

## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CHŨNG *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MS42

Nguyễn Văn Quyên<sup>1</sup>, Nguyễn Quang Thảo<sup>2</sup>, Nguyễn Thảo Anh<sup>3</sup>, Nguyễn Thành Đạt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học sư phạm Hà Nội

<sup>2</sup>Bộ Công Thương Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Ngày nhận bài: 18.5.2016

Ngày nhận đăng: 30.7.2016

### TÓM TẮT

Nghiên cứu sự sinh trưởng là một yêu cầu quan trọng trong quá trình ứng dụng nấm men vào công nghệ sản xuất rượu. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh sản và phát triển của nấm men: nhiệt độ, pH, hàm lượng oxygen hòa tan, hàm lượng đường, các chất dinh dưỡng,... Số lượng và chất lượng nấm men giống quyết định đến chất lượng của sản phẩm rượu. Khi số lượng nấm men giống áp đảo thì tốc độ lên men sẽ nhanh hơn, đây là yếu tố quan trọng trong việc chống nhiễm đối với các vi sinh vật có hại trong quá trình lên men. Việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của nấm men là cần thiết để đảm bảo mục đích chính của quá trình nhân giống nhằm tạo ra được quần thể nấm men có chất lượng tốt, số lượng lớn, thời gian nhân giống nhanh có ý nghĩa quan trọng đối với quá trình lên men để tạo được sản phẩm tốt. Ngoài ra, trong thực tiễn việc nhân giống nấm men nhanh, hiệu quả, sử dụng nguyên liệu rẻ tiền, thông dụng cũng là một yếu tố quan trọng trong quá trình sản xuất mang lại hiệu quả kinh tế cao. Nghiên cứu các yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến sinh trưởng của chủng *Saccharomyces cerevisiae* MS42 chúng tôi xác định môi trường, điều kiện tối ưu cho nhân giống: Hàm lượng đường là 80 (g/l), pH = 5,0; nhiệt độ từ 28°C với lượng ôxy hoà tan ban đầu từ 7,0 (mg/l), sau 24 giờ nuôi cấy (kể từ khi tiếp giống), số lượng tế bào nấm men đã đạt cực đại triệu tb/ml (219,5 ± 3,0) và tỉ lệ tế bào nảy chồi đạt khoảng: 70 – 72 %.

**Từ khóa:** Ảnh hưởng pH, nhiệt độ, Nấm men, phân lập, malt đại mạch, nhân giống, phát triển, sinh sản

### GIỚI THIỆU

Từ 107 dòng tế bào nấm men phân lập từ bánh men truyền thống (Bắc Hà, Mẫu Sơn, làng Vân) đã chọn được chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (ký hiệu MS42) đạt điểm cảm quan 16,6/20; hiệu suất lên men đạt 89,45%, thành phần tạp chất (*metanol* (không phát hiện < 0,50 mg/L), *Acetandehyde* (125 mg/L), rượu bậc cao (216 mg/L), *furfural* (không phát hiện < 0,21 mg/L) đạt tiêu chuẩn Việt Nam. Chúng tôi tiến hành khảo sát các yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của *S.cerevisiae* MS42 để xác định môi trường nhân giống tối ưu.

Chủ động các điều kiện ảnh hưởng đến sinh trưởng của nấm men đảm bảo tạo ra một số lượng lớn tế bào nấm men thuần, chất lượng cao, sinh trưởng mạnh, thời gian nhân giống nhanh,... là một công đoạn không thể thiếu trong quá trình sản xuất vì chất lượng giống ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng sản phẩm của quá trình lên men. Mỗi một chủng nấm men lại có tính đặc thù trong các điều kiện sinh trưởng và phát triển tối ưu.

Nghiên cứu các điều kiện tối ưu trong nhân giống đảm bảo hiệu quả trong sản xuất giống, đây là điều kiện tiên quyết trong quy trình sản xuất lên men rượu. Sự dụng các nguồn nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền trong sản xuất giống luôn là một hướng phát triển mang lại giá trị, hiệu quả cao. Các yếu tố khảo sát cơ bản về ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển nấm men là: pH, nhiệt độ, hàm lượng đường, oxi hòa tan, chất thay thế, bổ sung (Nguyễn Quang Thảo, 2000; Arroyo-López *et al.*, 2006; D'Amato *et al.*, 2006; Torija *et al.*, 2003). Môi trường nhân giống tối ưu trong nhân giống nấm men để sản xuất rượu (Phạm Văn Kiều, 1996; Lương Đức Phẩm, 2006; Nguyễn Quang Thảo, 2000).

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Nguyên liệu, thiết bị, hóa chất

Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* MS42 được phân lập từ bánh men truyền thống (Mẫu Sơn).

Malt: Nhập khẩu từ Barley (Sebastion, Pháp).

Hóa chất: Các hoá chất tinh khiết, đường glucoza, pepton...(Merck, Mỹ); Các loại muối: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (hóa chất phân tích loại PA)... Enzym *Termamyl*®; *Dextrozyme* ® *GA* (Novozymes - Đan Mạch)...

Thiết bị: Tủ ôn nhiệt FOC 225E, Kính hiển vi điện tử Olympus BX 41, Nồi hấp, thiết bị xác định độ cồn, độ đường, pH, DO, Thiết bị đo oxy cầm tay (Hanna HI 9146),...

Môi trường Hanxen lỏng; Môi trường nhân giống cấp 1 (ký hiệu là: G1) gồm:

Pepton: 10 (g/l), Glucose: 50 (g/l), Đường tổng số: 80 (g/l), Dịch malt (16Bx): 200ml Nước (đủ tới): 1000 ml, pH (chỉnh bằng citric acid) = 5,0.

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**Xác định khả năng sinh trưởng của nấm men**

Sử dụng phương pháp đếm số lượng tế bào trên buồng đếm hồng cầu (Thoma - Goriev), (Lê Thanh Mai *et al.*, 2006).

**Xác định tốc độ sinh sản của nấm men**

Tốc độ sinh sản trung bình của các chủng nấm men trong 1 giờ được tính bằng công thức [1]:

$$v = dx / dt = (\lg X - \lg X_0) / \lg 2(t - t_0)$$

Trong đó:

v: Tốc độ sinh trưởng trung bình (số lần phân chia) của nấm men trong 1 giờ

dx: Số tế bào nấm men tăng thêm trong 1ml dịch (từ

thời điểm t<sub>0</sub> đến t)

dt: Thời gian nuôi cấy (dt = t - t<sub>0</sub> (giờ))

t: Thời điểm xác định

t<sub>0</sub>: Thời điểm ban đầu

X: Nồng độ nấm men ở thời điểm xác định

X<sub>0</sub>: Nồng độ nấm men ở thời điểm ban đầu

Xác định hàm lượng đạm amin theo (AOAC, 2012).

Phương pháp toán học (Phạm Văn Kiều, 1996).

Tính trung bình tổng thể : 
$$M = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n}$$

Trong đó: M là trung bình tổng thể; X<sub>i</sub> là giá trị của mỗi kết quả thí nghiệm từ 1 đến n; n là số lần thí nghiệm.

Độ lệch tiêu chuẩn tổng thể:

$$\delta = \pm \sqrt{\frac{1}{2} \sum (X_i - M)^2}$$

Trong đó: M là trung bình tổng thể; X<sub>i</sub> là giá trị của mỗi kết quả thí nghiệm từ 1 đến n.

Hệ số biến thiên của trung bình tổng thể :

$$CV = \frac{\delta \times 100}{M} (\%)$$

Trong đó: CV là hệ số biến thiên của trung bình tổng thể; M là trung bình tổng thể; δ là độ lệch mẫu.

- Xử lí số liệu theo chương trình Excel/Data/Analysis/descriptive statistics; Dụng đồ thị trên Excel.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của pH tới sự sinh trưởng của *S. cerevisiae* MS42.

pH	Số lượng tế bào (x 10 <sup>6</sup> tb/ml) theo thời gian								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
4,0	5,5 ± 0,3	15,6 ± 1,0	81,2 ± 2,0	136,2 ± 2,0	186,2 ± 3,0	192,5 ± 3,0	182,5 ± 3,0	162,5 ± 2,0	132,5 ± 2,0
4,5	5,5 ± 0,3	16,2 ± 1,0	90,3 ± 2,0	152,5 ± 2,0	197,5 ± 3,0	191,5 ± 3,0	186,5 ± 3,0	178,5 ± 2,0	163,5 ± 2,0
<b>5,0</b>	5,5 ± 0,3	18,5 ± 1,0	92,5 ± 2,0	156,3 ± 2,0	<b>206,3 ± 3,0</b>	201,3 ± 3,0	195,3 ± 3,0	190,3 ± 2,0	175,3 ± 2,0
<b>5,5</b>	5,5 ± 0,3	17,4 ± 1,0	92,1 ± 2,0	151,5 ± 2,0	201,5 ± 3,0	196,5 ± 3,0	190,5 ± 3,0	182,5 ± 2,0	167,5 ± 2,0
<b>6,0</b>	5,5 ± 0,3	15,2 ± 1,0	88,6 ± 2,0	153,6 ± 2,0	198,6 ± 3,0	193,6 ± 3,0	188,6 ± 3,0	178,6 ± 2,0	163,6 ± 2,0
6,5	5,5 ± 0,3	14,7 ± 1,0	82,1 ± 2,0	148,1 ± 2,0	193,1 ± 3,0	183,1 ± 3,0	179,1 ± 3,0	169,1 ± 2,0	154,1 ± 2,0

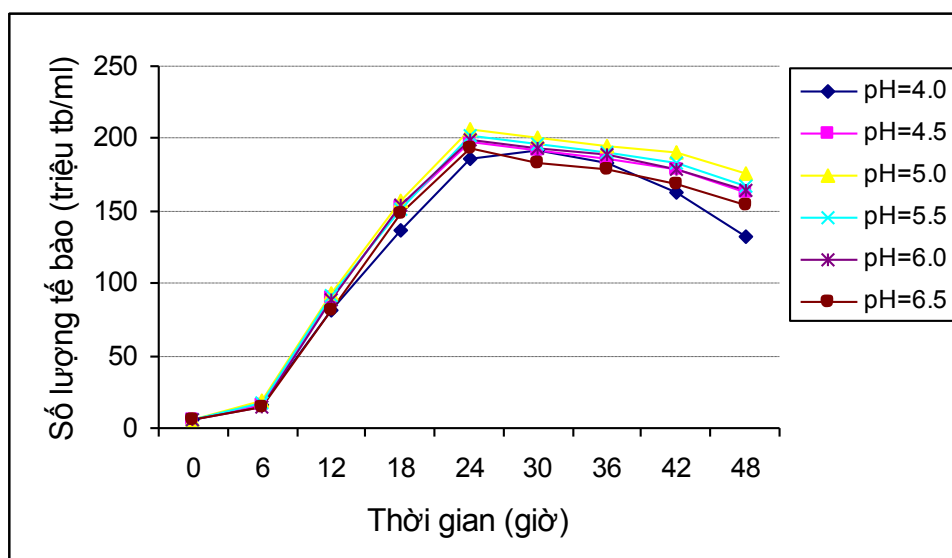
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

**Ảnh hưởng của độ pH**

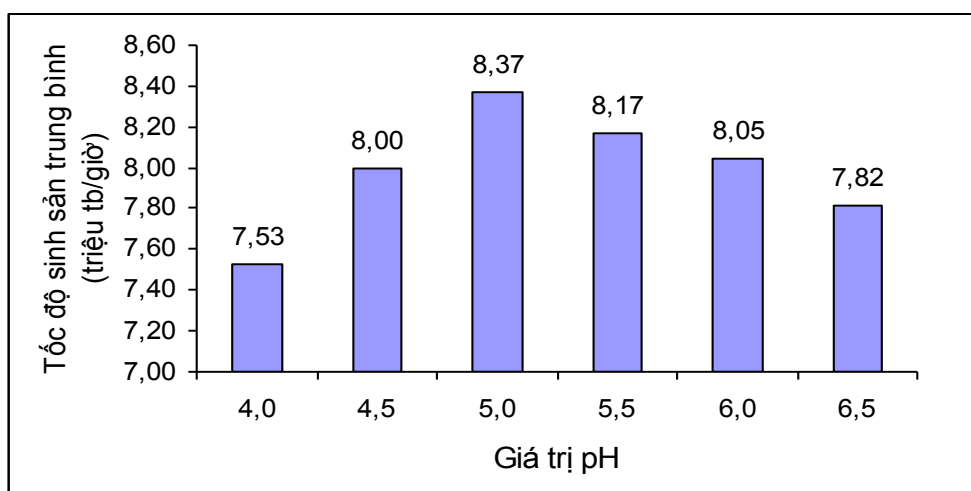
Chủng *S. cerevisiae* MS42 sau 30 giờ nuôi cấy trong môi trường Hanxen lỏng được nuôi cấy vào môi trường nhân giống cấp 1 (ký hiệu là: G1) với số lượng tế bào ban đầu là  $5,5 \times 10^6$  tế bào/ml, điều chỉnh độ pH ở các mức: 4,0 - 4,5 - 5,0 - 5,5 - 6,0 - 6,5 nhiệt độ 25 – 30°C, thời gian 48 giờ.

Tiến hành xác định tốc độ sinh trưởng của tế bào nấm men bằng phương pháp đếm số lượng tế bào và xác định tỉ lệ tế bào nấm men non sau khi nhuộm tế bào bằng dung dịch Lugol, thời gian lấy mẫu 6 giờ/lần. Kết quả thu được như sau (Bảng 1).

Sự sinh trưởng ở những điều kiện pH môi trường khác nhau của các chủng nấm men được thể hiện qua đồ thị (Hình 1, 2).



Hình 1. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng nấm men *S. cerevisiae* MS42.



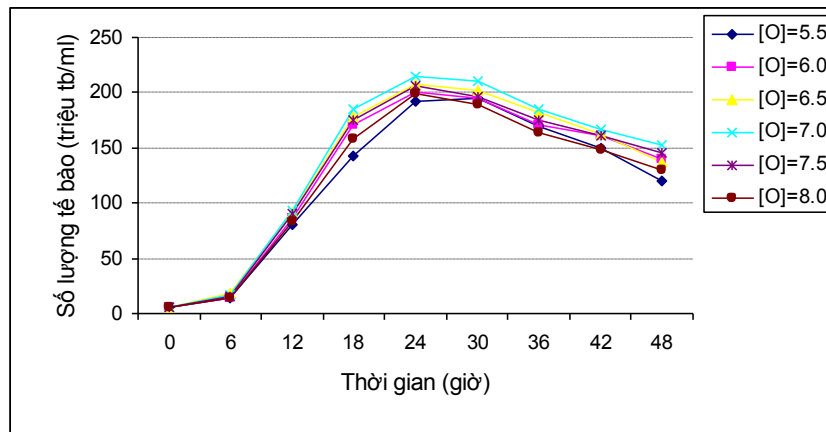
Hình 2. Tốc độ sinh sản trung bình *S. cerevisiae* MS42 trong 24 giờ ở môi trường có pH khác nhau.

Kết quả (Bảng 1, Hình 1, 2) cho thấy chủng *S.cerevisiae* MS42 sinh trưởng tốt ở môi trường có pH từ 4,5 đến 6,0. Tốc độ sinh sản trung bình đạt từ  $8,00 \times 10^6 - 8,37 \times 10^6$  tế bào/giờ, trong đó ở pH = 5,0 sau 24 giờ nuôi cấy có số lượng tế bào đạt cực đại ( $206,3 \times 10^6$  tb/ml). Ở pH = 4,0 tốc độ sinh trưởng của *S.cerevisiae* MS42 chậm hơn, sau 30

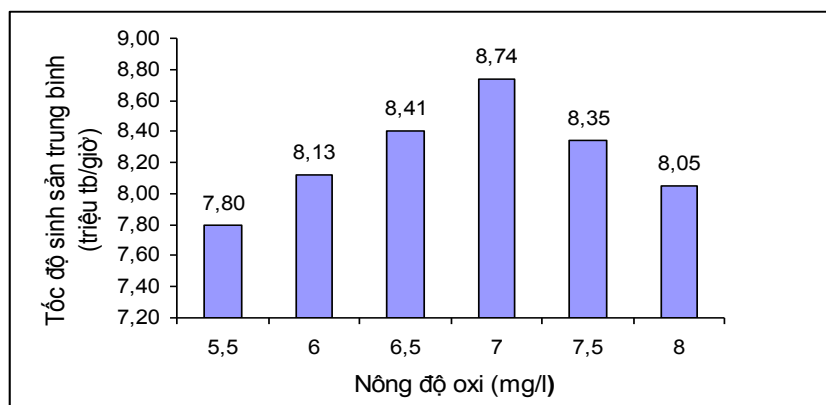
giờ mới đạt số lượng tế bào cực đại là  $192,5 \times 10^6$  tb/ml. Kiểm tra chất lượng tế bào ở pH từ 5,0 – 5,5 ở giai đoạn 18 – 24 giờ nuôi cấy chúng tôi thấy đây là quần thể tế bào trẻ có tỉ lệ tế bào nảy chồi rất cao (trên 70%). Số lượng tế bào duy trì ở mức cao kéo dài (pha ổn định) tốt nhất ở thời gian từ 24 đến 36 giờ.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của oxi hoà tan đến sinh trưởng nấm men.

Nồng độ O <sub>2</sub> (mg/l)	Số lượng tế bào ( $\times 10^6$ tb/ml) theo thời gian									
	0	6	12	18	24	30	36	42	48	
5,5	5,5 ± 0,3	13,6 ± 1,0	80,2 ± 2,0	142,6 ± 2,0	192,6 ± 2,0	195,1 ± 2,0	170,1 ± 2,0	150,1 ± 2,0	120,1 ± 1,0	
6,0	5,5 ± 0,3	14,2 ± 1,0	86,3 ± 2,0	170,5 ± 2,0	200,5 ± 3,0	195,5 ± 3,0	170,5 ± 2,0	160,5 ± 2,0	140,5 ± 1,0	
<b>6,5</b>	5,5 ± 0,3	18,5 ± 1,0	92,5 ± 2,0	177,3 ± 2,0	<b>207,3 ± 3,0</b>	<b>202,3 ± 3,0</b>	182,3 ± 2,0	162,3 ± 2,0	137,3 ± 1,0	
<b>7,0</b>	5,5 ± 0,3	17,4 ± 1,0	93,2 ± 2,0	185,2 ± 2,0	<b>210,8 ± 3,0</b>	<b>208,6 ± 3,0</b>	185,2 ± 2,0	167,2 ± 2,0	152,2 ± 1,0	
<b>7,5</b>	5,5 ± 0,3	16,2 ± 1,0	90,6 ± 2,0	175,8 ± 2,0	<b>205,8 ± 3,0</b>	<b>195,8 ± 3,0</b>	175,8 ± 2,0	160,8 ± 2,0	145,8 ± 1,0	
8,0	5,5 ± 0,3	13,4 ± 1,0	78,9 ± 2,0	159,6 ± 2,0	198,6 ± 3,0	188,6 ± 3,0	163,6 ± 2,0	148,6 ± 2,0	130,2 ± 1,0	



**Hình 3.** Đồ thị ảnh hưởng của oxygen đến sinh trưởng nấm men *S.cerevisiae* MS42.



**Hình 4.** Ảnh hưởng của oxygen đến tốc độ sinh trưởng trung bình *S.cerevisiae* MS42.

### Ảnh hưởng của lượng oxygen hoà tan ban đầu

Bổ sung 200 ml môi trường trường G1 trong các bình tam giác (loại 500 ml), điều chỉnh pH = 5,0 và thanh trùng ở 121°C trong thời gian 15 phút, sau đó hạ thấp nhiệt độ và giữ ổn định nhiệt độ của môi trường ở 25°C. Tiến hành lắc trên máy lắc ổn nhiệt ở tốc độ 150 và nâng dần tốc độ lắc đến 250 vòng/phút để thu được dịch dịch có nồng độ oxi hoà tan ban đầu ở các mức: 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5 - 8,0 (mg/l). Tiến hành nhân giống chủng *S.cerevisiae* MS42 vào các bình với lượng tiếp giống ban đầu là  $5,5 \times 10^6$  tb/ml, giữ nhiệt độ nhân giống ở 25°C trong tủ ổn nhiệt (Lương Đức Phẩm, 2006; Nguyễn Quang Thảo, 2000; AOAC, 2012). Số lượng tế bào nấm men được đếm liên tục trong 48 giờ nuôi cấy, thời gian lấy mẫu 6 giờ/lần, chúng tôi thu được kết quả như sau:

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở nồng độ oxi hoà tan từ 6,5 đến 7,5 (mg/l) sau 24 giờ nuôi cấy số lượng tế bào đã đạt trên 205 triệu tb/ml và tỉ lệ tế bào này chồi khá cao (70 – 75%). Mẫu có lượng oxi hoà tan 7,0 ml có số lượng tế bào nấm men đạt cao nhất

(210,8 triệu tb/ml). Điều này là phù hợp vì sự sinh trưởng (tăng sinh khối) của nấm men là quá trình hô hấp hiếu khí và phụ thuộc vào hàm lượng oxygen hoà tan có trong dịch nhân giống, hàm lượng oxygen thấp sẽ hạn chế sự sinh trưởng của nấm men và ngược lại khi hàm lượng oxygen trong dịch cao quá làm cho thể oxi hoá - khử tăng gây ức chế trao đổi chất nấm men, kìm hãm sự tăng sinh khối nấm men do đó số lượng tế bào của nấm men cũng không thể tăng thêm nữa (Lương Đức Phẩm, 2006). Kết quả trên có thể thấy rõ ở hình 3; 4.

### Ảnh hưởng của nhiệt độ

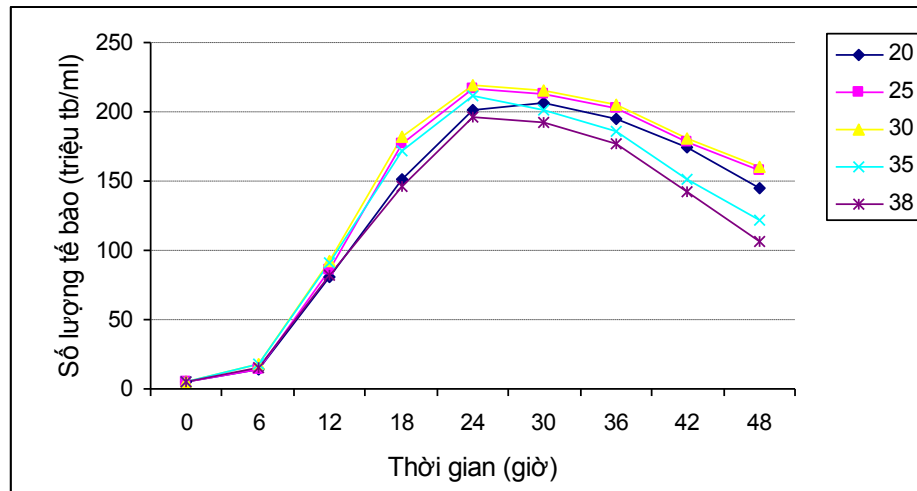
Tiến hành nhân giống chủng *S.cerevisiae* MS42 trên môi trường G1 và điều chỉnh pH= 5,0; hàm lượng oxi hoà tan trong dịch nhân giống đạt 7,0 mg/lít và giữ nhiệt độ ở các mức : 20 - 25 - 30 - 35 – 38°C, tiếp giống ban đầu với số lượng là  $5,5 \times 10^6$  tế bào/ml dịch. Mẫu được nuôi trong 48 giờ trong tủ ổn nhiệt (FOC - 225E) và thực hiện đếm số lượng tế bào 6 giờ/lần. Kết quả thu được:

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng nấm men.

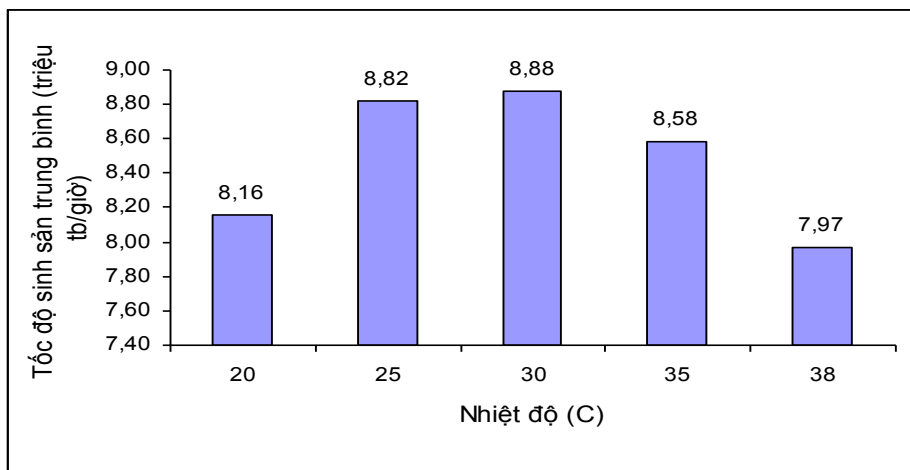
Nhiệt độ	Số lượng tế bào ( $\times 10^6$ tb/ml) theo thời gian								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
20°C	5,5 ± 0,3	13,6 ± 1,0	80,2 ± 1,0	151,3 ± 2,0	201,3 ± 2,0	205,9 ± 3,0	194,9 ± 2,0	174,9 ± 2,0	144,9 ± 1,0
<b>25°C</b>	5,5 ± 0,3	14,2 ± 1,0	86,3 ± 1,0	177,2 ± 2,0	<b>217,2 ± 3,0</b>	213,2 ± 3,0	203,2 ± 2,0	178,2 ± 2,0	158,2 ± 1,0
<b>30°C</b>	5,5 ± 0,3	18,5 ± 1,0	92,5 ± 1,0	182,6 ± 2,0	<b>218,6 ± 3,0</b>	215,6 ± 3,0	205,6 ± 2,0	180,6 ± 2,0	160,6 ± 1,0
35°C	5,5 ± 0,3	17,4 ± 1,0	91,2 ± 1,0	171,4 ± 2,0	211,4 ± 3,0	201,4 ± 3,0	186,4 ± 3,0	151,4 ± 3,0	121,4 ± 1,0
38°C	5,5 ± 0,3	15,2 ± 1,0	82,1 ± 1,0	146,7 ± 2,0	196,7 ± 3,0	191,7 ± 3,0	176,7 ± 2,0	141,7 ± 2,0	106,7 ± 1,0

Kết quả (Bảng 4, Hình 5; 6) cho thấy: ở nhiệt độ từ 25 – 30°C, chủng *S. cerevisiae* MS42 có sự sinh trưởng tốt nhất. Sau 24 giờ kể từ khi tiếp giống và nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C mật độ tế bào đã đạt cực đại ( $\approx 218,6$  triệu tb/ml). Ở các ngưỡng nhiệt độ 20°C sau 30 giờ nuôi cấy, số lượng tế bào mới đạt cực đại là  $\approx 205,9$  triệu tb/ml. Nhiệt độ càng thấp làm cho hoạt động chuyển hoá trong nấm men giảm, sự tăng sinh khối giảm. Khi nhiệt độ cao hoạt động chuyển hoá của nấm men nhanh hơn làm sinh khối tăng nhanh (Torija *et al.*, 2003). Ở nhiệt độ từ 35°C trở lên, số lượng tế bào nấm men thấp hơn, là do khi

nhiệt độ tăng cao, trong quá trình chuyển hoá trao đổi chất cũng tăng rất nhanh nên đã tạo ra nhiều chất (như diacetyl) đã gây ức chế cho sinh trưởng nấm men và làm cho protein có thể biến tính có thể làm nấm men bị chết dần. Điều này là phù hợp vì nhiều kết quả nghiên cứu về nấm men đã cho thấy nấm men để sản xuất rượu sinh trưởng tốt nhất ở nhiệt độ từ 25 – 32°C (Lương Đức Phẩm, 2006; Nguyễn Quang Thảo., 2000; Arroyo-López *et al.*, 2006) do đó chúng tôi đã chọn ngưỡng nhiệt độ nuôi cấy nấm men trong quá trình nhân giống ở mức 28°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo về nấm men.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng *S.cerevisiae* MS42.



Hình 6. Tốc độ sinh sản trung bình của *S. cerevisiae* MS42 ở nhiệt độ khác nhau (24 giờ).

### Ảnh hưởng của hàm lượng đường

Chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng *S. cerevisiae* MS42 vào các môi trường G1 đã bổ sung đường trong dịch nhân giống đạt các mức 60; 80; 100; 120; 140 (g/l). Điều chỉnh pH = 5,0; hàm lượng oxygen hòa tan: 7,0 mg/l, lượng giống tiếp ban đầu là 5,5 triệu tb/ml. Nấm men được nuôi cấy trong 48 giờ ở nhiệt độ 28°C (Nguyễn Quang Thảo, 2000; AOAC, 2012; D'Amato *et al.*, 2006) và tiến hành đếm số lượng tế bào ở các khoảng thời gian 6 giờ/lần. Kết quả thu được (Bảng 5, Hình 7; 8).

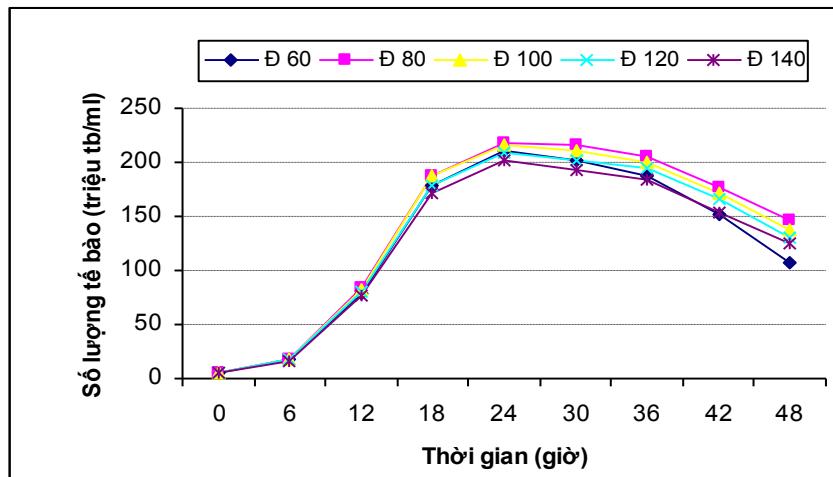
Chủng *S.cerevisiae* MS42 sinh trưởng tốt nhất ở môi trường nhân giống có hàm lượng đường 80 – 100 (g/l). Ở 80 g/l, sau 18 đến 24 giờ nuôi cấy số lượng tế bào đạt cực đại  $\approx 219,5$  triệu tb/ml, tỉ lệ tế bào này chồi đạt  $\approx 70\%$ . Ở các mẫu có hàm lượng đường thấp, giai đoạn đầu tốc độ tế bào tăng nhanh chủ yếu do lượng oxi hòa tan ban đầu nhiều hơn nên nấm men sinh trưởng nhanh hơn. Tuy nhiên do lượng đường thấp nên ở các giai đoạn sau của quá trình nhân giống khả năng cung cấp dinh dưỡng bị hạn chế nên tốc độ sinh trưởng và sinh sản của nấm men giảm dần và tỉ lệ tế bào chết đạt  $\approx 25\%$ , tỉ lệ tế

bào này chồi chỉ đạt 20 – 25% sau 48 giờ nuôi cấy. Ở các mẫu có hàm lượng đường cao (120 g/lit và 140 g/lit) lượng oxi hòa tan ban đầu của dịch có thể bị giảm hơn và áp suất thẩm thấu cao hơn (do dịch

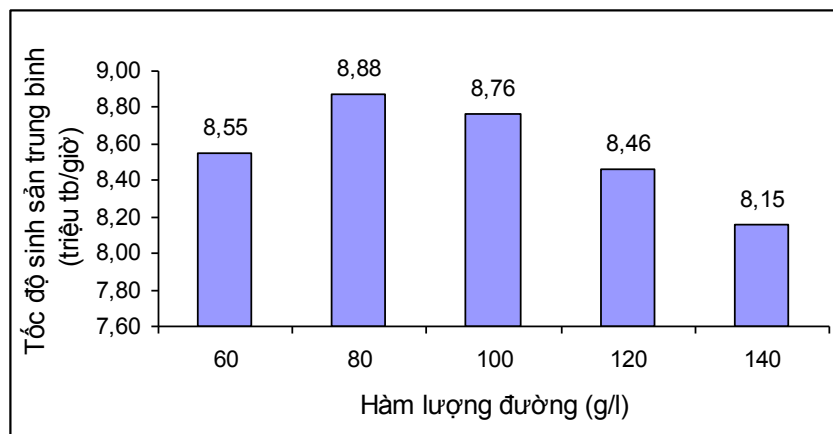
đường trong dịch cao hơn) đã hạn chế tốc độ sự sinh trưởng và số lượng tế bào nấm men. Căn cứ kết quả trên, chúng tôi chọn độ đường trong dịch nhân giống ở mức 80 g/l để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sinh trưởng nấm men.

Hàm lượng đường (g/l)	Số lượng tế bào ( $\times 10^6$ tb/ml) theo thời gian (h)								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
60	5,5 ± 0,3	18,6 ± 1,0	78,6 ± 1,0	178,6 ± 2,0	210,6 ± 3,0	202,6 ± 3,0	187,6 ± 3,0	152,6 ± 2,0	107,6 ± 1,0
80	5,5 ± 0,3	18,2 ± 1,0	84,2 ± 1,0	190,2 ± 2,0	<b>218,5 ± 3,0</b>	216,5 ± 3,0	203,5 ± 3,0	174,5 ± 2,0	144,5 ± 1,0
100	5,5 ± 0,3	17,5 ± 1,0	82,5 ± 1,0	187,5 ± 2,0	<b>215,8 ± 3,0</b>	210,8 ± 3,0	200,8 ± 3,0	171,8 ± 2,0	136,8 ± 1,0
120	5,5 ± 0,3	16,4 ± 1,0	79,4 ± 1,0	178,4 ± 2,0	208,6 ± 3,0	202,6 ± 3,0	194,6 ± 3,0	165,6 ± 2,0	130,6 ± 1,0
140	5,5 ± 0,3	15,2 ± 1,0	76,2 ± 1,0	172,2 ± 2,0	201,2 ± 3,0	192,2 ± 3,0	183,2 ± 3,0	154,2 ± 2,0	124,2 ± 1,0



**Hình 7.** Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến sinh trưởng của *S.cerevisiae* MS42.



**Hình 8.** Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến tốc độ sinh sản trung bình (24 giờ) của *S. cerevisiae* MS42.

**Sử dụng giá đỡ bổ sung trong nhân giống nấm men**

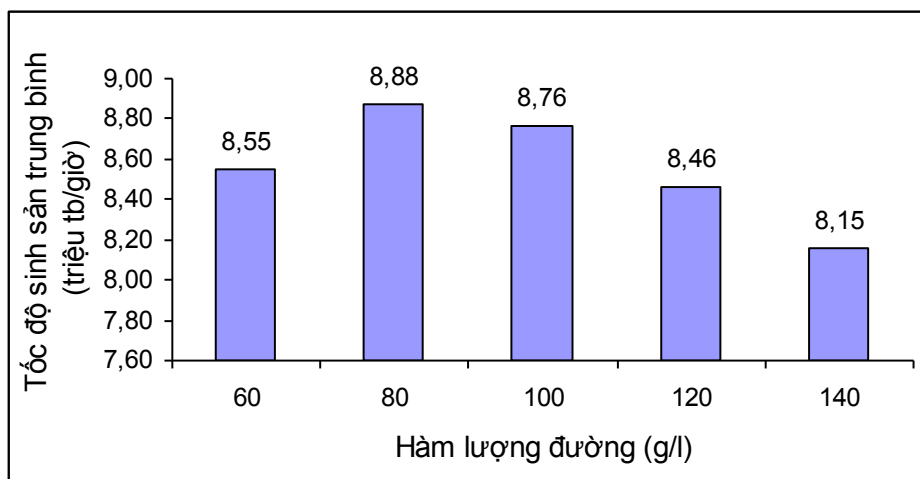
Theo một số nghiên cứu, trong giá đỡ rất giàu vitamin, khoáng chất, amino acid, protein,... đây là các nguồn dinh dưỡng rất tốt, có sẵn, dễ làm, giá thành rất rẻ có thể thay thế pepton trong môi trường nhân giống. Để tiến hành thí nghiệm nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng giá đỡ theo các mức khác nhau 20; 50;100;150; 200; 250 g/l để thay thế pepton dùng trong môi trường G1 bằng phương pháp sau: Sau khi ủ giá đỡ khoảng 72 giờ đến khi kích thước mầm đạt 2,0 – 2,5 cm, tiến hành xay nhuyễn 1.000 gam giá đỡ và bổ sung 1000 ml nước đun sôi, sau đó lọc, ép bã để thu hồi dịch chiết. Quy đổi số g/ml dịch giá đỡ theo thể tích dịch chiết thu được với khối lượng giá đỡ ban đầu. Giống được nhân và nuôi ở 28°C trong 48 giờ trên các môi trường có bổ sung

lượng giá đỡ khác nhau, điều chỉnh pH = 5,0; hàm lượng đường = 80 g/l; lượng oxygen hòa tan ban đầu = 7,0 mg/l và tiếp giống ban đầu với số lượng tế bào là  $5,5 \times 10^6$  tb/ml (Lương Đức Phẩm, 2006 ; Nguyễn Quang Thảo, 2000).

Từ kết quả thu được (Bảng 6, Hình 9; 10) cho thấy với hàm lượng giá đỡ bổ sung để thay thế pepton ở khoảng 100 g/l sau 24 giờ nuôi cấy, lượng tế bào nấm men đạt cực đại  $\approx 216,6$  triệu tb/ml, tỉ lệ tế bào này chồi đạt từ 70 – 72 % gần tương đương với nuôi cấy nấm men trên môi trường có sử dụng pepton (Bảng 5). Khi bổ sung lượng giá đỡ đạt mức trên 100 g/l thì số lượng tế bào nấm men và tỷ lệ nấm men trẻ hầu như không tăng. Điều này cho thấy bổ sung giá đỡ ở mức 100 g/l là phù hợp cho sinh trưởng nấm men.

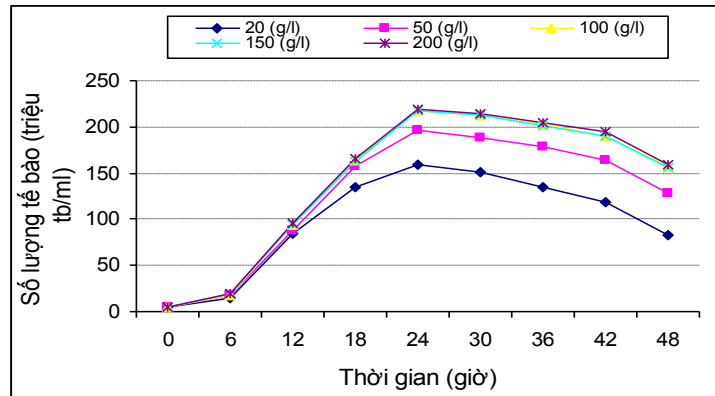
**Bảng 7.** Ảnh hưởng của hàm lượng giá đỡ đến sinh trưởng nấm men.

Hàm lượng giá đỡ (g/l)	Số lượng tế bào ( $\times 10^6$ tb/ml) theo thời gian (h)								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
20	5,5 ± 0,3	14,5 ± 1,0	84,5 ± 2,0	134,5 ± 2,0	158,5 ± 3,0	170,5 ± 2,0	155,5 ± 2,0	138,5 ± 1,0	103,5 ± 1,0
50	5,5 ± 0,3	17,6 ± 1,0	87,6 ± 2,0	157,6 ± 2,0	196,2 ± 3,0	188,2 ± 2,0	178,2 ± 2,0	163,2 ± 1,0	128,2 ± 1,0
<b>100</b>	5,5 ± 0,3	18,5 ± 1,0	93,5 ± 2,0	163,5 ± 2,0	<b>216,6 ± 3,0</b>	210,5 ± 2,0	200,5 ± 2,0	187,5 ± 2,0	154,5 ± 1,0
<b>150</b>	5,5 ± 0,3	18,7 ± 1,0	93,7 ± 2,0	162,5 ± 2,0	<b>216,8 ± 3,0</b>	212,8 ± 2,0	201,8 ± 2,0	190,2 ± 2,0	155,2 ± 1,0
<b>200</b>	5,5 ± 0,3	19,2 ± 1,0	95,1 ± 2,0	165,1 ± 2,0	<b>217,9 ± 3,0</b>	210,9 ± 2,0	205,1 ± 2,0	194,1 ± 2,0	159,1 ± 1,0

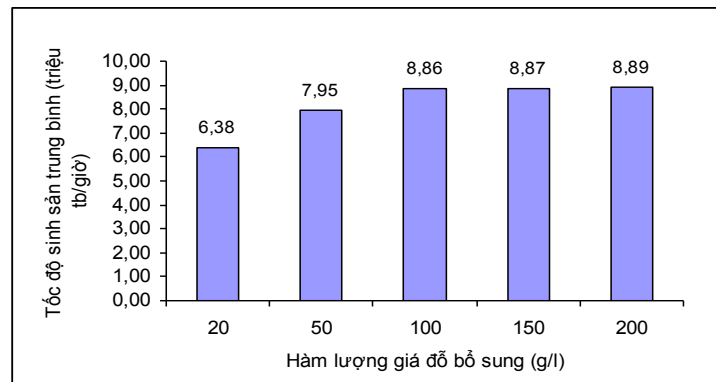


**Hình 8.** Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến tốc độ sinh sản trung bình (24 giờ) của *S.cerevisiae* MS42.





Hình 9. Ảnh hưởng của hàm lượng giá đỡ bổ sung đến sinh trưởng của *S.cerevisiae* MS42.



Hình 10. Ảnh hưởng của hàm lượng giá đỡ bổ sung đến tốc độ sinh sản trung bình của *S.cerevisiae* MS42.

## KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy: Khi sử dụng môi trường G1 để nhân giống nấm men *S.cerevisiae* MS42 ở các điều kiện hàm lượng đường là 80 g/l, pH = 5,0; nhiệt độ 28°C với lượng oxygen hoà tan ban đầu từ 7,0 mg/l thì chỉ sau 24 giờ nuôi cấy (kể từ khi tiếp giống), số lượng tế bào nấm men đã đạt cực đại (219,5±3,0) và tỉ lệ tế bào nảy chồi đạt khoảng: 70 – 72 %. Đề thuận tiện cho các nghiên cứu tiếp theo về nấm men, chúng tôi đặt tên cho môi trường có các điều kiện tối ưu trên là G2.

Trong trường hợp cần thiết có thể sử dụng sử dụng giá đỡ để thay thế pepton trong dịch nhân giống nấm men và lượng sử dụng phù hợp là 100 g giá đỡ /lít dịch môi trường.

**Lời cảm ơn:** Để thực hiện được các kết quả nghiên cứu trên chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ môn

*Công nghệ sinh học – Vi sinh, các nhóm nghiên cứu tại phòng thí nghiệm vi sinh thuộc khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội; Trung tâm bảo tồn giống vi sinh vật thuộc Viện Công nghệ thực phẩm đã tận tình và tạo điều kiện cơ sở vật chất, trang thiết bị cho chúng tôi hoàn thành kết quả nghiên cứu.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

AOAC (2012) *Official Methods of Analysis*. 19<sup>th</sup> Edition: 218–225.

Arroyo-López FN, Durán Quintana MC, Garrido Fernández A (2006) Use of the generalized z-value concept to study the effects of temperature, NaCl concentration and pH on *Pichia anomala*, a yeast related to table olive fermentation. *Int J Food Microbiol* 106: 45–51.

D'Amato D, Corbo MR, Del Nobile MA, Sinigaglia M, (2006) Effects of temperature, ammonium and glucose

concentrations on yeast growth in a model wine system. *Int J Food Sci Technol* 41: 1152–1157.

Lê Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thu Thủy, Nguyễn Thanh Hương, Lê Thị Lan Chi (2006) *Các phương pháp phân tích ngành công nghệ lên men*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật 28: 42–51.

Lương Đức Phẩm (2006) *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật: 5–10, 29–35; 79–91; 129–141.

Nguyễn Quang Thảo (2000) Nghiên cứu lên men vang và thiêu. Luận án Tiến sĩ: 100–105

Phạm Văn Kiều (1996) *Lý thuyết sản xuất và thống kê toán học*. Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội: 12–28; 35–42.

Torija MJ, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 80: 47–53.

## THE INFLUENCE OF SOME FACTORS ON THE REPRODUCTION AND GROWTH OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MS42

Nguyen Van Quyên<sup>1✉</sup>, Nguyen Quang Thao<sup>2</sup>, Nguyen Thanh Dat<sup>1</sup>, Nguyen Thao Anh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hanoi National University of Education

<sup>2</sup>Ministry of Industry and Trade of the Socialist Republic of Vietnam

<sup>3</sup>School of Biotechnology and Food technology, Hanoi University of Science and Technology

### SUMMARY

Research on the growth of yeast is a critical requirement, occupying an important role in the technology of alcohol production. In reality, there are many factors affecting on the reproductive process and the growth of yeast such as: temperature, pH, dissolved oxygen content, sugar content, nutrients, etc... The quantity and quality of yeast decide the quality on the wine products. When the amount of yeast is abundant, the fermentation speed is faster, which is an important factor in preventing infection from harmful microorganisms during fermentation. The study on influences affecting the growth of yeast is necessary to ensure the main aim of the propagation which is to create good quality breeding populations of yeast in a short time period. Furthermore, this has important implications for the fermentation process to create good products. Besides, increasing the speed and the number of yeast cells in practice, efficient, inexpensive materials used, as well as a common key element in the production process also bring high economic efficiency. In this study, basic factors affecting the growth of the species *Saccharomyces cerevisiae* MS42 we determined. Optimal conditions and compositions of the medium for breeding are shown in following: sugar content is 80 g/l; pH = 5.0; temperature from 28°C, the amount of dissolved oxygen from the initial is 7.0 mg/l, after 24 hours of incubation (since followed the same), the number of yeast cells has reached the maximum (219.5 ± 3.0 million cells/ml) and budding cell ratio (approximately 70 - 72%).

**Keywords:** Yeast, isolation, fermentation, temperature, barley malt, effects of pH, growth

---

✉ Author for correspondence: E-mail: vanquyengv@gmail.com