

CẢI BIẾN CHỦNG NẤM MEN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* D8 BẰNG KỸ THUẬT ĐỘT BIẾN NGẪU NHIÊN NHẪM NÂNG CAO HIỆU LỰC LÊN MEN ETHANOL

Hoàng Thị Lệ Thương^{1,✉}, Trần Thị Thuý², Nguyễn Quang Hào³

¹Trường Đại học Tân Trào, Tuyên Quang

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

³Bộ Giáo dục và đào tạo

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hoangthilethuong@gmail.com

Ngày nhận bài: 21.7.2017

Ngày nhận đăng: 02.4.2018

TÓM TẮT

Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* D8 phân lập từ dịch dứa Queen đã được công bố (Hoang Thi Le Thuong *et al.*, 2017) có hoạt lực lên men cao, đạt 12,37% v/v ethanol trong môi trường lên men có hàm lượng đường tổng từ 200 g/L trở lên. Nhằm nâng cao hoạt lực lên men ethanol, tế bào chủng *S. cerevisiae* D8 được gây đột biến ngẫu nhiên bằng hóa chất (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine - NTG) và tia cực tím UV. Kết quả khảo sát cho thấy trong cùng khoảng thời gian xử lý, 1% NTG có khả năng gây chết cao hơn tia UV (260 nm, 50W). Khi gây đột biến kết hợp NTG và UV, tỷ lệ tế bào chết tăng, thời gian gây chết giảm so với gây đột biến riêng rẽ với một trong hai yếu tố trên. Nghiên cứu hoạt lực lên men của các tế bào còn sống sau khi xử lý bằng NTG và UV, chúng tôi đã sàng lọc, tuyển chọn được 13 dòng nấm men đột biến tích lũy có khả năng lên men ethanol cao hơn chủng nấm men *S. cerevisiae* D8. Trong đó, dòng đột biến NU 120.4 có khả năng sinh tổng hợp ethanol cao nhất (tăng 22% so với chủng *S. cerevisiae* D8). Dòng đột biến tích lũy này cũng có khả năng chịu ethanol và chịu đường cao hơn chủng *S. cerevisiae* D8 trong môi trường lên men. Đặc biệt, dòng đột biến này có khả năng lên men ethanol trong điều kiện ổn định, hàm lượng ethanol đạt tới $15,07 \pm 0,12\%$, hiệu suất lên men đạt $92,62 \pm 0,2\%$. Trong khi chủng *S. cerevisiae* D8 lên men chỉ đạt hàm lượng ethanol tối đa là $12,37 \pm 0,2\%$ trong dịch ép dứa chứa 250 g/L đường tổng. Với khả năng lên men ethanol ổn định, dòng đột biến này có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất ethanol cao độ từ dịch dứa.

Từ khóa: Cải biến chủng, ethanol, NTG, *Saccharomyces cerevisiae*, UV

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, việc cải tiến giống nấm men trong sản xuất bằng các kỹ thuật di truyền nhằm nâng cao hiệu suất lên men được quan tâm nghiên cứu. Các kỹ thuật được sử dụng chủ yếu là công nghệ DNA tái tổ hợp, đột biến gen định hướng và đột biến ngẫu nhiên (Fleet, 2008; Lui *et al.*, 2011; Swinnen *et al.*, 2012; Duveau *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2014). Tuy nhiên, công nghệ gen trong thực phẩm hiện vẫn đang là vấn đề tranh cãi. Do vậy, cải tiến các chủng giống trong công nghệ thực phẩm bằng các đột biến ngẫu nhiên sẽ là một lợi thế (Fiedurek *et al.*, 2011; Steensels *et al.*, 2014; Glynn, 2016). Sử dụng NTG gây đột biến trên nhóm alkyl dẫn đến sự bất cặp nhằm với thymine chủ yếu sinh ra đột biến điểm thay thế cặp GC bằng cặp AT, số ít còn lại gây đột biến mất đoạn và dịch chuyển khung

đọc. Chiếu tia UV (50W) 260 nm gây ra hiện tượng gắn kết giữa hai vòng pyrimidine gần nhau tạo liên kết dimer (dimer thymine hoặc dimer cytosine) và làm tổn thương DNA. Qua quá trình sao chép DNA, thể đại CC chuyển thành thể đột biến TT, kết quả là cặp GC chuyển thành AC khi chiếu tia UV (Reed, Nagdawithna, 1991). Trên thế giới và ở Việt Nam, sử dụng hóa chất NTG và tia UV gây đột biến ngẫu nhiên đã được tiến hành trên một số nấm ký sinh côn trùng và vi khuẩn acetic (Lawrence *et al.*, 1985; Vũ Văn Hạnh *et al.*, 2012; Đỗ Thị Kim Loan *et al.*, 2015). Mặc dù vậy, phần lớn các công trình nghiên cứu này chưa đề cập đến việc kết hợp giữa NTG và UV. Bottcher và Mikrobio (1997) đã nghiên cứu độ nhạy cảm của UV và NTG trên tế bào nấm men. Swinnen *et al.*, (2012) cũng mới chỉ nghiên cứu ảnh hưởng của UV và NTG đến tần suất đột biến của các allele. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định mức

độ ảnh hưởng của các tác nhân đột biến UV và NTG đến tỉ lệ sống của chủng *S. cerevisiae* D8 và sàng lọc các dòng tế bào sống sót để tuyển chọn các dòng có hoạt lực lên men cao nhằm nâng cao hoạt lực lên men ethanol của chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 trong dịch dứa Queen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 được phân lập và tuyển chọn trên quả dứa Queen trồng tại Nông trường dứa Đồng Giao, thành phố Tam Điệp, tỉnh Ninh Bình. Chủng nấm men này được nhóm nghiên cứu Hoàng Thị Lệ Thương *et al.*, (2017) bảo quản và cung cấp tại Bộ môn Công nghệ sinh học - Vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học sư phạm Hà Nội. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (Merck, Đức) và Ultra Violet (50W) 260 nm (Thomas, Mỹ) là hai tác nhân gây đột biến.

Các môi trường được sử dụng bao gồm: Môi trường nhân giống (g/L) gồm saccharose: 70, (NH₄)₂SO₄: 2, nước chiết giá đỗ: 100, pH 4,0. Môi trường lên men là dịch ép dứa có hàm lượng đường tổng 200, lượng oxy hòa tan 7 mg/L, hàm lượng men giống bổ sung $17,3 \times 10^6$ tế bào/mL dịch lên men, pH 4,0. Môi trường đĩa thạch là môi trường Hansen đặc (g/L) gồm có glucose: 50, pepton: 10, KH₂PO₄: 3, MgSO₄.7H₂O: 2, agar: 20, pH 5,0. Môi trường nghiên cứu khả năng chịu ethanol là môi trường lên men có bổ sung ethanol với nồng độ ban đầu từ 5 đến 13%. Môi trường nghiên cứu khả năng chịu đường là môi trường lên men có bổ sung hàm lượng đường từ 200 đến 350 g/L.

Phương pháp

Gây đột biến bằng NTG

Chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 được hoạt hóa trên môi trường nhân giống, nuôi ở 28°C, lắc 200 rpm trong 24 h. Sau đó, 20 mL dịch tế bào được ly tâm 10.000 rpm ở 4°C để loại bỏ dịch nổi và thu sinh khối. Một nửa sinh khối được sử dụng để xác định số lượng tế bào; một nửa còn lại được hòa tan vào 200 mL dung dịch NTG (10 mg/100 mL), lắc đều, chia thành 5 lô để xử lý ở các khoảng thời gian lần lượt là 40, 60, 80, 120 và 140 min. Sau thời gian xử lý, 3 mL dịch tế bào được ly tâm thu sinh khối. Cặn tế bào được rửa bằng nước cất 2 lần để loại bỏ NTG và ly tâm thu sinh khối để đếm số lượng tế bào sống sót.

Tế bào sau khi xử lý đột biến được hoạt hóa trên

môi trường nhân giống ở 28°C, lắc 200 rpm. Sau 24 h, dịch tế bào được ly tâm thu sinh khối, pha loãng bằng nước cất và trải trên môi trường Hansen đặc. Các dòng tế bào đột biến còn sống (có hình thành khuẩn lạc) được cấy chuyển sang môi trường mới để tuyển chọn các dòng có khả năng lên men cao (Reed, Nagdawithna, 1991).

Tạo đột biến bằng tia UV

Chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 được hoạt hóa trong môi trường nhân giống ở 28°C, lắc 200 rpm. Sau 24 h nuôi cấy, 20 mL dịch tế bào được ly tâm 10.000 rpm ở 4°C để loại bỏ dịch nổi, thu sinh khối tế bào. Cặn tế bào nấm men sau đó được pha loãng trở lại bằng nước cất và trải trên các đĩa Petri; các đĩa Petri này được chia thành hai lô bằng nhau: lô 1 đặt vào tủ ẩm 28°C, lô 2 được xử lý với UV trong các khoảng thời gian khác nhau (từ 60 đến 140 min), khoảng cách từ nguồn UV đến đĩa Petri là 30 cm. Số lượng tế bào sống ở cả 2 lô được xác định thông qua số lượng khuẩn lạc hình thành (CFU) (Reed, Nagdawithna, 1991).

Tạo đột biến tích lũy bằng NTG kết hợp với UV

Dòng đột biến tuyển chọn được sau khi xử lý bởi NTG được nuôi cấy trên môi trường nhân giống ở 28°C, lắc 200 rpm trong 24 h. Cặn tế bào nấm men được ly tâm để loại bỏ dịch nổi và thu sinh khối tế bào. Sau đó, cặn tế bào được chia thành hai lô bằng nhau và tiếp tục xử lý với NTG kết hợp UV (kết hợp 2 thí nghiệm được mô tả ở trên).

Sàng lọc và tuyển chọn dòng đột biến có hoạt lực lên men ethanol cao

Các tế bào chủng *S. cerevisiae* D8 sống sót sau quá trình xử lý đột biến bằng NTG và đột biến tích lũy bằng NTG kết hợp với UV được cấy trên môi trường Hansen đặc. Sau hai ngày nuôi trong tủ ẩm, các dòng tế bào nấm men đột biến được tách sang môi trường mới để sàng lọc sơ bộ các dòng tế bào sinh ethanol cao hơn chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 dựa vào lượng đường dư trong môi trường lên men.

Đánh giá hoạt lực lên men của các dòng đã được xử lý đột biến so với chủng *S. cerevisiae* D8 trên môi trường lên men, với cùng một lượng men giống là $17,3 \times 10^6$ tế bào/mL. Quá trình lên men được tiến hành trong các bình vô trùng có dung tích 500 mL, trong thời gian 10 ngày.

Xác định số lượng tế bào sống bằng phương pháp đếm khuẩn lạc (Mai Thị Hằng *et al.*, 2011)

Xác định tỷ lệ tế bào chết theo công thức:

$$a (\%) = \frac{b-c}{b} \times 100$$

Trong đó: a: Tỷ lệ tế bào chết; b: Số tế bào trên mẫu đối chứng; c: Số tế bào trên mẫu thí nghiệm (Nguyễn Hoài Hương, Bùi Văn Thế Vinh, 2009).

Xác định hoạt lực lên men

Hoạt lực lên men được xác định sơ bộ thông qua lượng đường dư trong dịch sau lên men bằng phương pháp DNS (Miller, 1959) và đánh giá hoạt lực lên men thông qua lượng ethanol tạo thành (Nguyễn Đình Thường, Nguyễn Thanh Hằng, 2007).

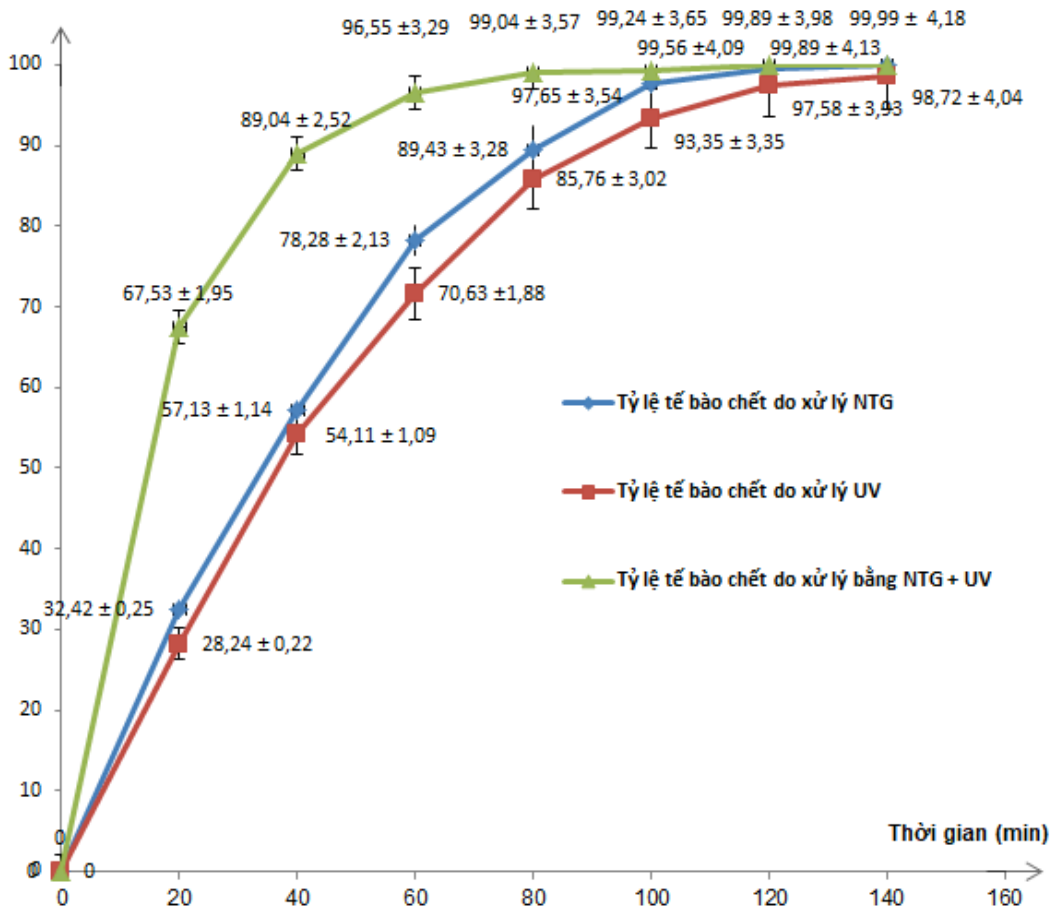
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần để xác định giá

trị trung bình và độ lệch chuẩn trên phần mềm Microsoft Excel 2010.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tác dụng gây chết của hóa chất NTG, tia cực tím UV và kết hợp NTG với UV đến tế bào nấm men *S. cerevisiae* D8

Chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 được gây đột biến bằng cả 3 phương pháp: Sử dụng NTG, tia cực tím UV và kết hợp NTG với UV trong khoảng thời gian từ 20 - 140 min. Tác dụng gây chết của từng tác nhân đột biến đến tế bào nấm men *S. cerevisiae* D8 được trình bày trong hình 1.



Hình 1. Tác dụng gây chết của hóa chất NTG, tia cực tím UV và kết hợp NTG với UV đến tế bào nấm men *S. cerevisiae* D8.

Hóa chất NTG và tia UV là các tác nhân gây đột biến ngẫu nhiên có ảnh hưởng lớn đến khả năng sống sót của tế bào nấm men *S. cerevisiae* D8. Thời

gian xử lý tế bào với các tác nhân đột biến càng dài thì tỷ lệ chết càng tăng. Trong cùng một khoảng thời gian, tỷ lệ nấm men chết do bị xử lý bởi NTG cao

hơn so với khi xử lý bằng tia UV: Sau 20 min số lượng tế bào chết do xử lý bằng UV là 28,24%, do NTG là 32,42%, do kết hợp NTG với UV là 67,53%. Sau 80 min, tỷ lệ tế bào chết do xử lý bằng UV là 85,76%, do NTG là 89,43%, do NTG kết hợp với UV là 99,04%. Tế bào nấm men *S. cerevisiae* D8 chết tới 99% khi xử lý với UV, NTG, UV kết hợp NTG lần lượt là ở 120 min, 100 min và 80 min. Tỷ lệ tế bào chết cao đồng thời rút ngắn thời gian gây chết khi xử lý đột biến kết hợp NTG và UV so với khi gây đột biến riêng lẻ bằng NTG hoặc UV đã được Lui *et al.*, (2011), Sridhar *et al.*, (2002) công bố. Hiệu quả gây chết khi kết hợp NTG với UV cao hơn khi kết hợp giữa sử dụng lực điện trường với NTG cũng đã được công bố bởi Kim và Lee (1998).

Hoạt lực lên men ethanol của các dòng đột biến

Hoạt lực lên men ethanol của các dòng đột biến được tạo ra bằng hóa chất NTG

Các tế bào *S. cerevisiae* D8 sống sót sau quá trình xử lý đột biến bằng NTG được cấy trên môi

trường Hansen đặc, thu được 120 dòng tế bào. Sàng lọc sơ bộ các dòng tế bào này dựa vào lượng đường dư trong dịch đã lên men, chúng tôi đã thu được 8 dòng (lần lượt được ký hiệu là N140.6, N100.18, N80.14, N120.5, N100.7, N80.9, N.80.2, N120.4) có khả năng sinh ethanol cao hơn chủng *S. cerevisiae* D8. Hoạt lực lên men của 8 dòng này được đánh giá cụ thể khi lên men trong các bình chứa môi trường lên men vô trùng có dung tích 500 mL, trong thời gian 10 ngày. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Trong 8 dòng đã được xử lý đột biến, ba dòng N80.9, N80.2 và N120.4 có hoạt lực lên men ethanol thấp hơn chủng *S. cerevisiae* D8 và 5 dòng có hoạt lực lên men ethanol cao hơn so với chủng gốc; đặc biệt dòng N140.6 có hoạt lực lên men ethanol đạt 14,02 % v/v cao hơn 13 % so với chủng *S. cerevisiae* D8 và cao hơn các dòng được xử lý đột biến còn lại. Hiệu suất lên men này tương đương với kết quả kết hợp gây đột biến bởi lực điện trường với NTG trên *Saccharomyces* sp. của Kim và Lee (1998). Do đó, dòng cải biến N140.6 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Bảng 1. Hoạt lực lên men ethanol của các dòng đã được xử lý đột biến bằng NTG.

STT	Chủng nấm men /dòng đột biến	Nồng độ ethanol thu được (%v/v)	Hoạt lực lên men ethanol (%) so với chủng nấm men <i>S. cerevisiae</i> D8
1	<i>S. cerevisiae</i> D8	12,37 ± 0,02	100
2	N140.6	14,02 ± 0,02	113
3	N100.18	13,88 ± 0,03	112
4	N80.14	13,51 ± 0,01	109
5	N120.5	13,48 ± 0,03	109
6	N100.7	13,25 ± 0,03	107
7	N80.9	11,05 ± 0,01	89
8	N.80.2	10,42 ± 0,01	84
9	N120.4	10,21 ± 0,03	83

Hoạt lực lên men ethanol của các dòng đột biến được tạo ra bằng gây đột biến tích lũy kết hợp NTG và UV

Dòng N140.6 tiếp tục được xử lý đột biến tích lũy bởi NTG 10 mg/100 mL và UV, thu được 76 dòng đột biến tích lũy. Sàng lọc sơ bộ các dòng đột biến này, chúng tôi thu được 13 dòng có khả năng sinh ethanol cao hơn chủng nấm men *S. cerevisiae* D8.

Đánh giá hoạt lực lên men của 13 dòng đột biến này so với chủng *S. cerevisiae* D8 trên môi trường lên men với lượng men giống như nhau ($17,3 \times 10^9$ tế bào/ mL). Kết quả sau 10 ngày lên men được thể hiện ở bảng 2.

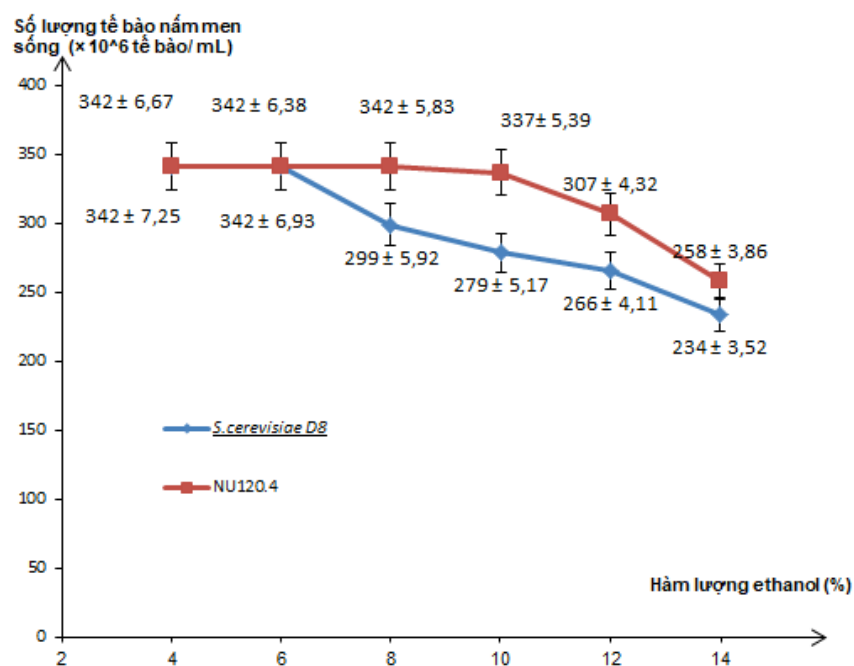
Kết quả tuyển chọn cho thấy tất cả các dòng đột biến tích lũy này có khả năng sinh ethanol cao hơn so với chủng *S. cerevisiae* D8; 09 dòng sinh ethanol cao hơn dòng đột biến gốc N140.6. Hoạt lực lên men ethanol của các dòng đột biến có thể phân thành 3 nhóm khác biệt có ý nghĩa (các dòng trong một nhóm có hoạt lực lên men khác nhau không có ý nghĩa). Nhóm 1 gồm các dòng đột biến tích lũy NU140.12, NU80.17, NU100.8 có hoạt lực lên men ethanol cao hơn 20% so với chủng *S. cerevisiae* D8. Nhóm 2 gồm các dòng đột biến tích lũy NU60.11, NU120.9, NU140.4, NU100.16, NU80.24 có hoạt lực lên men ethanol cao hơn 16 - 20% so với chủng *S. cerevisiae* D8. Nhóm 3 gồm các dòng đột biến NU60.18, NU120.6, NU60.5, NU80.8 có hoạt lực

lên men cao hơn 10% so với chủng *S. cerevisiae* D8. Đặc biệt dòng đột biến tích lũy NU120.4 có hoạt lực lên men ethanol cao nhất (đạt hàm lượng ethanol 15,07% v/v sau 10 ngày lên men), tăng 22% so với chủng *S. cerevisiae* D8 và tăng 9% so với dòng đột biến gốc N140.6. Khả năng lên men sinh ethanol của

dòng đột biến tích lũy NU 120.4 cao hơn và khác biệt so với 12 dòng còn lại với mức ý nghĩa $p = 0,05$. Kết quả này là cao hơn so với các công bố trước đây của Kim và Lee (1998) về gây đột biến trên *S. cerevisiae* bằng các phương pháp khác (đạt hàm lượng ethanol 13,3%).

Bảng 2. Hoạt lực lên men ethanol của các dòng được xử lý đột biến tích lũy kết hợp NTG và UV.

STT	Chủng nấm men/ dòng đột biến	Nồng độ ethanol thu được (%v/v)	Khả năng sinh ethanol cao hơn so với	
			Chủng <i>S. cerevisiae</i> D8 (%)	Dòng đột biến N140.6 (%)
1	<i>S. cerevisiae</i> D8	12,37 ± 0,02	100	88
2	N140.6	14,02 ± 0,02	113	100
3	NU120.4	15,07 ± 0,02	122	109
4	NU140.12	14,85 ± 0,01	120	106
5	NU80.17	14,84 ± 0,01	120	106
6	NU100.8	14,65 ± 0,02	118	104
7	NU60.11	14,46 ± 0,01	117	103
8	NU120.9	14,38 ± 0,03	116	103
9	NU140.4	14,32 ± 0,02	116	102
10	NU100.16	14,26 ± 0,02	115	102
11	NU80.24	14,25 ± 0,01	115	102
12	NU60.18	13,83 ± 0,02	112	99
13	NU120.6	13,75 ± 0,01	111	98
14	NU60.5	13,55 ± 0,02	110	97
15	NU80.8	13,27 ± 0,01	107	95



Hình 2. Khả năng kháng ethanol của dòng đột biến tích lũy NU120.4 và chủng nấm men *S. cerevisiae* D8.

Thử nghiệm lên men ethanol bằng dòng đột biến tích lũy NU120.4

*Khả năng chịu ethanol của dòng đột biến tích lũy NU120.4 và chủng *S. cerevisiae* D8*

Kết quả đếm số lượng tế bào sống của dòng đột biến tích lũy NU120.4 và chủng gốc *S. cerevisiae* D8 được nuôi trong môi trường lên men dịch thể có bổ sung ethanol với các nồng độ khác nhau được ghi lại trong hình 2.

Sau 24 h nuôi cấy, ở nồng độ ethanol ban đầu 4 - 6%, dòng đột biến NU120.4 và chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 đều phát triển tốt, đạt số lượng tế bào sống cực đại là 342×10^6 tế bào/mL dịch lên men. Ở các môi trường có nồng độ 6 - 10% ethanol, số lượng tế bào của chủng đột biến tích lũy NU120.4 vẫn tiếp tục ổn định và chỉ giảm đáng kể khi nồng độ ethanol vượt quá 10%. Trong khi đó, chủng *S. cerevisiae* D8 có số lượng tế bào giảm mạnh khi nồng độ ethanol bổ sung ban đầu cao hơn 6%. Như vậy, dòng đột biến tích lũy NU120.4 có khả năng chịu nồng độ ethanol cao hơn hẳn so với chủng nấm men *S. cerevisiae* D8. Điều này cũng đồng thời giải thích thêm cho khả năng sinh ethanol đạt tới 15,07 % của dòng đột biến này, trong khi chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 chỉ sinh ethanol ở mức cao nhất là 12,37%.

*So sánh khả năng lên men trong môi trường có hàm lượng đường cao của dòng đột biến tích lũy NU 120.4 và chủng *S. cerevisiae* D8.*

Bảng 3. Khả năng lên men trong môi trường có hàm lượng đường cao của dòng đột biến tích lũy NU 120.4 và chủng nấm men *S. cerevisiae* D8.

Hàm lượng đường (g/L)	Nấm men			
	Chủng <i>S. cerevisiae</i> D8		Dòng đột biến tích lũy NU 120.4	
	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hiệu suất lên men (%)	Hàm lượng ethanol (% v/v)	Hiệu suất lên men (%)
200	12,37 ± 0,02	95 ± 0,02	12,66 ± 0,02	96 ± 0,01
220	12,34 ± 0,01	86 ± 0,01	13,69 ± 0,03	95 ± 0,02
250	12,34 ± 0,01	76 ± 0,01	15,07 ± 0,01	93 ± 0,01
270	12,35 ± 0,02	70 ± 0,01	15,16 ± 0,03	86 ± 0,01
300	12,35 ± 0,01	63 ± 0,01	15,18 ± 0,02	78 ± 0,01
320	12,36 ± 0,02	59 ± 0,01	15,21 ± 0,05	73 ± 0,01
350	12,37 ± 0,03	54 ± 0,12	15,24 ± 0,01	67 ± 0,01

Thử nghiệm lên men ethanol trong dịch ép dứa Queen bằng dòng đột biến tích lũy NU 120.4

Thử nghiệm lên men ethanol trên môi trường nước

Sau 10 ngày lên men trong môi trường có bổ sung đường cao ở các nồng độ khác nhau, hàm lượng ethanol của dòng đột biến tích lũy NU120.4 và chủng *S. cerevisiae* D8 được ghi lại trong Bảng 3.

Trong môi trường lên men có hàm lượng đường 200 g/L hiệu suất lên men của dòng đột biến tích lũy NU 120.4 và chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 có sự chênh lệch không đáng kể. Khi hàm lượng đường trong môi trường lên men đạt 250 g/L thì hàm lượng ethanol ethanol trong dịch lên men của dòng đột biến tích lũy NU 120.4 đạt tới 15,07 % với hiệu suất lên men là 93%. Tiếp tục tăng hàm lượng đường trong môi trường lên men cao hơn 250 g/L thì hàm lượng ethanol sau lên men tạo bởi dòng đột biến vẫn tiếp tục tăng nhưng tăng không đáng kể, trong khi hiệu suất lên men lại giảm đáng kể (còn dưới 80% khi hàm lượng đường trên 270 g/L). Trong khi đó, chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 lên men tạo ethanol gần như không tăng khi hàm lượng đường trong môi trường lên men tăng từ 200 đến 350 g/L (12,37% v/v); do vậy, hiệu suất lên men của chủng này càng giảm khi nồng độ đường trong môi trường lên men trên 200 g/L. Rõ ràng là dòng đột biến tích lũy NU 120.4 có khả năng chịu nồng độ đường cao hơn so với chủng *S. cerevisiae* D8. Theo Fleet (2008) khả năng chịu hàm lượng đường cao là một tiêu chí tốt trong tuyển chọn chủng giống nấm men trong sản xuất rượu. Căn cứ vào kết quả này, hàm lượng đường 250 g/L sẽ được sử dụng cho dòng đột biến tích lũy NU 120.4 để lên men ethanol từ dịch dứa Queen.

ép dứa có hàm lượng đường tổng là 250 g/L được thực hiện đối với 10 dòng tế bào được cấy truyền từ dòng đột biến tích lũy NU120.4. Mỗi đợt thí nghiệm đều lặp lại 3 lần, kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Lên men ethanol bằng dòng đột biến tích lũy NU 120.4.

STT	Hàm lượng ethanol (%v/v)	Hiệu suất lên men (%)
1	15,05 ± 0,02	92,50 ± 0,1
2	15,18 ± 0,03	93,30 ± 0,2
3	15,12 ± 0,01	92,93 ± 0,1
4	15,07 ± 0,02	92,62 ± 0,1
5	14,97 ± 0,02	92,01 ± 0,1
6	14,94 ± 0,02	91,83 ± 0,1
7	15,16 ± 0,01	93,18 ± 0,1
8	15,15 ± 0,03	93,12 ± 0,2
9	14,98 ± 0,02	92,07 ± 0,1
10	15,08 ± 0,02	92,69 ± 0,1
TB	15,07 ± 0,12	92,62 ± 0,2

Kết quả thu được trong bảng 4 cho thấy dòng nấm men đột biến tích lũy NU 120.4 lên men ethanol tương đối ổn định (hàm lượng ethanol trung bình đạt tới 15,07 ± 0,12%, hiệu suất đạt 92,62 ± 0,2%). Trong khi chủng nấm men *S. cerevisiae* D8 lên men chỉ đạt hàm lượng ethanol tối đa là 12,37 ± 0,2% (Bảng 3). Do đó, dòng đột biến tích lũy NU 120.4 được đánh giá là có hoạt lực lên men ethanol cao, hiệu suất lên men cao và ổn định, có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất ethanol cao độ.

KẾT LUẬN

Việc gây đột biến ngẫu nhiên kết hợp giữa sử dụng NTG và UV làm tăng tỷ lệ chết của nấm men so với xử lý riêng rẽ với NTG hoặc UV. Từ các dòng đột biến ngẫu nhiên này, các dòng đột biến sinh ethanol cao, chịu được hàm lượng đường và ethanol cao đã được sàng lọc và tuyển chọn. Dòng đột biến tích lũy NU 120.4 có khả năng lên men ethanol cao và ổn định (đạt hàm lượng ethanol 15,07% v/v tăng 22% so với chủng nấm men *S. cerevisiae* D8), chịu được 10% ethanol, chịu được 250 g/L đường đã được tuyển chọn cho các nghiên cứu ứng dụng trong sản xuất ethanol cao độ từ dịch dứa Queen.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Bộ môn Công nghệ sinh học - Vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học sư phạm Hà Nội; Bộ môn Hóa - Lý và Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học cơ bản, Trường Đại học Tân Trào, Tuyên Quang cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bottcher F, Mikrobio ZA (1977) *Rhodospiridium Banno*: Yeast phase inactivation by ultraviolet light and N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *Z Allg Mikrobiol* 17(4): 283-292.
- Duveau FF, Metzger BPH, Gruber JD, Mack K, Sood N, Brooks TE, Wittkopp PJ (2014) Mapping small effect mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Impacts of experimental design and mutational properties. *Genes, Genomes, Genetics* 4(7): 1205-1216.
- Đỗ Thị Kim Loan, Nguyễn Thị Việt Anh, Vũ Văn Hạnh, Bạch Hoàng My (2015) Cải biến chủng vi khuẩn axetic bằng kỹ thuật đột biến ngẫu nhiên nhằm nâng cao khả năng sinh tổng hợp axit axetic ứng dụng trong sản xuất dấm lên men nồng độ cao trên môi trường bổ sung dịch bã rượu. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 267(12): 78-85.
- Fang Z, Gonzales AM, Clegg MT, Smith KP, Muehlbaue GJr, Steffenson BJ, Morrell PL (2014) Two genomic regions contribute disproportionately to geographic differentiation in wild barley. *Genes, Genomes, Genetics* 4(7): 1193-1203.
- Fiedurek J, Skowronek M, Gromada A (2011) Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* increased etylic tolerance and production. *Pol J Microbiol* 60(1): 51-58.
- Fleet GH (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res* 8(7): 979-995.
- Hoang Thi Le Thuong, Nguyen Quang Hao, Tran Thi Thuy (2017) Taxonomic characterization and identification of *Saccharomyces cerevisiae* D8 for brandy production from pineapple. *J Biol* 39 (4): 474-483.
- Glynn J (2016) Risks of GMOs. *J Nutrition & Food Sci* 6 (1): 458.
- Kim K, Lee JY (1998) Strain improvement of yeast for etylic production using a combined treatment of electric field and chemical mutagen /N-Methyl-N'-nitro-/Y-nitrosoguanidine. *J Microbiol Biotechnol* 8(2): 119-123.
- Lawrence CW, Nisson PE, Christensen RB (1985) UV and chemical mutagenesis in rev7 mutants of yeast. *Mol Gen Genet* 200(1): 86-91.
- Lui JJ, Ding WT, Zhang GC, Wang JY (2011) Improving etylic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* in very high-gravity fermentation through chemical mutagenesis and meiotic recombination. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(4): 1239-1246.
- Mai Thị Hằng, Đinh Thị Kim Nhung, Vương Trọng Hào (2011) *Thực hành vi sinh vật học*. NXB Đại học Sư Phạm, Hà Nội: 38-44.

- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem USA* 31(3): 426-428.
- Nguyễn Đình Thương, Nguyễn Thanh Hằng (2007) *Công nghệ sản xuất và kiểm tra cồn etylic*. NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội: 251.
- Nguyễn Hoài Hương, Bùi Văn Thế Vinh (2009) *Thực hành hóa sinh*. Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh, Khoa Môi trường và Công nghệ sinh học, Thành phố Hồ Chí Minh: 21.
- Reed G, Nagdawithna T (1991) *Yeast Technology*. Van Nostrand Reinhold Press, New York: 45-48.
- Sridhar M, Kiran SN, Rao LV (2002) Effect of UV radiation on thermotolerance, etylic tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. *Bioresour Technol* 83(3): 199-202.
- Steensels J, Snoek T, Meersman E, Nicolino MP, Kevin JK, Voordeckers V (2014) Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38(5): 947-995.
- Swinnen S, Schaerlaekens K, Pais T, Claesen J, Hubmann G, Yang Y, Demeke M, Foulquié - Moreno MR, Goovaerts A, Souvereyns K, Clement L, Dumortier F, Thevelein JM (2012) Identification of novel causative genes determining the complex trait of high etylic tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res* 22(5): 975-984.
- Vũ Văn Hạnh, Lê Thị Thùy Dương, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Thu Thùy (2012) Nâng cao độc lực diệt rệp đào chua chủng nấm kí sinh côn trùng *Lecanycium* bằng đột biến tia cực tím (UV) và N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) nhằm sản xuất thuốc trừ sâu sinh học. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 50(2): 197-209.

IMPROVEMENT OF THE ETHANOL PRODUCTION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* D8 BY THE RANDOM MUTAGENESIS

Hoang Thi Le Thuong¹, Tran Thi Thuy², Nguyen Quang Hao³

¹Tan Trao University, Tuyen Quang

²Hanoi National University of Education

³Ministry of Education and Training

SUMMARY

Saccharomyces cerevisiae D8 isolated from Queen pineapple extract and selected for high ethanol fermentation activity (12.37% v/v ethanol concentration in fermentation media with a total sugar content of 200 g/L) has been reported previously (Hoang Thi Le Thuong *et al.*, 2017). In this paper, the strain was subjected to random mutagenesis by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and ultraviolet (UV) in order to enhance its ethanol fermentation. The results showed that 1% NTG was more lethal than UV (260 nm, 50 V) to *S. cerevisiae* D8 at the same time of treatment. The combination of NTG and UV was found to increase the mortality of *S. cerevisiae* D8. Surviving cells after treatment with NTG and UV combination were identified for ethanol fermentation. Thirteen clones were capable of fermenting higher ethanol concentration than *S. cerevisiae* D8 was. Especially, mutant clone NU 120.4 was able to ferment glucose up to the highest ethanol concentration (22% higher than that of *S. cerevisiae* D8). This mutant clone also showed more tolerant to high ethanol and sugar concentrations in the fermentation medium than that of *S. cerevisiae* D8. The ethanol fermentation of this mutant was relatively stable in Queen pineapple extract (ethanol concentration of about $15.07 \pm 0.12\%$) and the yield of ethanol fermentation was $92.62 \pm 0.2\%$, while *S. cerevisiae* D8 gained maximum alcohol concentration of $12.37 \pm 0.2\%$. In the context of the availability of pineapple used as primary source of food processing in Vietnam nowadays, these results showed a potential application of this mutant clone NU 120.4 in brandy production from pineapple extract.

Keywords: Ethanol, NTG, random mutagenesis, *Saccharomyces cerevisiae*, UV