

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ  
VIỆN NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



**LUẬN VĂN TỐT NGHIỆP ĐẠI HỌC  
NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN  
LÊN MEN ETHANOL BẰNG NẤM MEN CHỊU NHIỆT**

**CÁN BỘ HƯỚNG DẪN  
TS. NGÔ THỊ PHƯƠNG DUNG**

**SINH VIÊN THỰC HIỆN  
NGUYỄN HỮU TƯỜNG  
MSSV: 3082645  
LỚP: CNSH TT K34**

**Cần Thơ, Tháng 5/2013**

**PHẦN KÝ DUYỆT**

**CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**

**SINH VIÊN THỰC HIỆN**

**TS. Ngô Thị Phương Dung**

**Nguyễn Hữu Tường**

**DUYỆT CỦA HỘI ĐỒNG BẢO VỆ LUẬN VĂN**

.....

.....

.....

.....

.....

*Cần Thơ, ngày tháng năm 2013*

**CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG**

## LỜI CẢM TẠ

Xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban Giám hiệu Trường Đại học Cần Thơ, Ban Lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, cùng Quý Thầy Cô đã tận tình giảng dạy em trong thời gian học tập vừa qua.

Xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình đến cô Ngô Thị Phương Dung – người đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất để em thực hiện đề tài nghiên cứu.

Xin gửi lời biết ơn chân thành đến thầy cố vấn học tập lớp Công nghệ Sinh học tiên tiến khóa 34, thầy Nguyễn Hữu Hiệp và thầy Phạm Văn Hậu. Sự hỗ trợ nhiệt tình của các thầy đã giúp cho chúng em hoàn thành tốt quá trình học tập của mình.

Xin chân thành cảm ơn các anh Huỳnh Xuân Phong, Nguyễn Ngọc Thanh và Phạm Hồng Quang – Cán bộ phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực phẩm, đã đóng góp ý kiến và hỗ trợ điều kiện thuận lợi để em hoàn thành tốt đề tài nghiên cứu này.

Xin ghi ơn gia đình, anh chị cán bộ các phòng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học và tất cả bạn bè đã đồng viên, giúp đỡ trong suốt thời gian qua.

Kính chúc Quý Thầy Cô được nhiều sức khỏe, thành đạt trên nhiều lĩnh vực và luôn có những cống hiến quý báu cho sự nghiệp giáo dục và đào tạo.

Xin chân thành cảm ơn!

*Cần Thơ, ngày 06 tháng 05 năm 2013*

**Sinh viên thực hiện**

## TÓM LƯỢC

Trong nghiên cứu này, 44 dòng nấm men được thử khả năng chịu nhiệt ở các mức nhiệt độ khác nhau (30, 36, 39, 42, 43, 44 và 45°C) và khảo sát khả năng chịu ethanol ở các nồng độ 4, 8, 10 và 12% (v/v). Các dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol tốt tiếp tục được khảo sát khả năng lên men đường glucose 2% và khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao (nhiệt độ phòng, 35, 40 và 45°C). Nghiên cứu khả năng lên men trong môi trường rỉ đường ở những điều kiện khác nhau đã được thực hiện gồm có: mật số giống chủng ( $10^4$ ,  $10^5$  và  $10^6$  tế bào/mL), nồng độ đường ban đầu (15, 20, 25 và 30°Brix), thời gian lên men (3, 5 và 7 ngày) và pH của môi trường (tự nhiên (pH 4,66), 4, 5 và 6). Kết quả cho thấy có 7 dòng nấm men chịu được nhiệt độ ở 42°C (C2, CC, BM2, V2, V3, L04-2 và L07-2) và 1 dòng phát triển được ở nhiệt độ 43°C (BM2). 25/44 dòng nấm men phát triển được trên môi trường bổ sung 12% ethanol. Dòng nấm men V2 có khả năng lên men nhanh và mạnh trong môi trường glucose 2%. Điều kiện thích hợp cho dòng nấm men V2 phát triển và lên men ethanol trên môi trường rỉ đường ở 40°C là mật số giống chủng ban đầu  $10^5$  tế bào/mL, nồng độ đường 25°Brix, thời gian lên men 3 ngày và pH môi trường 4,66. So sánh mức độ tương đồng chuỗi nucleotide giữa vùng ITS1, 5.8S rDNA và ITS2 với cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene, dòng nấm men V2 được xác định là loài *Pichia kudriavzevii* với độ tương đồng 100%.

**Từ khóa:** khả năng chịu ethanol, khả năng chịu nhiệt, lên men ethanol, nấm men chịu nhiệt, *Pichia kudriavzevii*

## MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
<b>PHẦN KÝ DUYỆT</b>	
<b>LỜI CẢM ƠN</b>	
<b>TÓM LƯỢC</b> .....	i
<b>MỤC LỤC</b> .....	ii
<b>DANH SÁCH BẢNG</b> .....	v
<b>DANH SÁCH HÌNH</b> .....	vi
<b>TỪ VIẾT TẮT</b> .....	vii
<b>CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU</b> .....	1
<b>1.1. Đặt vấn đề</b> .....	1
<b>1.2. Mục tiêu đề tài</b> .....	3
<b>CHƯƠNG 2. LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU</b> .....	4
<b>2.1. Giới thiệu chung về nấm men</b> .....	4
2.1.1. Hình dạng và kích thước của nấm men.....	4
2.1.2. Cấu tạo của nấm men.....	5
2.1.3. Sự sinh sản và phát triển của nấm men.....	5
2.1.4. Vai trò và ứng dụng của nấm men.....	6
<b>2.2. Nấm men chịu nhiệt</b> .....	7
<b>2.3. Một số dòng nấm men chịu nhiệt quan trọng</b> .....	8
2.3.1. Nấm men <i>Kluyveromyces</i> spp. ....	8
2.3.2. Nấm men <i>Saccharomyces</i> spp. ....	9
2.3.3. Nấm men <i>Candida</i> spp. ....	10
<b>2.4. Sự lên men ethanol</b> .....	10
2.4.1. Cơ chế của quá trình lên men ethanol từ glucose.....	11
2.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men ethanol của nấm men.....	12
<b>CHƯƠNG 3. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	14
<b>3.1. Phương tiện thí nghiệm</b> .....	14
3.1.1. Dụng cụ, thiết bị.....	14

3.1.2. Nguyên vật liệu .....	14
3.1.3. Hóa chất .....	14
<b>3.2. Phương pháp thí nghiệm .....</b>	<b>15</b>
3.2.1. Thử nghiệm khả năng chịu nhiệt của 44 dòng nấm men.....	15
3.2.2. Thử nghiệm khả năng chịu ethanol của 44 dòng nấm men .....	15
3.2.3. Khảo sát khả năng lên men đường glucose của các dòng nấm men đã tuyển chọn.....	16
3.2.4. Khảo sát khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men đã tuyển chọn.....	16
3.2.5. Khảo sát các điều kiện lên men ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men đã tuyển chọn.....	17
3.2.5.1. Ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường.....	17
3.2.5.2. Ảnh hưởng của thời gian lên men và pH môi trường .....	18
3.2.6. Định danh dòng nấm men được tuyển chọn .....	18
3.2.7. Xử lý số liệu, phân tích thống kê .....	19
<b>CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Khả năng chịu nhiệt của 44 dòng nấm men.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Khả năng chịu ethanol của 44 dòng nấm men.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Khả năng lên men đường glucose của các dòng nấm men đã tuyển chọn..</b>	<b>24</b>
<b>4.4. Khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men V2.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5. Các điều kiện lên men ethanol ở 40°C của dòng nấm men V2.....</b>	<b>26</b>
4.5.1. Ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường.....	26
4.5.2. Ảnh hưởng của thời gian lên men và pH môi trường.....	28
<b>4.6. Kết quả định danh dòng nấm men V2 .....</b>	<b>31</b>
4.6.1. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của dòng nấm men V2 .....	31
4.6.2. Kết quả định danh dòng nấm men V2 .....	32
4.6.3. Một số đặc điểm của loài nấm men <i>Pichia kudriavzevii</i> .....	32
<b>CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>33</b>
5.1. Kết luận.....	33

5.2. Đề nghị.....	33
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>34</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>.....</b>
<b>Phụ lục 1. Hình ảnh các thiết bị sử dụng trong phòng thí nghiệm</b>	
<b>Phụ lục 2. Số liệu kết quả thí nghiệm</b>	
<b>Phụ lục 3. Kết quả phân tích thống kê</b>	
<b>Phụ lục 4. Trình tự chuỗi polypeptides dòng nấm men V2</b>	

## DANH SÁCH BẢNG

<b>Tên bảng</b>	<b>Trang</b>
Bảng 1. Sự hiện diện và ứng dụng của nấm men trong một số thực phẩm, thức uống có cồn và sản phẩm lên men .....	6
Bảng 2. Những dòng nấm men được khảo sát có khả năng phát triển và sản sinh ethanol ở nhiệt độ 37°C đến 45°C .....	8
Bảng 3. Khả năng chịu nhiệt của 44 dòng nấm men sau 48 giờ .....	20
Bảng 4. Khả năng chịu ethanol của 44 dòng nấm men sau 48 giờ .....	22
Bảng 5. Chiều cao cột khí CO <sub>2</sub> (mm) trong ống Durham .....	24



**DANH SÁCH HÌNH**

<b>Tên hình</b>	<b>Trang</b>
Hình 1. Tế bào nấm men quan sát dưới kính hiển vi điện tử.....	4
Hình 2. Các dạng tế bào nấm men khác nhau quan sát dưới kính hiển vi điện tử.....	5
Hình 3. Nấm men <i>Kluyveromyces lactis</i> (a) và <i>Kluyveromyces marxianus</i> (b) .....	8
Hình 4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
Hình 5. <i>Candida</i> spp. ....	10
Hình 6. Cơ chế lên men glucose của nấm men tạo ethanol và CO <sub>2</sub> .....	12
Hình 7. Khuẩn lạc của 7 dòng nấm men BM2, C2, CC, V2, V3, L04-2 và L07-2 ở 43°C sau 48 giờ ủ .....	22
Hình 8. Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ ủ lên nồng độ ethanol sinh ra .....	25
Hình 9. Biểu đồ ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường lên nồng độ ethanol sinh ra.....	26
Hình 10. Biểu đồ hàm lượng đường sử dụng trong quá trình lên men .....	28
Hình 11. Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian lên men và pH môi trường lên nồng độ ethanol sinh ra.....	29
Hình 12. Giá trị pH sau khi lên men.....	30
Hình 13. Khuẩn lạc dòng nấm men V2 .....	31
Hình 14. Tế bào nấm men V2 dưới kính hiển vi với vật kính 100X .....	31
Hình 15. Kết quả định danh dòng nấm men V2.....	32

## TỪ VIẾT TẮT

DNA	Deoxyribose nucleic acid
ITS	Internal transcribed spacer
mL	milliliter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PGY	Potato – Glucose – Yeast extract
rDNA	ribosomal DNA
Viện NC&PT CNSH	Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học
YM agar	Yeast extract – Malt extract – Agar
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

## CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU

### 1.1. Đặt vấn đề

Từ xưa, con người đã biết làm ra rượu ethylic (ethanol) từ nguồn nguyên liệu là các sản phẩm nông nghiệp có hàm lượng tinh bột cao bằng phương pháp lên men truyền thống. Nhìn chung, ethanol rất quan trọng trong đời sống con người (có thể sử dụng theo nhiều mục đích khác nhau, tùy theo độ rượu thấp/cao): rượu – lên men truyền thống được sử dụng như một thức uống mang đậm tính văn hóa; ethanol – sản xuất công nghiệp được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực quan trọng như: y tế, dược bào chế, làm nguyên liệu trong tổng hợp hữu cơ, công nghiệp sơn,... Hiện nay, nhu cầu về ethanol công nghiệp với độ tinh sạch cao ngày càng cấp thiết, bởi ethanol đã được chứng minh là một loại nhiên liệu sinh học có tiềm năng thay thế những nguồn nhiên liệu hóa thạch đang dần cạn kiệt (Alfenore et al., 2002). Có thể pha trộn hợp lý một lượng vừa phải ethanol với xăng để làm nhiên liệu nhằm tăng tính thân thiện với môi trường đồng thời hạ giá thành.

Trong công nghiệp, ethanol có thể được sản xuất bằng hóa tổng hợp và sinh tổng hợp. Đối với tổng hợp hóa học, một trong những phương pháp phổ biến là hydrate hóa ethylene ( $C_2H_4$ ) với điều kiện xúc tác thích hợp. Trong tổng hợp sinh học, nấm men được sử dụng để chuyển hóa đường thành ethanol trong điều kiện kỵ khí. Nấm men có tiềm năng rất lớn trong việc lên men chuyển hóa đường thành ethanol. Tuy nhiên, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của nấm men như nguồn carbon, nguồn nitơ, pH, đặc biệt là nhiệt độ và nồng độ ethanol. Do đó, đặc tính chịu nhiệt và 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.

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sự lên men tạo ethanol của nấm men. Vào mùa hè, nhiệt độ ở miền Nam nước ta tăng rất cao, thậm chí trong tương lai nhiệt độ còn có thể tăng cao hơn nữa do hiện tượng nóng lên toàn cầu. Do đó, việc sản xuất ethanol sinh học bằng nấm men gặp nhiều khó khăn và thách thức. Chi phí dùng cho việc làm lạnh rất tốn kém, nên việc chọn lọc các dòng nấm men chịu nhiệt có thể giúp giảm thiểu chi phí, tận dụng được một số thuận lợi khi thực hiện lên men ở nhiệt độ cao như: độ tan của oxy và các chất khí khác giảm tạo điều kiện kỵ khí rất tốt, cơ hội bị nhiễm được giảm thiểu (Roehr, 2001).

Nồng độ ethanol trong môi trường cũng tác động đáng kể đến năng suất lên men của nấm men, nấm men không chịu được nồng độ ethanol cao sẽ dễ bị ức chế trong quá trình lên men dẫn đến hiệu quả lên men không cao. Những dòng nấm men có khả năng phát triển và lên men ethanol ở nhiệt độ cao, đồng thời kết hợp được đặc tính chịu được nồng độ ethanol cao rất có triển vọng cho việc sản xuất ethanol.

Thành phần dinh dưỡng của môi trường cũng như pH cũng ảnh hưởng nhất định đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm men. Các chất bổ sung vào môi trường sinh trưởng có chứa maltose hoặc glucose cùng với nguồn nitơ như peptone sẽ làm tăng sinh khối và sự sản sinh ethanol (Helena da Cruz et al., 2003). Giá trị pH không thích hợp sẽ hạn chế khả năng tạo ethanol của nấm men. Do đó, việc nghiên cứu ảnh hưởng của dinh dưỡng và pH lên khả năng lên men của nấm men là rất quan trọng nhằm tìm ra điều kiện tối ưu cho quá trình lên men.

Mía là cây ưa ẩm, được trồng phổ biến ở nhiều nước châu Á, châu Úc, Cuba, đảo Java (Indonesia), đảo Hawaii (Mỹ). Trong quá trình chế biến mía thành đường sẽ thu được một loại chất lỏng đặc sánh, đó là rỉ đường (hay mật rỉ đường). Thành phần rỉ đường thu từ các nhà máy đường ở Việt Nam chứa lượng đường khử khá cao (khoảng 39%), ngoài ra trong rỉ đường còn chứa sucrose (21,6%), glucose (8,7%), fructose (8,47%). Các thành phần khác trong rỉ đường gồm có: nitơ, protein thô, khoáng, canxi, magiê, kali, photpho, natri, lưu huỳnh, đồng, sắt, mangan, kẽm,... (Vũ Chí Cương et al., 2004). Rỉ đường là nguồn nguyên liệu rẻ tiền không cần phải trải qua quá trình thủy phân, không giống như những phụ phẩm nông nghiệp khác (Ghorbani et al., 2011). Vì vậy, rỉ đường là một trong những loại nguyên liệu thích hợp để sản xuất ethanol công nghiệp.

Nguyễn Văn Anh et al. (2011) đã phân lập được 31 dòng nấm men từ các nguồn khác nhau. Trong đó có 9 dòng có đặc tính chịu được nhiệt độ cao và có khả năng lên men ethanol mạnh. Việc tiếp tục nghiên cứu đặc tính lên men của các dòng nấm men này cũng như khảo sát các điều kiện lên men của chúng sẽ tạo cơ sở cho việc đưa vào thực nghiệm sản xuất ethanol ở các cấp độ và quy mô lớn hơn. Điều này có ý nghĩa quan trọng, là tiền đề cho việc đưa các dòng nấm men có triển vọng cao vào ứng dụng trong sản xuất ethanol sinh học. Do đó đề tài **“Tuyển chọn và khảo sát điều kiện lên men ethanol bằng nấm men chịu nhiệt”** được thực hiện. Ngoài 9 dòng nấm men được lựa chọn từ đề tài trên, đề tài này còn sử dụng thêm 4 dòng nấm men có khả năng

chịu nhiệt cao từ đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên cấp Trường “*Thử nghiệm lên men ethanol ở nhiệt độ cao bằng nấm men chịu nhiệt*” của Nguyễn Hữu Tường et al. (2012), 29 dòng nấm men có khả năng lên men nhanh và mạnh từ luận văn tốt nghiệp đại học “*Khảo sát khả năng lên men và tuyển chọn nấm men có khả năng chịu cồn cao*” năm 2011 của Nguyễn Thị Ngọc Mai và 2 dòng từ Trung tâm nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Lên men sản phẩm Nông nghiệp, Khoa Công nghệ, Trường Đại học Khon Kaen, Thái Lan. Điểm mới của đề tài là khảo sát khả năng lên men ethanol trong dịch rỉ đường ở nhiệt độ cao của các dòng nấm men đã được tuyển chọn.

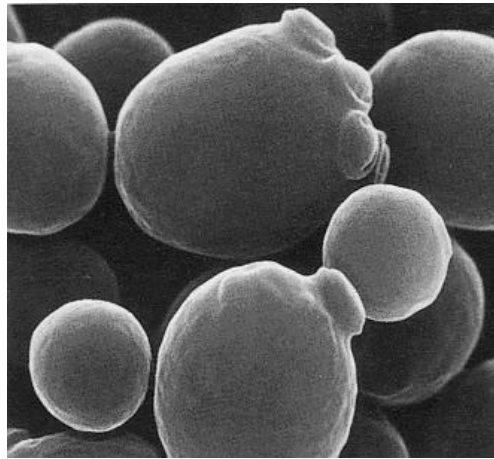
## **1.2. Mục tiêu đề tài**

Mục tiêu của đề tài là chọn lọc dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt và nồng độ ethanol cao đồng thời có khả năng lên men mạnh; khảo sát điều kiện lên men thích hợp trên môi trường rỉ đường.

## CHƯƠNG 2. LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU

### 2.1. Giới thiệu chung về nấm men

Nấm men là tên gọi chung của nhóm nấm có những đặc điểm như cấu tạo đơn bào, đa số sinh sôi nảy nở bằng cách nảy chồi hoặc phân cắt tế bào, nhiều loại có khả năng lên men đường. Nấm men phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong các môi trường có chứa đường, có pH thấp, chẳng hạn như trong hoa quả, mật mía, rỉ đường, mật ong, trong đất ruộng trồng mía, đất vườn cây ăn quả, trong các đất có nhiễm dầu mỏ (Nguyễn Lâm Dũng, 1999). Nấm men có nhiều ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm, con người từ lâu đã biết ứng dụng nấm men vào sản xuất các loại thực phẩm truyền thống như rượu, bia, bánh mì,...



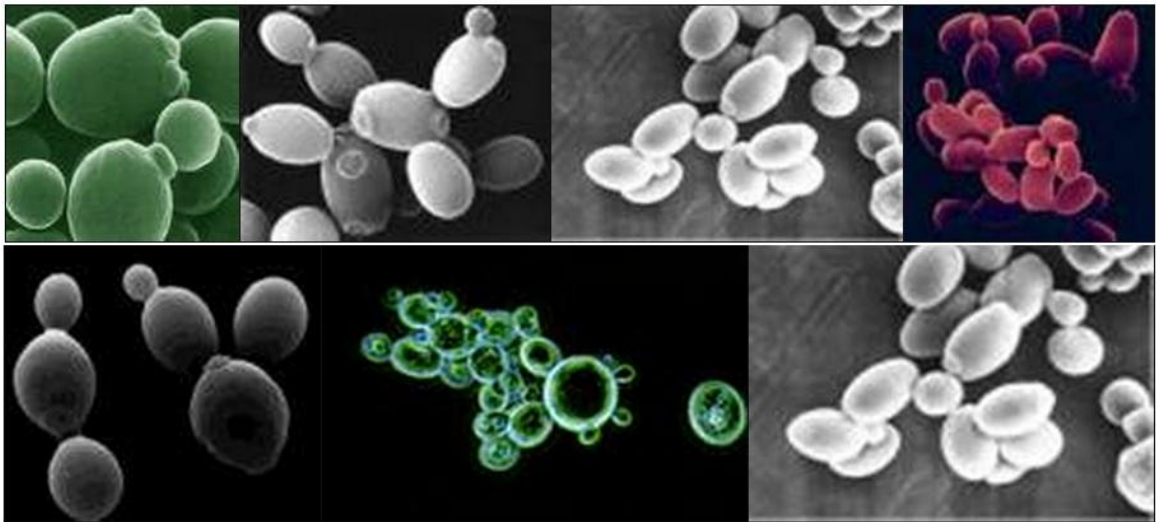
**Hình 1. Tế bào nấm men quan sát dưới kính hiển vi điện tử**

(Nguồn: <http://vietsciences.free.fr/lichsu/kinhhienvi.htm>, ngày 18/04/2013)

#### 2.1.1. Hình dạng và kích thước của nấm men

**Hình dạng tế bào:** Nấm men thường có hình cầu, hình elip, hình ovan và có cả dạng hình dài. Chúng hầu hết tồn tại dưới dạng đơn bào, một số loài như *Candida albicans* không chỉ nảy chồi mà các tế bào nối lại với nhau tạo thành khuẩn ty giả và *Eremothecium gossypii* hình thành khuẩn ty thật (Kurtzman và Piškur, 2006).

**Kích thước tế bào:** Kích thước của nấm men khác nhau tùy theo loài và thời kỳ sinh trưởng của nấm men. *Saccharomyces cerevisiae* là nấm men thường được sử dụng trong lên men rượu, bia có kích thước chiều rộng khoảng 2,5 – 10  $\mu\text{m}$  và chiều dài 4,5 – 21  $\mu\text{m}$ , có thể thấy rõ dưới kính hiển vi quang học (Nguyễn Lâm Dũng, 1999).



**Hình 2. Các dạng tế bào nấm men khác nhau quan sát dưới kính hiển vi điện tử**

(Nguồn: <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/nammen01.htm>, ngày 21/04/2013)

### 2.1.2. Cấu tạo của nấm men

**Thành tế bào:** Thành tế bào nấm men dày khoảng 25 nm, chiếm 15 – 30% trọng lượng khô của tế bào nấm men, được cấu tạo chủ yếu từ glucan (60% khối lượng thành tế bào), mannoprotein, chitin và một lượng nhỏ lipid.

**Màng nguyên sinh chất:** Màng nguyên sinh chất có 3 tầng kết cấu khác nhau, được cấu tạo chủ yếu từ protein (50% khối lượng khô), phần còn lại là lipid và một ít polysaccharide (Nguyễn Lâm Dũng, 1999).

**Chất nguyên sinh:** Chất nguyên sinh của nấm men cũng tương tự như chất nguyên sinh của vi khuẩn, thành phần chủ yếu là nước, protein, glucid, lipid, enzyme.

**Nhân tế bào:** Nhân tế bào nấm men là nhân điển hình, có màng nhân, bên trong là chất dịch nhân có chứa hạch nhân. Nhân tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có chứa 17 đôi nhiễm sắc thể.

**Các bào quan và thành phần khác:** Ty thể, không bào, ribosome,...

### 2.1.3. Sự sinh sản và phát triển của nấm men

Theo Nguyễn Lâm Dũng (1999), nấm men có hai hình thức sinh sản là sinh sản hữu tính và sinh sản vô tính.

+ Sinh sản hữu tính: Nấm men hình thành bào tử túi ở các chi *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* và nhiều chi nấm men khác thuộc bộ Endomycetales.

+ Sinh sản vô tính: Chủ yếu bằng hình thức nảy chồi (diễn ra ở hầu hết các chi nấm men), hình thức phân cắt (ở chi *Schizosaccharomyces*), bằng bào tử (ở chi *Geotrichum*, *Sporobolomyces*, *Candida albicans*).

Nấm men là các vi sinh vật hóa dị dưỡng vì chúng sử dụng các hợp chất hữu cơ làm nguồn cung cấp năng lượng cho sự sinh trưởng và phát triển. Nguồn carbon được nấm men sử dụng hầu hết là đường sáu carbon như glucose và fructose hoặc các đường đôi như sucrose hoặc maltose. Một số loài có thể sử dụng đường năm carbon (đường ribose). Nấm men có thể tồn tại được trong điều kiện hiếu khí lẫn kỵ khí với khoảng nhiệt độ tương đối rộng và pH acid thích hợp cho sự phát triển của nấm men.

#### 2.1.4. Vai trò và ứng dụng của nấm men

Nấm men có nhiều ứng dụng quan trọng trong công nghiệp thực phẩm như dùng trong sản xuất ethanol, bánh mì, rượu vang, bia,... Trong đó việc ứng dụng nấm men vào việc lên men các sản phẩm nông nghiệp để sản xuất ethanol rất đáng được quan tâm, nguồn ethanol giá thành rẻ sẽ đóng góp đáng kể vào việc giải quyết vấn đề về nhiên liệu và ô nhiễm môi trường. Một số sản phẩm ứng dụng của từng dòng nấm men cụ thể được liệt kê trong Bảng 1 (Jacobson và Jolly, 1989).

**Bảng 1. Sự hiện diện và ứng dụng của nấm men trong một số thực phẩm, thức uống có cồn và sản phẩm lên men**

Sản phẩm, ứng dụng	Nấm men
Rượu, bia	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bánh mì và bột nhào bánh mì	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>S. rosei</i>
D-Arabitol (chất làm ngọt)	<i>Candida diddensiae</i>
Chất tạo nhũ tương	<i>C. lipolytica</i>
Thức ăn gia cầm và cá	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Lactose và sữa lên men	<i>C. pseudotropicalis</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>K. lactis</i>
Lên men bia lager	<i>S. carlsbergensis</i>
Mannitol (chất hút ẩm)	<i>Torulopsis manitofaciens</i>
Shoyu, Miso	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Lên men rượu vang	<i>S. cerevisiae</i>
Xylitol (chất làm ngọt)	<i>T. candida</i>
Lên men D-xylose	<i>C. shehatae</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Pichia stipitis</i> , <i>P. segobiensis</i>



## 2.2. Nấm men chịu nhiệt

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hoạt động của nấm men. Arthur và Watson (1976) đã xác định nhiệt độ phát triển của nấm men ưa lạnh (psychrophilic) trong khoảng 2 – 20°C; nấm men ưa nhiệt độ trung bình (mesophilic) là 5 – 35°C; nấm men chịu nhiệt (thermotolerant) là 8 – 42°C; nấm men ưa nhiệt (thermophilic) là 28 – 45°C.

Nấm men được sử dụng rộng rãi trong nhiều quy trình công nghiệp như trong sản xuất thức uống có cồn, sinh khối và các sản phẩm trao đổi chất khác. Một số sản phẩm được sản xuất thương mại trong khi cũng có những sản phẩm có giá trị về mặt sinh học (Kurtzman và Fell, 1997). Theo Roehr (2001), nấm men chịu nhiệt có một số thuận lợi trong việc sản xuất ethanol trong điều kiện nhiệt độ cao bao gồm: hoạt động trao đổi chất vẫn tốt và tốc độ lên men cao tạo ra nhiều sản phẩm; độ tan của oxy và các khí khác trong nước giảm khi nhiệt độ tăng đảm bảo điều kiện kỵ khí cho quá trình lên men của nấm men; độ nhớt của môi trường lên men giảm khi nhiệt độ tăng nên năng lượng cần thiết cho việc trộn môi trường được giảm đi; cơ hội bị nhiễm được giảm thiểu.

Trong những nghiên cứu gần đây, nấm men *Kluyveromyces marxianus* có thể phát triển ở nhiệt độ 47°C (Anderson et al., 1986), 40°C (Hughes et al., 1984), thậm chí là 52°C (Banat et al., 1992) và sản sinh ethanol ở nhiệt độ cao trên 40°C (Fonseca et al., 2008). Hơn thế nữa, *K. marxianus* còn có thuận lợi là tốc độ phát triển cao (Pecota et al., 2007) và khả năng sử dụng rộng rãi các cơ chất trong công nghiệp như đường mía, bắp, nước trái cây, rỉ đường,... (Nonklang et al., 2008). Ngoài *Kluyveromyces marxianus*, quá trình lên men ở nhiệt độ cao còn có thể kể đến *Saccharomyces uvarum* với khả năng phát triển tối ưu ở khoảng nhiệt độ 25 – 43°C và loài *Candida* spp. với khả năng lên men glucose ở nhiệt độ 40°C (McCracken và Gong, 1982).

Từ đề tài nghiên cứu khoa học “*Phân lập và tuyển chọn các dòng nấm men chịu nhiệt có khả năng lên men ethanol mạnh*”, Nguyễn Văn Anh et al. (2011) đã phân lập được 31 dòng nấm men từ các nguồn trái cây chín, men rượu, men bánh mì,... Bằng thí nghiệm nuôi các dòng nấm men trong dung dịch glucose 2% trong chai Durham và đo chiều cao cột khí trong ống thủy tinh úp ngược, những dòng nấm men đã được xác

định có khả năng lên men ethanol. Đặc tính chịu nhiệt của chúng cũng được chứng minh khi nuôi cấy trong môi trường ở các nhiệt độ khác nhau.

Những dòng nấm men khác nhau chịu ảnh hưởng của nhiệt độ không giống nhau. Số lượng dòng nấm men sinh ethanol cũng giảm theo nhiệt độ (Bảng 2).

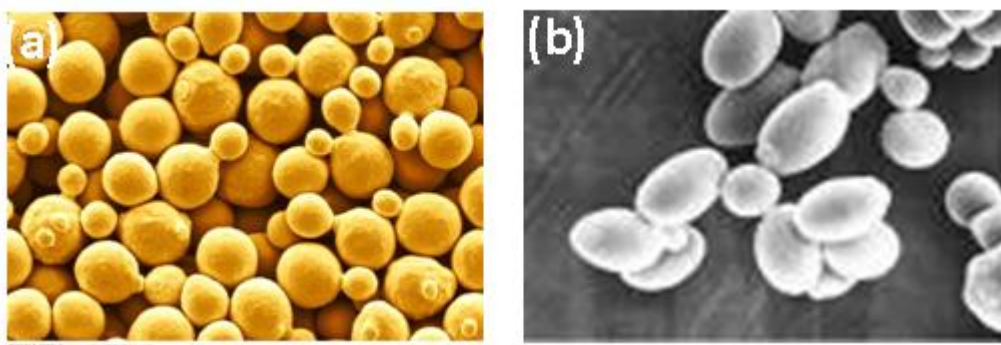
**Bảng 2. Những dòng nấm men được khảo sát có khả năng phát triển và sản sinh ethanol ở nhiệt độ 37°C đến 45°C**

Nấm men	Số lượng dòng			Phát triển và sản sinh ethanol ở 45°C
	Tổng số được khảo sát ở 37°C	Có hiệu suất lên men ethanol trên 50% ở 37°C	Có hiệu suất lên men ethanol trên 50% ở 40°C	
<i>Candida</i>	15	5	4	1
<i>Hansenula</i>	7	1	0	0
<i>Kluyveromyces</i>	12	8	5	5
<i>Pichia</i>	4	0	0	0
<i>Saccharomyces</i>	14	13	3	0
<i>Schizosaccharomyces</i>	2	1	0	0
<i>Torulopsis</i>	1	0	0	0

(Nguồn: Hacking et al., 1984)

## 2.3. Một số dòng nấm men chịu nhiệt quan trọng

### 2.3.1. Nấm men *Kluyveromyces* spp.



**Hình 3. Nấm men *Kluyveromyces lactis* (a) và *Kluyveromyces marxianus* (b)**

(Nguồn: [http://visualphotos.com/image/1x3745113/kluyveromyces\\_lactis\\_yeast\\_cell\\_kluyveromyces](http://visualphotos.com/image/1x3745113/kluyveromyces_lactis_yeast_cell_kluyveromyces), ngày 21/04/2013 và <http://envis.kuenvbiotech.org/fungi.htm>, ngày 21/04/2013)

Kurtzman và Fell (1997) đã mô tả đặc điểm hình thái của *Kluyveromyces* spp. là tế bào có hình ovan, hình elip và hình trụ kéo dài.

Theo Bảng 2, *Kluyveromyces* spp. là dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt cao nhất trong số bảy dòng nấm men được khảo sát (Hacking et al., 1984). Banat et al.

(1992) đã phân lập được dòng *K. marxianus* có khả năng phát triển và lên men ở nhiệt độ 52°C từ mẫu đất ở một nhà máy chưng cất rượu tại Ấn Độ. Một chủng nấm men *K. marxianus* là IMB3 đã được báo cáo là có khả năng sản sinh ethanol ở 45°C trong môi trường có glucose, cellobiose (Barron et al., 1994), sucrose (Fleming et al., 1993) và lactose (Brady et al., 1994). Brady et al. (1995) nhận thấy rằng khi *K. marxianus* IMB3 phát triển trên môi trường 2% glucose thì nấm men này sản sinh ra ethanol với nồng độ cao nhất là 8,5 g/L và năng suất trên lý thuyết là 83%.

### 2.3.2. Nấm men *Saccharomyces* spp.



**Hình 4. *Saccharomyces cerevisiae***

(Nguồn: [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces\\_cerevisiae\\_Alt](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces_cerevisiae_Alt), ngày 21/04/2013)

Tế bào nấm men *Saccharomyces* spp. có hình cầu, hình elip hoặc hình trụ (Kurtzman và Fell, 1997).

Toriya et al. (2003) đã kết luận sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đối với *Saccharomyces cerevisiae* là từ 15°C đến 35°C, sự phát triển của nấm men sẽ thay đổi theo nhiệt độ. Đường tăng trưởng của vi sinh vật gồm các giai đoạn: pha tiềm phát (lag phase), pha chỉ số (log phase), pha cân bằng (stationary phase) và pha tử vong (death phase) khi quan sát ở nhiệt độ 25°C và 30°C, nhưng ở 35°C mật số nấm men giảm nhiều, đặc biệt ở cuối giai đoạn lên men. Kết quả này cũng tương tự như những báo cáo trước cho rằng mật số nấm men sẽ giảm khi nhiệt độ tăng. Nhiệt độ cao có thể làm quá trình lên men kết thúc sớm, có nghĩa là lên men không hoàn toàn và nồng độ ethanol thấp (Larue et al., 1980). Hơn nữa, Lee et al. (1980) đã khảo sát quá trình lên men bởi *S. uvarum* (hay *S. carlsbergensis*) trong mẻ nuôi cấy với nhiệt độ giữa 25°C và 43°C, kết quả nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của nấm men là 33°C trong khi chúng có thể tạo ethanol ở mức nhiệt độ 37 – 43°C (Sripiromrak et al., 2006).

Trong suốt quá trình lên men, mật số tế bào thay đổi đáng kể do chúng nhạy cảm với ethanol, một số dòng không còn tồn tại khi nồng độ ethanol cao. Đồng thời, khả năng chịu ethanol còn phụ thuộc vào nhiệt độ. Điều này lý giải tại sao một vài dòng có mật số giảm ở một vài nhiệt độ nhưng có thể hoàn tất quá trình lên men ở nhiệt độ khác (Torija et al., 2003).

### 2.3.3. Nấm men *Candida* spp.

Tế bào nấm men *Candida* spp. có dạng hình cầu, hình elip, hình trụ hoặc trụ kéo dài, đặc biệt có các tế bào hình dài nối với nhau tạo thành những sợi gọi là khuẩn ty giả (Kurtzman và Fell, 1997) (Hình 5).



**Hình 5. *Candida* spp.**

(Nguồn: <http://www.syadh.com/vb/imgcache8/3923.imgcache.jpg>, ngày 20/04/2013)

McCracken và Gong (1982) đã khảo sát sự lên men glucose ở 40°C của 8 dòng nấm men *Candida* spp. được phân lập từ bã mía. Kết quả có 3 dòng cho kết quả hiệu suất lên men cao nhất. Trong đó 1 dòng được khảo sát cẩn thận với nhiệt độ cao nhất khoảng 48°C vì đây là nhiệt độ thích hợp cho sự đường hóa liên tục cellulose và lên men hoặc một trong hai quá trình sẽ được kết hợp với enzyme isomerase xylose để thực hiện tiến trình đồng phân hóa và lên men xylose. Ở 45°C, từ 10% (w/v) glucose sẽ tạo ra 4,3% (w/v) ethanol trong 2 ngày. Tốc độ lên men ban đầu gần như không đổi trong khoảng nhiệt độ từ 30°C đến 50°C. Ở 50°C có khoảng 2% (w/v) ethanol được tạo ra từ 4,5% (w/v) glucose trong 6 giờ (Sripiromrak, 2006).

## 2.4. Sự lên men ethanol

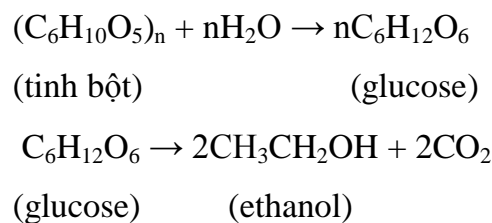
Lên men ethanol là quá trình chuyển hóa đường thành ethanol được thực hiện bởi nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau nhưng chủ yếu là nấm men. Trong công nghiệp cồn, bia, rượu, các loại nước uống có cồn, người ta thường sử dụng nấm men

*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* trong quá trình lên men tạo ethanol.

Ethanol được sản xuất chủ yếu từ các loại nguyên liệu từ thực vật có chứa đường, hoặc tinh bột và cellulose thông qua phản ứng trung gian thủy phân tạo đường.

- Các cơ chất có hàm lượng đường cao thường được dùng để lên men ethanol thường là: rỉ đường, nước mía, củ cải đường, nước trái cây chín; sự lên men từ các nguyên liệu này được thực hiện trực tiếp mà không thông qua quá trình thủy phân tạo đường.

- Những cơ chất giàu tinh bột như: gạo, lúa mì, ngô, khoai mì, khoai tây, khoai lang,... Đối với các loại nguyên liệu này cần phải có quá trình thủy phân tinh bột tạo đường cho nấm men sử dụng để lên men tạo ethanol.



Các nguồn nguyên liệu chứa cellulose như: gỗ, giấy, xác mía,... cũng có thể sử dụng để sản xuất ethanol nhưng việc xử lý để phân cắt cellulose tạo glucose rất khó khăn và tốn kém.

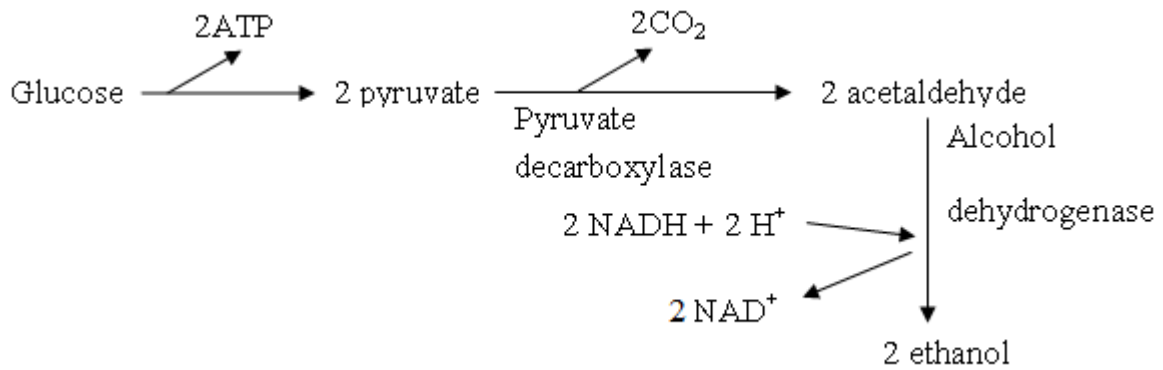
#### 2.4.1. Cơ chế của quá trình lên men ethanol từ glucose

Lên men ethanol là quá trình trao đổi chất dưới tác dụng của chất xúc tác là enzyme. Đây là quá trình lên men kỵ khí dưới sự có mặt của nấm men tạo thành ethanol và giải phóng khí CO<sub>2</sub>.

Quá trình lên men rượu của nấm men gồm hai giai đoạn chính:

- Tăng sinh khối nấm men: Tế bào nấm men phát triển và tăng sinh khối, giai đoạn này cần sự hiện diện của oxy.

- Lên men chuyển hóa đường thành rượu: Quá trình này xảy ra dưới điều kiện kỵ khí theo sơ đồ Hình 6.



**Hình 6. Cơ chế lên men glucose của nấm men tạo ethanol và CO<sub>2</sub>**

(Norr et al., 2003)

**2.4.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men ethanol của nấm men + Dinh dưỡng**

Nitơ và nguồn carbon là yếu tố dinh dưỡng chính trong môi trường lên men. Sự tương tác lẫn nhau của các chất dinh dưỡng có thể đóng vai trò quan trọng trong trao đổi chất của nấm men. Các chất bổ sung vào môi trường sinh trưởng có chứa maltose hoặc glucose cùng với nguồn nitơ như peptone sẽ làm tăng sinh khối và sự sản sinh ethanol (Helena de Cruz et al., 2003).

**+ Nhiệt độ**

Nhiệt độ là yếu tố cần thiết ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của nấm men. Thông thường nhiệt độ phù hợp cho lên men là 28 – 30°C. Nhiệt độ khoảng hơn 50°C và dưới 0°C thì sự lên men hầu như bị đình trệ. Thông thường quá trình lên men ở nhiệt độ thấp sẽ kéo dài hơn, nhưng lên men ở nhiệt độ quá cao sẽ làm tổn thất sản phẩm, cũng như ảnh hưởng đến mùi vị sản phẩm. Trong công nghiệp lên men thực phẩm, nhiệt độ tối ưu của quá trình lên men có thể không trùng khớp với nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng của vi sinh vật.

**+ pH**

Nồng độ của ion H<sup>+</sup> có ảnh hưởng đáng kể đến sự lên men trong công nghiệp do pH đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát các vi khuẩn có thể bị nhiễm và ảnh hưởng lên sự phát triển của nấm men. Năng suất lên men ethanol cao nhất thường dao động ở pH 4,5 – 4,7. Khi pH được điều chỉnh lên 7 hoặc cao hơn thì acid acetic được tạo thành từ acetaldehyde dựa vào sự gia tăng hoạt động của enzyme aldehyde dehydrogenase, glycerol được sản sinh và ức chế sự lên men (Wang et al., 2001).

### + Khí oxy và carbonic

Nấm men là vi sinh vật vừa kỵ khí vừa hiếu khí. Trong điều kiện kỵ khí, chúng lên men đường tạo thành rượu và khí carbonic ( $\text{CO}_2$ ). Còn trong điều kiện đầy đủ oxy, chúng có khả năng oxy hóa đường thành  $\text{CO}_2$  và nước, đồng thời sinh sản và phát triển mạnh. Hàm lượng  $\text{CO}_2$  hình thành trong quá trình lên men thường hạn chế mạnh sự sinh sản của nấm men. Trong điều kiện nhiệt độ cao, lượng khí hòa tan trong dung dịch lên men sẽ giảm xuống, tạo điều kiện kỵ khí cho quá trình lên men của nấm men.

### + Nồng độ ethanol

Nồng độ ethanol cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình lên men, nồng độ ethanol cao có thể ức chế khả năng sinh sản tế bào và khả năng sống sót của nấm men. Việc chọn lọc dòng nấm men có khả năng chịu được nồng độ ethanol cao sẽ mang lại lợi ích đáng kể cho quá trình lên men vì các dòng nấm men này có thể nâng cao hiệu suất của quá trình lên men.

Ngô Thị Phương Dung (2009) đã phân lập được 50 dòng nấm men từ viên men rượu, chín dòng được chọn để khảo sát khả năng chịu độ cồn. Kết quả thử khả năng chịu đựng độ cồn cho thấy bảy dòng có khả năng chịu độ cồn trong khoảng 5 – 6% (w/v) ethanol và hai dòng có khả năng chịu độ cồn thấp hơn từ 2,4 – 3% (w/v) ethanol.

### + Nồng độ dịch lên men

Nồng độ dịch lên men được xác định bằng khối lượng đường sucrose trong dung dịch (độ Brix). Nồng độ dịch đường quá cao sẽ làm thay đổi độ nhớt của môi trường tăng áp suất dẫn đến mất cân bằng trạng thái sinh lý của nấm men. Nồng độ ethanol được sản sinh tăng cao cũng gây ức chế nấm men. Tuy nhiên nếu nồng độ dịch đường quá thấp thì sẽ không kinh tế vì sẽ làm giảm năng suất lên men, hao phí trong quá trình chưng cất.

## CHƯƠNG 3. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 3.1. Phương tiện nghiên cứu

#### 3.1.1. Dụng cụ, thiết bị

- Cân phân tích (Ohaus Corp, ARA520, Mỹ)
- Kính hiển vi quang học (Olympus Optical, BH-2, Nhật)
- Máy vortex (HEIPOLPH, Đức)
- Nồi thanh trùng (Breukelen, Hà Lan)
- Tủ cấy (Totelstar Bio-II-A, Tây Ban Nha)
- Tủ ủ (Henrich, Đức)
- Water bath & Shaker (GESELLSCHAFT, Đức)
- Các dụng cụ thông dụng như: buồng đếm hồng cầu, ống nghiệm, pipet, bình tam giác, ống đong...

#### 3.1.2. Nguyên vật liệu

- Dịch rỉ đường (được thu mua từ Nhà máy đường Phụng Hiệp – Hậu Giang)
- Khoai tây, agar
- 44 dòng nấm men: 9 dòng đã được phân lập từ đề tài của Nguyễn Văn Anh et al. (2011) (C2, CC, BM2, BM3, HN3, HN4, HDD2, V2 Và V3), 4 dòng đã được tuyển chọn từ đề tài của Nguyễn Hữu Tường et al. (2012) (HX1, N1, MO và T), 29 dòng đã được tuyển chọn từ đề tài của Nguyễn Thị Ngọc Mai (2011) (14, 17, 26, 30, 57, 65, 66, 87, 89, 92, 96, 107, 110, 122, 135, MR15, MR19, N23, VIII, 20/5, 29/3, 126.5, Y1c, Y5c, Y10, Y11, Y58, Y64 và Y65) và 2 dòng từ Trung tâm nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Công nghệ Lên men sản phẩm Nông nghiệp, Khoa Công nghệ, Trường Đại học Khon Kaen, Thái Lan (L04-2 và L07-2).

#### 3.1.3. Hóa chất

##### a) Môi trường

- Môi trường YM agar: yeast extract 0,3%, malt extract 0,3%, D-glucose 1%, peptone 0,5%, agar 1,5%
- Môi trường PGY: khoai tây 20%, D-glucose 2%, yeast extract 0,2%

##### b) Các hóa chất khác

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, D-glucose, NaOH, acid citric,...



### 3.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 3.2.1. Thử khả năng chịu nhiệt của 44 dòng nấm men

**Mục đích:** Tuyển chọn những dòng nấm men có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt ở nhiệt độ cao.

**Phương pháp:**

- Thí nghiệm 2 nhân tố (dòng nấm men và nhiệt độ) với 3 lần lặp.
- Nuôi sinh khối 44 dòng nấm men trong môi trường PGY trong 24 giờ.
- Cấy ria các dòng nấm men trên đĩa petri có chứa môi trường YM agar.
- Ủ các đĩa petri ở các nhiệt độ khác nhau: 30, 36, 39, 42, 43, 44 và 45°C từ 1 đến 4 ngày.
- Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các dòng nấm men khác nhau trên thạch. Chỉ có các dòng nấm men chịu nhiệt mới có khả năng phát triển thành khuẩn lạc ở nhiệt độ cao.

- Chỉ tiêu đánh giá: Khả năng phát triển tốt thành khuẩn lạc to, tròn của các dòng nấm men ở điều kiện nhiệt độ cao trong thời gian từ 1 đến 4 ngày.

- Tuyển chọn những dòng nấm men có khả năng phát triển ở nhiệt độ cao.

#### 3.2.2. Thử khả năng chịu ethanol của 44 dòng nấm men

**Mục đích:** Tuyển chọn những dòng nấm men phát triển tốt trong môi trường có ethanol.

**Phương pháp:**

- Thí nghiệm 2 nhân tố (dòng nấm men và nồng độ ethanol) với 3 lần lặp.
- Nuôi sinh khối 44 dòng nấm men trong môi trường PGY trong 24 giờ.
- Cấy ria các dòng nấm men trên đĩa petri có chứa môi trường YM agar có bổ sung các nồng độ ethanol tinh khiết khác nhau 4, 8, 10 và 12%. Ethanol được bổ sung trong quá trình đổ môi trường agar vào đĩa.
- Ủ các đĩa petri ở nhiệt độ 30°C từ 1 đến 4 ngày.
- Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các dòng nấm men khác nhau trên thạch. Chỉ có các dòng nấm men chịu ethanol mới có khả năng phát triển thành khuẩn lạc trên môi trường có nồng độ ethanol cao.

- Chỉ tiêu đánh giá: Khả năng phát triển tốt thành khuẩn lạc to, tròn của các dòng nấm men ở điều kiện nồng độ ethanol cao trong thời gian từ 1 đến 4 ngày.

- Tuyển chọn những dòng nấm men có khả năng phát triển trên môi trường có nồng độ ethanol cao.

\* Tuyển chọn những dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol từ các thí nghiệm 3.2.1 và 3.2.2.

### **3.2.3. Khảo sát khả năng lên men đường glucose của các dòng nấm men đã tuyển chọn**

**Mục đích:** Tuyển chọn các dòng nấm men có khả năng lên men mạnh bằng phương pháp lên men dung dịch đường glucose 2% trong ống Durham.

#### **Phương pháp:**

- Thí nghiệm 1 nhân tố (dòng nấm men) 3 lần lặp.

- Nuôi sinh khối nấm men tuyển chọn từ các thí nghiệm 3.2.1 và 3.2.2 trong môi trường PGY trong 24 giờ.

- Chủng 1 mL dung dịch nấm men với mật số  $10^7$  tế bào/mL vào ống Durham có chứa 9 mL dung dịch sucrose 2% đã được khử trùng ở  $115^\circ\text{C}$  trong 10 phút (mật số sau khi chủng là  $10^6$  tế bào/mL). Lắc thật đều để dung dịch đường tràn đầy vào ống thủy tinh úp ngược nằm bên trong ống Durham chiều cao 30 mm, ủ ở nhiệt độ phòng.

- Chỉ tiêu đánh giá: Chiều cao cột khí  $\text{CO}_2$  sinh ra trong ống thủy tinh úp ngược tại các thời điểm 4, 8, 12, 16, 20 và 24 giờ ủ.

- Chọn lọc những dòng nấm men có khả năng lên men nhanh và mạnh.

### **3.2.4. Khảo sát khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men đã tuyển chọn**

**Mục đích:** Tuyển chọn những dòng nấm men có khả năng tạo ethanol cao ở nhiệt độ cao.

#### **Phương pháp:**

- Thí nghiệm 2 nhân tố (dòng nấm men và nhiệt độ) với 3 lần lặp lại.

- Nuôi sinh khối nấm men tuyển chọn từ thí nghiệm 3.2.3 trong môi trường PGY đến khi mật số tế bào nấm men đạt  $10^8$  tế bào/mL.

- Cho 99 mL dung dịch rỉ đường nồng độ 20°Brix vào bình tam giác 250 mL, khử trùng ở 115°C trong 10 phút.

- Chủng 1 mL dung dịch nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác, mật số nấm men sau khi chủng là  $10^6$  tế bào/mL.

- Ủ 5 – 7 ngày trong điều kiện kỵ khí (đậy bằng waterlock) ở các nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng, 35, 40 và 45°C. Đếm số bọt khí sinh ra trong 2 phút sau mỗi 24 giờ.

- Chung cất để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được, quy về nồng độ ethanol ở 20°C.

- Chỉ tiêu đánh giá khả năng lên men tạo ethanol ở các nhiệt độ khác nhau: Nồng độ ethanol thu được sau lên men. Tuyển chọn các dòng nấm men cho nồng độ ethanol cao ở nhiệt độ cao.

### **3.2.5. Khảo sát các điều kiện lên men ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men đã tuyển chọn**

#### **3.2.5.1. Ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường**

**Mục đích:** Khảo sát ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường lên khả năng lên men tạo ethanol của các dòng nấm men.

#### **Phương pháp:**

- Thí nghiệm 2 nhân tố (mật số giống chủng và nồng độ đường) với 3 lần lặp.

- Nuôi sinh khối nấm men tuyển chọn từ thí nghiệm 3.2.3 trong môi trường PGY đến khi mật số tế bào nấm men đạt  $10^6$ ,  $10^7$  và  $10^8$  tế bào/mL.

- Cho 99 mL dung dịch rỉ đường ở 4 độ Brix khác nhau: 15, 20, 25 và 30°Brix vào bình tam giác 250 mL, khử trùng ở 115°C trong 10 phút.

- Chủng 1 mL dung dịch nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác 250 mL, mật số nấm men sau khi chủng lần lượt là  $10^4$ ,  $10^5$  và  $10^6$  tế bào/mL.

- Ủ 5 – 7 ngày trong điều kiện kỵ khí (đậy bằng waterlock) ở nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm 3.2.4. Đếm bọt khí sinh ra trong 2 phút sau mỗi 24 giờ.

- Sau thời gian ủ, đem chung cất dịch lên men để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được, quy về nồng độ ethanol ở 20°C.

- Chỉ tiêu đánh giá khả năng lên men tạo ethanol ở các mật số giống chủng và nồng độ đường khác nhau: Nồng độ ethanol thu được sau lên men, hàm lượng đường sử dụng.

### **3.2.5.2. Ảnh hưởng của thời gian lên men và pH môi trường**

**Mục đích:** Khảo sát khả năng lên men của nấm men ở các môi trường có giá trị pH khác nhau và thời gian lên men.

#### **Phương pháp:**

- Thí nghiệm 2 nhân tố (pH môi trường và thời gian lên men) với 3 lần lặp lại.
- Nuôi sinh khối các dòng nấm men tuyển chọn từ thí nghiệm 3.2.3 trong môi trường PGY điều chỉnh cho mật số tế bào nấm men thích hợp (chọn từ thí nghiệm 3.2.5.1).
- Cho 99 mL dung dịch ri đường có nồng độ đường thích hợp (được chọn từ thí nghiệm 3.2.5.1) vào bình tam giác 250 mL. Điều chỉnh giá trị pH ở các bình khác nhau: 4,0; 5,0; 6,0 và pH tự nhiên. Khử trùng các bình tam giác trên ở 115°C trong 10 phút.
- Chủng nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác.
- Ủ 3, 5 và 7 ngày trong điều kiện kỵ khí (đậy bằng waterlock) ở nhiệt độ được chọn từ thí nghiệm 3.2.4. Đếm bọt khí sinh ra trong 2 phút sau mỗi 24 giờ.
- Chung cất để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được, quy về nồng độ ethanol ở 20°C.
- Chỉ tiêu đánh giá khả năng lên men tạo ethanol ở các môi trường có giá trị pH và thời gian lên men khác nhau: Nồng độ ethanol thu được sau lên men, giá trị pH sau lên men.

### **3.2.6. Định danh dòng nấm men được tuyển chọn**

**Mục đích:** Khảo sát đặc tính sinh học của dòng nấm men được tuyển chọn bằng phương pháp quan sát khuẩn lạc, chụp hình dưới kính hiển vi và định danh ở mức độ loài.

**Phương pháp:** Định danh các dòng nấm men bằng phương pháp sinh học phân tử.

- Các dòng nấm men được định danh bằng cách giải trình tự nucleotide giữa vùng ITS1, 5.8S rDNA và ITS2. Chuỗi trình tự được so sánh tương đồng với dữ liệu trên ngân hàng gene của NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), từ đó xác định loài của mẫu nấm men.

- Tóm tắt các bước để định danh nấm men bằng kỹ thuật sinh học phân tử:

+ Ly trích DNA nấm men

+ Kiểm tra hàm lượng và chất lượng DNA bằng phương pháp quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8%.

+ Khuếch đại vùng ITS1, 5.8S rDNA và ITS2 bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi tổng ITS 1-4:

ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

+ Tinh sạch sản phẩm khuếch đại.

+ Kiểm tra hàm lượng và chất lượng sản phẩm sau tinh sạch bằng phương pháp quang phổ và điện di trên gel agarose 2%.

+ Giải trình tự sản phẩm PCR theo cả hai hướng bằng máy giải trình tự tự động.

+ So sánh BLAST với dữ liệu trên ngân hàng gene của NCBI và xác định dòng nấm men phân lập.

**3.2.7. Xử lý số liệu, phân tích thống kê:** Số liệu được xử lý bằng chương trình Microsoft Office Excel 2007 và Statgraphics Centurion XV, USA.

## CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1. Khả năng chịu nhiệt của 44 dòng nấm men

Khả năng sinh trưởng ở các mức độ nhiệt độ khác nhau của 44 dòng nấm men được thể hiện ở Bảng 3.

**Bảng 3. Khả năng chịu nhiệt của 44 dòng nấm men sau 48 giờ**

STT	Dòng nấm men	Nhiệt độ khảo sát						
		30°C	36°C	39°C	42°C	43°C	44°C	45°C
1	14	+	+	+	-	-	-	-
2	17	+	+	-	-	-	-	-
3	20/5	+	+	+	-	-	-	-
4	26	+	+	-	-	-	-	-
5	29/3	+	+	+	-	-	-	-
6	30	+	+	+	-	-	-	-
7	57	+	+	+	-	-	-	-
8	65	+	+	+	-	-	-	-
9	66	+	+	-	-	-	-	-
10	87	+	+	+	-	-	-	-
11	89	+	+	+	-	-	-	-
12	92	+	+	+	-	-	-	-
13	96	+	+	+	-	-	-	-
14	107	+	+	+	-	-	-	-
15	110	+	+	+	-	-	-	-
16	122	+	+	-	-	-	-	-
17	126.5	+	+	-	-	-	-	-
18	135	+	+	-	-	-	-	-
19	BM2	+	+	+	+	+	+	-
20	BM3	+	+	+	+	-	-	-
21	C2	+	+	+	+	+	-	-
22	CC	+	+	+	+	+	-	-
23	HDD2	+	+	+	+	-	-	-
24	HN3	+	+	+	+	-	-	-
25	HN4	+	+	+	+	-	-	-
26	HX1	+	+	+	+	-	-	-
27	MO	+	+	+	+	-	-	-
28	MR15	+	+	+	-	-	-	-

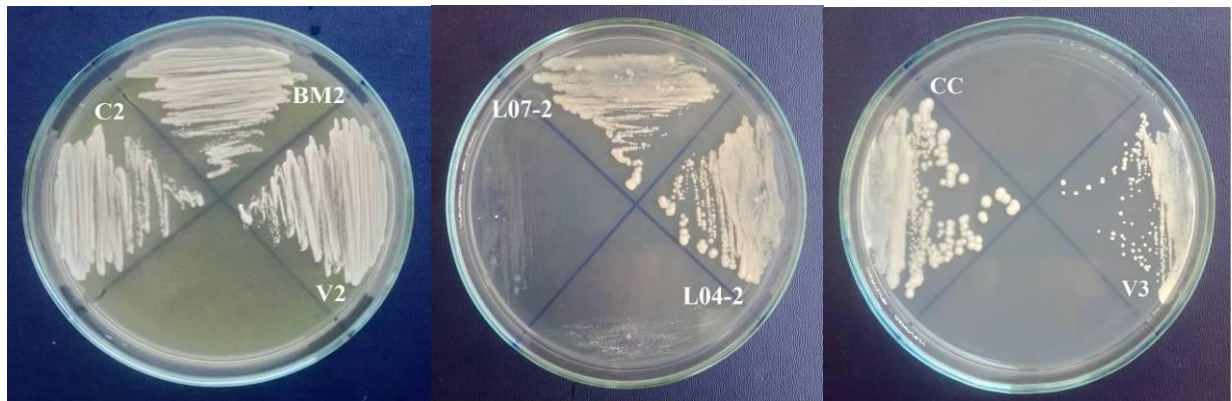
**Bảng 3. Khả năng chịu nhiệt của 44 dòng nấm men sau 48 giờ (tiếp theo)**

STT	Dòng nấm men	Nhiệt độ khảo sát						
		30°C	36°C	39°C	42°C	43°C	44°C	45°C
29	MR19	+	+	+	-	-	-	-
30	N1	+	+	+	+	-	-	-
31	N23	+	+	+	-	-	-	-
32	T	+	+	+	-	-	-	-
33	V2	+	+	+	+	+	-	-
34	V3	+	+	+	+	+	-	-
35	VIII	+	+	-	-	-	-	-
36	Y10	+	+	-	-	-	-	-
37	Y11	+	+	+	+	-	-	-
38	Y1c	+	+	+	+	-	-	-
39	Y58	+	+	+	-	-	-	-
40	Y5c	+	+	+	-	-	-	-
41	Y64	+	+	+	-	-	-	-
42	Y65	+	+	+	-	-	-	-
43	L04-2	+	+	+	+	+	-	-
44	L07-2	+	+	+	+	+	-	-
Tổng cộng		44	44	36	16	7	1	0

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

Sau 48 giờ cấy nấm men trên môi trường dinh dưỡng, tất cả các dòng nấm men đều phát triển trong khoảng nhiệt độ 30 – 36°C. Ở mức nhiệt độ 39°C, có 36 dòng phát triển. Ở mức nhiệt độ 42°C, chỉ có 16 dòng phát triển. Đến mức nhiệt độ 43°C chỉ còn quan sát được sự phát triển của 7 dòng nấm men (C2, CC, BM2, V2, V3, L04-2 và L07-2) (Hình 7). Chỉ có dòng nấm men BM2 hình thành khuẩn lạc ở nhiệt độ 44°C. Không có dòng nấm men nào phát triển và tạo khuẩn lạc ở 45°C sau 48 giờ ủ. Điều này chứng tỏ nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các dòng nấm men. Nhiệt độ càng cao, số dòng nấm men phát triển càng ít.

Kết quả đã chọn được 7 dòng từ 44 dòng nấm men có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao (43°C). Bảy dòng nấm men được lựa chọn là: C2, CC, BM2, V2, V3, L04-2 và L07-2.



**Hình 7. Khuẩn lạc của 7 dòng nấm men BM2, C2, CC, V2, V3, L04-2 và L07-2 ở 43°C sau 48 giờ ủ**

#### 4.2. Khả năng chịu ethanol của 44 dòng nấm men

Khả năng sinh trưởng ở môi trường có bổ sung nồng độ ethanol khác nhau của 44 dòng nấm men được thể hiện ở Bảng 4.

**Bảng 4. Khả năng chịu ethanol của 44 dòng nấm men sau 48 giờ**

STT	Dòng nấm men	Nồng độ ethanol bổ sung			
		4%	8%	10%	12%
1	14	+	+	+	+
2	17	+	+	+	-
3	20/5	+	+	+	+
4	26	+	+	+	+
5	29/3	+	+	+	+
6	30	+	+	+	-
7	57	+	+	+	+
8	65	+	+	+	+
9	66	+	+	+	-
10	87	+	+	+	+
11	89	+	+	+	+
12	92	+	+	+	-
13	96	+	+	+	-
14	107	+	+	+	+
15	110	+	+	-	-
16	122	+	+	+	-
17	126.5	+	+	+	-
18	135	+	+	+	-
19	BM2	+	+	+	-



**Bảng 4. Khả năng chịu ethanol của 44 dòng nấm men sau 48 giờ (tiếp theo)**

STT	Dòng nấm men	Nồng độ ethanol bổ sung			
		4%	8%	10%	12%
20	BM3	+	+	-	-
21	C2	+	+	+	+
22	CC	+	+	+	+
23	HDD2	+	+	+	-
24	HN3	+	+	-	-
25	HN4	+	+	+	-
26	HX1	+	+	-	-
27	MO	+	+	+	+
28	MR15	+	+	+	+
29	MR19	+	+	+	+
30	N1	+	+	+	+
31	N23	+	+	+	+
32	T	+	+	-	-
33	V2	+	+	+	+
34	V3	+	+	+	+
35	VIII	+	+	+	+
36	Y10	+	+	+	+
37	Y11	+	+	+	-
38	Y1c	+	+	-	-
39	Y58	+	+	+	+
40	Y5c	+	+	+	-
41	Y64	+	+	+	+
42	Y65	+	+	+	+
43	L04-2	+	+	+	+
44	L07-2	+	+	+	+
Tổng cộng		44	44	38	25

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

Sau 48 giờ cấy nấm men trên môi trường dinh dưỡng, tất cả các dòng nấm men đều phát triển trong môi trường có bổ sung 4 và 8% ethanol. Ở mức độ 10% ethanol, có 38 dòng phát triển, tuy nhiên khi tăng nồng độ ethanol lên 12% chỉ còn có 25 dòng có thể phát triển. Cả bảy dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt ở 43°C đều có khả năng hình thành khuẩn lạc trên môi trường có bổ sung 12% ethanol. Nhìn chung, số

dòng nấm men có thể phát triển giảm khi nồng độ ethanol bổ sung tăng. Điều này chứng tỏ ethanol là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các dòng nấm men. Ethanol ức chế quá trình phát triển của nấm men, nồng độ ethanol cao sẽ gây ngộ độc nấm men.

Từ các kết quả 4.1 và 4.2, chọn ra được bảy dòng nấm men vừa có khả năng chịu nhiệt, vừa có khả năng chịu ethanol cao: BM2, C2, CC, V2, V3, L04-2 và L07-2. Bảy dòng nấm men này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 4.3. Khả năng lên men đường glucose của các dòng nấm men đã tuyển chọn

Khả năng lên men của các dòng nấm men được theo dõi và xác định ở các thời điểm 4, 8, 12, 16, 20 và 24 giờ sau khi chủng. Kết quả chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> sinh ra trong ống thủy tinh úp ngược được trình bày trong Bảng 5.

**Bảng 5. Chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> (mm) trong ống Durham**

STT	Dòng nấm men	Thời gian xuất hiện bọt khí (giờ)	Chiều cao cột khí CO <sub>2</sub> (mm)				
			8 giờ	12 giờ	16 giờ	20 giờ	24 giờ
1	C2	7	1,00 <sup>b</sup>	4,67 <sup>c</sup>	10,00 <sup>c</sup>	20,33 <sup>cde</sup>	30,00 <sup>a</sup>
2	CC	7	1,00 <sup>b</sup>	5,33 <sup>bc</sup>	10,67 <sup>c</sup>	23,33 <sup>bcd</sup>	30,00 <sup>a</sup>
3	BM2	7	1,00 <sup>b</sup>	4,00 <sup>c</sup>	9,67 <sup>c</sup>	20,00 <sup>de</sup>	27,33 <sup>b</sup>
4	V2	6	2,00 <sup>a</sup>	9,33 <sup>a</sup>	20,67 <sup>a</sup>	30,00 <sup>a</sup>	30,00 <sup>a</sup>
5	V3	7	0,67 <sup>b</sup>	3,67 <sup>c</sup>	8,33 <sup>c</sup>	18,67 <sup>e</sup>	27,67 <sup>b</sup>
6	L04-2	7	0,67 <sup>b</sup>	7,67 <sup>ab</sup>	15,67 <sup>b</sup>	24,67 <sup>bc</sup>	30,00 <sup>a</sup>
7	L07-2	10	0,00 <sup>c</sup>	4,00 <sup>c</sup>	10,67 <sup>c</sup>	27,33 <sup>ab</sup>	30,00 <sup>a</sup>
cv%			69,07	44,57	39,09	19,13	4,72

**Ghi chú:** Chiều cao tối đa của cột khí trong ống Durham là 30 mm. Giá trị trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp. Các trị trung bình trong cùng một cột theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Phương pháp lên men đường glucose trong ống Durham giúp đánh giá sơ bộ khả năng lên men của bảy dòng nấm men đã tuyển chọn.

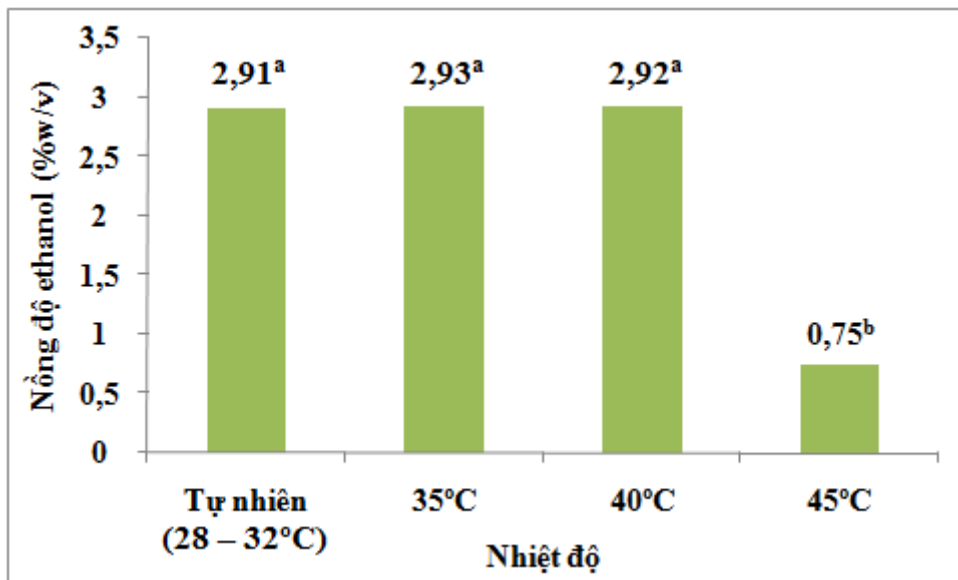
Trong khoảng thời gian đầu sau khi chủng giống, các dòng nấm men chủ yếu tăng sinh khối nên quá trình lên men diễn ra chậm. Sau 6 giờ chủng, bọt khí mới bắt đầu xuất hiện trong ống chứa dòng nấm men V2, các ống còn lại có bọt khí xuất hiện chậm hơn (7 giờ và 10 giờ sau khi chủng). Dòng nấm men V2 thể hiện khả năng lên men mạnh trong suốt 24 giờ. Ở các thời điểm khảo sát 8, 12, 16 và 20 giờ, chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> trong ống chứa dòng nấm men V2 luôn cao hơn các ống còn lại (Bảng 5).

Sau 20 giờ lên men, cột khí CO<sub>2</sub> trong ống chứa dòng nấm men V2 đạt giá trị cực đại (30 mm). Đến thời điểm 24 giờ sau khi chủng giống, hầu hết các dòng nấm men đều sinh bọt khí làm đầy ống. Kết quả cho thấy dòng nấm men V2 có khả năng lên men nhanh và mạnh hơn các dòng nấm men còn lại, nên dòng nấm men V2 được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

#### 4.4. Khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men V2

Chủng 1 mL dung dịch nấm men V2 (sau 24 giờ ủ trong môi trường PGY) vào 99 mL dung dịch rỉ đường (20°Brix) với mật số 10<sup>6</sup> tế bào/mL. Sau 5 ngày ủ ở các nhiệt độ 35, 40, 45°C và nhiệt độ phòng, tiến hành chưng cất và đo độ rượu sinh ra.

Khả năng sinh ethanol ở các mức độ nhiệt độ khác nhau của dòng nấm men V2 được thể hiện ở Hình 8.



**Hình 8. Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ ủ lên nồng độ ethanol sinh ra**

*Ghi chú:* Số liệu trong biểu đồ là giá trị trung bình của 3 lần lặp. Các giá trị theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả cho thấy ba nghiệm thức nhiệt độ môi trường tự nhiên (nhiệt độ dao động từ 28 đến 32°C tại thời điểm khảo sát), 35°C và 40°C không khác biệt có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. Độ rượu cao nhất được ghi nhận ở 35°C (2,93% w/v). Độ rượu sinh ra giảm mạnh nhất khi tăng nhiệt độ từ 40°C lên 45°C (từ 2,92 xuống 0,75% w/v).

Theo nghiên cứu của Ghorbani et al. (2011), ở nhiệt độ bình thường, dòng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có thể tạo ra 1,915% (w/v) ethanol trong môi trường rỉ đường. Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến sự lên men tạo ethanol của nấm men. Theo Navarro và Durand (1978) khi nhiệt độ tăng cao thì lượng ethanol tích lũy nội

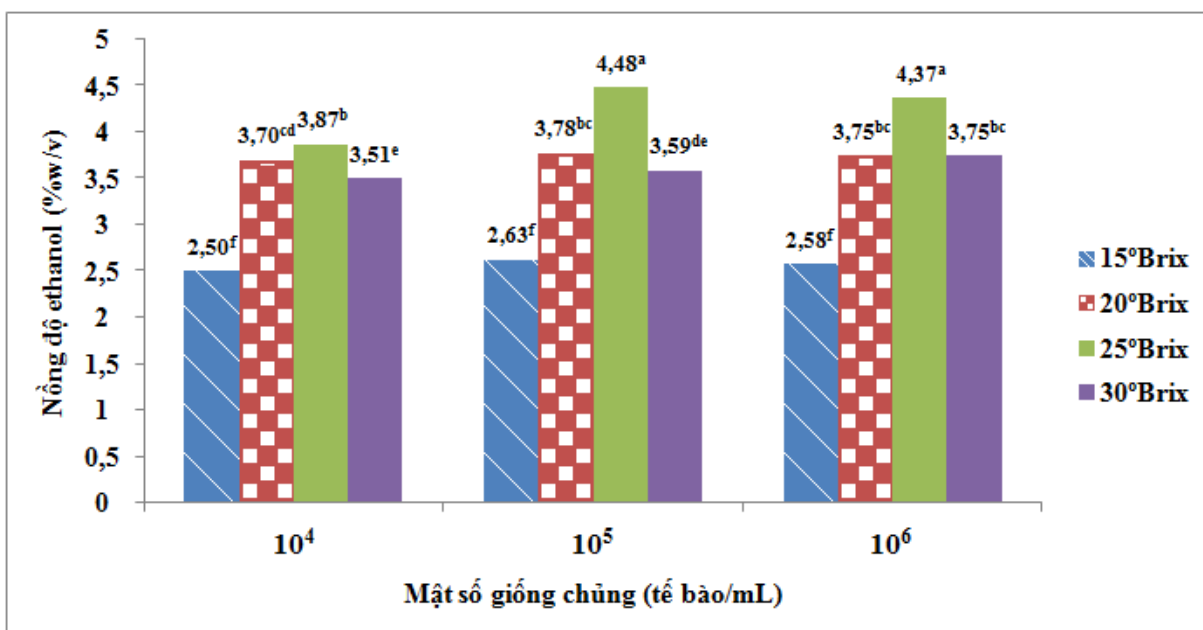
bào trong tế bào nấm men tăng cao làm ngưng trệ sự phát triển của nấm men. Vì vậy lượng ethanol sinh ra giảm khi nhiệt độ môi trường tăng.

Vì thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo sát khả năng lên men ở nhiệt độ cao của nấm men nên nhiệt độ ủ cho các thí nghiệm tiếp theo được chọn là 40°C.

#### 4.5. Các điều kiện lên men ethanol ở 40°C của dòng nấm men V2

##### 4.5.1. Ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường

Khả năng sinh ethanol của dòng nấm men V2 với mật số giống chủng và nồng độ đường khác nhau được ghi nhận qua Hình 9.



**Hình 9. Biểu đồ ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường lên nồng độ ethanol sinh ra**

**Ghi chú:** Số liệu trong biểu đồ là giá trị trung bình của 3 lần lặp. Các giá trị theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

Kết quả cho thấy hai nghiệm thức 10<sup>5</sup> tế bào/mL – 25°Brix và 10<sup>6</sup> tế bào/mL – 25°Brix cho kết quả độ rượu cao nhất (lần lượt là 4,48% và 4,37%) và không khác biệt có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. Với mật số giống chủng 10<sup>4</sup> tế bào/mL và nồng độ đường ban đầu 15°Brix thì nồng độ ethanol sinh ra là thấp nhất (2,50%). Tuy nhiên, nồng độ ethanol sinh ra ở nghiệm thức mật số cao nhất (10<sup>6</sup> tế bào/mL) và nồng độ đường cao nhất (30°Brix) lại không phải là giá trị cao nhất (3,75%). Điều này chứng tỏ, mật số giống chủng và nồng độ đường ban đầu cao sẽ làm hạn chế nhất định lượng ethanol sinh ra của nấm men.

Nhìn chung, nồng độ ethanol có xu hướng thay đổi giống nhau ở tất cả các mật số giống chủng: khi nồng độ đường tăng từ 15 tới 25°Brix thì nồng độ ethanol tương

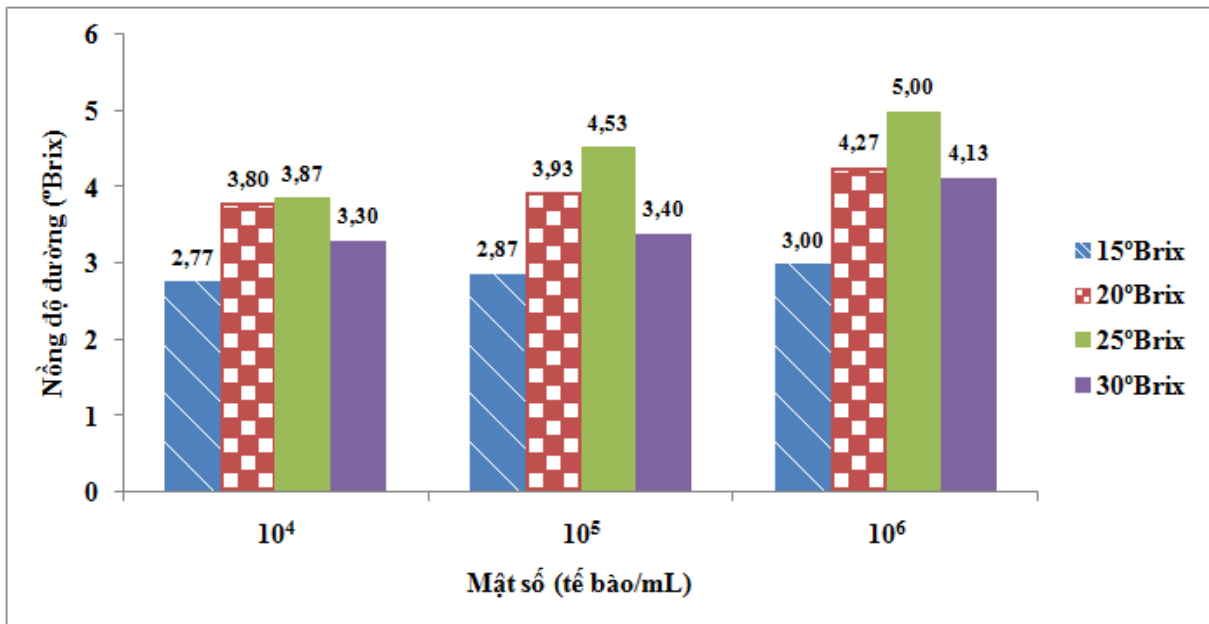
ứng tăng, nhưng khi tăng lên 30°Brix thì lượng ethanol giảm. Nồng độ ethanol luôn đạt cao nhất ở nghiệm thức 25°Brix trong cả ba trường hợp mật số giống chủng khác nhau. Nồng độ đường là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng sinh ethanol của nấm men. Nồng độ đường ban đầu thấp sẽ làm giảm năng suất lên men trong khi nồng độ dịch đường quá cao sẽ làm thay đổi áp suất thẩm thấu gây nguy hiểm đối với tế bào nấm men (Pereira et al., 2010).

Nồng độ ethanol thu được có xu hướng thay đổi giống nhau khi nồng độ đường ban đầu giống nhau, trừ trường hợp 30°Brix: nồng độ ethanol cao nhất ở nghiệm thức mật số chủng ban đầu là  $10^5$  tế bào/mL, riêng trường hợp 30°Brix thì nghiệm thức  $10^6$  tế bào/mL lại cho kết quả ethanol cao nhất. Nồng độ ethanol thu được cao nhất ở nghiệm thức 25°Brix –  $10^5$  tế bào/mL (4,48% w/v). Trong quá trình lên men, mật số giống chủng ban đầu sẽ ảnh hưởng đến nồng độ ethanol sinh ra. Khi tỷ lệ nấm men bổ sung càng cao thì tốc độ lên men ở thời gian đầu càng nhanh và có thể cản trở quá trình lên men tiếp theo (Lương Đức Phẩm, 2006).

Vậy mật số giống chủng và nồng độ đường được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo lần lượt là  $10^5$  tế bào/mL và 25°Brix.

### ***Khả năng sử dụng đường***

Nhìn chung, lượng đường sử dụng tăng theo mật số tế bào nấm men. Lượng đường sử dụng nhiều nhất là ở nghiệm thức  $10^6$  tế bào/mL – 25°Brix (5,00°Brix), tuy nhiên không phải toàn bộ lượng đường được sử dụng đều chuyển hóa thành ethanol. Do vậy nghiệm thức  $10^6$  tế bào/mL – 25°Brix không cho nồng độ ethanol cao nhất (Hình 10).



**Hình 10. Biểu đồ hàm lượng đường sử dụng trong quá trình lên men**

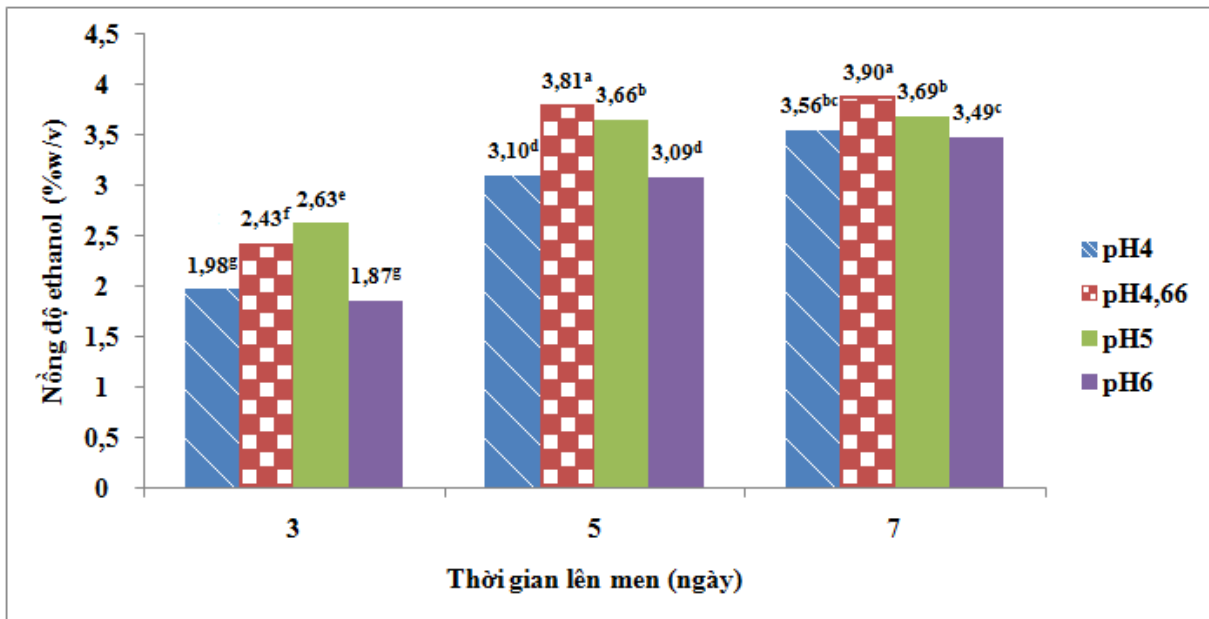
*Ghi chú: Số liệu trong biểu đồ là giá trị trung bình của 3 lần lặp.*

Tỉ lệ sử dụng đường của dòng nấm men V2 trong dịch rỉ đường không cao do trong rỉ đường có chứa rất nhiều loại đường, nấm men không thể sử dụng tất cả để chuyển hóa thành ethanol được.

#### 4.5.2. Ảnh hưởng của thời gian lên men và pH môi trường

Khả năng sinh ethanol của dòng nấm men V2 với thời gian lên men và pH khác nhau được ghi nhận qua Hình 11.

Sau 5 và 7 ngày lên men nghiệm thức pH tự nhiên (4,66) cho kết quả nồng độ ethanol cao nhất (lần lượt là 3,81% và 3,90%) và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Với 3 ngày lên men trong môi trường pH 6, dòng nấm men V2 sinh ra nồng độ ethanol thấp nhất (1,87%). Nhìn chung thời gian lên men càng lâu thì nồng độ ethanol sinh ra càng cao nhưng không có sự chênh lệch nhiều về nồng độ ethanol thu được giữa thời gian lên men 5 và 7 ngày.



**Hình 11. Biểu đồ ảnh hưởng của thời gian lên men và pH môi trường lên nồng độ ethanol sinh ra**

**Ghi chú:** Số liệu trong biểu đồ là giá trị trung bình của 3 lần lặp. Các giá trị theo sau có các mẫu tự giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%.

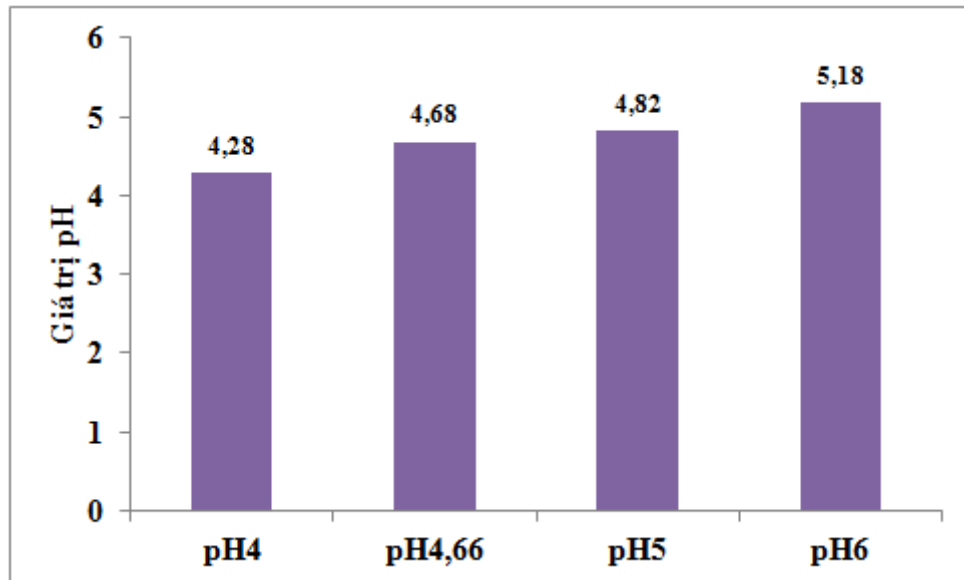
Nồng độ ethanol thu được có xu hướng giống nhau sau 5 và 7 ngày lên men: khi pH giảm từ 6 về giá trị pH tự nhiên (4,66) thì nồng độ ethanol tương ứng tăng, nhưng khi giảm xuống 4 thì lượng ethanol giảm. Nghiệm thức pH tự nhiên cho kết quả độ rượu thu được cao nhất. Nếu pH cao thì sẽ có nhiều glycerol và acid hữu cơ tạo thành làm hạn chế ethanol (Wang et al., 2001). Nếu pH thấp, hàm lượng ion  $H^+$  trong dịch lên men càng cao, tạo ra sự chênh lệch ion  $H^+$  giữa trong và ngoài tế bào, làm hạn chế sự phát triển của nấm men. Điều này chứng tỏ pH của môi trường là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các dòng nấm men.

Nồng độ ethanol thu được có xu hướng tăng khi thời gian lên men càng lâu. Thời gian lên men là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo ethanol của nấm men. Sau 3 ngày lên men thì nồng độ ethanol sinh ra thấp do thời gian đầu nấm men phát triển sinh khối, quá trình chuyển hóa đường thành ethanol diễn ra chậm. Khi tăng thời gian lên men thì nồng độ ethanol sinh ra cũng tăng theo. Nồng độ ethanol ở nghiệm thức 5 và 7 ngày ủ không khác biệt có ý nghĩa có thể là do hai nguyên nhân sau: (1) sau khi phát triển đến pha cân bằng (stationary phase), nấm men bắt đầu chuyển qua pha tử vong (death phase) làm cho quá trình lên men chậm lại; (2) lượng ethanol sinh ra đã ức chế quá trình lên men của nấm men.

Vậy thời gian và pH thích hợp cho quá trình lên men của dòng nấm men V2 trong môi trường rỉ đường ở nhiệt độ cao lần lượt là 5 ngày và pH tự nhiên (pH 4,66).

### ***Sự thay đổi của pH trong quá trình lên men***

Sự thay đổi của pH trong quá trình lên men của dòng nấm men V2 được thể hiện qua Hình 12.



**Hình 12. Giá trị pH sau khi lên men**

*Ghi chú: Số liệu trong biểu đồ là giá trị trung bình của 12 lần lặp.*

Trong nghiệm thức pH tự nhiên, giá trị pH không có sự chênh lệch lớn giữa trước (pH 4,66) và sau khi lên men (pH 4,68). Trong nghiên cứu này giá trị pH thích hợp cho quá trình lên men của dòng nấm men V2 là trong khoảng pH 4,66.



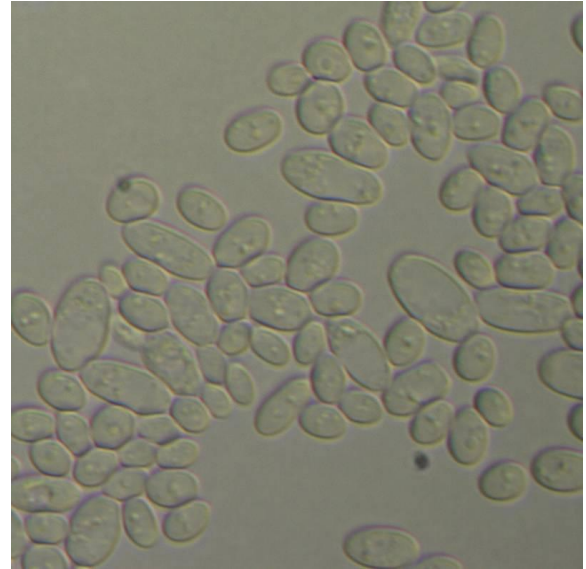
#### 4.6. Kết quả định danh dòng nấm men V2

Đặc điểm khuẩn lạc: Kích thước 3,0 – 3,5 mm, dày 0,1 mm, khuẩn lạc nổi, bề mặt sần khô, bìa răng cưa, màu trắng đục (Hình 13).

Đặc điểm thể bào: Đường kính khoảng 2,5 – 6,0  $\mu\text{m}$ , hình ovan hoặc elip, nảy chồi ở một đầu (Hình 14).

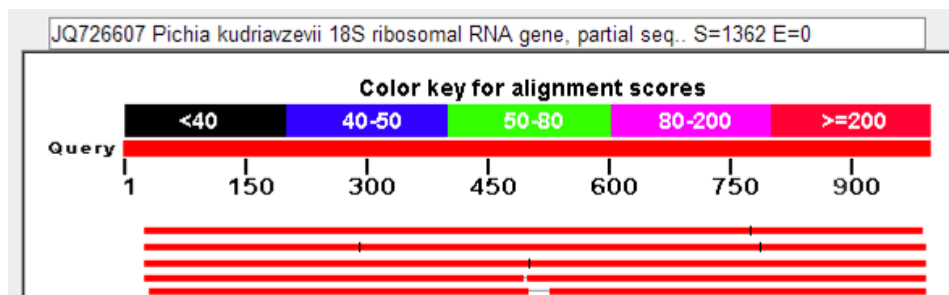


**Hình 13. Khuẩn lạc nấm men V2 trên môi trường YM agar**



**Hình 14. Tế bào nấm men V2 dưới kính hiển vi với vật kính 100X**

Kết quả cho thấy trình tự thu được của dòng nấm men V2 tương đồng với vùng ITS1, 5.8S ribosomal DNA và ITS2 của loài *Pichia kudriavzevii*, mã số (Accession number) JQ726607.1, mức độ tương đồng 100% (Hình 15). Do đó dòng V2 được xác định là loài *Pichia kudriavzevii*.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<a href="#">Pichia kudriavzevii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1362	2599	96%	0.0	100%	<a href="#">JQ726607.1</a>
<a href="#">Candida xyloperos 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	1284	2468	96%	0.0	98%	<a href="#">JQ726604.1</a>
<a href="#">Pichia kudriavzevii strain GY1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	859	1712	96%	0.0	99%	<a href="#">JQ808004.1</a>
<a href="#">Saccharomyces sp. 5B12 voucher 3C6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	857	1706	96%	0.0	99%	<a href="#">GU931323.1</a>
<a href="#">Pichia kudriavzevii strain DY1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	856	1647	93%	0.0	99%	<a href="#">JQ808005.1</a>

**Hình 15. Kết quả định danh dòng nấm men V2**

Theo Oberoi et al. (2012), loài nấm men *Pichia kudriavzevii* có thể sử dụng nhiều loại đường khác nhau: glucose, sucrose, galactose, fructose và mannose. Tế bào nấm men có thể chịu được môi trường 40% glucose và 5% NaCl nhưng bị ức chế trong môi trường 1% acid acetic và 0,01% cyclohexamide.

Năng suất lên men ethanol của nấm men *Pichia kudriavzevii* ở nhiệt độ 40°C và 45°C cao hơn nấm men *Saccharomyces cerevisiae* lần lượt là 35% và 200% (Oberoi et al., 2012).

## CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 5.1. Kết luận

- Tuyển chọn được 7 dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt tương đối cao (43°C) bao gồm: C2, CC, BM2, V2, V3, L04-2 và L07-2 từ 44 dòng nấm men thử nghiệm. Trong đó, dòng BM2 phát triển được ở nhiệt độ 44°C.

- Trong 44 dòng nấm men đã khảo sát, có 38 dòng có thể phát triển trên môi trường có bổ sung 10% ethanol. Ở mức độ 12% ethanol, có 25 dòng phát triển.

- Tuyển chọn được 7 dòng từ 44 dòng nấm men thử nghiệm có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol cao bao gồm: C2, CC, BM2, V2, V3, L04-2 và L07-2.

- Dòng V2 có khả năng lên men nhanh và mạnh trong môi trường glucose 2% hơn 6 dòng còn lại (chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> đạt 30 mm trong 20 giờ).

- Ở 40°C, trên môi trường rỉ đường, dòng V2 sản sinh ra lượng ethanol là 2,92% w/v, khác biệt không có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% so với nhiệt độ 35°C (2,93% w/v) và nhiệt độ tự nhiên (2,91% w/v).

- Điều kiện lên men tốt của dòng V2 trên môi trường rỉ đường ở 40°C là: mật số giống chủng 10<sup>5</sup> tế bào/mL, nồng độ đường ban đầu 25°Brix, thời gian lên men 5 ngày và pH 4,66.

- Dòng V2 được định danh là *Pichia kudriavzevii* với độ tương đồng 100%.

### 5.2. Đề nghị

- Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng lên men của nấm men như: hàm lượng nitơ, hàm lượng MgSO<sub>4</sub>,...

- Khảo sát khả năng lên men của dòng nấm men V2 trên các loại môi trường khác nhau: nước trái cây, nước mía,...

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

- Lương Đức Phẩm, 2006. *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
- Ngô Thị Phương Dung, 2009. Khảo sát khả năng lên men và tính chịu cồn của nấm men. *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ 11: 374-382.
- Nguyễn Hữu Tường, Nguyễn Minh Đồi, Hồ Thị Bé Hảo, Nguyễn Thị Ái Xuân, Nguyễn Ngọc Thanh và Phạm Hồng Quang, 2012. Thử nghiệm lên men ethanol ở nhiệt độ cao bằng nấm men chịu nhiệt. *Đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên cấp Trường*, Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Lâm Dũng, 1999. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục.
- Nguyễn Thị Ngọc Mai, 2011. Khảo sát khả năng lên men và tuyển chọn nấm men có khả năng chịu cồn cao. *Luận văn tốt nghiệp Đại học*, Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Vân Anh, Phạm Minh Tú, Hứa Hữu Danh, Nguyễn Bình Duy Anh, Huỳnh Xuân Phong và Ngô Thị Phương Dung, 2011. Phân lập và tuyển chọn các dòng nấm men chịu nhiệt có khả năng lên men ethanol mạnh. *Đề tài nghiên cứu khoa học sinh viên cấp Trường*, Trường Đại học Cần Thơ.
- Vũ Chí Cương, Đặng Vũ Hòa, Nguyễn Thành Trung, Đoàn Thị Khang, Graeme Mc Crabb, 2004. Nghiên cứu xác định thành phần hoá học và giá trị dinh dưỡng của ri mật. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*. 2004:1 45-48.

### Tiếng Anh

- Alfenore, S., C. Molina-Jouve, S.E. Guillouet, J.L. Uribelarrea, G. Goma and L. Benbadis. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 67-72.
- Anderson, P. J., K. McNeil, and K. Watson. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40 degrees C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 1314-1320.

- Arthur, H. and K. Watson. 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology*, 128(1): 58-68.
- Banat, I. M., P. Nigram, and R. Marchant. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 8: 259-263.
- Barron, N., R. Marchant, L. McHale and A.P. McHale. 1994. Growth of a thermotolerant ethanol-producing strain of *Kluyveromyces marxianus* on cellobiose-containing media. *Biotechnology Letter*, 16: 625-630.
- Brady, D., R. Marchant, L. McHale and A.P. McHale. 1994. Production of ethanol by the thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. *Biotechnology Letter*, 16: 737-740.
- Brady, D., R. Marchant, L. McHale and A.P. McHale. 1995. Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 696-699.
- Fleming, M., N. Barron, R. Marchant, L. McHale and A.P. McHale. 1993. Studies on the growth of a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. *Biotechnology Letter*, 16: 1195-1198.
- Fonseca, G.G., E. Heinzle, C. Wittmann, and A.K. Gombert. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 339-354.
- Ghorbani, F., H. Younesi, A. E. Sri and G. Najafpour. 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36 (2): 503-509.
- Hacking, A.J., I.W.F Taylor and C.M. Hanas. 1984. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19: 361.
- Helena da Cruz, S., M. Batistote and J.R. Ernandes. 2003. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of nitrogen source on yeast growth and fermentation. *Journal of Industrial and Brewing*, 109(4): 349-355.

- Hughes, D. B., N. J. Tudroszen, and C. J. Moye. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letter*, 6: 1-6.
- Jacobson, G.K. and S.O. Jolly. 1989. Yeasts, molds and algae. *Biotechnology*, 7: 279-314.
- Kurtzman, C.P. and J. Piškur. 2006. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. *Topics in Current Genetics*, 15: 29-46.
- Kurtzman, C.P. and J.W. Fell. 1997. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company.
- Larue, F., S. Lafon-Lafourcade and P. Ribéreau-Gayon. 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 808.
- Lee, J.H., D. Williamson and P.L. Rogers. 1980. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by *Saccharomyces uvarum*. *Biotechnology Letter*, 2(4): 141-146.
- McCracken, L.D. and C.S. Gong. 1982. Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeasts. *Biotechnology Bioengineering*, 25: 253-300.
- Navarro, J.M. and G. Durand. 1978. Alcohol fermentation: effect of temperature on ethanol accumulation within yeast cells. *Annals of Microbiology*, 129B: 215-224.
- Nonklang S., B.M. A. Abdel-Banat, K. Cha-aim, N. Moonjai, H. Hoshida, S. Limtong, M. Yamada and R. Akada. 2008. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24): 7514-7521.
- Norr, A.A., A. Hameed, K.P. Bhatti, and S.A. Tunio. 2003. Bio-ethanol fermentation by the bioconversion of sugar from dates by *Saccharomyces cerevisiae* strain ASN-3 and HA-4. *Biotechnology*, 2(1): 8-17.
- Oberoi, H.S., N. Babbar, S.K. Sandhu, S.S. Dhaliwal, U. Kaur, B.S. Chadha and V.K. Bhargava. 2012. Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated

- thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(4): 557-566.
- Pecota, D. C., V. Rajgarhia, and N. A. Da Silva. 2007. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Biotechnol*, 127:408-416.
- Pereira, F.B., P.M.R. Guimarães, J.A. Teixeira and L. Domingues. 2010. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 101: 7856-7863.
- Roehr, M. 2001. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. Chichester: Wiley-VCH, pp. 232
- Sripiromrak, A. 2006. Isolation and characterization of thermotolerant yeast for ethanol production. Thesis of Master of Science in Biotechnology. Suranaree University of Technology. Thailand.
- Toriya, M.J., N. Rozes, M. Poblet, J.M. Guillamon, and A. Mas. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 47-53.
- Wang, Z.X., J. Zhuge, H. Fang and B.A. Prior. 2001. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances*, 19: 201-223.

**Trang web:**

<http://envis.kuenvbiotech.org/fungi.htm> (ngày 21/04/2013)

[http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces\\_cerevisiae\\_Alt](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces_cerevisiae_Alt) (ngày 21/04/2013)

<http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/nammen01.htm> (ngày 21/04/2013)

<http://vietsciences.free.fr/lichsu/kinhhienvi.htm> (ngày 18/04/2013)

[http://visualphotos.com/image/1x3745113/kluyveromyces\\_lactis\\_yeast\\_cell\\_kluyveromyces](http://visualphotos.com/image/1x3745113/kluyveromyces_lactis_yeast_cell_kluyveromyces) (ngày 21/04/2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (ngày 06/05/2013)

<http://www.syadh.com/vb/imgcache8/3923.imgcache.jpg> (ngày 20/04/2013)

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1. Hình ảnh các thiết bị sử dụng trong phòng thí nghiệm



**Cân phân tích**



**Hệ thống chưng cất rượu**



**Khúc xạ kế**



**Kính hiển vi**



**Máy vortex**

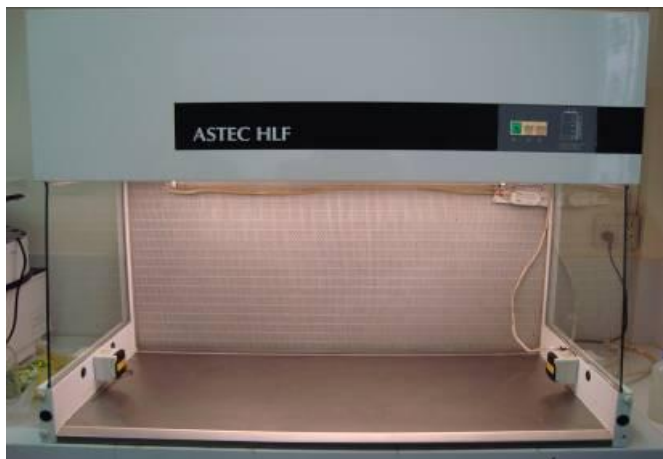


**Nồi khử trùng nhiệt ướt**





**pH kế**



**Tủ cấy**



**Tủ ủ**



**Water bath**

**Phụ lục 2. Số liệu kết quả thí nghiệm****Bảng 6. Kết quả khảo sát lên men đường glucose**

Dòng nấm men	Lần lặp	Chiều cao cột khí CO <sub>2</sub> (mm)				
		8 giờ	12 giờ	16 giờ	20 giờ	24 giờ
C2	1	1	4	10	22	30
C2	2	1	6	11	20	30
C2	3	1	4	9	19	30
CC	1	1	5	11	20	30
CC	2	1	5	10	20	30
CC	3	1	6	11	30	30
BM2	1	1	5	8	22	30
BM2	2	1	4	10	20	26
BM2	3	1	3	11	18	26
V2	1	2	9	21	30	30
V2	2	2	9	20	30	30
V2	3	2	10	21	30	30
V3	1	0	3	8	19	28
V3	2	1	4	8	17	27
V3	3	1	4	9	20	28
L04-2	1	0	6	12	26	30
L04-2	2	1	5	11	23	30
L04-2	3	1	12	24	25	30
L07-2	1	0	4	11	28	30
L07-2	2	0	3	10	26	30
L07-2	3	0	5	11	28	30

**Bảng 7. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ**

Nhiệt độ (°C)	Lần lặp	Nồng độ đường trước lên men (°Brix)	Nồng độ đường sau lên men (°Brix)	Nồng độ ethanol ở 20°C (%w/v)
26 – 34	1	20	16,2	2,83
26 – 34	2	20	16,2	2,90
26 – 34	3	20	16,2	2,99
35	1	20	16,2	3,07
35	2	20	16,2	2,89
35	3	20	16,2	2,83
40	1	20	16,2	2,70
40	2	20	16,2	3,17
40	3	20	16,2	2,89
45	1	20	18,5	0,65
45	2	20	19	0,95
45	3	20	18,5	0,65

**Bảng 8. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của mật số giống chủng và hàm lượng đường**

Mật số – Nồng độ đường (tế bào/mL) (°Brix)	Lần lặp	Nồng độ đường sau lên men (°Brix)	Lượng đường sử dụng (°Brix)	Nồng độ ethanol ở 20°C (% w/v)
10 <sup>6</sup> – 15	1	12,5	2,5	2,45
10 <sup>6</sup> – 15	2	12,0	3,0	2,53
10 <sup>6</sup> – 15	3	12,2	2,8	2,53
10 <sup>6</sup> – 20	1	16,2	3,8	3,57
10 <sup>6</sup> – 20	2	16,2	3,8	3,77
10 <sup>6</sup> – 20	3	16,2	3,8	3,77
10 <sup>6</sup> – 25	1	21,2	3,8	3,87
10 <sup>6</sup> – 25	2	21,4	3,6	3,87
10 <sup>6</sup> – 25	3	20,8	4,2	3,87
10 <sup>6</sup> – 30	1	26,2	3,5	3,64
10 <sup>6</sup> – 30	2	27,0	3,0	3,24
10 <sup>6</sup> – 30	3	26,6	3,4	3,64
10 <sup>7</sup> – 15	1	12,4	2,6	2,63
10 <sup>7</sup> – 15	2	12,0	3,0	2,63
10 <sup>7</sup> – 15	3	12,0	3,0	2,63
10 <sup>7</sup> – 20	1	16,2	3,8	3,77
10 <sup>7</sup> – 20	2	16,0	4,0	3,79
10 <sup>7</sup> – 20	3	16,0	4,0	3,79
10 <sup>7</sup> – 25	1	21,0	4,0	4,44
10 <sup>7</sup> – 25	2	20,2	4,8	4,54
10 <sup>7</sup> – 25	3	20,2	4,8	4,47
10 <sup>7</sup> – 30	1	26,6	3,4	3,51
10 <sup>7</sup> – 30	2	27,0	3,0	3,57
10 <sup>7</sup> – 30	3	26,5	3,8	3,69
10 <sup>8</sup> – 15	1	12,0	3,0	2,55
10 <sup>8</sup> – 15	2	12,0	3,0	2,6
10 <sup>8</sup> – 15	3	12,0	3,0	2,6
10 <sup>8</sup> – 20	1	15,8	4,2	3,79
10 <sup>8</sup> – 20	2	15,8	4,2	3,79
10 <sup>8</sup> – 20	3	15,6	4,4	3,68
10 <sup>8</sup> – 25	1	20,0	5,0	4,37
10 <sup>8</sup> – 25	2	20,0	5,0	4,37
10 <sup>8</sup> – 25	3	20,0	5,0	4,37
10 <sup>8</sup> – 30	1	25,4	4,6	3,79
10 <sup>8</sup> – 30	2	25,0	3,0	3,68
10 <sup>8</sup> – 30	3	25,2	4,8	3,79

**Bảng 9. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men và pH của môi trường**

<b>Thời gian lên men – pH môi trường (ngày)</b>	<b>Lần lặp</b>	<b>Giá trị pH sau lên men</b>	<b>Nồng độ ethanol ở 20°C (%w/v)</b>
3 – Tự nhiên (pH4,66)	1	4,69	2,33
3 – Tự nhiên (pH4,66)	2	4,71	2,63
3 – Tự nhiên (pH4,66)	3	4,66	2,33
3 – pH4	1	4,28	2,03
3 – pH4	2	4,30	1,87
3 – pH4	3	4,27	2,03
3 – pH5	1	4,90	2,53
3 – pH5	2	4,93	2,63
3 – pH5	3	4,84	2,73
3 – pH6	1	5,31	1,87
3 – pH6	2	5,17	1,87
3 – pH6	3	5,17	1,87
5 – Tự nhiên (pH4,66)	1	4,69	3,79
5 – Tự nhiên (pH4,66)	2	4,69	3,79
5 – Tự nhiên (pH4,66)	3	4,63	3,85
5 – pH4	1	4,26	3,09
5 – pH4	2	4,28	3,11
5 – pH4	3	4,24	3,11
5 – pH5	1	4,79	3,59
5 – pH5	2	4,69	3,69
5 – pH5	3	4,82	3,69
5 – pH6	1	5,13	3,09
5 – pH6	2	5,06	3,09
5 – pH6	3	5,12	3,09
7 – Tự nhiên (pH4,66)	1	4,71	3,87
7 – Tự nhiên (pH4,66)	2	4,68	3,87
7 – Tự nhiên (pH4,66)	3	4,67	3,95
7 – pH4	1	4,31	3,59
7 – pH4	2	4,26	3,59
7 – pH4	3	4,36	3,59
7 – pH5	1	4,81	3,69
7 – pH5	2	4,84	3,69
7 – pH5	3	4,78	3,69
7 – pH6	1	5,19	3,49
7 – pH6	2	5,20	3,49
7 – pH6	3	5,23	3,49

### Phụ lục 3. Kết quả phân tích thống kê

**Bảng 10. Phân tích ANOVA khả năng lên men glucose 2% sau 8 giờ**

**ANOVA Table for Sau 8 gio by Dong nam men**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6.47619	6	1.07937	11.33	0.0001
Within groups	1.33333	14	0.0952381		
Total (Corr.)	7.80952	20			

**Multiple Range Tests for Sau 8 gio by Dong nam men**

Method: 95.0 percent LSD

Dong nam men	Count	Mean	Homogeneous Groups
L07-2	3	0.0	X
V3	3	0.666667	X
L04-2	3	0.666667	X
BM2	3	1.0	X
CC	3	1.0	X
C2	3	1.0	X
V2	3	2.0	X

**Bảng 11. Phân tích ANOVA khả năng lên men glucose 2% sau 12 giờ**

**ANOVA Table for Sau 12 gio by Dong nam men**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	83.9048	6	13.9841	5.24	0.0051
Within groups	37.3333	14	2.66667		
Total (Corr.)	121.238	20			

**Multiple Range Tests for Sau 12 gio by Dong nam men**

Method: 95.0 percent LSD

Dong nam men	Count	Mean	Homogeneous Groups
V3	3	3.66667	X
BM2	3	4.0	X
L07-2	3	4.0	X
C2	3	4.66667	X
CC	3	5.33333	XX
L04-2	3	7.66667	XX
V2	3	9.33333	X

**Bảng 12. Phân tích ANOVA khả năng lên men glucose 2% sau 16 giờ**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	343.81	6	57.3016	7.04	0.0013
Within groups	114.0	14	8.14286		
Total (Corr.)	457.81	20			

**Multiple Range Tests for Sau 16 gio by Dong nam men**

Method: 95.0 percent LSD

Dong nam men	Count	Mean	Homogeneous Groups
V3	3	8.33333	X
BM2	3	9.66667	X
C2	3	10.0	X
CC	3	10.6667	X
L07-2	3	10.6667	X
L04-2	3	15.6667	X
V2	3	20.6667	X

**Bảng 13. Phân tích ANOVA khả năng lên men glucose 2% sau 20 giờ**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	311.905	6	51.9841	7.97	0.0007
Within groups	91.3333	14	6.52381		
Total (Corr.)	403.238	20			

**Multiple Range Tests for Sau 20 gio by Dong nam men**

Method: 95.0 percent LSD

Dong nam men	Count	Mean	Homogeneous Groups
V3	3	18.6667	X
BM2	3	20.0	XX
C2	3	20.3333	XXX
CC	3	23.3333	XXX
L04-2	3	24.6667	XX
L07-2	3	27.3333	XX
V2	3	30.0	X

**Bảng 14. Phân tích ANOVA khả năng lên men glucose 2% sau 24 giờ**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	26.9524	6	4.49206	5.55	0.0039
Within groups	11.3333	14	0.809524		
Total (Corr.)	38.2857	20			

**Multiple Range Tests for Sau 24 gio by Dong nam men**

Method: 95.0 percent LSD

Dong nam men	Count	Mean	Homogeneous Groups
BM2	3	27.3333	X
V3	3	27.6667	X
CC	3	30.0	X
L07-2	3	30.0	X
V2	3	30.0	X
L04-2	3	30.0	X
C2	3	30.0	X

**Bảng 15. Phân tích ANOVA ảnh hưởng của nhiệt độ**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10.585	3	3.52833	130.76	0.0000
Within groups	0.215867	8	0.0269833		
Total (Corr.)	10.8009	11			

**Multiple Range Tests for Nong do ethanol by Nhiet do**

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
45°C	3	0.75	X
Tu nhien	3	2.90667	X
40°C	3	2.92	X
35°C	3	2.93	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
35°C - 40°C		0.01	0.309288
35°C - 45°C	*	2.18	0.309288
35°C - Tu nhien		0.0233333	0.309288
40°C - 45°C	*	2.17	0.309288
40°C - Tu nhien		0.0133333	0.309288
45°C - Tu nhien	*	-2.15667	0.309288

\* denotes a statistically significant difference.

**Bảng 16. Phân tích ANOVA ảnh hưởng của mật số giống chủng và nồng độ đường**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	14.0579	11	1.27799	172.57	0.0000
Within groups	0.177733	24	0.00740556		
Total (Corr.)	14.2357	35			

**Multiple Range Tests for Nong do ethanol by Mat so va Nong do duong**

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
10 <sup>4</sup> - 15	3	2.50333	X
10 <sup>6</sup> - 15	3	2.58333	X
10 <sup>5</sup> - 15	3	2.63	X
10 <sup>4</sup> - 30	3	3.50667	X
10 <sup>5</sup> - 30	3	3.59	XX
10 <sup>4</sup> - 20	3	3.70333	XX
10 <sup>6</sup> - 20	3	3.75333	XX
10 <sup>6</sup> - 30	3	3.75333	XX
10 <sup>5</sup> - 20	3	3.78333	XX
10 <sup>4</sup> - 25	3	3.87	X
10 <sup>6</sup> - 25	3	4.37	X
10 <sup>5</sup> - 25	3	4.48333	X

**Bảng 17. Phân tích ANOVA ảnh hưởng của thời gian lên men và pH của môi trường**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	16.8063	11	1.52784	<b>312.51</b>	<b>0.0000</b>
Within groups	0.117333	24	0.00488889		
Total (Corr.)	16.9236	35			

**Multiple Range Tests for Nồng độ ethanol by Thời gian và pH**

Method: 95.0 percent LSD

Thời gian và pH	Count	Mean	Homogeneous Groups
3 - 6	3	1.87	X
3 - 4	3	1.97667	X
3 - 4,66	3	2.43	X
3 - 5	3	2.63	X
5 - 6	3	3.09	X
5 - 4	3	3.10333	X
7 - 6	3	3.49	X
7 - 4	3	3.55667	XX
5 - 5	3	3.65667	XX
7 - 5	3	3.69	X
5 - 4,66	3	3.81	X
7 - 4,66	3	3.89667	X

**Phụ lục 4. Trình tự chuỗi polypeptides dòng nấm men V2**

(5')AGAGGTCGTCCCCCGGTAGGATAGTCTCCTACACTGCGTGAGCGGACG  
 AAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAA  
 ATCTACGAAAAAACAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGC  
 ATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCAT  
 CGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGCATTCCGGGG  
 GGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCGCGTGCGCAGAGTTGGGG  
 GAGCGGAGCGGACGACGTGTAAGAGCGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAA  
 AGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTCAGGGACGCTTGG  
 CGGCCGAGAGCGAGTGTTGCGAGACAACAAAAGCTCGACCTCAAATCAG  
 GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGRAAAAGGAT  
 CATTACTGTGATTTACTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAACAAC  
 ACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAA  
 AACAAACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGA  
 GCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATC  
 GAGTTCTTGAACGCNCATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTT  
 TGAGCGTCGTTTCATCTTGCGCGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGA  
 CGACGTGTAAGAGCGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCGAAGC  
 TGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTCAGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGA  
 GTGTTGCGAGACAACAAAAGCTCGACCTCAAATCAGTAGGAAATACCCG  
 CTGAACTTAAGCATATCAATTAAGGCGGGAGGGAA(3')