

THỬ NGHIỆM LÊN MEN ETHANOL Ở NHIỆT ĐỘ CAO BẰNG NẤM MEN CHỊU NHIỆT

Nguyễn Hữu Tường¹, Phạm Hồng Quang¹, Ngô Thị Phương Dung¹, Huỳnh Xuân Phong¹ và Nguyễn Minh Đời¹

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 07/03/2013

Ngày chấp nhận: 20/08/2013

Title:

Testing of ethanol fermentation at high temperature by thermotolerant yeasts

Từ khóa:

Candida tropicalis, khả năng chịu ethanol, lên men ethanol, nấm men chịu nhiệt

Keywords:

Candida tropicalis, ethanol tolerant ability, ethanol fermentation, thermotolerant yeast

ABSTRACT

The application of thermotolerant yeasts in the ethanol production is an interested topic, because the yeasts are able to grow and ferment under high temperature. In addition, the yeasts adapt in the tropical climate, for example Vietnam's climate. In this research, 37 yeast strains from the previous researches were tested the thermotolerant ability by incubating for two days in different temperatures (including 30, 35, 40, 43, 45 and 47°C). Thermotolerant yeasts were tested ethanol tolerant ability in 20° Brix sucrose medium with 0, 3, 6, 9 and 12% (w/v) ethanol level. The yeast strain with high capacity of thermotolerance and ethanol tolerance was screened for ethanol production in different conditions consisting of cell density (10⁴, 10⁵, 10⁶, and 10⁷ cells/mL), initial sugar concentration (10, 15, 20, 25 and 30° Brix) and pH of medium (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 and 6.0). There were 18 yeast strains that could withstand relative high temperature at 43°C and 4 strains could grow at 45°C (HX1, N1, MO, and T), among them, HX1 had higher capacity of ethanol tolerance than others at 9% ethanol level. The HX1 yeast strain grew and fermented well with conditions 10⁵ cells/mL of initial cell density, 20 degree of initial Brix and pH 4.5. Comparing the nucleotide sequences of ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA with the gene bank database, the HX1 strain which was determined was *Candidatropicalis* with 100% homogeneous level.

TÓM TẮT

Sử dụng nấm men chịu nhiệt vào việc sản xuất ethanol là vấn đề đang được quan tâm và chú ý vì chúng có khả năng tăng trưởng và lên men ở điều kiện nhiệt độ cao, phù hợp với điều kiện khí hậu các nước nhiệt đới, trong đó có Việt Nam. Trong nghiên cứu này, 37 dòng nấm men từ các đề tài nghiên cứu trước được thử khả năng chịu nhiệt ở các mức nhiệt độ khác nhau (30, 35, 40, 43, 45 và 47°C) trong hai ngày. Các dòng nấm men chịu nhiệt được khảo sát khả năng chịu ethanol trong môi trường sucrose 20°Brix ở các mức độ ethanol lần lượt là 0, 3, 6, 9 và 12% (w/v). Dòng nấm men có khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol tốt tiếp tục được khảo sát khả năng lên men ở những điều kiện khác nhau: mật số giống chủng (10⁴, 10⁵, 10⁶ và 10⁷ tế bào/mL), nồng độ đường ban đầu (10, 15, 20, 25 và 30°Brix) và pH của môi trường (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 và 6,0). Kết quả cho thấy có 18 dòng nấm men chịu được nhiệt tương đối cao ở 43°C và 4 dòng phát triển được ở nhiệt độ 45°C (HX1, N1, MO và T), trong đó HX1 có khả năng chịu được ethanol ở nồng độ 9% tốt hơn so với ba dòng còn lại. Điều kiện thích hợp cho dòng nấm men HX1 phát triển và lên men ethanol là mật số giống chủng ban đầu 10⁵ tế bào/mL, nồng độ đường ban đầu 20°Brix và pH môi trường 4,5. So sánh mức độ tương đồng chuỗi nucleotide giữa vùng ITS1, ITS2 và 5.8S rDNA với cơ sở dữ liệu của ngân hàng gene, dòng HX1 được xác định là loài *Candida tropicalis* với độ tương đồng 100%.

1 GIỚI THIỆU

Ethanol đóng vai trò quan trọng trong đời sống con người. Hiện nay, nhu cầu sản xuất 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).

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 kỹ 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.

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

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

Nguyên vật liệu:

– Nước mía được thu mua từ căn-tin ký túc xá Trường Đại học Cần Thơ.

– 37 dòng nấm men đã được phân lập từ đề tài của Nguyễn Văn Anh *et al.* (2011) (31 dòng), Nguyễn Thị Pha Ly (3 dòng) và Viện NC&PT Công nghệ Sinh học (3 dòng).

– 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 Sabouraud (glucose 4%, peptone 2%, agar 1,5%), môi trường PGY (khoai tây 20%, D-glucose 2%, yeast extract 0,2%)

– Hóa chất: C₂H₅OH (Việt Nam), NaCl (Trung Quốc), NaHSO₃ (Trung Quốc), NaOH (Việt Nam), HCl (Trung Quốc),...

2.2 Phương pháp thí nghiệm

2.2.1 Khảo sát khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao của các dòng nấm men

Cấy 37 dòng nấm men được tuyển chọn lên đĩa petri có chứa môi trường YM agar, mỗi dòng thành 1 đường. Ủ các đĩa petri ở các nhiệt độ khác nhau: 30, 35, 40, 43, 45 và 47°C trong 48 giờ. Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các dòng nấm men trên môi trường thạch. Tuyển chọn những dòng nấm men có khả năng phát triển mạnh ở nhiệt độ cao.

2.2.2 Khảo sát khả năng chịu ethanol của các dòng nấm men

Nuôi cấy các dòng nấm men tuyển chọn từ thí nghiệm 2.2.1 trong môi trường PGY đến khi mật số nấm men đạt 10⁸ tế bào/mL. Chúng nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác chứa 100 mL dung dịch đường sucrose (20°Brix) có bổ sung ethanol tinh khiết với các nồng độ khác nhau: 0%, 3%, 6%, 9% và 12% (w/v) để khảo sát nồng độ mà tế bào nấm men bị ức chế. Ủ 3 ngày trong

điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ thích hợp chọn từ thí nghiệm 2.2.1. Lấy mẫu thực hiện phương pháp đếm sống trên đĩa môi trường Sabouraud có bổ sung oxytetracycline và tính ra đơn vị log CFU/mL. Tuyển chọn các dòng nấm men có mật số cao.

2.2.3 *Khảo sát khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao của các dòng nấm men đã được tuyển chọn*

Nuôi cấy nấm men trong môi trường PGY đến khi mật số tế bào nấm men đạt 10^8 tế bào/mL. Chủng 1 mL nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác chứa 99 mL dung dịch nước mía (20°Brix). Ủ 5 ngày trong điều kiện kỵ khí ở các nhiệt độ khác nhau: 30, 35, 40, 45°C. Đếm bọt khí sinh ra trong 2 phút sau mỗi 24 giờ. Chung cất để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được, qui về nồng độ ethanol ở 20°C. Tuyển chọn các dòng nấm men cho nồng độ ethanol cao ở nhiệt độ cao.

2.2.4 *Khảo sát điều kiện lên men ethanol ở nhiệt độ cao*

2.2.4.1 *Khảo sát ảnh hưởng của mật số giống chủng*

Nuôi cấy nấm men trong môi trường PGY đến khi mật số tế bào nấm men đạt 10^6 , 10^7 , 10^8 và 10^9 tế bào/mL. Chủng 1 mL nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác chứa 99 mL dung dịch nước mía (20°Brix). Ủ 5 ngày trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ thích hợp (chọn từ thí nghiệm 2.2.3). Đếm bọt khí sinh ra trong 2 phút sau mỗi 24 giờ. Chung cất dịch lên men để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được.

2.2.4.2 *Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đường*

Nuôi cấy nấm men trong môi trường PGY, điều chỉnh cho mật số tế bào nấm men tới giá trị thích hợp (chọn từ thí nghiệm 2.2.4.1). Chủng 1 mL nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác chứa 99 mL dung dịch đường mía ở 5 độ Brix khác nhau: 10, 15, 20, 25 và 30°Brix. Ủ 5 ngày trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ thích hợp (chọn ở thí nghiệm 2.2.3). Đếm bọt khí sinh ra trong 2 phút sau mỗi 24 giờ. Chung cất dịch lên men để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được.

2.2.4.3 *Khảo sát ảnh hưởng của pH*

Nuôi cấy nấm men trong môi trường PGY,

điều chỉnh đến mật số tế bào nấm men thích hợp (chọn từ thí nghiệm 2.2.4.1). Chủng 1 mL nấm men đã nuôi cấy vào các bình tam giác chứa 99 mL dung dịch nước mía có nồng độ đường ban đầu thích hợp (được chọn từ thí nghiệm 2.2.4.2) và giá trị pH ở các bình khác nhau: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 và 6,0 bằng dung dịch HCl và NaOH. Ủ 5 ngày trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ thích hợp đã được chọn ở thí nghiệm 2.2.3. Đếm bọt khí sinh ra trong 2 phút sau mỗi 24 giờ. Chung cất để thu ethanol và đo nồng độ ethanol thu được.

2.2.5 *Định danh những dòng nấm men có đặc tính tốt*

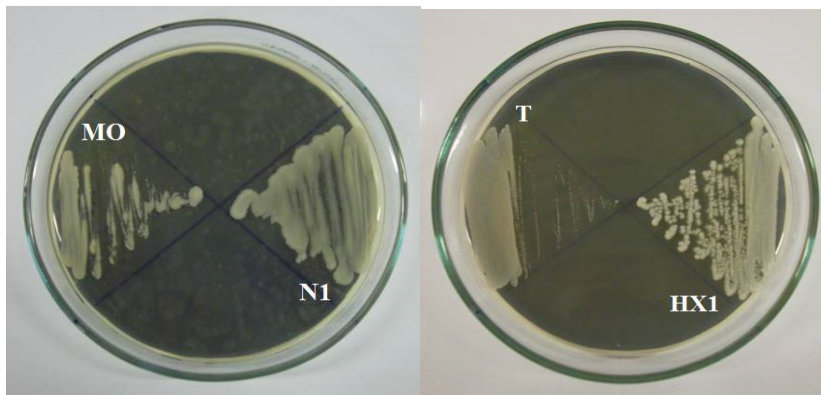
Chọn lọc những dòng nấm men mang đặc tính tốt từ các thí nghiệm để tiến hành khảo sát đặc tính sinh học của nấm men bằng phương pháp quan sát khuẩn lạc, chụp hình dưới kính hiển vi và định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Dòng nấm men có đặc tính tốt được gửi đến công ty Microgene để ly trích DNA và khuếch đại vùng ITS1, ITS2 và 5.8S rDNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi tổng 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3') và 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Dựa vào phần mềm BLAST để so sánh mức độ tương đồng với dữ liệu trên ngân hàng gene của NCBI (National Center for Biotechnology Information) trên trang web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> và xác định loài của dòng nấm men.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 *Khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao và khả năng chịu ethanol của 37 dòng nấm men*

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 - 40°C. Ở mức nhiệt độ 43°C, chỉ có 18 dòng phát triển. Đến mức nhiệt độ 45°C chỉ còn quan sát được sự phát triển của 4 dòng nấm men HX1, MO, N1 và T (Hình 1). Không có dòng nấm men nào phát triển và tạo khuẩn lạc ở 47°C sau 48 giờ ủ (Bảng 1). Điều này chứng tỏ nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các dòng nấm men.



Hình 1: Khuẩn lạc của 4 dòng nấm men HX1, MO, N1 và T ở 45°C sau 48 giờ ủ

Bảng 1: Khảo sát khả năng chịu nhiệt của 37 dòng nấm men sau 48 giờ

STT	Dòng nấm men	Nhiệt độ khảo sát					
		30°C	35°C	40°C	43°C	45°C	47°C
1	Bia	+	+	+	-	-	-
2	BM1	+	+	+	-	-	-
3	BM2	+	+	+	+	-	-
4	BM3	+	+	+	-	-	-
5	BM4	+	+	+	+	-	-
6	CC	+	+	+	-	-	-
7	C2	+	+	+	+	-	-
8	HDD1	+	+	+	-	-	-
9	HDD2	+	+	+	-	-	-
10	HM	+	+	+	+	-	-
11	HN1	+	+	+	+	-	-
12	HN2	+	+	+	-	-	-
13	HN3	+	+	+	+	-	-
14	HN4	+	+	+	+	-	-
15	HT1	+	+	+	-	-	-
16	HT2	+	+	+	-	-	-
17	HX1	+	+	+	+	+	-
18	HX2	+	+	+	+	-	-
19	HX3	+	+	+	+	-	-
20	HX4	+	+	+	+	-	-
21	MC1	+	+	+	-	-	-
22	MC2	+	+	+	+	-	-
23	MO	+	+	+	+	+	-
24	MR1	+	+	+	-	-	-
25	MR2	+	+	+	-	-	-
26	N1	+	+	+	+	+	-
27	N2	+	+	+	-	-	-
28	N3	+	+	+	+	-	-
29	RD	+	+	+	+	-	-
30	T	+	+	+	+	+	-
31	V1	+	+	+	-	-	-
32	V2	+	+	+	-	-	-
33	V3	+	+	+	+	-	-
34	X1	+	+	+	-	-	-
35	2.1	+	+	+	-	-	-
36	M	+	+	+	-	-	-
37	U	+	+	+	-	-	-

Kết quả đã chọn được 4 dòng (HX1, MO, N1 và T) từ 37 dòng nấm men có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ cao.

3.2 Khả năng chịu ethanol của các dòng nấm men

Khả năng chịu ethanol của 4 dòng nấm men được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Khả năng chịu ethanol của 4 dòng nấm men

Dòng nấm men	0% ethanol	3% ethanol	6% ethanol	9% ethanol	12% ethanol
HX1	7,09 ^{ab}	6,97 ^a	6,07 ^{ab}	5,66 ^a	0
T	7,21 ^a	6,98 ^a	6,49 ^a	4,41 ^b	0
MO	6,87 ^c	6,56 ^b	5,68 ^b	3,99 ^b	0
N1	7,03 ^{bc}	6,63 ^b	5,78 ^b	4,48 ^b	0
CV (%)	2,18	3,02	6,38	15,36	-

Ghi chú: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp. Kết quả tính ra đơn vị log CFU/mL. 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%

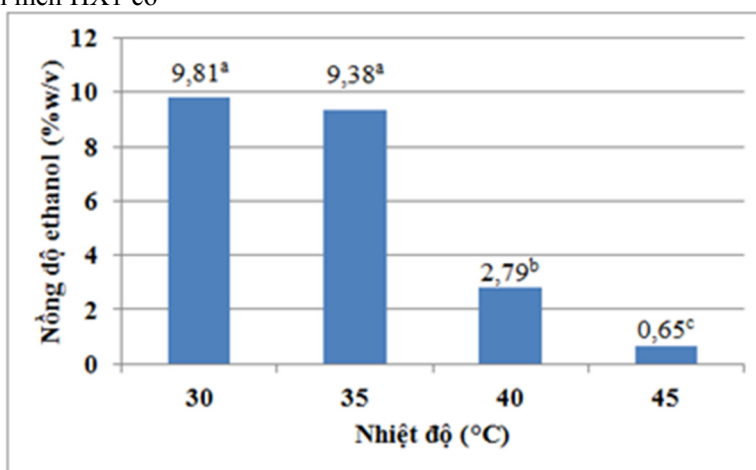
Nhìn chung, mật số nấm men sẽ giảm khi tăng nồng độ ethanol. Mật số nấm men đạt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng (0% ethanol). Điều này chứng tỏ ethanol là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của các dòng nấm men. Ở mức độ 9% ethanol, mật số nấm men của dòng nấm men HX1 đạt giá trị lớn nhất (5,66 log CFU/mL). Lựa chọn được dòng nấm men HX1 có

khả năng chịu ethanol ở 9% khác biệt có ý nghĩa so với 3 dòng nấm men còn lại ở độ tin cậy 95%.

3.3 Khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men được tuyển chọn

Khả năng sinh ethanol ở nhiệt độ cao của dòng nấm men HX1 được ghi nhận qua Hình 2.

Hình 2: Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ ủ lên nồng độ ethanol sinh ra



Kết quả cho thấy hai nghiệm thức 30°C và 35°C không có khác biệt ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. Nồng độ ethanol cao nhất được ghi nhận ở 30°C (9,81%). Ở các nghiệm thức còn lại, khi nhiệt độ tăng thì nồng độ ethanol sinh ra giảm. Nồng độ ethanol sinh ra giảm mạnh nhất khi tăng nhiệt độ từ 35°C lên 40°C. 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

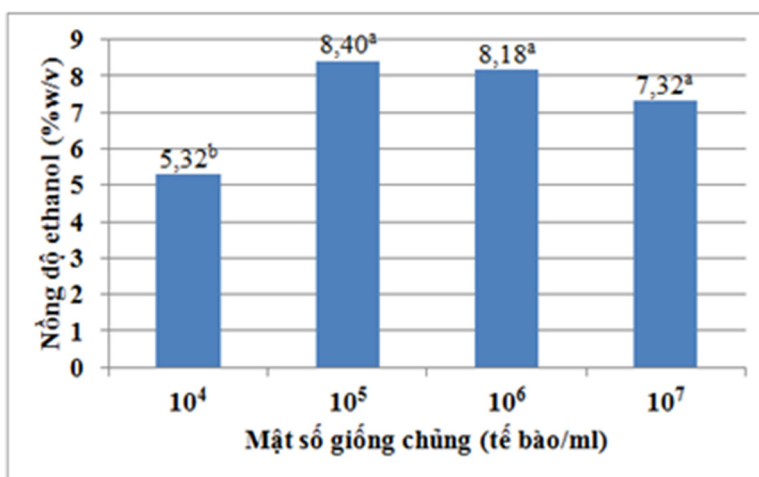
triển của nấm men. Vì vậy lượng ethanol sinh ra giảm khi nhiệt độ môi trường tăng. Vì thí nghiệm được tiến hành nhằm khảo sát khả năng lên men ở nhiệt độ cao của nấm men nên nhiệt độ ủ cho các thí nghiệm tiếp theo được chọn là 35°C.

3.4 Điều kiện lên men ethanol ở nhiệt độ cao

3.4.1 Ảnh hưởng của mật số giống chủng

Khả năng sinh ethanol của dòng nấm men HX1 với mật số giống chủng khác nhau được ghi nhận qua Hình 3.

Hình 3: Biểu đồ ảnh hưởng của mật số giống chủng lên nồng độ ethanol sinh ra



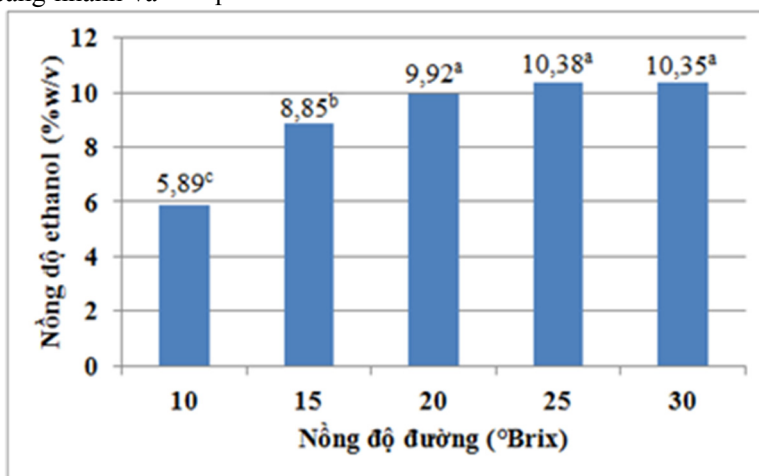
Kết quả cho thấy ở ba nghiệm thức mật số giống chủng 10^5 , 10^6 và 10^7 tế bào/mL không có khác biệt ý nghĩa. Ở nghiệm thức 10^5 tế bào/mL, nồng độ ethanol thu được đạt 8,40% và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với nghiệm thức 10^6 và 10^7 tế bào/mL (lần lượt là 8,18% và 7,32%). Ngoài ra, theo Lương Đức Phẩm (2006) 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 (Nguyễn Minh Thủy *et al.*, 2011). Như vậy, mật số giống chủng 10^5 tế bào/mL được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.4.2 Ảnh hưởng của nồng độ đường

Khả năng sinh ethanol của dòng nấm men HX1 với nồng độ đường khác nhau được ghi nhận qua Hình 4.

Hình 4: Biểu đồ ảnh hưởng của nồng độ đường lên nồng độ ethanol sinh ra



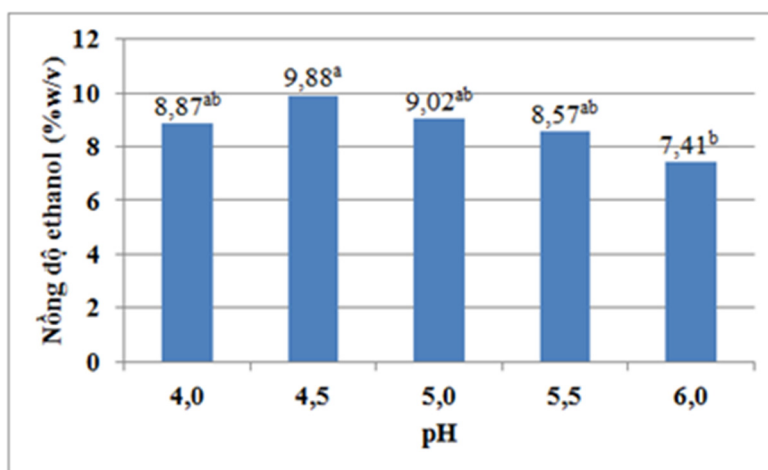
Nghiệm thức 10°Brix cho kết quả nồng độ ethanol thấp nhất (5,89%) có thể do dịch lên men không đủ lượng đường cho nấm men tăng sinh khối và chuyển hóa đường thành ethanol. Nghiệm thức 25°Brix cho kết quả nồng độ ethanol 10,38% và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% so với nghiệm thức 20°Brix (9,92%) và 30°Brix (10,35%). Vì vậy, nồng độ đường ban đầu 20°Brix được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. 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).

3.4.3 Ảnh hưởng của pH

Khả năng sinh ethanol của dòng nấm men HX1 trong các môi trường có giá trị pH khác nhau được ghi nhận qua Hình 5.

Hình 5: Biểu đồ ảnh hưởng của pH lên nồng độ ethanol sinh ra



Kết quả cho thấy các nghiệm thức pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0 và pH 5,5 không khác biệt có ý nghĩa, nghiệm thức pH 4,5 cho kết quả nồng độ ethanol thu được cao hơn các nghiệm thức còn lại (9,88%). Theo nghiên cứu của Wang *et al.* (2001), nếu pH cao thì sẽ có nhiều glycerol và acid hữu cơ tạo thành làm hạn chế ethanol, vì vậy hàm lượng ethanol sinh ra giảm dần khi tăng giá trị pH. 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. Giá trị pH 4,5 được chọn là giá trị thích hợp nhất cho dòng nấm men

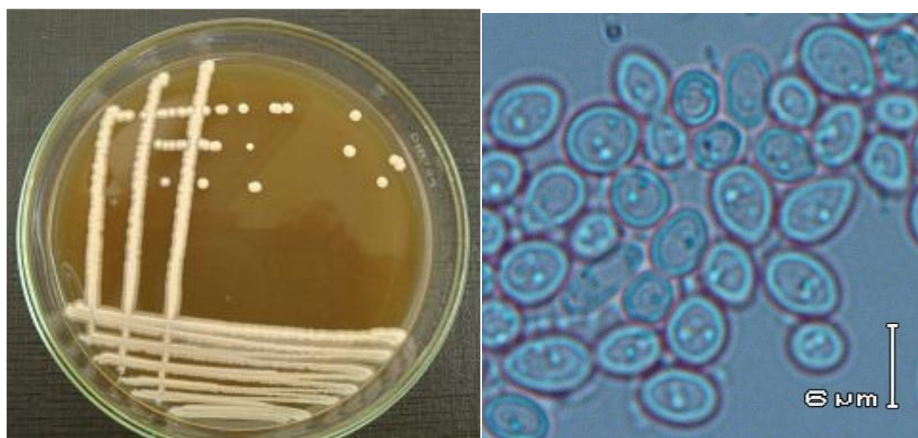
HX1 lên men trong môi trường nước mía ở 35°C.

3.5 Định danh những dòng nấm men có đặc tính tốt

3.5.1 Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của dòng nấm men HX1 (Hình 6)

Đặc điểm khuẩn lạc: Đường kính khoảng 2 mm; bề dày khoảng 0,1 mm; khuẩn lạc nổi; màu trắng đục; bề mặt trơn, bìa nguyên.

Đặc điểm tế bào: Tế bào hình ovan, kích thước khoảng 3x5 µm, nảy chồi ở một đầu.



Hình 6: Khuẩn lạc dòng nấm men HX1 và tế bào dưới kính hiển vi ở 100X

3.5.2 Định danh dòng nấm men HX1

Dòng nấm men HX1 được giải trình tự giữa vùng ITS1, ITS2 và 5.8S ribosomal DNA. Kết quả cho thấy trình tự thu được tương đồng với vùng ITS1, ITS2 và 5.8S ribosomal RNA gene của loài *Candida tropicalis* strain Wu1, mã số (Accession number) JN162678.1, mức độ tương

đồng 100%. Do đó, dòng HX1 được xác định là loài *Candida tropicalis*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lương Đức Phẩm, 2006. *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, Nguyễn Phú Cường, Dương Kim Thanh, Lê Văn Boi, Lê Thanh Trường, Huỳnh Thị Chính và Phan

- Thanh Nhân, 2011. Ảnh hưởng của mật số nấm men, chất khô hòa tan và pH của dịch lên men đến chất lượng rượu vang thốt nốt. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 2011:19b 209-218.
3. Nguyễn Thị Pha Ly, 2011. Tuyển chọn, nghiên cứu nấm men và vi khuẩn chịu nhiệt lên men ethanol. *Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ*, Trường Đại học Cần Thơ.
 4. Nguyễn Văn 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.
 5. Alfenore, S., C. Molina-Jouve, S.E. Guillouet, J.L. Uribealarea, 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.
 6. 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.
 7. Navarro, J.M. and G. Durand. 1978. Alcohol fermentation: effect of temperature on ethanol accumulation within yeast cells. *Annals of Microbiology* 129B: 215-224.
 8. 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.
 9. Roehr, M. 2001. *The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*. Chichester: Wiley-VCH, pp. 232.
 10. Wang, Z.X., J. Zhuge, H. Fang and B.A. Prior. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances*. 19: 201-223.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, ngày truy cập 31/05/2012.