

TUYỂN CHỌN DÒNG NẤM MEN PHÂN LẬP TỪ DỊCH QUẢ THANH LONG RUỘT ĐỎ (*Hylocereus polyrhizus*) TRỒNG TẠI HUYỆN CHỢ GẠO, TỈNH TIỀN GIANG

Võ Thị Kiên Hảo*, Nguyễn Hương Giang, Nguyễn Văn Bá, Nguyễn Thị Thu Thảo,
Phan Hữu Tăng, Phan Chí Thảo và Phạm Thanh Sang
Trường Đại học Tây Đô
(*Email: vtkhao@tdu.edu.vn)

Ngày nhận: 20/11/2024

Ngày phản biện: 27/11/2024

Ngày duyệt đăng: 10/3/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu tuyển chọn dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu cồn cao, cho hoạt lực lên men cao từ dịch quả thanh long ruột đỏ. Trái thanh long được thu hoạch tại huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang. Kết quả nghiên cứu cho thấy 13 dòng nấm men được khảo sát đều phát triển tốt ở nhiệt độ nuôi cấy là 44°C và chịu được nồng độ ethanol 12%, ở nồng độ ethanol cao nhất là 16% vẫn còn 6 dòng nấm men phát triển tốt. Các dòng nấm men khảo sát đều lên men được dịch quả thanh long, trong đó có 6 dòng nấm men lên men nhanh với chiều cao cột khí CO₂ đạt tối đa sau 66 giờ lên men. Trong đó dòng D9 lên men nhanh nhất với chiều cao cột khí tối đa (45 mm) chỉ sau 54 giờ. Quá trình lên men rượu thanh long bởi dòng nấm men D9 kết thúc sau 10 ngày với các thông số hàm lượng chất khô hòa tan và hàm lượng đường sót thấp nhất lần lượt là 7,67 °Bx và 2,15 g/l, pH sản phẩm thấp nhất (4,08) và độ cồn đạt cao nhất (18,33%). Như vậy, dòng nấm men D9 có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol cao, hoạt lực lên men nhanh và mạnh, rất thích hợp để ứng dụng cho quá trình lên men rượu vang thanh long.

Từ khóa: Dòng nấm men, khả năng chịu cồn, khả năng chịu nhiệt, rượu vang, thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*)

Trích dẫn: Võ Thị Kiên Hảo, Nguyễn Hương Giang, Nguyễn Văn Bá, Nguyễn Thị Thu Thảo, Phan Hữu Tăng, Phan Chí Thảo và Phạm Thanh Sang, 2025. Tuyển chọn dòng nấm men phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) trồng tại huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang. Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 22: 121-135.

*ThS. Võ Thị Kiên Hảo – Giảng viên Khoa Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Tây Đô

1. GIỚI THIỆU

Công nghiệp lên men hiện đại xây dựng dựa trên việc sử dụng chủng nấm men tuyển chọn an toàn, khả năng lên men tốt, góp phần ổn định chất lượng của sản phẩm tạo ra (Czyhrinciwk, 1966; Fleet, 2003). Do đó, các chủng nấm men thuần đang được sử dụng phổ biến trong công nghiệp nước quả lên men trên thế giới (Maragatham, 2011; Tahía et al., 2011). Các chủng *Saccharomyces cerevisiae* có tính chất sinh hóa đặc trưng đã được tuyển chọn dùng để sản xuất rượu vang từ trái cây có sẵn tại địa phương với công nghệ thích ứng có thể thực hiện đơn giản, rẻ tiền (Maragatham, 2011).

Hoạt tính lên men của nấm men bị chi phối bởi nhiều yếu tố như nguồn carbon, nguồn nitơ, pH, đặc biệt là nhiệt độ và hàm lượng ethanol (Keating et al., 2006). Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sự lên men tạo ethanol của nấm men (Heard và Fleet, 1988). Hiện nay, hiệu ứng nhà kính đang làm cho trái đất ấm dần lên và nhiệt độ vẫn tiếp tục tăng dần trong tương lai (Isaac và Soden, 2000). Do đó, việc phân lập tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng chịu nhiệt cao ứng dụng trong lên men sinh ethanol là một xu hướng. Ngoài ra, sử dụng nấm men chịu nhiệt độ cao có thể giúp cho quá trình lên men diễn ra nhanh, giảm nguy cơ nhiễm vi sinh vật, giảm chi phí đầu tư cho thiết bị làm mát và tăng năng suất thu nhận ethanol (Auesukaree et al., 2012; Apiwatanapiwat et al., 2013; Siedlarz et al., 2016).

Khả năng chịu ethanol của *Saccharomyces cerevisiae* là một trong những đặc điểm chính quyết định việc ứng dụng chủng nấm men này trong công nghiệp lên men. *Saccharomyces cerevisiae* là chủng nấm men truyền thống được ứng dụng trong lên men rượu và được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp lên men ethanol (Radecka et al., 2015). Hầu hết các chủng *S. cerevisiae* chịu được giá trị pH thấp, hàm lượng đường và nồng độ ethanol cao nhưng hiệu suất lên men ở nhiệt độ trên 35°C khá thấp (Nevoigt, 2008).

Một số nghiên cứu trước đây cho thấy một số loài nấm men phân lập từ tự nhiên là nấm men chịu nhiệt sử dụng cho lên men công nghiệp như *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925 (Apiwatanapiwat et al., 2013), *P. kudriavzevii* KVMP10 (Koutina et al., 2016) và *S. cerevisiae* KKUeVN8, KKUeVN20 và KKUeVN27, *Pichia kudriavzevii* KKUeTH33 và KKUeTH43 (Techaparin et al., 2017). Các chủng nấm men này có khả năng chịu được nồng độ cồn cao cũng như các chất độc hại hình thành trong suốt tiến trình lên men. Pongcharoen et al. (2018) đã phân lập được 3 chủng nấm men là *P. kudriavzevii* NUNS-4, NUNS-5 và NUNS-6 có khả năng chịu nhiệt cao từ đất trồng mía tại Thái Lan. Các chủng nấm men này có khả năng lên men sinh ethanol cao ở nhiệt độ từ 40°C đến 45°C và có thể phát triển trên môi trường thạch dinh dưỡng bao gồm chiết xuất men, peptone và glucose chứa 13% (v/v) ethanol. Các chủng nấm men *P. kudriavzevii* NUNS-4, NUNS-5 và NUNS-6 có thể ứng dụng cho

sản xuất ethanol ở quy mô công nghiệp trên cơ chất là glucose.

Việc phân lập nấm men từ cùng một loại trái cây nhưng tại các khu vực địa lý khác nhau có thể dẫn đến sự khác biệt đáng kể về đặc tính sinh học cũng như khả năng lên men của các chủng nấm men. Trong nghiên cứu của Phạm Thị Thu Thảo và ctv. (2019), khi tiến hành phân lập nấm men từ trái thanh long ruột đỏ được thu thập tại Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long, Đồng Tháp và Bến Tre, chủng BT2.1 phân lập từ mẫu thu tại huyện Chợ Lách (Bến Tre) được ghi nhận có khả năng lên men vượt trội, với hàm lượng ethanol cao nhất và lượng đường sót thấp nhất. Tuy nhiên, khả năng chịu nhiệt và chịu cồn của các chủng nấm men vẫn chưa được đánh giá. Tương tự, nghiên cứu của Đoàn Thị Kiều Tiên và ctv. (2018) cho thấy sự khác biệt về khả năng chịu nhiệt và mức độ chịu đựng nồng độ ethanol giữa các chủng nấm men, phản ánh tác động của điều kiện sinh thái địa phương đến đặc tính sinh lý và sinh hóa của chúng. Đây là cơ sở cho việc phân lập và tuyển chọn các dòng nấm men chịu nhiệt và chịu cồn cao từ nguyên liệu thanh long ruột đỏ thu hoạch tại huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tuyển chọn dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu cồn cao có triển vọng lên men sinh ethanol cao từ dịch quả thanh long ruột đỏ.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thanh long ruột đỏ được thu thập tại Huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang. Nấm men phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ thu được 50 dòng nấm men thuần

chủng được ký hiệu từ D1 đến D50. Các dòng nấm men này được tăng sinh và đánh giá khả năng lên men đường glucose và saccharose. Kết quả đã sơ tuyển được 13 dòng nấm men từ D1, D2, D3, D4, D5, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D14 có khả năng lên men mạnh cả đường glucose và saccharose. Tất cả 13 dòng nấm men này được lưu trữ ở phòng thí nghiệm Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Tây Đô để tiếp tục đánh giá khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol, hoạt lực lên men của nấm men.

Thiết bị, dụng cụ: kính hiển vi (Olympus BH - 2, Nhật Bản), tủ cấy Telstar AV-100 (Việt Nam), nồi khử trùng nhiệt ướt (SA-300VF, Đài Loan), cân phân tích (ELB300, Nhật Bản), tủ ủ (Mettler, Đức), thiết bị chưng cất rượu (Trung Quốc), micropipet (EMC Lab, Đức), chiết quang kế (Atago, Nhật Bản).

Phụ gia: đường saccharose (Biên Hòa, Việt Nam), glucose (Trung Quốc), acid citric (Austria).

Hóa chất: KH_2PO_4 (Trung Quốc), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Trung Quốc), Cồn 70°, cồn 96°, cồn 99,5° (Việt Nam), Nước cất.

Môi trường phân tích vi sinh vật: Yeast Extract Powder (Ấn Độ), agar (Việt Nam), Pepton (Ấn Độ), YDP Broth (Ấn Độ), YPD agar (môi trường YPD bổ sung 1,5% agar).

2.1. Phương pháp phân tích

Khả năng chịu ethanol được đánh giá thông qua quan sát sự bắt màu của tế bào nấm men dưới kính hiển vi khi nhuộm tế bào nấm men với xanh methylene 0,1%

(ghi nhận các dòng nấm men có tỷ lệ tế bào sống trên 50% - là những tế bào không bắt màu khi nhuộm) (Trần Thanh Thủy, 1998); khả năng chịu nhiệt của nấm men được xác định bằng cách theo dõi sự phát triển của khuẩn lạc trên môi trường đĩa thạch ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau (Techaparin et al., 2017); hoạt lực lên men của nấm men được xác định bằng phương pháp đo chiều cao cột khí trong chuông Durham trong quá trình lên men (Warren and Shadomy, 1991) và xác định hàm lượng ethanol (% v/v) bằng phương pháp chưng cất và đo độ rượu (ethanol) bằng cồn kế ở 20°C (Nguyễn Đình Thường và Nguyễn Thanh Hằng, 2007); hàm lượng đường sót (đường khử) (%) được xác định dựa trên quá trình khử bởi đường, Cu^{2+} trong hỗn hợp Fehling bị khử thành Cu^+ (Cu_2O) không tan, có màu đỏ. Thể tích dung dịch đường khử cần để khử hoàn toàn một thể tích nhất định hỗn hợp Fehling được xác định bằng phương pháp nội chuẩn với chất chỉ thị xanh metylen (Lane and Eynon, 1924).

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1 Thí nghiệm 1: *Đánh giá khả năng chịu nhiệt của các dòng nấm men được phân lập từ quả thanh long ruột đỏ*

Nuôi sinh khối 13 dòng nấm men trong môi trường YDP Broth (2% pepton, 2% glucose, 1% yeast extract powder) trong 24 giờ ở nhiệt phòng. Cấy rìa liên tục 13 dòng nấm men đã phân lập được trên đĩa petri có chứa môi trường YDP agar (2% Pepton, 2% glucose, 1% Yeast Extract Powder, 1,5% agar). Ủ các đĩa petri trên ở các nhiệt độ: 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44,

46, 48 và 50°C trong 48 giờ. Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các dòng nấm men trên môi trường thạch đĩa (Phong và et al., 2016; Techaparin et al., 2017). Chỉ có các dòng nấm men chịu nhiệt mới có khả năng phát triển thành khuẩn lạc ở nhiệt độ cao.

2.2.2 Thí nghiệm 2: *Đánh giá khả năng chịu ethanol của các dòng nấm men được phân lập từ quả thanh long ruột đỏ*

Các dòng nấm men đã phân lập và tuyển chọn (13 dòng) được nuôi cấy trong môi trường Hansen lỏng (peptone 10 g/l, D-glucose 50 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l) có bổ sung ethanol tinh khiết (6, 8, 10, 12, 14 và 16% v/v). Các ống nghiệm trên được ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ và quan sát sự phát triển của các chủng nấm men (Thao et al., 2018). Dung dịch xanh methylene 0,1% được nhỏ lên lam kính, dùng que cấy lấy mẫu nấm men cho vào giọt xanh methylen 0,1%, quan sát tế bào nấm men dưới kính hiển vi. Các dòng nấm men có tỷ lệ tế bào sống lớn hơn 50% (tức là các tế bào không bắt màu xanh của thuốc nhuộm methylen) được ghi nhận. Tiếp theo, các dòng nấm men được lựa chọn sẽ được cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng. Các chủng nấm men có khả năng phát triển mạnh trong môi trường có nồng độ ethanol cao được tuyển chọn bằng cách quan sát khuẩn lạc phát triển trên đĩa thạch sau 24 giờ nuôi cấy (Trần Thanh Thủy, 1998).

2.2.3 Thí nghiệm 3: Đánh giá hoạt lực lên men của các dòng nấm men được phân lập từ quả thanh long ruột đỏ

Nguyên liệu thanh long ruột đỏ được tách bỏ phần vỏ, lấy phần thịt quả. Thịt quả thanh long được xay nhuyễn với nước (tỷ lệ thịt quả : nước là 1 : 1). Mẫu dịch thanh long ban đầu có hàm lượng chất khô hòa tan dao động 12 - 14 °Bx, pH dao động từ 5,1 - 5,3 được điều chỉnh đến 22 °Bx và pH = 4,5 (Phạm Thị Thu Thảo và ctv., 2019). Dịch quả được thanh trùng bằng NaHSO₃ với hàm lượng 120 mg/l trong vòng 2 giờ sau đó phân phối 8 ml vào trong ống nghiệm 20 ml có chuông Durham úp ngược và 150 ml vào bình tam giác dung tích 250 ml.

Các dòng nấm men được tuyển chọn có khả năng chịu nhiệt và chịu cồn cao từ thí nghiệm 1 và 2 được nuôi sinh khối các chủng nấm men trong môi trường YPD Broth, sau đó chủng nấm men vào trong ống nghiệm có chuông Durham úp ngược và bình tam giác dung tích 250 ml, sao cho mật độ nấm men đạt 10^7 tế bào/ml (xác định bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu).

Dịch quả thanh long ruột đỏ được lên men trong ống nghiệm và bình tam giác ở nhiệt độ phòng. Chiều cao cột khí CO₂ sinh ra trong chuông Durham úp ngược

trong ống nghiệm được ghi nhận tại các thời điểm 18, 32, 54, 60 và 66 giờ ủ và cho đến khi đầy chuông đồng thời phân tích các chỉ tiêu pH, độ cồn và hàm lượng đường sót của rượu thanh long ruột đỏ.

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả được xử lý theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định LSD để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức bằng chương trình SPSS20. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng chịu nhiệt của các dòng nấm men

Kết quả về khả năng sinh trưởng của 13 dòng nấm men phân lập được từ dịch quả thanh long ruột đỏ ở các mức độ nhiệt độ khác nhau được thể hiện ở Bảng 1. Tất cả 13 dòng nấm men được khảo sát đều có khả năng chịu được nhiệt độ nuôi cấy từ 32 - 44°C. Khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên cao ở mức 46°C vẫn còn 10/13 dòng phát triển tốt. Sự phát triển của nấm men trên môi trường đĩa thạch suy giảm khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên đến 48°C, có đến 9/13 dòng nấm men vẫn phát triển được. Nhiệt độ nuôi cấy 50°C, tất cả các dòng nấm men đều ngừng phát triển.

Bảng 1. Kết quả khả năng chịu nhiệt của các dòng nấm men phân lập từ dịch quả Thanh long ruột đỏ

Dòng nấm men	Nhiệt độ nuôi cấy (°C)									
	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
D1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: Dấu “+”: có hình thành khuẩn lạc, dấu “-”: không hình thành khuẩn lạc

Như vậy, các dòng nấm men phân lập từ thanh long ruột đỏ có khả năng chịu nhiệt cao khi so sánh với các dòng nấm men được phân lập từ khóm (Huỳnh Xuân Phong và ctv., 2017) hay từ trái giắc (Đoàn Thị Kiều Tiên và ctv., 2018). Huỳnh Xuân Phong và ctv. (2017) đã tuyển chọn được 7/23 dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt cao từ quả khóm. Trong đó, dòng nấm men *S. cerevisiae* Y8 được tuyển chọn do có khả năng lên men tốt nhất, với lượng ethanol sinh ra cao nhất ở 37°C và 40°C. Ngoài ra, Đoàn Thị Kiều Tiên và ctv. (2018) đã nghiên

cứu phân lập và tuyển chọn nấm men chịu nhiệt ứng dụng trong lên men rượu vang trái giắc (*Cayratia trifolia* L.). Theo đó, có 19/55 dòng nấm men được phân lập có khả năng phát triển ở 37 - 45°C. Jayamma et al. (2022) đã đánh giá khả năng chịu nhiệt của 100 dòng nấm men được phân lập từ các phế phẩm trái cây như sapoche, đu đủ, xoài, dứa, chuối, nho và cam khi tiến hành nuôi cấy nấm men trong môi trường YPD Broth ở các mức nhiệt độ là 35, 40 và 45°C. Kết quả có 20 dòng có khả năng phát triển ở 45°C.

Nhìn chung, các dòng nấm men được khảo sát đều có đặc tính chịu nhiệt cao. Kết quả này cho thấy khả năng ứng dụng cao của các dòng nấm men được phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ trong lên men rượu hoặc sản xuất ethanol ở điều kiện nhiệt độ cao.

3.2 Khả năng chịu ethanol của các dòng nấm men

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của nấm men như nguồn carbon, nguồn nitơ, pH, đặc biệt là nhiệt độ và hàm lượng ethanol (Keating et al., 2006). Trong đó, đặc tính chịu ethanol của nấm men rất quan trọng trong việc tổng hợp ethanol thông qua quá trình lên men được thực hiện bởi nấm men. Nồng độ ethanol tại đó sự sinh trưởng của nấm men bị ức chế được đánh giá là nồng độ vượt quá khả năng chịu đựng ethanol của nấm men (Casey and Ingledew, 1986; Tahía et al., 2011). Trong nghiên cứu này, khả năng chịu ethanol của 13 dòng nấm men thuần chủng phân lập từ thanh long ruột đỏ được khảo sát, kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 2.

Sau 24 giờ nuôi cấy trong môi trường Hansen có bổ sung ethanol ở nồng độ từ 6% đến 12%, 12 trong tổng số 13 dòng nấm men vẫn phát triển tốt. Khi nồng độ ethanol tăng lên 14%, chỉ còn 8 dòng nấm men tiếp tục sinh trưởng. Tại nồng độ ethanol 16%, số dòng nấm men có khả năng phát triển giảm xuống còn 6 dòng.

Nồng độ ethanol là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các dòng nấm men. Theo Lương Đức Phẩm (2009), trong lên men rượu vang, ethanol được nấm men tạo ra và được tích tụ trong môi trường ngày càng nhiều. Hàm lượng ethanol cao dần sẽ làm cho nấm men giảm hoạt tính, thậm chí có thể làm ngừng hẳn sự phát triển của nấm men.

Khả năng chịu ethanol của nấm men phân lập từ các nguyên liệu khác nhau là rất khác nhau. Khi đánh giá khả năng chịu cồn của các dòng nấm men được phân lập từ trái giắc, Đoàn Thị Kiều Tiên và ctv. (2018) đã sơ tuyển được 19 chủng nấm men có khả năng chịu ethanol ở mức 9-12% (v/v). Tuy nhiên, nấm men được phân lập bởi Nguyễn Thị Thanh Hải và Đỗ Thị Ánh Hòa (2017) từ các mẫu gồm dâu, nho, xoài, vải, nhãn thu thập từ các tỉnh Ninh Thuận, Khánh Hòa và Lâm Đồng lại cho kết quả nấm men có khả năng chịu nồng độ ethanol chỉ 8% (v/v). Trong khi đó, đối với nấm men được phân lập từ thanh long ruột đỏ cho kết quả có đến 13/13 dòng chịu được nồng độ ethanol đến 12%, và ở nồng độ ethanol cao nhất là 16% vẫn còn 6 dòng nấm men phát triển được là các dòng D1, D2, D9, D12, D13, D14. Khả năng chịu ethanol cao của các dòng nấm men được khảo sát cho thấy tiềm năng của việc ứng dụng các dòng nấm men này trong lên men rượu vang thanh long.

Bảng 2. Khả năng chịu ethanol của các dòng nấm men được phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ

Dòng nấm men	Nồng độ ethanol bổ sung (%)					
	6	8	10	12	14	16
D1	+	+	+	+	+	+
D2	+	+	+	+	+	+
D3	+	+	+	+	-	-
D4	+	+	+	+	+	-
D5	-	-	-	-	-	-
D7	+	+	+	+	+	-
D8	+	+	+	+	-	-
D9	+	+	+	+	+	+
D10	+	+	+	+	-	-
D11	+	+	+	+	-	-
D12	+	+	+	+	+	+
D13	+	+	+	+	+	+
D14	+	+	+	+	+	+
Tổng cộng	12	12	12	12	8	6

Ghi chú: “+” tế bào nấm men còn sống, “-” tế bào nấm men chết

3.3. Hoạt lực lên men của các dòng nấm men

Trong quá trình lên men rượu có hai sản phẩm chính là rượu ethylic và CO₂. Để xác định hoạt lực lên men của nấm men có thể dựa vào khả năng thoát khí CO₂ trong quá trình lên men. Vì vậy có thể dựa vào thời gian đầy hết ống Durham sớm nhất để xác định dòng nấm men có hoạt lực lên men mạnh nhất (Nguyễn Đức Lượng và ctv., 2003). Dựa trên kết quả khả năng chịu nhiệt và chịu cồn của các

dòng nấm men phân lập từ thanh long ruột đỏ, tuyển chọn 13 dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt cao và chịu cồn cao để đánh giá hoạt lực lên men, đây cũng là 13 dòng đã được thử nghiệm cho khả năng lên men đường glucose và saccharose mạnh (kết quả không được trình bày chi tiết ở bài báo này). Kết quả nghiên cứu cho thấy tại các thời điểm khác nhau, chiều cao cột khí CO₂ trong ống Durham cũng khác nhau điều đó có nghĩa là cường độ lên men của các dòng nấm men cũng khác nhau (Bảng 3).

Bảng 3. Chiều cao cột khí CO₂ trong chuông Durham sau các mốc thời gian lên men

Dòng nấm men	Chiều cao cột khí CO ₂ trong chuông Durham (mm)				
	18 giờ	32 giờ	54 giờ	60 giờ	66 giờ
D1	-	2,67±1,15 ^{ab}	25,67±1,53 ^d	34,33±2,52 ^d	45,00±0,00 ^e
D2	-	3,67±2,08 ^{abc}	14,33±1,53 ^{ab}	15,67±1,53 ^{ab}	16,33±0,58 ^{ab}
D3	-	2,33±1,53 ^{ab}	14,67±1,53 ^{ab}	15,00±1,73 ^{ab}	15,66±1,53 ^{ab}
D4	0,66±0,15 ^a	2,33±1,53 ^{ab}	26,67±1,15 ^d	35,00±2,00 ^d	45,00±0,00 ^e
D5	0,33±0,18 ^a	3,33±1,53 ^{abc}	12,33±0,58 ^a	13,67±1,53 ^a	14,33±2,08 ^a
D7	0,67±0,10 ^a	4,00±1,00 ^{abc}	29,67±1,53 ^e	33,33±2,31 ^e	45,00±0,00 ^e
D8	0,33±0,08 ^a	2,00±0,00 ^a	18,33±1,53 ^c	19,33±1,15 ^c	20,00±2,00 ^c
D9	1,00±0,00^a	9,00±1,00^d	45,00±0,00^f	**	**
D10	1,00±0,00 ^a	4,33±2,08 ^{abc}	29,33±1,53 ^e	36,67±1,53 ^e	45,00±0,00 ^e
D11	0,33±0,03 ^a	2,67±1,15 ^{ab}	26,33±1,53 ^d	35,67±1,15 ^d	45,00±0,00 ^e
D12	1,00±0,00 ^a	5,67±1,53 ^c	24,66±1,53 ^d	25,00±1,00 ^d	26,00±2,00 ^d
D13	0,67±0,15 ^a	5,00±1,00 ^{bc}	17,67±1,55 ^c	19,00±1,00 ^c	19,67±1,53 ^c
D14	0,33±0,04 ^a	4,00±2,00 ^{abc}	29,67±3,06 ^e	34,67±2,08 ^e	45,00±0,00 ^f

*Ghi chú: “-”: chưa hình thành CO₂, “**”: đã đầy chuông. Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại, trong cùng một cột mang chữ cái khác nhau có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)*

Nấm men đóng vai trò chủ đạo trong quá trình chuyển hóa đường thành ethanol. Sự phát triển của nấm men làm thay đổi đáng kể thành phần hóa học của dịch quả trong quá trình lên men. Khi được bổ sung vào dịch quả, nấm men bước đầu thích nghi với môi trường mới và bắt đầu sinh trưởng. Trong giai đoạn đầu của quá trình lên men, nấm men sử dụng các chất dinh dưỡng có trong dịch quả để nảy chồi và tăng sinh khối, quá trình này đòi hỏi sự hiện diện của oxy. Khi lượng oxy trở nên hạn chế, nấm men chuyển sang pha kỵ khí, trong đó đường được lên men để tạo thành ethanol cùng các sản phẩm phụ như khí CO₂, các este thơm, acid hữu cơ và rượu bậc cao. Khí

CO₂ sinh ra sẽ được giữ trong chuông Durham úp ngược. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 18 giờ lên men, ngoại trừ 3 dòng D1, D2 và D3, tất cả các dòng nấm men còn lại đều xuất hiện bọt khí trong chuông. Quá trình lên men chuyển hóa đường bắt đầu diễn ra mạnh mẽ. Tại thời điểm sau 54 giờ lên men, có đến 7/13 dòng nấm men có chiều cao cột khí hơn 1/2 chuông (chiều cao chuông Durham là 45 mm). Trong đó có dòng nấm men D9 đã đạt chiều cao cột khí tối đa (45 mm). Sau 60 giờ lên men, các dòng nấm men tiếp tục lên men và sinh khí mạnh, tuy nhiên lúc này có 5/13 dòng nấm men có chiều cao cột khí chưa đến 1/2 chuông là D2, D3, D5, D8 và D13. Đến 66 giờ,

có thêm 6 dòng nấm men có khí đầy chuông là D1, D4, D7, D10, D11 và D14. Như vậy, có tất cả 6 dòng nấm men có khí sinh ra đầy chuông Durham sau 66 giờ lên men.

Chất lượng dịch lên men cũng được phân tích nhằm đánh giá hiệu quả lên men của 13 dòng nấm men đã tuyển chọn, kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát khả năng lên men của 13 dòng nấm men phân lập được tuyển chọn

Dòng nấm men	HLCKHT (°Bx)	pH	Độ cồn (%)	Hàm lượng đường sót (g/l)
D1	10,33 ± 1,15 ^{cd}	4,21 ± 0,05 ^{bcd}	10,00 ± 1,00 ^{abc}	2,90 ± 0,10 ^{ef}
D2	9,67 ± 0,58 ^{bcd}	4,20 ± 0,02 ^{bc}	8,67 ± 0,58 ^{ab}	2,77 ± 0,20 ^{cdef}
D3	9,67 ± 0,58 ^{bcd}	4,22 ± 0,02 ^{bcd}	10,33 ± 1,53 ^{abc}	2,67 ± 0,25 ^{bcdef}
D4	10,00 ± ,00 ^{cd}	4,20 ± 0,04 ^{bc}	12,33 ± 1,53 ^{cde}	2,43 ± 0,15 ^{abc}
D5	9,67 ± 0,58 ^{bcd}	4,24 ± 0,07 ^{bcd}	13,66 ± 1,16 ^{def}	2,40 ± 0,26 ^{abc}
D7	9,33 ± 0,58 ^{bcd}	4,17 ± 0,07 ^b	15,33 ± 2,08 ^f	2,57 ± 0,15 ^{bcd}
D8	9,00 ± 1,00 ^{abc}	4,26 ± 0,06 ^{cd}	12,33 ± 2,52 ^{cde}	2,57 ± 0,20 ^{bcde}
D9	7,67 ± 0,58^a	4,08 ± 0,04^a	18,33 ± 0,58^g	2,15 ± 0,05^a
D10	8,33 ± 0,33 ^{ab}	4,18 ± 0,03 ^{bc}	14,33 ± 1,53 ^{ef}	2,53 ± 0,15 ^{bcde}
D11	12,33 ± 1,52 ^e	4,29 ± 0,01 ^d	8,00 ± 1,00 ^a	3,00 ± 0,10 ^f
D12	10,67 ± 0,58 ^d	4,25 ± 0,03 ^{bcd}	11,33 ± 1,53 ^{bcd}	2,83 ± 0,25 ^{def}
D13	10,67 ± 0,58 ^d	4,23 ± 0,02 ^{bcd}	11,67 ± 0,58 ^{cde}	2,45 ± 0,05 ^{abcd}
D14	9,67 ± 0,58 ^{bcd}	4,26 ± 0,05 ^{cd}	11,00 ± 1,73 ^{bcd}	2,63 ± 0,15 ^{bcdef}

Ghi chú: Các số liệu trong bảng là giá trị trung bình 3 lần lặp lại, các số trong cùng một cột mang chữ cái khác nhau có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Độ cồn là một chỉ tiêu quan trọng, không chỉ phản ánh hiệu quả của quá trình lên men mà còn góp phần tạo nên hương vị đặc trưng cho sản phẩm rượu vang. Quá trình lên men rượu đạt hiệu quả cao khi quá trình chuyển hóa đường thành rượu ethanol của nấm men diễn ra mạnh. Khi đó đường trong dịch quả lên men sẽ giảm và độ cồn trong dịch quả sẽ tăng lên. TCVN 7405 : 2002, độ cồn của sản phẩm rượu vang phải đạt từ 8,5%. Sau 10 ngày lên men, độ cồn của rượu

vang thanh long dao động từ 8 – 18% (Bảng 4). Kết quả cho thấy cả 13 mẫu rượu vang được lên men từ 13 dòng nấm men đều đạt tiêu chuẩn về độ cồn theo quy định đối với sản phẩm rượu vang, ngoại trừ dòng nấm men D11 với nồng độ cồn thấp nhất, chỉ đạt khoảng 8%, không đáp ứng yêu cầu theo TCVN. Dòng nấm men D9 tạo ra sản phẩm có độ cồn cao nhất, đạt 18,33%.

Quá trình chuyển hóa đường thành ethanol, đồng thời với việc sử dụng các

chất dinh dưỡng phục vụ cho sinh trưởng và tăng sinh khối của nấm men, dẫn đến sự suy giảm dần hàm lượng đường cũng như các chất dinh dưỡng có trong dịch thanh long. Do đó, hàm lượng chất khô hòa tan trong dịch thanh long cũng giảm theo trong quá trình lên men. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy hàm lượng chất khô hòa tan của dịch thanh long giảm đáng kể, từ 22 °Bx xuống còn khoảng 7,7 - 10,7 °Bx sau 10 ngày lên men. Hàm lượng chất khô hòa tan sau lên men thấp nhất là dòng D9 (7,67 °Bx) và D10 (8,33 °Bx) và khác biệt với các dòng nấm men còn lại ($p < 0,05$). Sản phẩm sau lên men với các dòng nấm men khác nhau có độ cồn dao động trong khoảng từ 8% đến 18,33%, trong đó dòng nấm men D9 cho độ cồn cao nhất là 18,33% và khác biệt so với các độ cồn thu nhận ở các mẫu lên men còn lại ($p < 0,05$). Độ cồn thu nhận mẫu rượu lên men với dòng nấm men D9 phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ cao hơn so với độ cồn thu nhận từ mẫu rượu lên men với dòng TVK1 được phân lập từ dịch quả cam đã được công bố bởi Nguyễn Phúc Trường và Nguyễn Văn Thành (2022). Cụ thể nghiên cứu phân lập và đánh giá hoạt lực lên men của các dòng nấm men phân lập từ dịch cam cũng cho thấy có 4/15 dòng nấm men có khả năng lên men rượu vang từ dịch cam. Sau quá trình lên men hàm lượng chất khô hòa tan trong dịch lên men giảm từ 22 °Bx xuống còn khoảng 6,7 - 18,33 °Bx sau 8 ngày lên men. Dòng nấm men TVK1 cho hiệu quả lên men tốt nhất với độ cồn cao nhất đạt được là 13% (Nguyễn Phúc Trường và Nguyễn Văn Thành, 2022).

Song song với sự giảm hàm lượng chất khô hòa tan, giá trị pH của dịch quả sau quá trình lên men cũng có xu hướng giảm, từ mức ban đầu dao động trong khoảng 5,1 - 5,3 xuống còn 4,08 - 4,29. Sự giảm pH trong quá trình lên men chủ yếu là do sự hình thành các acid hữu cơ. Giá trị pH là một trong những yếu tố quan trọng, có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng bảo quản và chất lượng của sản phẩm. Khi pH của dịch lên men ở mức cao, điều này tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn, từ đó dễ dẫn đến các quá trình lên men không mong muốn. Khi đó, sản phẩm rượu vang có chất lượng kém và màu sắc xấu (Kurtzman and Fell, 1998; Ribéreau - Gayon et al., 2006). Hầu hết dịch quả sau lên men bởi các dòng nấm men đều có pH lớn hơn 4. Trong đó, dòng nấm men D9 lên men dịch quả có pH thấp nhất là 4,08, khác biệt với tất cả các dòng còn lại ($p < 0,05$).

Hàm lượng đường sót là một thông số quan trọng đánh giá hiệu quả của quá trình lên men. Sau quá trình lên men rượu, hàm lượng đường sót còn lại nhiều sẽ làm ảnh hưởng đến mùi vị sản phẩm (Trần Minh Tâm, 2000). Kết quả ở bảng 4 cho thấy hàm lượng đường sót của tất cả các mẫu rượu vang không vượt quá 3 g/l. Hàm lượng đường sót thấp nhất trong sản phẩm lên men từ dòng nấm men D4, D5, và D9.

Dựa trên kết quả thu được cho thấy dòng nấm men D9 có khả năng chịu nhiệt và chịu cồn cao, hoạt lực lên men mạnh và lên men tạo sản phẩm rượu vang thanh long có chất lượng cao nhất. Chiều cao cột khí CO₂ trong chuông durham đạt mức tối đa nhanh nhất chỉ sau 54 giờ lên

men. Quá trình lên men rượu thanh long bởi dòng nấm men D9 kết thúc sau 10 ngày với các thông số hàm lượng chất khô hòa tan và hàm lượng đường sót thấp nhất lần lượt là 7,67 °Bx và 2,15 g/l, pH sản phẩm thấp nhất (4,08) và độ cồn đạt cao nhất (18,33%). Hoạt tính lên men của chủng nấm men D9, được phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ thu hoạch tại huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang, được xác định là cao hơn so với 29 chủng nấm men khác được phân lập từ 12 mẫu thanh long ruột đỏ thu tại các địa phương bao gồm Cần Thơ, Hậu Giang, Vĩnh Long, Đồng Tháp và Bến Tre. Trong số các chủng được khảo sát, chủng BT2.1, phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ tại tỉnh Bến Tre, được ghi nhận có hoạt lực lên men cao nhất trong nhóm này. Khi sử dụng chủng BT2.1 để lên men rượu vang thanh long ruột đỏ trong điều kiện bổ sung đường saccharose để đạt 22°Brix, pH 4,5, mật độ tế bào khởi đầu 10^6 tế bào/ml và lên men ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày, nồng độ cồn thu được đạt tối đa

12,15% (Phạm Thị Thu Thảo và ctv., 2019). Tuy nhiên, giá trị này vẫn thấp hơn so với nồng độ ethanol đạt được khi sử dụng chủng D9, cho thấy tiềm năng ứng dụng vượt trội của chủng D9 trong quá trình sản xuất rượu vang thanh long.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy cả 13 dòng nấm men được phân lập từ dịch quả thanh long ruột đỏ đều có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol cao. Đặc biệt, dòng nấm men D9 có tốc độ lên men nhanh nhất, đạt chiều cao cột khí CO₂ cực đại chỉ sau 54 giờ lên men. Quá trình lên men rượu thanh long bởi dòng nấm men D9 kết thúc sau 10 ngày với các thông số hàm lượng chất khô hòa tan và hàm lượng đường sót thấp nhất, pH sản phẩm thấp nhất (4,08) và độ cồn đạt cao nhất (18,33%). Như vậy, dòng nấm men D9 có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol cao, hoạt lực lên men nhanh và mạnh nhất, rất thích hợp để ứng dụng cho quá trình lên men rượu vang thanh long ruột đỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Apiwatanapiwat W., P. Rugthaworn and P. Vaithanomsat, 2013. Ethanol production at high temperature from cassava pulp by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* strain, TISTR 5925. AIMS Energy, 1: 1-14.

Auesukaree C., P. Koedrith, P. Saenpayavai, P., 2012. Characterization and gene expression profiles of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. J. Biosci. Bioeng, 114: 144-149.

Czyhrinciwk N., 1966. The technology of passion fruit and mango wines. American Journal of Enology and Viticulture, 17: 27-30.

Đoàn Thị Kiều Tiên, Lữ Hằng Nghi, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong, Hà Thanh Toàn và Ngô Thị Phương Dung, 2018. Phân lập và tuyển chọn nấm men chịu nhiệt ứng dụng trong lên men rượu vang trái giắc (*Cayratia trifolia* L.) Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, số 2/2018.

- Fleet G. H., 2003. Yeasts in fruit and fruit products. In: Boekhout T., Robert R., Yeasts and Food. Beneficial and Detrimental Aspects BehrsVerlag: 267-288.
- Heard, G. M. and G. H. Fleet, 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Microbiology*. 65(1): 23-28.
- Jayamma P., G. Geeta Shirnalli, D. Geeta Goudar and S. Nagaratna Olekar, 2022. Isolation and identification of thermotolerant yeast isolates from different fruit wastes. *The Pharma Innovation Journal*, 11(1): 855-859
- Maragatham, C. and Panneerselvam, A., 2011. Isolation, identification and characterization of wine yeast from rotten papaya fruits for wine production. *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research*. 2 (2): 93-98.
- Keating, J. D., C. Panganiban, and S. D. Mansfield, 2006. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeaststo lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6): 1196-1206.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., 1998. *The Yeast: ATaxonomic 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.
- Nevoigt E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72(3): 379-412.
- Nguyễn Đức Lượng, 2002. *Công nghệ vi sinh, tập 3 – Thực phẩm lên men truyền thống*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thị Thanh Hải và Đỗ Thị Ánh Hòa, 2018. Phân lập, tuyển chọn nấm men từ trái cây địa phương và thử nghiệm lên men dịch xoài. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang*, 3: 9-16.
- Nguyễn Phúc Trường và Nguyễn Văn Thành, 2022. 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.
- Phạm Thị Thu Thảo, Nguyễn Ngọc Anh Thư, Lê Thanh Duy, Nguyễn Ngọc Thanh, Bùi Hoàng Đăng Long, Huỳnh Xuân Phong, 2019. Phân lập và tuyển chọn nấm men có khả năng lên men rượu vang thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*). *Vietnam Journal of Science and Technology* 61(8):54-59.
- 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.
- Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M., 2015. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*.

- 15(6), fov053.
http://doi.org/10.1093/femsyr/fov053.
- Siedlarz P., M. Sroka, M. Dylag, U. Nawrot, M. Gonchar and M. Kus-Lisskiewicz, 2016. Preliminary physiological characteristics of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* clinical isolates identified by molecular biology techniques. *Lett. Appl. Microbiol*, 62: 277-282.
- Tahía B., Lucas DEL C., Andrés A., Jaime C., and E. Cerdá I. E., 2011. Selection of Wine Yeasts for Growth and Fermentation in the Presence of Ethanol and Sucrose *Mycobiology*, 39(1): 33–39.
- Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7045:2002 Quy định kỹ thuật đối với rượu vang.
- Techaparin A., Thanonkeo P., & Klanrit P., 2017. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian Journal of Microbiology* 48(3): 461-475.
- Thao P.N.P, B.T.T Thuy, L.B.T. Trinh and N.M.P.Long. 2018. Screening yeast strains for alcohol fermentation from the dried traditional yeast. *Journal of Science Ho Chi Minh City Open University*, 8(1): 78-88.
- Trần Minh Tâm, 2000, Công nghệ vi sinh ứng dụng, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Trần Thanh Thủy, 1998. Hướng dẫn thực hành Vi sinh vật học. NXB Giáo dục Việt Nam.
- Trung tâm tin tức VTV24 đăng ngày 27/02/2020. Tiền Giang đề nghị xây dựng kho bảo quản trái cây tồn đọng do ảnh hưởng từ dịch COVID-19. <https://vtv.vn/kinh-te/tien-giang-de-nghi-xay-kho-bao-quan-trai-cay-ton-dong-do-anh-huong-tu-dich-covid-19-20200227162454218>.
- Warren P. and L. Shadomy, 1991. Yeast fermentation broth base with carbohydrate and Durham tube. *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 5, pp. 34-39.

SELECTION OF YEAST STRAINS ISOLATED FROM THE JUICE OF RED- DRAGON FRUIT (*Hylocereus polyrhizus*) CULTIVATED IN CHO GAO DISTRICT, TIEN GIANG PROVINCE

Vo Thi Kien Hao*, Nguyen Huong Giang, Nguyen Van Ba, Nguyen Thi Thu Thao,
Phan Huu Tang, Phan Chi Thao and Pham Thanh Sang
Tay Do University
(*Email: vtkhao@tdu.edu.vn)

ABSTRACT

The study aimed to select high active yeast strains with high heat and alcohol tolerance, and high fermentation activity from red dragon fruit juice to produce high quality wine. Fruits were collected from Cho Gao district, Tien Giang province. The results showed that 13/13 yeast strains grew well at culture temperature of 44°C and 12% ethanol. At the highest ethanol concentration of 16%, there were still 6 yeast strains grew well. All yeast strains surveyed were able to ferment dragon fruit juice. Results of selective experiment showed that the yeast strain D9 isolated from dragon fruit showed the best fermentation activity such as the fastest fermentation by Durham test (54 hours) the highest ethanol content (18.33% v/v) and lowest remained Brix (7.67 °Bx), lowest residual sugar content (2.15 g/l) after the fermented substrates at day 10. Therefore, the D9 yeast strain which has high heat and ethanol resistance, fastest and strongest fermentation activity, was very suitable for application in dragon fruit wine fermentation process.

Keywords: *Ethanol resistance, fermentation, red dragon fruit, temperature resistance, yeast strain*