



## ISOLATION OF YEAST STRAINS WITH HIGH PROLIFERATION ABILITY FROM FOOD SAMPLES IN SON DUONG DISTRICT, TUYEN QUANG PROVINCE

Vi Dai Lam<sup>1,\*</sup>, Bui Dinh Lam<sup>1</sup>, Luu Hong Son<sup>1</sup>, Nguyen Thi Tinh<sup>1</sup>, Ta Thi Luong<sup>1</sup>, Pham Thi Ngoc Mai<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Vietnam

\*Email address: [vidailam@tuaf.edu.vn](mailto:vidailam@tuaf.edu.vn)

<http://doi.org/10.51453/2354-1431/2021/575>

---

### Article info

Received: 27/5/2021

Accepted: 05/7/2021

---

### Keywords:

yeasts; isolation;  
*Trichosporon asahii*;  
*Saccharomyces cerevisiae*; application.

---

### Abstract:

Yeasts are eukaryotic, single - celled microorganisms with many applications in life. The fermentation products, such as wine, bread, feed, always require yeasts strains possessing high ability in proliferation and fermentation. Following Zerihun Tsegaye's isolation methods and identification with sequencing, there are two yeast strains with high proliferating ability are isolated from food products in Son Duong district, Tuyen Quang province. The strain *Trichosporon Asahi* is the potential to become a good model organism in molecular biology researches and medicine. The strain *Saccharomyces cerevisiae* can increase the size of dough in bread making, show the potential to be able to apply into production processes.

---



## PHÂN LẬP CÁC CHỦNG NẤM MEN CÓ KHẢ NĂNG TĂNG SINH CAO TỪ MỘT SỐ MẪU THỰC PHẨM TẠI HUYỆN SƠN DƯƠNG, TỈNH TUYÊN QUANG

Vi Đại Lâm<sup>1,\*</sup>, Bùi Đình Lâm<sup>1</sup>, Lưu Hồng Sơn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Tình<sup>1</sup>, Tạ Thị Lượng<sup>1</sup>, Phạm Thị Ngọc Mai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, Việt Nam

\*Địa chỉ email: [vidailam@tuaf.edu.vn](mailto:vidailam@tuaf.edu.vn)

<http://doi.org/10.51453/2354-1431/2021/575>

### Thông tin bài viết

Ngày nhận bài: 27/5/2021

Ngày duyệt đăng: 05/7/2021

### Từ khóa:

*nấm men; phân lập; Trichosporon asahii; Saccharomyces cerevisiae; ứng dụng.*

### Tóm tắt

Nấm men là loại vi sinh vật nhân thực đơn bào có nhiều ứng dụng trong sản xuất. Những sản phẩm từ quá trình lên men như rượu, bánh mì, thức ăn chăn nuôi luôn đòi hỏi những chủng nấm men có hoạt tính tốt, khả năng tăng sinh cao. Bằng các phương pháp phân lập nấm men của Zerihun Tsegaye, phương pháp định danh nấm men đã phân lập và xác định được 2 loài nấm men có khả năng tăng sinh tốt từ các mẫu thực phẩm tại huyện Sơn Dương, tỉnh Tuyên Quang. Chủng *Trichosporon asahii* có khả năng là sinh vật mô hình cho các nghiên cứu sinh học phân tử và y học. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng tăng kích thước bột nhào bánh mì, cho thấy tiềm năng có thể được ứng dụng vào thực tế sản xuất.

### 1. Mở đầu

Nấm men là những sinh vật sản xuất có khả năng cung cấp nhiều chất dinh dưỡng và hợp chất sinh học bền vững khi nuôi cấy trên quy mô công nghiệp. Trong nghiên cứu, nấm men là một vector chuyển gene với nhiều điểm tương đồng với các tế bào nhân thực bậc cao. Nhiều ngân hàng vi sinh vật được xây dựng để lưu giữ các dòng vi sinh vật nói chung và nấm men nói riêng nhằm phục vụ cho nghiên cứu và sản xuất. Việc mở rộng và tăng số lượng các chủng thuần cho các ngân hàng là nhiệm vụ quan trọng để đáp ứng nhu cầu liên tục từ các hoạt động thực tiễn sản xuất, phục vụ cho các nhu cầu đa dạng và luôn thay đổi của thị trường.

Khả năng tăng sinh luôn là một trong các tiêu chí đánh giá quan trọng khi chọn lọc các chủng nấm men. Số lượng tế bào nấm men đủ lớn sẽ rút ngắn thời gian ủ với các nguyên liệu, tăng khả năng cạnh tranh vị trí bám và nguồn dinh dưỡng. Những

loài nấm men được sử dụng trong công nghệ thực phẩm và thức ăn chăn nuôi gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Candida utilis* đã cho thấy ưu thế cạnh tranh và ưu thế sản xuất của chủng nấm men có khả năng tăng nhanh số lượng tế bào.

Ngoài khả năng lên men, bản thân sinh khối nấm men là nguồn protein dồi dào. Trong nhiều loại thực phẩm, sinh khối nấm men có vai trò quan trọng trong những chỉ tiêu về hàm lượng dinh dưỡng, đánh giá cảm quan. Trong thức ăn chăn nuôi, sinh khối nấm men cũng được bổ sung để làm giàu giá trị dinh dưỡng. Vì vậy, những chủng nấm men tăng sinh mạnh thường là đối tượng quan tâm của nhiều hướng nghiên cứu. Những chủng nấm men hoang dại được phân lập không ngừng và tối ưu hóa nhằm mở rộng khả năng ứng dụng trong thực tiễn sản xuất[2] [6].

## 2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Nguyên vật liệu

Các mẫu cam, quýt, chuối và mẫu nước mía tại xã Tú Thịnh, huyện Sơn Dương, tỉnh Tuyên quang được thu nhận ngẫu nhiên theo phương pháp của Tika B. Karki và cộng sự [5]. Trong trường hợp không thể tiến hành phân lập ngay sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm, mẫu được bảo quản độc lập tại phòng thí nghiệm khoa Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên ở nhiệt độ 3-5<sup>0</sup>C, thời gian 2-3 ngày. Những mẫu phân hủy có nhiều nấm mốc không được sử dụng trong nghiên cứu này.

### Phân lập nấm men

Nấm men trong các mẫu thực phẩm được phân lập theo phương pháp của Zerihun Tsegaye và cộng sự [7]. Trái cây được rửa vài lần bằng nước cất để loại bỏ các bụi bẩn hoặc dị vật bên ngoài. Mẫu được cắt nhỏ thành các khối 2-3 cm, nuôi cấy tăng sinh trong ống nghiệm vô trùng chứa 5ml môi trường YEPD (Yeast Extract Peptone-Dextrose). Hỗn hợp được ủ trong tủ ấm, nhiệt độ 30<sup>0</sup>C, thời gian 48h.

Hỗn hợp dung dịch trái cây được pha loãng theo dãy thập phân thành các dung dịch có độ pha loãng 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>. Mỗi độ pha loãng được cấy trái lên các đĩa petri chứa môi trường YEPD bổ sung kháng sinh chloramphenicol (100 mg/L), nuôi cấy ở 30<sup>0</sup>C trong 48h [1].

Các khuẩn lạc có thể phát triển trên môi trường kháng sinh chọn lọc được cấy ria tinh sạch và cấy truyền, lưu giữ ở điều kiện 4<sup>0</sup>C.

### Đánh giá hình thái các chủng nấm men

Tế bào từ các khuẩn lạc sau quá trình tinh sạch được quan sát dưới kính hiển vi với vật kính 40X. Hình thái tế bào được mô tả theo phương pháp của Zerihun Tsegay [7]. So sánh hình thái các tế bào phân lập được với những mô tả đặc trưng về hình thái của nấm men.

### Đánh giá hình thái khuẩn lạc nấm men

Khuẩn lạc những chủng thu nhận được trên môi trường YEPD được mô tả về các đặc điểm hình dạng, màu sắc, bề mặt, gờ. Những mô tả này được sử dụng như một trong các căn cứ để nhận diện nấm men.

### Đánh giá khả năng tăng sinh của các chủng phân lập

Các chủng thu nhận được sau cấy ria và chủng nấm men thương mại *Saccharomyces cerevisiae* (đối chứng) được nuôi cấy trong môi trường YEPD lỏng, nuôi cấy ở 30<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 180 rpm. Số lượng tế bào của mỗi chủng được xác định bằng buồng đếm hồng cầu sau 24h nuôi cấy [3] [5].

### Đánh giá khả năng sinh khí CO<sub>2</sub>

Chủng nấm men có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất thực tiễn thường có khả năng sinh khí CO<sub>2</sub> mạnh. Trong sản xuất bánh mỳ khí CO<sub>2</sub> làm nở bột nhào, làm tăng kích thước và tạo cấu trúc hấp dẫn cho bánh mỳ.

Trong thí nghiệm này, chủng nấm men sau phân lập được nuôi lắc trong 100 ml dung dịch YEPD lỏng, nuôi cấy ở 30<sup>0</sup>C, tốc độ lắc 180 rpm, thời gian 24h. Tiến hành ly tâm thu cặn tế bào nấm men, tái huyền phù bằng nước lọc, phối trộn với bột mỳ, sử dụng máy khuấy cầm tay cho tới khi bột nhào có độ dai và đàn hồi thích hợp. Ủ bột nhào trong điều kiện thường, đánh giá sự thay đổi kích thước của khối bột nhào theo thời gian.

### Định danh

Các chủng thu nhận được có các đặc điểm phù hợp với những mô tả lý thuyết về nấm men, đồng thời có khả năng tăng sinh tốt, được tách chiết nucleic acid và giải trình tự bởi Trung tâm xét nghiệm kỹ thuật cao KTEST (Bình Chánh, thành phố Hồ Chí Minh) bằng phương pháp giải trình tự Sanger vùng ITS1 và ITS2. Trình tự gene được so sánh với các cơ sở dữ liệu di truyền của các chủng nấm men để định danh loài.

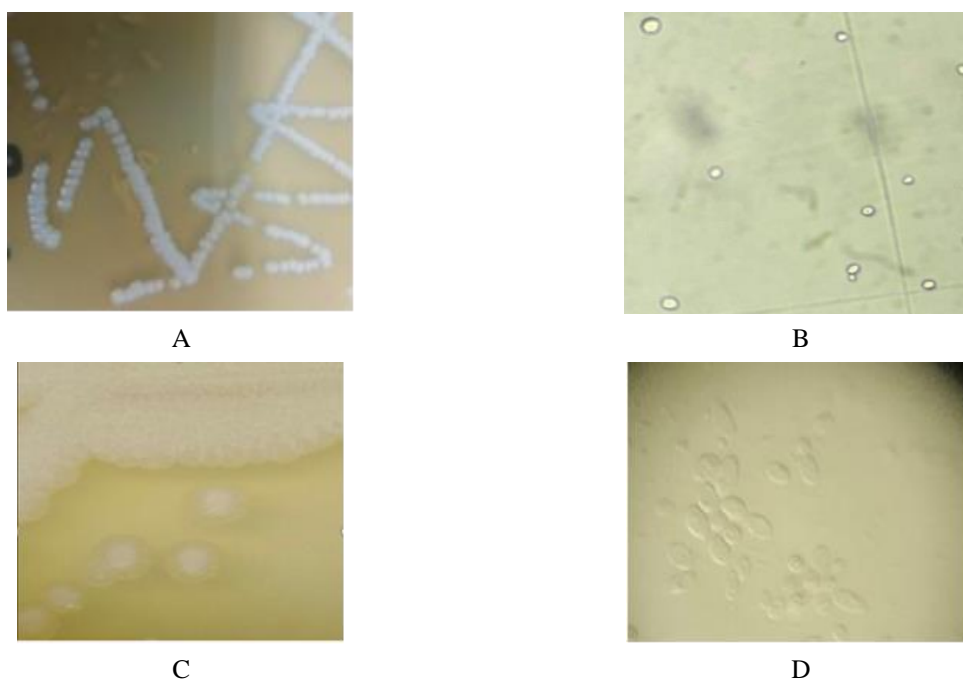
### Bảo quản và giữ giống

Mẫu nấm men sau định danh được cấy chuyển vào ống nghiệm thạch nghiêng chứa môi trường YEPD. Những mẫu này sẽ được nuôi cấy trong tủ ấm trong khoảng 24 giờ để tiếp tục tăng sinh, cất giữ ở 4<sup>0</sup>C.

## 3. Kết quả nghiên cứu

### Phân lập nấm men

Từ các mẫu thực phẩm thu nhận được 20 chủng vi sinh vật trên môi trường kháng sinh chọn lọc YEPD. Điều này cho thấy 20 chủng vi sinh vật thu nhận được thuộc nhóm vi sinh vật nhân thực, hoạt động của ribosome không bị ảnh hưởng bởi kháng sinh Chloramphenicol.



Hình 1: Phân lập nấm men từ mẫu thực phẩm

- A: Hình thái khuẩn lạc chủng Q
- B: Hình thái tế bào chủng Q
- C: Hình thái khuẩn lạc chủng C
- D: Hình thái tế bào chủng C

Trong đó 02 chủng thu nhận từ mẫu chuối (Ký hiệu: C) và mẫu quýt (ký hiệu: Q) có tốc độ tăng sinh nhanh, tạo thành khuẩn lạc có thể quan sát được bằng mắt thường sau 15-20 giờ nuôi cấy trên môi trường thạch (Hình 1). Khuẩn lạc chủng Q có màu trắng sữa, hình tròn, trơn bóng, gờ nhẵn trong khi chủng C cho khuẩn lạc màu trắng đục, bề mặt khô, nhẵn, không chia thùy (Hình 1A, 1C). Tế bào có hình ovan hoặc hình cầu (Hình 1B, 1D). Đặc điểm này phù hợp với các mô tả lý thuyết về nấm men.

**Đánh giá khả năng tăng sinh của các chủng phân lập**

Các chủng C, Q và nấm men thương mại (TM) được nuôi cấy trong môi trường YEPD lỏng ở 30°C, 24h, đếm bằng buồng đếm hồng cầu (Bảng 1).

**Bảng 1: Xác định nồng độ tế bào các chủng phân lập**

| Chủng | Nồng độ tế bào/ml  |
|-------|--------------------|
| TM    | $1,18 \times 10^8$ |
| C     | $1,42 \times 10^8$ |
| Q     | $2,16 \times 10^8$ |

Kết quả cho thấy, sau 24h nuôi cấy chủng nấm men thương mại đạt nồng độ  $1,18 \times 10^8$  tế bào/ml, nồng độ chủng C đạt  $1,42 \times 10^8$  tế bào/ml và chủng Q đạt  $2,16 \times 10^8$  tế bào/ml. Nồng độ chủng Q và C cao hơn chủng nấm men đối chứng, trong đó chủng

Q có khả năng tăng sinh tốt nhất. Vì vậy chủng Q và C là những đối tượng tiềm năng cho các hướng nghiên cứu sản xuất sinh khối nấm men.

**Định danh**

Hai chủng Q và C được định danh bằng phương pháp giải trình tự Sanger bởi Trung tâm xét nghiệm kỹ thuật cao KTEST. Kết quả cho thấy chủng C được xác định thuộc chi *Trichosporon asahii*. Những nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng các loài *Trichosporon* có thể được phân lập từ môi trường hoặc từ mẫu bệnh phẩm. Đây là loài nấm men gây bệnh cơ hội trên những bệnh nhân suy giảm miễn dịch. Những trường hợp nhiễm *Trichosporon spp* thường gặp nhiều khó khăn do những thông tin về những loại nấm gây bệnh này còn hạn chế. Vì vậy cần tiếp tục đẩy mạnh nghiên cứu trong tương lai [4].

Chủng Q thuộc loài *Saccharomyces cerevisiae*. Trình tự các nucleotide như sau:

```
TTTTTTTTGTTTTTKGCMAGARSMWKAGA
GMYTTTWMTKGGSMAGAAGACMAGAGAW
KGAGARKYCMRSCSGGSCYGCGBYTAAGTG
CGCGGTTYTKSTWRGSYTGTAARTTTTTTY
TTKSTAWTCCAAAMGGTGAGAGRTTTTTGK
GSYTTTGTWTARGRCAAWTWAAAMCSKT
TYMAWACAACACMCYGGKGRGKTTTTYMW
ATTTTTKSMAMYTTTTTTTTGGGSHWTYGR
```

RSMAWYGGGGCCCAGRRGKTAACMAACAC  
 AAACAATTTTATYTATTCATTAATTTTTGT  
 CAAAAACAAGAATTTTYGTAAGTGGAAATT  
 TAAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGAT  
 CTCTTGGTTCTCGCATY GATGAAGAACGCA  
 GCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAG  
 AATTCCGTGAATCATYGAATCTTKGAACGC  
 ACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCA  
 WGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAA  
 CATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTTTTG  
 GAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATT  
 GGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGTTTCT  
 CTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGG

TCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATC  
 TTTTTATACTGAGCG

*Saccharomyces cerevisiae* là loài nấm men có nhiều ứng dụng như sản xuất bánh mì, rượu, bia. Cùng *E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae* là loài vi sinh vật thứ 2 được sử dụng như những mô hình nghiên cứu trong di truyền học, sinh học phân tử. Vì vậy, chủng Q được lựa chọn cho thử nghiệm theo định hướng ứng dụng vào thực tiễn sản xuất.

#### Đánh giá khả năng sinh khí CO<sub>2</sub>

Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được phân lập từ mẫu quýt được thử nghiệm trên khối bột nhào. Sau 5h, thể tích bột nhào có sự thay đổi thay đổi rõ rệt (Hình 2).



A

B

C

A- Bổ sung chủng nấm men gây bệnh cơ hội

B- Bổ sung chủng *Saccharomyces cerevisiae* thu nhận từ mẫu quýt

C- Không bổ sung nấm men

Hình 2: Thử nghiệm khả năng sinh khí CO<sub>2</sub> làm nở bột nhào

Khối bột nhào bổ sung chủng nấm men gây bệnh cơ hội không có sự thay đổi thể tích đáng kể, có kích thước tương đương khối bột nhào không bổ sung nấm men (Hình 2A, 2C). Khối bột nhào có bổ sung chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thu nhận từ mẫu quýt có thể tích lớn nhất, bề mặt khối bột mịn, mềm, có màu trắng sáng. Điều này cho thấy chủng *Saccharomyces cerevisiae* mới thu nhận có thể được ứng dụng trong sản xuất bánh mì hoặc làm các mô hình thử nghiệm theo hướng cải tạo giống nhằm nâng cao hiệu suất chủng nấm men trong lĩnh vực Công nghệ thực phẩm.

#### 4. Kết luận

Đã phân lập thành công 02 chủng nấm men từ các mẫu thực phẩm tại huyện Sơn Dương, tỉnh Tuyên Quang. Chủng *Trichosporon asahii* có khả năng tăng sinh cao, có thể là sinh vật mô hình cho các nghiên cứu sinh học phân tử và y học. Chủng *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng tăng kích thước bột nhào bánh mì, cho thấy tiềm năng có thể

được ứng dụng vào thực tế sản xuất. Các thử nghiệm sinh lý, sinh hóa trên chủng phân lập sẽ được tiếp tục nhằm tối ưu hóa quy trình nuôi cấy và ứng dụng trong tương lai.

#### REFERENCES

- [1] Dangelly, L. F. M. d.M., Flavia, C. S., Antonio, M. B. J., Patricia, O. S., Marcelo, A. G. C., Rita, d.C. T. (2007). Identification of yeasts isolated from the pulp in nature and the production of homemade "umbu" wine. *Braz. arch. biol. Technol*, 50 (5).
- [2] Erika, D. V., Maria, d.G. S. A., Silvio, R. A. (2013). Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Braz J Microbiol*, 44(2):551–558.
- [3] Ibeas, J. I., Jimenez, J. (1997). Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Appl Environ Microbiol* 63(1):7-12.
- [4] Takashi Sugita. (2011). *The Yeasts (Fifth Edition)*. Elsevier, 2015-2061.

[5] Tika, B. K., Parash, M. T., Archana, Y., Gyanu, R. P., Yogesh, J., Sahansila, B., Rojina, A., Katyayanee, N. (2017). Selection and Characterization of Potential Baker's Yeast from Indigenous Resources of Nepal. *Biotechnology Research International*, 1925820.

[6] Wittawan, W., Shun, I., Takahiro, O., Yasuyuki, T., Shigehiro, I., Ariya, C., Masakazu, N., Kyoko, N., Erwin, L., Richard, D. C., Susumu,

K. (2016). Identification and characterization of *Candida utilis* multidrug efflux transporter CuCdr1p. *FEMS Yeast Research*, 16(4).

[7] Zerihun, T. (2016). Isolation, Identification and Characterization of Ethanol Tolerant Yeast Species from Fruits for Production of Bio-ethanol. *International Journal of Current Trends in Pharmacobiology and Medical Sciences*, 1(2), ISSN: 2456-2432.