết quả quan sát về màu sắc của khuẩn lạc có màu trắng sữa là 14/17 chủng (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST8, ST9, ST11, ST12, ST13, ST14, ST16 và ST17) và màu trắng ngà 3/17 chủng (ST6, ST10 và ST15).

Kết quả quan sát hình thức nảy chồi (Bảng 1) của tế bào nấm men cho thấy 14/17 (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST8, ST9, ST11, ST12, ST13, ST14, ST16 và ST17) chủng phân lập đều có hình thức nảy chồi đa hướng và 3/17 chủng (ST6, ST10 và ST15) có hình thức nảy chồi lưỡng cực. Kết quả này cũng phù hợp với mô tả của Toàn (2017) về đặc tính nảy chồi của nấm men.

Khả năng lên men các loại đường là một trong những chỉ tiêu quan trọng được sử dụng để phân loại nấm men. từ bảng 1, 17/17 chủng nấm men phân lập được đều lên men đường glucose, sinh ra khí  $\text{CO}_2$  và tích lũy khí trong chuông durham. có 14/17 chủng (st1, st2, st3, st4, st5, st7, st8, st9, st11, st12, st13, st14, st16 và st17) nấm men phân lập được lên men đường sucrose và sinh ra khí  $\text{CO}_2$  và tích lũy khí trong chuông

durham. bên cạnh đó có 3/17 chủng (st6, st10 và st15) không có khả năng lên men đường sucrose. đường sucrose là loại đường thông dụng, dễ tìm và ít tốn chi phí thường được sử dụng bổ sung vào dịch quả để điều chỉnh độ brix trước khi lên men. chính vì vậy, việc khảo sát khả năng sử dụng các loại đường của các chủng nấm men phân lập được có ý nghĩa rất quan trọng trong nghiên cứu và ứng dụng thực tiễn.

### **3.2. Khả năng chịu cồn của các chủng nấm men phân lập được**

Mặc dù cồn là sản phẩm chính của quá trình lên men nhưng ở một nồng độ nào đó nó sẽ ức chế sự phát triển và khả năng lên men của nấm men (Phong và cộng sự, 2016). Vì vậy, việc xác định khả năng chịu cồn là một yếu tố rất cần thiết.

Từ bảng 2 ta thấy, sau 48 giờ cấy nấm men trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung cồn, tất cả 17/17 chủng nấm men đều phát triển tốt trong môi trường có bổ sung 0%, 3%, 6% cồn. Ở nghiệm thức nồng độ 9% (v/v) cồn chỉ còn 12/17 chủng (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST8, ST9, ST11, ST12, ST13 và ST14) có khả năng sống sót và phát triển mạnh tạo khuẩn lạc, 3/17 chủng (ST6, ST10 và ST16) phát triển nhưng bắt đầu yếu dần, 2/17 chủng (ST15 và

ST17) không phát triển nữa. Ở nghiệm thức nồng độ 12% (v/v) còn chỉ còn 9/17 chủng (ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST9, ST12, ST13 và ST14) phát triển mạnh, có khả năng sống sót và phát triển mạnh tạo khuẩn lạc, 4/17 chủng (ST1, ST8, ST11 và ST16) phát triển kém, 4/17 chủng (ST6, ST10, ST15 và ST17) ngừng phát triển. Ở môi trường có bổ sung 15% (v/v) và 18% (v/v) còn tất cả 17/17 chủng đều không phát triển.

Qua đó, cho ta thấy nồng độ cồn cao nhất mà các chủng nấm men có thể phát triển mạnh và tạo khuẩn lạc, ít bị ảnh hưởng khả năng sinh trưởng và phát triển là ở nồng độ

12% (v/v) ethanol. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nhận định của Amore và cộng sự (1990) còn ức chế quá trình phát triển của nấm men, nồng độ càng cao sẽ gây hiện tượng ngộ độc cho nấm men. Bên cạnh đó cũng tương đồng với nghiên cứu của Phong và cộng sự (2016) cũng như nghiên cứu của Tiên và cộng sự (2018) cho thấy nấm men có khả năng chịu cồn đến 12% (v/v). Chín chủng (ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST9, ST12, ST13 và ST14) có khả năng chịu cồn 12% (v/v), được chọn sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 2. Khả năng chịu cồn của các chủng nấm men phân lập được**

| STT | Chủng nấm men | Nồng độ cồn (% v/v) |     |     |     |     |    |    |
|-----|---------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|----|----|
|     |               | 0                   | 3   | 6   | 9   | 12  | 15 | 18 |
| 1   | ST1           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +   | -  | -  |
| 2   | ST2           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 3   | ST3           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 4   | ST4           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 5   | ST5           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 6   | ST6           | +++                 | +++ | +++ | ++  | -   | -  | -  |
| 7   | ST7           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 8   | ST8           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +   | -  | -  |
| 9   | ST9           | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 10  | ST10          | +++                 | +++ | +++ | ++  | -   | -  | -  |
| 11  | ST11          | +++                 | +++ | +++ | +++ | +   | -  | -  |
| 12  | ST12          | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 13  | ST13          | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 14  | ST14          | +++                 | +++ | +++ | +++ | +++ | -  | -  |
| 15  | ST15          | +++                 | +++ | +++ | -   | -   | -  | -  |
| 16  | ST16          | +++                 | +++ | +++ | ++  | +   | -  | -  |
| 17  | ST 17         | +++                 | +++ | +++ | -   | -   | -  | -  |

Ghi chú: (+++): phát triển mạnh; (++) : phát triển; (+) phát triển kém; (-): không phát triển.



### 3.3. Kết quả tuyển chọn các chủng nấm men có hoạt lực lên men tốt từ những chủng nấm men đã phân lập

Khả năng lên men dịch quả sau 7 ngày lên men của 9 chủng nấm men (ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST9, ST12, ST13 và ST14) tuyển chọn được thể hiện ở Bảng 3.

**Bảng 3. Kết quả lên men của các chủng nấm men tuyển chọn**

| STT | Chủng nấm men | pH sau lên men      | Hàm lượng chất khô sau lên men (°Brix) | Độ rượu (% v/v, ở 20°C) |
|-----|---------------|---------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| 1   | ST2           | 3,68 <sup>bc</sup>  | 12,00 <sup>ab</sup>                    | 8,33 <sup>c</sup>       |
| 2   | ST3           | 3,74 <sup>a</sup>   | 10,83 <sup>ab</sup>                    | 10,50 <sup>b</sup>      |
| 3   | ST4           | 3,69 <sup>bc</sup>  | 10,67 <sup>b</sup>                     | 10,67 <sup>b</sup>      |
| 4   | ST5           | 3,67 <sup>c</sup>   | 12,50 <sup>a</sup>                     | 9,67 <sup>bc</sup>      |
| 5   | ST7           | 3,72 <sup>ab</sup>  | 10,67 <sup>b</sup>                     | 10,33 <sup>b</sup>      |
| 6   | ST9           | 3,75 <sup>a</sup>   | 10,50 <sup>b</sup>                     | 12,67 <sup>a</sup>      |
| 7   | ST12          | 3,71 <sup>abc</sup> | 10,67 <sup>b</sup>                     | 10,33 <sup>b</sup>      |
| 8   | ST13          | 3,63 <sup>d</sup>   | 11,50 <sup>ab</sup>                    | 9,33 <sup>bc</sup>      |
| 9   | ST14          | 3,62 <sup>d</sup>   | 12,00 <sup>ab</sup>                    | 9,33 <sup>bc</sup>      |

*Chú thích: Các số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% theo phép thử LSD.*

Hàm lượng chất khô hòa tan sau lên men dao động trong khoảng 10,50 - 12,50°Brix (bảng 3), giảm so với ban đầu (25°Brix) do trong quá trình lên men, nấm men sử dụng đường làm nguồn carbon chủ yếu để lên men tạo ra sản phẩm rượu. pH dịch lên men dao động trong khoảng 3,62 - 3,75. Qua đó, giá trị pH của dịch quả sau lên men bởi các chủng nấm men khác nhau không có sự chênh lệch nhiều. Độ rượu là một trong những thông số quan trọng xác định đặc tính lên men rượu của nấm men. Sau 7 ngày lên men, độ rượu tạo thành ở 9 nghiệm thức tương ứng với 9 chủng (ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST9, ST12, ST13 và ST14) nấm men cho thấy hàm lượng ethanol dao động trong khoảng từ 8,33 -

12,67% (v/v). Kết quả từ bảng 2 và 3 cho thấy, tuy các chủng ST3, ST4, ST7 và ST12 có khả năng chịu cồn đến 12% nhưng hàm lượng ethanol sinh ra dao động trong khoảng 10,33 - 10,67% (v/v) khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nhau ở mức 5%. Nguyên nhân có thể do khác biệt về thành phần dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy. Chủng nấm men ST9 cho hàm lượng ethanol cao nhất đạt 12,67% (v/v) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các chủng còn lại. Kết quả các chủng nấm men tuyển chọn cho hàm lượng ethanol đạt yêu cầu ứng dụng trong sản xuất rượu vang tương đương với các nghiên cứu lên men rượu vang cam 13,00% (v/v) của tác giả Trường và Thành (2011), lên men rượu vang thanh long ruột đỏ

của Thảo và cộng sự (2019) cũng cho hàm lượng ethanol 12,15% (v/v), rượu vang sơ ri 12,06% (v/v) của Thảo và Vi (2021) sau 7 ngày lên men.

### 3.4. Kết quả giải trình tự

Dòng nấm men ST9 có khả năng lên men cho độ rượu cao nên được chọn để định danh bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Trình tự đoạn gene 28S của dòng ST9 được so

sánh với các trình tự gene 28S rRNA của nấm men trong ngân hàng gene trên NCBI với phần mềm BLASTN. Kết quả cho thấy, đoạn gen 28S rRNA của dòng nấm men ST9 có độ tương đồng đến 100% so với trình tự gen 28S rRNA của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (CP024006.1) (Hình 2). Bên cạnh đó, đặc điểm về khuẩn lạc, tế bào của chủng ST9 cũng cho thấy sự tương đồng với dòng *Saccharomyces cerevisiae*

| Description                                                                                                                    | Scientific Name          | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per Ident | Acc. Len | Accession  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-----------|----------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain KSD-Yc chromosome 12                                       | <i>Saccharomyces ...</i> | 1230      | 8530        | 100%        | 0.0     | 99.13%    | 1068606  | CP024006.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae strain LL2013_040 MATalpha ho: kanMX4 ade2- hohNT1 chromosome XII | <i>Saccharomyces ...</i> | 1230      | 20929       | 100%        | 0.0     | 99.13%    | 1141845  | CP125425.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM451 chromosome XII sequence                                    | <i>Saccharomyces ...</i> | 1230      | 92324       | 100%        | 0.0     | 99.13%    | 1673802  | CP006446.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM11592 chromosome XII sequence                                  | <i>Saccharomyces ...</i> | 1230      | 1.059e+05   | 100%        | 0.0     | 99.13%    | 1770650  | CP008433.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1419 chromosome XII sequence                                   | <i>Saccharomyces ...</i> | 1230      | 2.548e+05   | 100%        | 0.0     | 99.13%    | 2886794  | CP006415.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1389 chromosome XII sequence                                   | <i>Saccharomyces ...</i> | 1230      | 89862       | 100%        | 0.0     | 99.13%    | 1655040  | CP006407.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Saccharomyces cerevisiae YJM1388 chromosome XII sequence                                   | <i>Saccharomyces ...</i> | 1230      | 1.268e+05   | 100%        | 0.0     | 99.13%    | 1929697  | CP006406.1 |

Hình 2. So sánh trình tự gen chủng ST9 và chủng *Saccharomyces cerevisiae* với số đăng kí là CP024006.1

## 4. KẾT LUẬN

Từ 4 mẫu lêkima thu hái tại 4 địa điểm khác nhau thuộc huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng đã phân lập được 17 dòng nấm men. Trong đó, dòng ST9 là dòng nấm men có khả năng lên men dịch quả lêkima mạnh và cho độ cồn cao đạt 12,67% (v/v) với các thông số kỹ thuật: nồng độ chất khô hòa tan 25°Brix, pH 4,5, mật số nấm men  $10^7$  tế bào/mL, lên men 7 ngày ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  trong điều kiện kỵ khí. Dòng ST9 được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử và xác định thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae* với độ tương đồng 100% khi so sánh trên ngân hàng gene NCBI. Qua kết quả nghiên cứu đã cho thấy có sự đa dạng về nấm men tự nhiên trên nguyên liệu quả lêkima được trồng ở huyện Kế Sách, tỉnh Sóc Trăng. Đồng thời đã tuyển chọn được dòng nấm men ST9

(*Saccharomyces cerevisiae*) có tiềm năng ứng dụng trong lên men rượu vang lêkima.

### Tài liệu tham khảo

Amore, T.D, Panchal, C.J, Russell, I, Stewart, G.G, (1990), “A study of ethanol tolerance in yeast”, Crit Rev Biotechnol, 9(4), 287-304.

Dung, N.T.P, Hương, L.H.L, Phong, H.X, (2011), “Phân lập, tuyển chọn nấm men và xác định điều kiện ảnh hưởng quy trình lên men rượu vang dưa hấu”, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 18(B), 137-145.

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, 783-787.



Lợi, Đ.T, (2004), “Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam”, Nhà xuất bản Y Học, Hà Nội.

Morton J.F, (1987), “Fruits of warm climates *Pouteria lucuma* O.Ktze”, Miami.

Phong, H.X, Giang, N.T.C, Nitiyon, S, Yamada, M, Thanonkeo, P, Dung, N.T.P, (2016), “Ethanol production from molasses at high temperature by thermotolerant yeasts isolated from cocoa”, Can Tho University Journal of Science, 3, 32-37.

Silva B.A., Gordon A, Jungfer, E, Marx F, Maia, J.G.S, (2012), “Antioxidant capacity and phenolics of *Pouteria macrophylla* an under-utilized fruit from Brazilian Amazon”, European Food Research and Technology, 234, 761-768.

Thành, N.V và cộng sự, (2013), “Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang khóm”, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học (25), 27-35.

Thảo, L.T.T và Vi, N.T.T, (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.

Thảo, P.T.T, Thư, N.N.A, Duy, L.T,

Thanh, N.N, Long, B.H.Đ, Phong, H.X, (2019), “Phân lập và tuyển chọn nấm men có khả năng lên men rượu vang thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*)”, Tạp chí khoa học và Công nghệ Việt Nam, 61(8), 54-59.

Tiên, Đ.T.K, Yên, V.T.H, Phong, H.X, Long, B.H.Đ, Toàn, H.T, Dung, N.T.P, (2018), “Tuyển chọn nấm men chịu nhiệt và ứng dụng lên men rượu vang trái giắc (*Cayratia trifolia* L.) từ tỉnh Hậu Giang”, Tạp chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ, 54 (4B), 64-71.

Toàn, H.T, (2017), “Giáo trình nấm men”, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.

Trương, N.P và Thành N.V, (2011), “Phân lập, tuyển chọn và định danh nấm men trong lên men rượu vang cam sành (*Citrus nobilis* Var. *Typica* Hassk.)”, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 58(1B), 121-131.

Yahia E.M and Gutierrez-Orozco, F, (2011), “*Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Lucuma (Pouteria lucuma (Ruiz and Pav.) Kuntze)*”, Woodhead Publishing, England, Volume 3, Cocona to mango, 442-449.

## ISOLATION AND SELECTION OF YEASTS FROM LEKIMA FRUIT (POUTERIA LUCUMA) CAPABLE OF FERMENTING WINE

### ABSTRACT

*Research on the isolation and selection of yeasts as well as its application in lekima wine fermentation was carried out with the following contents: isolation and identification of physiological and biochemical characteristics of selected yeasts strains; alcohol tolerance; investigation wine fermentation ability to select promising yeast strains with good fermentation ability; identification of promising yeast strains by molecular biology techniques. Results have shown that, among 17 collected yeasts strains from 4 Lekima samples in Soc Trang, 9/17 strains still survived and grew well at a alcohol concentration of 12% exhibiting the highest alcohol tolerance. Regarding alcohol fermentation ability, strain ST9 had the highest alcohol content of 12.67% (v/v) after 7 days of fermentation. Sequencing results using molecular biology techniques identified strain ST9 as *Saccharomyces cerevisiae* (CP024006.1) with 100% similarity.*

**Keywords:** Resistant to alcohol, lekima, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.