

**BỘ CÔNG THƯƠNG  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

---

**BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI CẤP BỘ  
BẢO TỒN VÀ LƯU GIỮ NGUỒN GEN VI SINH VẬT  
CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

*Chủ nhiệm đề tài:* VŨ NGUYỄN THÀNH

**7310**  
23/4/2009

HÀ NỘI - 2009

BỘ CÔNG THƯƠNG  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM

NHIỆM VỤ KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ THƯỜNG XUYÊN

**BẢO TỒN VÀ LƯU GIỮ NGUỒN GEN VI SINH VẬT  
CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM**

Chủ nhiệm: PGS. TS. Vũ Nguyên Thành

Cộng tác viên

ThS. Nguyễn Thuý Hương  
TS. Nguyễn La Anh  
ThS. Nguyễn thị Hương Giang  
ThS. Đinh thị Mỹ Hằng  
ThS. Nguyễn Thanh Thủy  
ThS. Đặng Thu Hương  
ThS. Dương Anh Tuấn  
ThS. Khuất Thị Thủy  
ThS. Lê Thùy Mai  
CN. Phạm thị Hoà  
KS. Đào Anh Hải  
KS. Nguyễn Minh Thu

Hà nội, 12/2008

# MỤC LỤC

KÝ HIỆU VÀ VIẾT TẮT .....	3
1. TỔNG QUAN.....	4
1.1. Cơ sở pháp lý/xuất xứ của đề tài.....	4
1.2. Tính cấp thiết và mục tiêu nghiên cứu của đề tài.....	4
1.3. Đối tượng/phạm vi và nội dung nghiên cứu .....	4
1.4. Tổng quan tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	5
2.1.1. Ngoài nước .....	5
2.1.2. Trong nước .....	8
2. THỰC NGHIỆM .....	10
2.1. Phương pháp tiến hành nghiên cứu .....	10
2.1.1. Bảo quản vi sinh vật trong nitor lỏng .....	10
2.1.2. Môi trường nuôi cấy và bảo quản giống.....	12
2.1.3. Phân tích hoạt tính cellulaza theo định lượng đường khử Somogyi – Nelson .....	15
2.1.4. Phân lập các chủng sinh cellulase .....	17
2.1.5. Điện di SDS-PAGE và Zymogram.....	17
2.1.6. Đánh giá đa dạng sinh học trong bánh men Việt Nam bằng kỹ thuật DGGE.....	19
2.1.7. Phân tích trình tự DNA.....	20
2.1.8. Đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của nấm men .....	21
2.2. Kết quả thực nghiệm và thảo luận .....	22
2.2.1. Điều tra khảo sát thu thập nguồn gen .....	22
2.2.1.1. Tiếp nhận toàn bộ bảo tồn gen từ Viện Rượu Bia Nước giải khát .....	22
2.2.1.2. Thu thập 10 chủng nấm men có khả năng chịu áp suất thẩm thấu cao .....	26
2.2.1.3. Tiếp nhận các chủng nấm mốc .....	27
2.2.1.4. Phân lập tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng sinh enzyme cellulase .....	27
2.2.1.5. Thu thập 10 chủng vi khuẩn Bacillus từ mẫu thức ăn gia súc.....	28
2.2.2. Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen .....	28
2.2.2.1. Bảo quản và kiểm tra mức độ sống sót của các chủng nấm men .....	30
2.2.2.2. Bảo quản và kiểm tra mức độ sống sót của các chủng nấm mốc .....	32
2.2.2.3. Bảo quản các chủng vi khuẩn.....	36
2.2.3. Đánh giá nguồn gen.....	37
2.2.3.1. Khảo sát khả năng chịu muối của 15 chủng nấm men mới thu thập.....	37
2.2.3.2. Đánh giá 12 chủng nấm men có trong bộ sưu tập giống của Viện CNTP .....	40
2.2.3.3. Đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của một số chủng nấm men .....	41
2.2.3.4. Đánh giá khả năng sinh cellulase của các chủng nấm mốc .....	47
2.2.3.5. Đánh giá một số chủng vi khuẩn Bacillus .....	51
2.2.3.6. Đánh giá đa dạng vi sinh vật trong bánh men rượu bằng phương pháp DGGE .....	53
2.2.4. Xây dựng cơ sở dữ liệu- Data Bank .....	62
3. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	64
3.1. Kết luận .....	64
3.2. Kiến nghị .....	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	65
PHỤ LỤC .....	68

## KÝ HIỆU VÀ VIẾT TẮT

2D – Two dimensional (hai chiều)

ATCC – American Type Culture Collection (Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ)

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures (Bảo tàng giống Vi sinh vật Hà Lan)

CMC - Carboxymethyl cellulose

CNTP – Suu tập giống vi sinh vật Viện Công nghiệp Thực phẩm

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Suu tập giống vi sinh vật và mô CHLB Đức)

FIRI – Food Industries Research Institute (Viện Công nghiệp Thực phẩm)

h – hour (giờ)

JCM – Japan Collection of Microorganisms (Bảo tàng giống Vi sinh vật Nhật Bản)

JICA - Japan International Cooperation Agency

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (kỹ thuật khối phổ peptid dựa trên sự ion hóa bằng tia laser)

NMR - Nuclear Magnetic Resonance (cộng hưởng từ hạt nhân)

NRRL - Northern Regional Research Laboratory (hiện là National Center For Agricultural Utilization Research) (Bảo tàng giống Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ)

OD – Optical Density (mật độ quang)

PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (điện di polyacrylamide)

DGGE - Denaturing gradient gel electrophoresis

rDNA - Ribosomal DNA

rRNA - Ribosomal RNA

PCR – Polymerase Chain Reaction (phản ứng trùng hợp chuỗi)

PDA – Potato Dextrose Agar

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (đánh giá đa hình DNA theo phương pháp cắt hạn chế)

SDS- Sodium Dodecyl Sulfate

SEM – Scanning Electron Microscope (kính hiển vi điện tử quét)

T – Type strain (chủng chuẩn)

U – Unit (đơn vị)

# **1. TỔNG QUAN**

## **1.1. Cơ sở pháp lý/xuất xứ của đề tài**

Đề tài được thực hiện theo hợp đồng nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ với mã số: 06.08.QG/HĐ-KHCN giữa Bộ Công Thương và Viện Công nghiệp Thực phẩm ký ngày 20/02/2008 (bản photo hợp đồng trong phần phụ lục).

## **1.2. Tính cấp thiết và mục tiêu nghiên cứu của đề tài**

Trong công nghệ sinh học, ứng dụng vi sinh vật chiếm tỷ trọng lớn nhất. Các ứng dụng của vi sinh vật bao gồm: sản xuất enzyme, thực phẩm chức năng, thực phẩm lên men, vaccine tái tổ hợp, dược phẩm, mỹ phẩm, thuốc trừ sâu, hóa chất, công nghệ khai khoáng, bảo vệ môi trường. Ứng dụng rộng rãi của vi sinh vật xuất phát từ tính đa dạng vốn có của vi sinh vật. Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới và có một hệ vi sinh vật vô cùng phong phú. Nền văn hóa và kỹ nghệ lên men lâu đời đã góp phần sàng lọc những vi sinh vật tiềm năng cho công nghệ sinh học.

Hiện tại Viện Công nghiệp Thực phẩm đang bảo tồn và lưu giữ một nguồn gen quan trọng cho công nghiệp thực phẩm với trên 1000 chủng vi sinh vật có các ứng dụng khác nhau từ lên men rượu, bia, cốm, bánh mỳ, sản xuất axit lactic, axetic, chuyển hóa chất thơm, lipid, sinh kháng sinh, enzyme cho tới các ứng dụng trong bảo vệ môi trường, thức ăn gia súc, diệt trừ sâu bệnh. Đây là thành quả lao động của nhiều thế hệ các nhà khoa học công tác tại Viện cũng như đóng góp của các nhà khoa học trong và ngoài nước thông qua hợp tác khoa học công nghệ trong nhiều thập kỷ qua. Mục tiêu của đề tài là duy trì và phát triển nguồn gen vi sinh vật hiện có nhằm tạo cơ sở hạ tầng phục vụ phát triển công nghệ sinh học của đất nước.

## **1.3. Đối tượng/phạm vi và nội dung nghiên cứu**

Đề tài “Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm” là một trong những nỗ lực của Chính phủ Việt nam nhằm tạo nền tảng và phát triển ngành công nghệ Sinh học của Việt nam với những nội dung chính sau đây:

- Điều tra khảo sát thu thập nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm
- Bảo tồn và lưu giữ
- Đánh giá nguồn gen
- Xây dựng cơ sở dữ liệu.

## 1.4. Tổng quan tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

### 2.1.1. Ngoài nước

Thành công trong công nghệ sinh học phụ thuộc nhiều vào sự đa dạng nguồn gen. Chính vì lẽ đó các quốc gia cũng như các công ty lớn đang tập trung nhiều công sức, tiền của vào việc thu thập và nắm giữ nguồn gen. Hiện nay trên thế giới có trên 600 sưu tập gen vi sinh vật. Điều đó có nghĩa là nhiều nước có không phải chỉ một sưu tập mà là có nhiều sưu tập (hoặc độc lập với nhau, hoặc liên kết với nhau một cách chặt chẽ). Không một nước nào muốn phát triển công nghệ sinh học mà không có ít ra một sưu tập gen vi sinh vật. Sưu tập giống chuẩn của Mỹ (ATCC) là sưu tập gen lớn nhất thế giới. ATCC hiện có trên 50.000 chủng vi sinh vật các loại, kể cả virus, thực khuẩn thể, các dòng tế bào động thực vật, các plasmid, đoạn DNA, các gen quý... Các sưu tập trên thế giới hoạt động theo những hướng sau:

*Sưu tập, tuyển chọn các gen quý đã biết cũng như những gen mới chưa được nghiên cứu*

Từ sản xuất và môi trường thiên nhiên. Đối với nguồn gen Vi sinh vật, mối quan tâm hàng đầu là những gen có tiềm năng ứng dụng trong công nghệ sinh học. Một vài ví dụ có thể liệt kê là: gene mã hoá enzym chịu nhiệt (trên 90°C) từ vi sinh vật sống trong suối nước nóng, các enzym hoạt động tốt ở nhiệt độ thấp từ các vi sinh vật Châu Nam cực, các gen sinh kháng sinh mới, các gen điều khiển quá trình sinh tổng hợp chất màu Astaxanthin từ *Xanthophyllomyces dendrorhous* làm tăng chất lượng màu của cá hồi, enzym thủy phân lignin cho công nghiệp giấy, hệ cytochrom P-450 trong chuyển hoá thuốc và các hợp chất thơm... Những gen này một khi được ứng dụng sẽ tạo đột phá mới trong công nghệ. Một trong những hướng phát triển của vài năm gần đây là việc sưu tập và thiết lập các ngân hàng gen tổng thể từ môi trường. Theo đó, toàn bộ DNA từ môi trường thiên nhiên (đất, nước, chất hữu cơ...) sẽ được phân lập và biến nạp vào các vector lưu trữ. Từ thư viện này các dòng gen quan tâm có thể được tách dòng và thể hiện. Điều đáng lưu ý là trong những năm gần đây các nước phát triển đặc biệt quan tâm tới nguồn gen với những tiềm năng hầu như chưa được khai phá của những quốc gia đang phát triển tại khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới. Các mạng lưới như Asian Culture Collection Network hay BioNET-INTERNATIONAL là ví dụ của những cố gắng nhằm tận dụng khai phá nguồn gen này. Đây cũng là cơ hội cho các quốc gia như Việt nam tham gia, tiếp cận với công nghệ cao trong lĩnh vực vi sinh.

*Nghiên cứu đặc tính sinh học, và đánh giá nguồn gen*

Việc lưu giữ nguồn gen sẽ trở nên vô nghĩa nếu không được nghiên cứu và đánh giá. Những gen vi sinh vật được chọn lọc sẽ trở thành vật liệu tạo ra những gen mới với ứng dụng mới hoặc hoàn hảo hơn. Công việc đánh giá ban đầu bao gồm việc phân loại định tên Vi sinh vật thông qua các đặc điểm hình thái, sinh lý. Tại sưu tập giống Nhật bản

(JCM), Hà lan (CBS), Mỹ (ATCC) việc định tên một chủng giống với ví dụ nấm men cần thực hiện trên dưới 60 test sinh lý, sinh hoá. Ngoài ra còn cần phải phân tích các đặc điểm thành phần % G+C và A+T, loại CoQ, thành phần thành tế bào. Hiện nay các sưu tập kể trên còn ứng dụng phương pháp đọc trình tự các gen 18S rRNA, 26SrRNA, ITS cho việc phân loại và định tên. Tiếp theo sau là việc đánh giá các đặc tính sinh học của gen quan tâm. Tại sưu tập giống DSMZ của Đức với những gen mã hoá protein hay enzym ngoài việc đánh giá hoạt lực, những protein, enzym này sẽ được tinh sạch bằng 2D SDS-PAGE sau đó phân tích bằng MALDI-TOF để đối chiếu với ngân hàng dữ liệu và định tên protein. Trong trường hợp quan tâm hơn, các đoạn trình tự axit amin có thể được giải trình tự, dựa trên kết quả đó gen có thể được tách dòng, đọc trình tự. Protein có thể được thể hiện, tinh sạch và nghiên cứu cấu trúc bằng NMR hay X-ray. Tất cả thông tin thu thập sẽ được lưu trữ vào ngân hàng dữ liệu và các gen quý được bảo quản phục vụ nghiên cứu khi cần thiết.

Các công cụ mới như chip DNA cũng bắt đầu được sử dụng. Với một chip thông thường hiện nay tới 150,000 mẫu dò có thể được kết gắn. Với mật độ gen lớn như vậy có thể xác định sự thể hiện của toàn bộ các gen trong cơ thể hoặc sự có mặt của bất kỳ vi sinh vật nào trong mẫu phẩm.

#### *Lưu giữ và bảo tồn nguồn gen*

Do hiểu biết của con người về hoạt động của các gen phần nào còn hạn chế, việc lưu giữ và bảo tồn những gen quý một cách đơn giản và hiệu quả nhất vẫn được thực hiện thông qua việc bảo tồn và lưu giữ cơ thể chủ mang những gen đó. Với những gen đã được nghiên cứu kỹ và/hoặc có nhu cầu sử dụng thường xuyên, chúng có thể được giữ trong những vector tách dòng, trong tiêu bản DNA, và thậm chí dưới dạng số liệu máy tính (cho những gen ngắn, có thể tổng hợp dễ dàng). Các kỹ thuật bảo quản tế bào chủ thông dụng nhất là đông khô, lạnh sâu, và trong Nitơ lỏng. Tại các sưu tập quốc gia của Mỹ (ATCC), Hà lan (CBS), Đức (DSMZ) giống được lưu giữ đồng thời bởi nhiều phương pháp, nhưng phương pháp bảo quản trong Nitơ lỏng vẫn là chủ đạo. Sử dụng Nitơ lỏng có thể bảo quản hầu như tất cả các chủng vi sinh vật. Phương pháp này có chi phí cao nhưng an toàn và bảo đảm giữ vững các đặc tính ban đầu. Phương pháp đông khô là một phương pháp rất thuận tiện. Giống sau khi đông khô có thể lưu giữ tới vài chục năm mà không phải quan tâm gì nhiều. Do nằm trong các ống thủy tinh đã hàn kín và trong chân không nên nguy cơ lây nhiễm là không thể xảy ra. Nhược điểm chính là không phải vi sinh vật nào cũng có thể bảo quản được bằng phương pháp này. Ngoài ra các phương pháp khác như cấy truyền, bảo quản trong parafin, bảo quản trong cát... vẫn còn được sử dụng trong một số ít trường hợp, chủ yếu cho những đối tượng đang trong quá trình nghiên cứu. Như vậy để bảo đảm lưu giữ nguồn gen một cách an toàn cần thiết phải kết hợp đồng thời nhiều phương pháp.

### *Nghiên cứu phát triển nguồn gen*

Những gen quý hiếm luôn là đối tượng được quan tâm đặc biệt cho nghiên cứu phát triển. Trong một số ít trường hợp những gen này có thể được trực tiếp thể hiện (gene expression) và phục vụ trong sản xuất. Với đa số trường hợp còn lại, nguồn gen sưu tập được sẽ dùng làm vật liệu để tạo những gen mới phù hợp hơn với yêu cầu công nghệ. Một minh chứng cụ thể là gen mã hoá protein diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đã được ứng dụng đưa vào thực vật để tạo khả năng tự kháng côn trùng và đó có lẽ cũng là ứng dụng lớn nhất của kỹ thuật gen trong tạo giống cây trồng. Một gen kinh điển khác là gen mã hoá DNA-polymerase từ vi sinh vật *Thermus aquaticus*. Gen này được tách dòng và thể hiện để tạo enzym *Taq* DNA polymerase cần thiết cho phản ứng PCR. Chính gen vi sinh vật này đã góp phần tạo nên cuộc cách mạng công nghệ sinh học ngày nay. Một trong những hướng phát triển mới trong thời gian gần đây là ứng dụng Metagenomics với việc thu thập sàng lọc toàn bộ DNA có trong mẫu phẩm mà không thông qua phân lập vi sinh vật. Với Metagenomics người ta có thể khai thác đa dạng thiên nhiên triệt để hơn vì cho tới nay theo ước tính chỉ có khoảng 0.1-1% vi sinh vật trong thiên nhiên là có thể nuôi cấy được.

### *Phát triển cơ sở dữ liệu về nguồn gen*

Việc phát triển cơ sở dữ liệu là một trong những công việc được quan tâm đặc biệt nhằm phục vụ nhu cầu nghiên cứu cũng như quảng bá. Nội dung thông tin của nguồn gen thường bao gồm: nguồn gốc, phương pháp lưu giữ, trình tự DNA, trình tự axit amin, đặc tính sinh học, ứng dụng, tài liệu liên quan, bản quyền... Tư liệu có thể dưới dạng văn bản in ấn hoặc thông tin điện tử. Trong thời gian gần đây, do tốc độ phát triển quá nhanh của cơ sở dữ liệu, một số sưu tập như ATCC (Mỹ) đã bỏ dần dạng văn bản in ấn và tập trung chủ yếu vào văn bản điện tử. Thông thường các cơ sở dữ liệu đều được kết nối với mạng internet, tuy nhiên chỉ một phần thông tin được công bố rộng rãi, phần còn lại được phân quyền và bảo mật nghiêm ngặt.

### *Đào tạo và nâng cao trình độ chuyên môn*

Các sưu tập trong thời gian gần đây thường đòi hỏi đào tạo nhân lực với những nội dung chính sau: phân loại vi sinh vật, sinh học phân tử, xây dựng và quản lý cơ sở dữ liệu. Một trong những hướng phát triển nguồn nhân lực trong các sưu tập là sự chuyên môn hoá cao độ. Một nhân viên thường chỉ đảm nhiệm một nhóm đối tượng rất nhỏ nhưng về trình độ họ lại cũng thường là những chuyên gia hàng đầu về lĩnh vực mình đảm nhiệm. Điều này đã giúp các sưu tập nâng cao hiệu quả công việc và khả năng cạnh tranh.



### 2.1.2. Trong nước

Sưu tập giống Vi sinh vật ở Việt nam đã có tại các cơ sở nghiên cứu ngay trong những năm kháng chiến. Những sưu tập quan trọng trong nước bao gồm: Sưu tập giống Vi sinh vật Công nghiệp Viện Công nghiệp thực phẩm, Sưu tập giống chuẩn Đại Học Quốc Gia Hà nội, Sưu tập giống của Viện Công nghệ Sinh học, Sưu tập giống của Viện di truyền Nông nghiệp, Sưu tập giống của Viện Vệ sinh Dịch tễ... Sưu tập giống Vi sinh vật Công nghiệp đã có từ những ngày đầu thành lập Viện (1967) với 3 nhóm vi sinh vật chính là vi khuẩn, nấm men và nấm mốc.

Sưu tập đã được cơ quan chủ quản tạo điều kiện kinh phí, vật tư, nhân lực cho việc lưu giữ, bảo quản và khai thác nguồn gen. Nhiều đề tài nghiên cứu, dự án đã được thực hiện dựa trên nguồn gen này. Sưu tập giống đã đóng góp rất nhiều cho công tác giảng dạy, nghiên cứu và sản xuất. Trong thời kỳ khó khăn của đất nước các cơ sở sản xuất đã ứng dụng vi sinh vật thuần chủng của sưu tập giống vi sinh vật công nghiệp trong sản xuất mì chính, axit xitric, axit acetic, bia, rượu, chao, tương, xì dầu, nước chấm... đáp ứng một phần đáng kể nhu cầu sản xuất và tiêu dùng. Viện Công nghiệp thực phẩm đã thực hiện sản xuất ở quy mô pilot các chế phẩm enzym ( $\alpha$ -amylaza, glucoamylaza, glucoizomeraza, proteaza), các axit amin (glutamin, lizin), và nghiên cứu nâng cao chất lượng các sản phẩm lên men truyền thống. Hàng năm sưu tập giống Viện Công nghiệp thực phẩm cung cấp trên 600 ống giống gốc chất lượng cao cho các cơ sở sản xuất, nghiên cứu trên phạm vi cả nước. Vi sinh vật với những gen quý hiếm do các nhà nghiên cứu thu thập chọn lọc trong những thập kỷ qua là vốn quý góp phần phát triển công nghệ vi sinh, lên men và enzym ở nước ta.

Hiện nay Sưu tập giống Vi sinh vật Công nghiệp Thực phẩm lưu giữ 287 chủng chính thức bao gồm 91 chủng vi khuẩn, 69 nấm mốc và 127 nấm men. Ngoài ra còn có trên 600 chủng mới phân lập, tuyển chọn hoặc do các cán bộ nghiên cứu mang từ nước ngoài về. Các chủng trong sưu tập có nhiều đặc tính quý hiếm như khả năng sinh các enzym thủy phân protein, tinh bột, cellulosa ở các chế độ khác nhau, các vi sinh vật sinh axit hữu cơ, vitamin, axit amin, kháng sinh, protein diệt côn trùng, chất màu thực phẩm, biến đổi chất thơm. Một lượng lớn các chủng đã và đang được sử dụng trong lên men bia, rượu, tạo chế phẩm thuốc trừ sâu sinh học...tại nhiều địa phương trong cả nước.

Do điều kiện kinh phí còn hạn hẹp sưu tập giống mới chỉ tạm dừng lại ở công tác lưu giữ và bảo quản giống là chính. Các kỹ thuật được đưa vào sử dụng trong bảo quản bao gồm bảo quản trong nitrơ lỏng, bảo quản đông khô, lạnh sâu, trong cát, bằng paraffin và cấy truyền. Công tác đánh giá nguồn gen mới chỉ được thực hiện sơ bộ, thông qua các đặc tính và thể hiện bên ngoài. Thông tin về sưu tập giống chưa đầy đủ, cục bộ.

Tuy nhiên, hiện nay nhu cầu cũng như lượng giống cung cấp được cho các cơ sở sản xuất vừa và nhỏ ngày càng tăng đi đôi với sự tăng trưởng của nền kinh tế. Nhu cầu giống

phục vụ nghiên cứu ứng dụng cũng tăng lên do yêu cầu của kinh tế xã hội. Sự phát triển vượt bậc của công nghệ sinh học trong thời gian gần đây và quá trình mở cửa đã tạo ra nhiều hướng nghiên cứu và phát triển mới. Đòi hỏi về sự đa dạng của nguồn gen trong sưu tập do vậy cũng trở nên rất cấp thiết. Sưu tập gen là một trong những nền móng cơ bản của Công nghệ Sinh học. Để phát triển Công nghệ Sinh học việc củng cố và phát triển các Sưu tập gen giống vi sinh vật cần nhận được sự quan tâm đúng mức và kịp thời.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Phương pháp tiến hành nghiên cứu

#### 2.1.1. Bảo quản vi sinh vật trong nitơ lỏng

Ngoài các phương pháp bảo quản như cấy truyền, bảo quản trong cát, bảo quản dưới paraffin, bảo quản lạnh sâu, bảo quản đông khô, trong năm 2008, bảo tồn gen Vi sinh vật Công nghiệp thực phẩm đã tiến hành bảo quản lưu giữ các chủng vi sinh vật trong nitơ lỏng. Việc bảo quản được thực hiện bảo quản được tiến hành theo quy trình sau:

##### *Chuẩn bị dụng cụ*

Lựa chọn loại ống hút bằng chất liệu polypropylene (có thể sử dụng loại ống hút sữa, nước hoa quả), cắt ngắn thành từng đoạn 2-3 cm. Dùng panh kẹp chặt một đầu và hàn bằng ngọn lửa. Đặt ống vào hộp và hấp vô trùng. Hấp vô trùng các ống nút xoáy chuyên dụng cho bảo quản nitơ lỏng (không dùng các loại khác vì nếu hở vì ống có thể bị nổ khi lấy ra từ nitơ lỏng).

##### *Chuẩn bị môi trường*

Môi trường nuôi cấy sinh khối và kiểm tra độ phân trăm sống sót của mẫu giống là môi trường nuôi cấy chọn lọc. Cân và hoà tan các thành phần môi trường trong nước cất theo thứ tự đã cho. Phân phối môi trường vào các bình tam giác. Đậy nút bông, khử trùng ở điều kiện phù hợp cho từng loại môi trường. Môi trường bảo vệ có tỷ lệ sữa tách bơ 10% (w/v), hoặc glycerol 10% (v/v), hoặc dimethyl sulfoxide (DMSO) 5% (v/v). Môi trường bảo vệ cần được tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur, hoặc màng lọc vi khuẩn hoặc ở 121°C trong 15 phút.

##### *Chuẩn bị mẫu giống*

Một mẫu giống vật liệu cần bảo quản lặp lại không ít hơn ba lần. Không được chọn những khuẩn lạc riêng biệt trong các lần cấy chuyển làm giống (tránh đột biến sinh trưởng). Việc lấy mẫu được tiến hành sao cho mẫu kiểm tra phải là mẫu thuần. Người lấy mẫu phải được huấn luyện và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu. Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu phải đảm bảo tránh sự tạp nhiễm từ bên ngoài và đảm bảo được tính nguyên trạng ban đầu.

##### *Chuẩn bị dịch huyền phù theo 2 cách*

(a) - Chuẩn bị dịch huyền phù từ mẫu giống nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng:

Các mẫu giống được nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng thích hợp. Sau khi tế bào phát triển tốt, ổn định (pha sinh trưởng), thu sinh khối vi sinh vật để tiến hành bảo quản. Dùng pipet vô trùng hút 5 ml môi trường dinh dưỡng (NB) chứa 10% (v/v)

glycerol hoặc 5% (v/v) DMSO hoặc 10% (w/v) sữa tách bơ vào mỗi ống thạch nghiêng. Dùng dụng cụ vô trùng đánh tan toàn bộ sinh khối trên bề mặt thạch nghiêng vào môi trường, sau đó hút toàn bộ dịch huyền phù tế bào, đảm bảo mật độ tế bào ít nhất là  $10^8$  tế bào/ml. Dùng pipet vô trùng phân 200  $\mu$ l của dịch huyền phù tế bào vào ống polypropylene đã thanh trùng và hàn một đầu. Kẹp đầu còn lại và hàn bằng ngọn lửa. Đặt ampul trong tủ lạnh 5 °C trong 30 phút để đạt được sự ổn định giữa tế bào và môi trường.

(b) - Chuẩn bị dịch huyền phù từ mẫu giống nuôi cấy trên môi trường dịch thể:

Các mẫu giống được nuôi cấy trên môi trường dịch thể thích hợp. Sau khi tế bào phát triển tốt, ổn định, tiến hành bảo quản bằng nitơ lỏng. Dùng pipet vô trùng bổ sung một lượng 20% (v/v) glycerol hoặc 10% (v/v) DMSO hoặc 20% sữa tách bơ đã khử trùng bằng thể tích của dịch vi sinh vật để đạt nồng độ glycerol cuối cùng 10% (v/v) hoặc DMSO 5% (v/v) hoặc sữa tách bơ 10% (w/v). Lắc nhẹ để thu được dịch huyền phù tế bào đồng đều, đảm bảo mật độ tế bào ít nhất là  $10^8$  tế bào/ml. Dùng pipet vô trùng phân 200  $\mu$ l của dịch huyền phù tế bào vào ống polypropylene đã thanh trùng và hàn một đầu. Kẹp đầu còn lại và hàn bằng ngọn lửa. Đặt 3 - 4 ống vào các ampul chuyên dụng, vặn thật chặt (nếu hở có thể nổ ống) và đặt trong tủ lạnh 5°C trong 30 phút để đạt được sự ổn định giữa tế bào và môi trường.

#### *Quá trình bảo quản bằng nitơ lỏng*

Đặt ống polypropylen vào các ống nút xoáy chịu lạnh, để trong hộp sau đó đặt vào buồng làm lạnh của máy làm lạnh và làm lạnh tới -35°C trong 1h. Nhanh chóng chuyển hộp chứa giống đến vị trí bảo quản cuối cùng trong bình nitơ lỏng (nhiệt độ từ -156°C đến -196°C).

*Ghi chú:* Cần đi găng tay polyolefin khi thao tác để tránh bị bỏng tay

#### *Kiểm tra giống*

Định kỳ hàng năm kiểm tra độ sống sót và đặc tính sinh học của giống. Chỉ cho phép giữ lại các giống có độ sống sót và có hoạt tính sinh học ổn định như giống gốc. Dùng môi trường nuôi cấy chọn lọc là môi trường để kiểm tra. Môi trường được pha chế theo thứ tự các hoá chất trong thành phần đã cho. Sau đó phân phối vào các dụng cụ thủy tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở những điều kiện phù hợp. Để nguội môi trường đến 45-50°C rồi phân phối vào các đĩa petri vô trùng. Thao tác này được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Nước muối sinh lý (NaCl 0.85%), không chứa các hợp chất nitơ, sau khi khử trùng có độ pH là 7.0 được sử dụng làm dịch pha loãng. Phân phối dịch pha loãng vào các ống nghiệm có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi khử trùng, mỗi ống nghiệm chứa 9 ml. Làm nút bông và khử trùng ở 1 atm (121°C) trong 30 phút. Nếu

chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 - 10°C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị.

*Ghi chú:* Để tránh làm ảnh hưởng đến các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nên điều chỉnh nhiệt độ của dịch pha loãng đến nhiệt độ phòng thử nghiệm trước khi sử dụng.

#### *Chuẩn bị dịch huyền phù tế bào*

Lấy ống giống bảo quản cần kiểm tra ra khỏi bình nitơ lỏng, cho băng tan tự nhiên (trong điều kiện phòng thử nghiệm). Lau bên ngoài của ống bằng gạc vô trùng có thấm etanol 70% (v/v). Cắt ống polypropylen trong điều kiện vô trùng. Dùng bơm tiêm đã vô trùng hút 0.1 ml dịch huyền phù trong ống nghiệm cho vào 9.9 ml dịch pha loãng, tránh chạm bơm tiêm vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5-10 giây. Tiếp tục pha loãng tới  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ .

#### *Cấy mẫu*

Dùng pipet vô trùng lấy từ dịch mẫu pha loãng một lượng 50 µl mẫu cấy vào 1 đĩa petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn. Mỗi mẫu pha loãng được cấy vào 3 đĩa petri (mỗi độ pha loãng sử dụng 1 pipet vô trùng riêng). Dùng que gạt vô trùng gạt đều dịch mẫu trên bề mặt thạch, đợi khô bề mặt thạch, úp ngược đĩa petri, để trong tủ ẩm với nhiệt độ và thời gian thích hợp. Đếm số lượng khuẩn lạc đặc trưng của mẫu giống vi sinh vật trên mỗi đĩa petri.

### **2.1.2. Môi trường nuôi cấy và bảo quản giống**

#### *Môi trường thạch dinh dưỡng (Nutrient Agar)*

Cao thịt bò (beef extract)	3 g
Pepton	5 g
Thạch	20 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh về pH 7.0, thanh trùng 121°C/15 phút.

#### *Môi trường Corynebacterium Agar*

Casein peptone tryptic digest	10 g
Cao nấm men (Yeast extract)	5 g
Glucose	5 g
NaCl	5 g
Thạch	20 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh về pH 7.2 – 7.4, thanh trùng 121°C/15 phút.

*Môi trường Trypticase Soy Yeast Extract Agar*

Trypticase Soy Broth	30 g
Yeast extract	3 g
Thạch	20 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh về pH 7.0 – 7.2, thanh trùng 121°C/15 phút.

*Môi trường MRS*

Pepton	10 g
Cao thịt (beef extract)	10 g
Cao nấm men (yeast extract)	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Sodium acetate	5 g
Triammonium citrate	2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.05 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh về pH 6.2 - 6.6, thanh trùng 121°C/15 phút .

*Môi trường Gluconobacter Oxydans Agar*

Glucose	100 g
Cao nấm men	10 g
CaCO <sub>3</sub>	20 g
Thạch	20 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh về pH 6.8, thanh trùng 121°C/15 phút.

*Môi trường YS*

Tinh bột tan	10 g
Cao nấm men	2 g
Agar	20 g
Nước cất	1000 ml

Chỉnh về pH 7.0, thanh trùng 121°C/15 phút.

*Môi trường LB*

Cao nấm men	5 g
Tryptone	10 g
NaCl	10 g

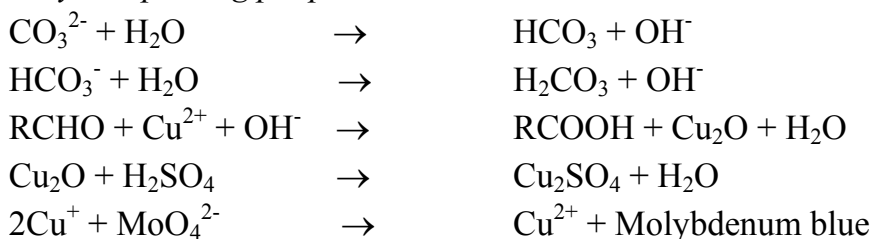
Nước cất	1000 ml
Chỉnh pH về 7.0. Thanh trùng 121°C/15 phút	
<i>Môi trường YM:</i>	
Cao nấm men	3 g
Malt extract	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Nước cất	1000 ml
Thanh trùng 121°C/15 phút	
<i>Môi trường YPD</i>	
Cao nấm men	10 g
Tryptone	10 g
Glucose	20 g
Nước cất	1000 ml
Thanh trùng 121°C/15 phút	
<i>Môi trường Czapeck cơ bản không cacbon</i>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%
KCl	0.05%
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05%
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.001%
<i>Môi trường Mandel ×1 (cho 1000 ml)</i>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
Urea	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.45 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CoCl <sub>2</sub>	0.05 g
<i>Môi trường PDA</i>	

Dùng 300 g khoai tây gọt vỏ, thái chỉ, rửa sạch, thêm 1.4 lít nước, ninh trong 2 giờ. Thu lấy 1 lít dịch, thêm 20 g glucose, 20 g agar, khuấy đều, đun sôi trong 5 phút, chia vào các ống nghiệm, hấp thanh trùng 121°C/20 phút. Để nghiêng môi trường, chờ nguội rồi bảo quản trong tủ 4°C.

### 2.1.3. Phân tích hoạt tính cellulaza theo định lượng đường khử Somogyi – Nelson

Đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi để định lượng đường khử do có ưu điểm là độ nhạy rất cao. Nguyên lý cơ bản của phương pháp này là đường khử bị oxy hóa bởi  $\text{Cu}^{2+}$  trong môi trường kiềm, sau đó  $\text{Cu}_2\text{O}$  tạo ra sẽ khử phức chất arsenomolybdate để tạo thành sản phẩm có màu xanh. Lượng đường khử có trong dung dịch sẽ được xác định gián tiếp qua lượng phức tạo thành.

*Nguyên lý của phương pháp*



*Dung dịch Somogyi I (Thành phần cho 1 lit)*

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	24 g
$\text{NaHCO}_3$	16 g
K-tartrate	12 g
$\text{CuSO}_4$	4 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	180 g

Cách pha:

- ❖ Dung dịch A: hòa tan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , K-tartrate và 144 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  trong nước, và nâng thể tích lên 800 ml
  - ❖ Dung dịch B: hòa tan  $\text{CuSO}_4$  và 36 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  trong nước, nâng thể tích lên 200ml
- Trước khi sử dụng, trộn dung dịch A và B với tỉ lệ 4:1

*Dung dịch Somogyi II (Thành phần cho 1lit)*

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$	50 g
Dung dịch $\text{H}_2\text{SO}_4$ đặc (96%)	42 ml
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	6 g

Cách pha:

- ❖ Hòa tan  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$  trong 900 ml nước, bổ sung 42 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đặc
  - ❖ Hòa tan  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  trong 50 ml nước cất
- Trộn 2 phần với nhau, nâng thể tích lên tới 1 lít, giữ 48 tiếng ở 37°C trong bình tối màu, sau đó mới được dùng.

*Phương pháp phân tích*

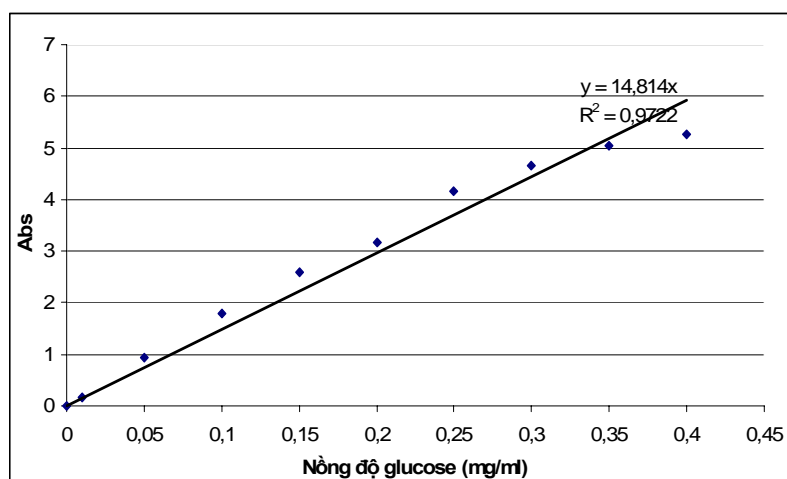
Cho 0.5 ml dịch chiết enzyme thô vào ống nghiệm có chứa 0.5 ml CMC 1% pha trong đệm Na-acetate 0.1M pH5. Tiến hành phản ứng ở 50°C trong 180 phút. Thêm 1 ml dung dịch Somogyi I vào và đun sôi trong 10 phút, sau đó làm lạnh ngay bằng nước đá.



Thêm 1 ml dung dịch Somogy II vào, vortex đều, bổ sung 6 ml nước cất, vortex và đem ly tâm 12000 rpm trong 5 phút. Mẫu sau khi ly tâm thì tiến hành đo phổ hấp thụ ở bước sóng 760 nm. Với mẫu đối chứng, thay enzyme thô và CMC 1% bằng 1 ml dung dịch đệm Na-acetate 0.1M. Với mẫu trước phản ứng, thay CMC 1% bằng 0.5 ml đệm Na-acetate 0.1M.

#### *Xây dựng đường chuẩn*

Chuẩn bị dung dịch Glucose 10 mg/ml, dùng dung dịch Na-acetate làm dung môi pha loãng. Từ đó pha tiếp thành các dung dịch glucose với các nồng độ khác nhau như 0.01; 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25; 0.3; 0.35; 0.4 mg/ml. Tiến hành xây dựng đường chuẩn bằng cách cho 1 ml dung dịch Somogy I vào ống nghiệm có chứa 1 ml dung dịch đường. Sau đó đun sôi trong 10 phút và làm lạnh ngay bằng nước đá. Thêm 1 ml dung dịch Somogy II vào, vortex đều, bổ sung 6 ml nước cất, vortex và đem ly tâm 12000 rpm trong 5 phút. Mẫu sau khi ly tâm thì tiến hành đo độ hấp thụ ở bước sóng 760 nm. Với mẫu đối chứng, thay 1 ml dung dịch đường bằng 1 ml dung dịch đệm Na-acetate 0.1M



**Hình 1.** Đồ thị đường chuẩn phục vụ định lượng đường khử theo phương pháp Somogyi – Nelson.

Phương trình đường chuẩn:  $y = \text{Abs} = ax$

Lượng đường khử:  $x \text{ (mg/ml)} = \frac{y}{a} \times E$

$$x \text{ (}\mu\text{mol)} = \frac{y}{a \times 0.18} \times E$$

Hoạt lực enzyme:  $\text{IU} = (x_1 - x_0) \times E \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$

$$= (y_1 - y_0) \times \frac{E}{a \times 0.18 \times 180 \times 0.5}$$

Trong đó:

$x_0$  : Đường khử của mẫu trước phản ứng,  $\mu\text{mol}$

- $x_1$  : Đường khử của mẫu sau phản ứng,  $\mu\text{mol}$   
 $y_0$  : Chỉ số Abs của mẫu trước phản ứng  
 $y_1$  : Chỉ số Abs của mẫu sau phản ứng  
 $E$  : Độ pha loãng tổng

Sự có mặt của đường khử trong dịch phản ứng được phát hiện bằng cách đun nóng  $100^\circ\text{C}$  trong 10 phút hỗn hợp dịch phản ứng và dung dịch Somogyi. Những mẫu chuyển màu vàng sau phản ứng trên được xác định là chứa đường khử. Nguyên lí của phản ứng này là:  $\text{Cu}^{2+}$  oxi hoá đường khử trong môi trường kiềm tạo thành  $\text{Cu}_2\text{O}$  có màu nâu đỏ.

#### 2.1.4. *Phân lập các chủng sinh cellulase*

Mẫu phân lập được lấy từ nhiều nơi khác nhau và được bảo quản trong tủ  $4^\circ\text{C}$ . Tiến hành phân lập trên môi trường Czapeck cơ bản không cacbon bổ sung thêm 0.2% sucrose, 1% bột giấy, 2% agar. Lấy 1 g mẫu cho vào một ống nghiệm chứa 9 ml nước vô trùng, lắc đều. Hút 1 ml dịch đưa vào ống nghiệm chứa 9 ml nước vô trùng thứ hai. Dùng pipet hút 100  $\mu\text{l}$  dịch từ mỗi ống nghiệm trên vào đĩa petri có môi trường phân lập. Dùng que trang thuỷ tinh trang đều mẫu trên bề mặt môi trường. Sau mỗi lần trang, khử trùng que cấy bằng cách ngâm trong cồn  $70^\circ$  rồi đốt trên ngọn lửa đèn ga. Các đĩa petri sau đó được ủ trong điều kiện  $30^\circ\text{C}$  trong 2 - 7 ngày.

#### 2.1.5. *Điện di SDS-PAGE và Zymogram*

##### *Chuẩn bị mẫu chạy điện di*

Mẫu chiết enzyme thô được ly tâm 10000 rpm/5 phút/2 lần sau đó đem cô đặc chân không trong ống eppendorf. Hòa tan mẫu trong sample buffer với lượng thích hợp. Lắc đều và đun 4 phút ở  $100^\circ\text{C}$  (để giãn mạch protein). Sau đó ly tâm 10000 rpm trong 30 giây. Mẫu chuẩn bị xong phải điện di ngay, hoặc để không quá 2 giờ ở  $2^\circ\text{C}$  (trên đá).

##### *Phương pháp điện di SDS-PAGE*

Chuẩn bị bản gel có thành phần theo thứ tự như sau:

##### Phần gel phân tách 10%

Nước cất	3 ml
30% Acrylamide	2.5 ml
1.5M Tris-HCl (pH=8,8)	1.9 ml
10% SDS	80 $\mu\text{l}$
30% APS	15 $\mu\text{l}$
TEMED	15 $\mu\text{l}$

##### Phần gel cô 5%

Nước cất	1.385 ml
30% Acrylamide	0.415 ml

1M Tris-HCl (pH=6,8)	0.62 ml
10% SDS	25 $\mu$ l
30% APS	7.5 $\mu$ l
TEMED	7.5 $\mu$ l

Sau khi đổ lớp gel phân tách thì cho ngay một lớp ethanol 100% lên trên, chờ 30 phút để gel đông. Loại bỏ lớp ethanol và đổ tiếp lớp gel cô, gấn lược, chờ 30 phút để gel đông. Đặt bản gel vào buồng điện di và tiến hành nạp mẫu. Chạy 120 V trong khoảng 2 giờ.

Kết thúc chạy gel thì tiến hành nhuộm như sau:

- Nhuộm gel trong 100 ml CBB ở 50°C trong 1 h hoặc lâu hơn để CBB bắt màu với protein.
- Tẩy màu bằng dung dịch tẩy I ở 50°C/30 phút, lặp lại 2 lần mỗi lần 100 ml.
- Ngâm gel trong 200 ml dung dịch tẩy II ở nhiệt độ thường, kèm theo lắc đến khi thấy rõ các vạch màu xanh.

#### *Phương pháp điện di zymogram*

*Nguyên tắc:* Trước tiên hỗn hợp gồm các enzyme và protein được phân tách trên gel SDS có bổ sung cơ chất CMC. Sau khi phân tách, phản ứng enzyme được tiến hành trong gel, enzyme có mặt sẽ thủy phân cơ chất CMC. Sau phản ứng, bản gel sẽ được nhuộm bằng Congo Red. Những phần cơ chất bị enzyme thủy phân sẽ không bắt màu thuốc nhuộm, và do đó tạo nên các băng màu sáng hơn so với màu nền của gel.

*Phương pháp tiến hành:* Các bước tiến hành giống như phương pháp SDS-Page với thành phần bản gel như sau:

#### Phần gel phân tách 10%

CMC 1% (0.03 g CMC trong 3 ml nước cất)	3 ml
30% Acrylamide	2.5 ml
1.5M Tris-HCl (pH=8.8)	1.9 ml
10% SDS	80 $\mu$ l
30% APS	15 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l

#### Phần gel cô 5%

Nước cất	1.385 ml
30% Acrylamide	0.415 ml
1M Tris-HCl (pH=6.8)	0.62 ml
10% SDS	25 $\mu$ l
30% APS	7.5 $\mu$ l
TEMED	7.5 $\mu$ l

Kết thúc chạy gel thì tiến hành nhuộm như sau:

- Ngâm gel trong 100 ml Triton ×2%, lắc 30 phút (làm 2 lần).
- Ngâm gel trong 100 ml PB lạnh 0.1M, lắc 15 phút (làm 2 lần )
- Ngâm gel trong 100 ml PB ấm 0.1M trong 1h - 12h/50°C
- Nhuộm gel trong 100 ml Congo Red 0.1%, lắc 30 phút (bắt màu phản ứng)
- Cố định màu bằng cách rửa gel trong 200 ml NaCl 1M, rửa 2 lần, mỗi lần 15 phút.

#### **2.1.6. Đánh giá đa dạng sinh học trong bánh men Việt Nam bằng kỹ thuật DGGE**

##### *Bảo tồn bánh men*

Quá trình thu thập bánh men được tiến hành trong khoảng thời gian từ năm 2004-2006. Vị trí thu thập mẫu trải rộng khắp các vùng trên toàn lãnh thổ Việt Nam, bao gồm cả 3 miền Bắc - Trung - Nam. Địa điểm thu thập bao gồm hộ dân cư tại các làng nghề và các chợ địa phương. Bánh men sau khi thu thập được bóp mịn trong các túi nhựa vô trùng tới kích thước nhỏ hơn 1 mm. Sau đó, mẫu bánh men được chuyển vào các ống thủy tinh vô trùng (đường kính ống =10 mm) và nắp bằng nút bông. Các mẫu bánh men này được làm khô qua đêm bằng máy đông khô Lioalfa-6, Telstar (Spain). Khi áp suất trong khoang làm khô đạt  $1 \times 10^{-2}$  -  $5 \times 10^{-2}$  mbar (nhiệt độ khoang lạnh là -80°C) các ống thủy tinh được cắt và bịt kín nhờ một đèn khò oxy. Sau đó ống bảo quản được dán nhãn và bảo quản trong các hộp nhựa ở nhiệt độ 4 - 10°C.

##### *Tách DNA từ các mẫu bánh men*

Để đảm bảo tính đại diện, chúng tôi tiến hành phân tích 52 mẫu bánh men từ các vùng miền khác nhau. Khoảng 0.1 g bánh men sau đông khô được hòa vào 1 ml 2×SSC (NaCl 0.3M, sodium citrate 30 mM) (Sambrook et al., 1989) trong ống 1.5 ml và ủ ở 99 °C trong 10 phút. Sau đó li tâm 10000 vòng/phút trong 5 phút và loại bỏ phần dịch lỏng phía trên. Bổ sung 200 µl nước cất vô trùng, 200 µl phenol-chloroform (1:1) và 300 µl bi thủy tinh (đường kính 0.2 - 0.5 mm). Phá tế bào vi sinh vật bằng máy lắc bi trong 4 phút. Sau đó li tâm 10000 vòng /phút trong 10 phút. Thu dịch trong phía trên sang ống mới và tiến hành rửa với 2.5 lần thể tích ethanol 100%. Ủ các ống ở -20 °C trong 30 phút sau đó li tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút. Thu rửa phía dưới và rửa hai lần bằng cồn 70%. Làm khô cồn và hoà tan trong 50 µl nước cất vô trùng. Tinh bột còn sót lại trong mẫu ức chế mạnh mẽ phản ứng PCR, vì vậy DNA tổng số được tinh chế bằng kit của Fermentas (USA).

##### *Khuyếch đại DNA và DGGE*

Thành phần vi sinh vật trong bánh men được khảo sát bằng cách khuyếch đại một phần của gene mã hóa ribosome RNA từ DNA tổng số. Đối với vi khuẩn, cặp mồi 16F945 (5'-GGGCCCCGACAAGCGGTGG-3') (Wagner - Döbler et al., 1998) và 16R1401 (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Nübel et al., 1996) tương ứng với các vị

trí 927 - 945 và 1385 - 1401 trên 16S rDNA của *Escherichia coli* được sử dụng để tổng hợp đoạn DNA dài 470 bp. Tương tự như vậy với nấm và nấm men, vùng D2 của 26S rDNA được khuếch đại nhờ mỗi cặp mồi NL3A (5'-GAGACCGATAGCGAACAAG-3' và NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman and Robnett, 1997). Việc sử dụng toàn bộ vùng D1/D2 dài 610 bp NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA G-3') và NL4 (Kurtzman and Robnett, 1997) cũng được khảo sát. Khóa GC dài 40 nucleotide (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3') (Davies et al., 2004) được gắn vào đầu 5' của các mồi ngược (16R1401GC and NL4GC). Phản ứng khuếch đại được tiến hành riêng rẽ cho từng nhóm vi sinh vật trên máy GeneAmp 9700 (PE - Applied Biosystem, USA) với chu kỳ PCR: 95 °C trong 2 phút; 35 chu kỳ 94 °C trong 30 giây, 60 °C trong 40 giây, 72 °C trong 1 phút; chu kỳ cuối kéo dài 72 °C trong 7 phút.

Sản phẩm PCR được phân tách trên gel kích thước 20×20 cm chứa polyacrylamide 9% (37.5:1 acrylamide: bisacrylamide) với dải gradien từ 20% - 60% (gel 100% biến tính có nồng độ urea 7M và formamide 40% (v/v) trong 1×TAE (Tris 40 mM, acetic acid 20 mM, EDTA 1 mM)). Quá trình điện di được tiến hành ở điều kiện 60°C và 70 V trong 16 h sử dụng bể DGGE 6L (Scie-Plas, UK). Sau đó gel được rửa bằng nước deion trong 30 phút để loại bỏ chất biến tính (urea và formamide), nhuộm trong 0.5×TAE chứa 0.5 µg/ml ethidium bromide và hiển thị bằng Benchtop Ultraviolet Transilluminator (VWR Scientific, USA). Hình ảnh được ghi lại bằng máy Camedia 4000Z digital camera (Olympus, Japan).

#### *Xác định các băng DGGE*

Các băng DNA đại diện được đánh dấu và cắt dưới UV. Mỗi băng được đựng trong ống riêng, sau đó rửa với 1 ml 0.5×TAE và 1 ml nước deion. Ethidium bromide được loại bỏ bằng 1 ml isopropanol và gel được làm khô trong không khí. Bổ sung bi thủy tinh (70 µl) nước deion (150 µl), sau đó đồng hoá bằng máy lắc bi trong 4 phút. Ly tâm 10000 vòng/phút và thu dịch lỏng phía trên làm khuôn cho phản ứng PCR tiếp theo. Các băng được khuếch đại một lần nữa sử dụng cặp mồi DGGE ban đầu và kiểm tra mức độ sạch bằng DGGE. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng QIAEX II, đọc trình tự sử dụng mồi không chứa khóa GC. Kết quả đọc trình tự được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GeneBank nhờ giao diện BLAST tại <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Altschul et al., 1997).

#### **2.1.7. Phân tích trình tự DNA**

Vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường YMA (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose, 2% agar) trong 3 ngày ở 25 °C. Một vòng que cấy được chuyển vào ống eppendorf chứa 1 ml đệm 2×SSC và ủ ở 99 °C trong 10 phút. Tế bào được thu nhận và rửa một lần bằng 1 ml nước cất vô trùng. Sau đó bổ sung vào mỗi

ống khoảng 75 µl hạt thủy tinh (đường kính 0.2-0.5 mm), 75 µl phenol-chloroform, và 100 µl nước. Ống được lắc ở 1400 rpm trong 10 phút và ly tâm ở 10000 g trong 10 phút. Phần dịch trong phía trên được sử dụng chuyển sang ống mới và sử dụng trực tiếp làm khuôn cho PCR.

Phân đoạn ITS-D1/D2 được khuếch đại sử dụng cặp mồi ITS1 và NL4 trên máy GeneAmp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). Điều kiện nhiệt cho PCR như sau: giai đoạn biến tính ban đầu ở 94°C trong 30 giây sau đó là 35 chu kỳ nhiệt ở 94 °C trong 30 giây, 52 °C trong 40 giây và 72 °C trong 60 giây. Giai đoạn kéo dài cuối cùng được thực hiện ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được tinh chế bằng QIAEX II (Qiagen). Việc giải trình tự DNA được thực hiện sử dụng các mồi đã công bố là ITS1, ITS4, NL1, và NL4 (Kurtzman & Robnett, 1998; Esteve-Zarzoso, 1999) sử dụng thiết bị giải trình tự DNA sequencer 377 của Applied Biosystems. Để phân tích phả hệ, trình tự DNA được so sánh với các trình tự đã có trong GenBank sử dụng giao diện tìm kiếm nucleotide-nucleotide BLAST của National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1997). Những trình tự gần nhất được xử lý bằng BioEdit (Hall, 1999) và so sánh sử dụng ClustalX version 1.81 (Thompson et al., 1997). Giá trị phạt cho gap cố định và gap trôi tương ứng là 10 và 0.2. Cây phả hệ được tính toán dựa trên sự khác biệt giữa các trình tự theo phương pháp Kimura (Kimura, 1980) và sử dụng thuật toán neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) trong ClustalX. Phân tích bootstraps được thực hiện thông qua 1000 nhóm ngẫu nhiên (Felsenstein, 1985). Cây phả hệ được dựng sử dụng phần mềm TreeExplorer version 1.21.

#### **2.1.8. Đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của nấm men**

##### *Đánh giá khả năng phát triển ở nhiệt độ cao*

Nấm men được cấy ra ống thạch nghiêng trên môi trường Malt-glucose agar. Hòa 1 vòng que cấy sinh khối vào 1 ml nước cất đã thanh trùng. Hút 0.2 ml giống dạng lỏng cho vào lỗ của đĩa in dầu bằng inox đã thanh trùng. Đánh dấu các chủng lên trên đĩa môi trường thạch nuôi cấy nấm men Malt-glucose 2°Bx. Nuôi cấy ở các nhiệt độ 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C và đánh giá kết quả sau 48 giờ.

##### *Đánh giá khả năng lên men tạo cồn ở nhiệt độ cao*

Chủng giống được hoạt hóa trên môi trường ống thạch nghiêng chứa Malt-glucose agar và cấy truyền một vòng que cấy vào 4 ml môi trường lỏng (glucose 10%, yeast extract 0.5%). Sau khi nuôi cấy 24 giờ ở nhiệt độ 28°C bổ sung 36 ml môi trường lên men (glucose 20%, yeast extract 0.5%) và ủ ở các nhiệt độ 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C. Sau 36 giờ lên men nồng độ cồn được xác định bằng máy cất Ebulliometer (Dujardin-Salleron Model 360) và lượng đường sót được xác định bằng khúc xạ kế.

## 2.2. Kết quả thực nghiệm và thảo luận

### 2.2.1. Điều tra khảo sát thu thập nguồn gen

Trong năm 2008 Bảo tồn gen Vi sinh vật Công nghiệp Thực phẩm tiếp nhận 171 chủng vi sinh vật (toàn bộ là nấm men) từ Viện Rượu Bia Nước giải khát, thu thập thêm 10 chủng nấm men có khả năng chịu áp suất thẩm thấu cao, 5 chủng nấm mốc từ các sưu tập khác và phân lập được 277 chủng nấm mốc có khả năng sinh cellulose và 10 chủng vi khuẩn *Bacillus* từ mẫu thức ăn gia súc.

#### 2.2.1.1. Tiếp nhận toàn bộ bảo tồn gen từ Viện Rượu Bia Nước giải khát

Một trong những nhiệm vụ lớn mà chúng tôi thực hiện trong năm 2008 là tiếp thu toàn bộ bảo tồn gen vi sinh vật của Viện Rượu Bia Nước giải khát (RIB). Từ danh sách 194 chủng của RIB chúng tôi nhận bàn giao 185 chủng, trong đó 7 chủng vi khuẩn, 7 chủng nấm mốc và 171 chủng nấm men. Tình trạng chủng giống sau khi tiếp nhận như sau:

- 07 chủng **vi khuẩn** ở dạng ống thạch nghiêng đã mất sức sống và bị loại bỏ
- 07 chủng **nấm mốc** bị tap nhiễm quá nhiều và không đúng với tên trong sưu tập cũng bị loại bỏ
- 171 chủng **nấm men** trong tình trạng còn sức sống. Tất cả những chủng này đã được làm sạch lại và bảo quản bằng cả hai phương pháp đông khô và bảo quản trong ni tơ lỏng.

Sau đây là danh sách các chủng từ RIB cũng như tình trạng của chúng.

**Bảng 1.** Danh sách các chủng từ RIB cũng như tình trạng của chúng.

TT	Ký hiệu	Mã số RIB	Tên khoa học	Nguồn gốc	Tình trạng
1	B1	1010	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Anh	++
2	B2	1011	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Anh	++
3	B3	1012	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Nhật	++
4	B4	1013	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Nhật	++
5	B5	1014	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Đức	++
6	B6	1015	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
7	B7	1016	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
8	B8	1017	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
9	B9	1018	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
10	B10	1019	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	++
11	B11	1020	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	++
12	B12	1021	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	++
13	B13	1022	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	++
14	B14	1023	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	++
15	B15	1024	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	++

TT	Ký hiệu	Mã số RIB	Tên khoa học	Nguồn gốc	Tình trạng
16	B16	1025	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Nhật	++
17	B17	1026	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiếp	++
18	B19	1028	Cxđ	Tự phân lập	++
19	B20	1029	Cxđ	Tự phân lập	++
20	B21	1030	Cxđ	Anh	++
21	B22	1031	Cxđ	Anh	++
22	B23	1032	Cxđ	Anh	++
23	B24	1033	Cxđ	Tiếp	++
24	B25	1034	Cxđ	Tiếp	++
25	B26	1035	Cxđ	Tiếp	++
26	B27	1036	Cxđ	Tiếp	++
27	B28	1037	Cxđ	Tiếp	++
28	B29	1038	Cxđ	Tự phân lập	++
29	B30	1039	Cxđ	Tự phân lập	++
30	RV1	2010	Cxđ	Nhật	++
31	RV2	2011	Cxđ	Nhật	++
32	RV3	2012	Cxđ	Nhật	++
33	RV4	2013	Cxđ	Thái Lan	++
34	RV5	2014	Cxđ	Thái Lan	++
35	RV6	2015	Cxđ	Thái Lan	++
36	RV7	2016	Cxđ	Cty rượu HN	++
37	RV8	2017	Cxđ	Nho Ninh Thuận	++
38	RC1	2018	Cxđ	Quả mơ	++
39	RC2	2019	Cxđ	BM Trung quốc	++
40	RC3	2020	Cxđ	BM Bắc Giang	++
41	RC4	2021	Cxđ	BM Bắc Giang	++
42	RC5	2022	Cxđ	BM làng Ngâu	++
43	RC6	2023	Cxđ	BM làng Ngâu	++
44	RLN1	2024	Cxđ	BM Bắc Ninh	++
45	RLN2	2025	Cxđ	BM Bắc Ninh	++
46	RLN3	2026	Cxđ	BM Bắc Ninh	++
47	RLN4	2027	Cxđ	BM Bắc Ninh	++
48	RLN5	2028	Cxđ	BM Lạng Sơn	Không có
49	RLN6	2029	Cxđ	BM Lạng Sơn	++
50	RLN7	2030	Cxđ	BM Lạng Sơn	Không có
51	RLN8	2031	Cxđ	BM Lạng Sơn	++
52	RLN9	2032	Cxđ	BM Tuyên Quang	++
53	RLN10	2033	Cxđ	BM Tuyên Quang	++
54	RLN11	2034	Cxđ	BM Tuyên Quang	++
55	B31	1040	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Anh	++
56	B32	1041	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Cânda	++
57	B33	1042	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
58	B34	1043	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiếp	++
59	B35	1044	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Tiếp	++
60	B36	1045	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
61	B37	1046	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
62	B38	1047	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
63	B39	1048	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung quốc	++
64	B40	1049	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung quốc	++
65	RV9	2035	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Nhật	++
66	RV10	2036	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++



TT	Ký hiệu	Mã số RIB	Tên khoa học	Nguồn gốc	Tình trạng
67	RV11	2037	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Thái lan	++
68	RV12	2038	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
69	RV13	2039	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Quả sim	++
70	RC7	2040	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung quốc	++
71	RC8	2041	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
72	RC9	2042	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Cty rượu HN	++
73	RC10	2043	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Trung quốc	++
74	RC11	2044	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Bắc Hà	++
75	RC12	2045	Cxđ	Bm làng Ngâu	++
76	RC13	2046	Cxđ	Bm Bắc ninh	++
77	RLN13	2047	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Lạng Sơn	++
78	RLN14	2048	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Tuyên Quang	++
79	M11	3020	<i>Aspergillus niger</i> <sup>1</sup>	Bm Lạng Sơn	Chết
80	M12	3021	<i>Aspergillus niger</i> <sup>1</sup>	Bm Tuyên Quang	Chết
81	M14	3023	<i>Aspergillus niger</i> <sup>1</sup>	Bm Bắc Giang	Chết
82	M15	3024	<i>Aspergillus niger</i> <sup>1</sup>	Bm Bắc Giang	Chết
83	G8	4010	<i>Endomycopsis fibuliger</i> <sup>1</sup>	Bm Trung Quốc	++
84	L17	5023	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <sup>1</sup>	Thái Lan	Chết
85	L19	5025	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	Chết
86	B41	1050	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Đức	++
87	B42	1051	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Thái lan	++
88	B43	1052	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Pháp	++
89	B44	1053	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	++
90	B45	1054	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Đức	++
91	B46	1055	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Canada	++
92	B47	1056	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung quốc	++
93	B48	1057	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Đức	++
94	RV14	2049	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Đức	++
95	RV15	2050	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Nhật	++
96	RC14	2051	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	++
97	RLN15	2052	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Vân Nam-TQ	++
98	RLN17	2053	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Lào Cai	++
99	RLN18	2054	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Hải Dương	++
100	RLN19	2055	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Bắc Ninh	++
101	RLN20	2056	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Lạng Sơn	++
102	RLN21	2057	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm Bắc Giang	++
103	M16	3025	<i>Aspergillus niger</i> <sup>1</sup>	Bm Lào Cai	Chết
104	L22	5028	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <sup>3</sup>	Đã có tên	Chết
105	B203	1058	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Đức	++
106	B227	1059	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Thái lan	++
107	B230	1060	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Pháp	++
108	B237	1061	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Tiệp	++
109	B1001	1062	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Đức	++
110	B1025	1063	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Canada	++
111	B1277	1064	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Đức	++
112	B1288	1065	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	++
113	B1318	1066	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	++
114	B1336	1067	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Việt Nam	++
115	RV216	2058	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Tự nhiên	++
116	RV217	2059	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Pháp	Không có
117	RV218	2060	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Pháp	++

TT	Ký hiệu	Mã số RIB	Tên khoa học	Nguồn gốc	Tình trạng
118	RV219	2061	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Pháp	++
119	RV230	2062	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Đức	++
120	RC215	2063	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	Không có
121	RC217	2064	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
122	RC218	2065	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Đức	++
123	RC219	2066	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
124	RLN213	2067	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	BML	++
125	RLN214	2068	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BMTB	++
126	RLN215	2069	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BML	++
127	RLN216	2070	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BMTB	++
128	RLN217	2071	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BMTB	++
129	RLN218	2072	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BML	++
130	M6230	3030	<i>Aspergillus niger</i> <sup>1</sup>	Bm Giao Thủy	Chết
131	M7620	3033	<i>Aspergillus niger</i> <sup>1</sup>	Bm Kim Sơn	Chết
132	M8800	3034	<i>Aspergillus awamori</i> Nakazawa <sup>1</sup>	Bm Đông Hưng	Chết
133	L299	5034	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <sup>1</sup>	Việt Nam	Chết
134	L1980	5036	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <sup>3</sup>	Thái lan	Chết
135	B401	1068	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Nhật	++
136	B402	1069	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Nhật	++
137	B403	1070	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Nhật	++
138	B420	1071	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Nhật	++
139	B422	1072	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
140	B425	1073	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
141	B437	1074	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Đức	++
142	B449	1075	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Việt Nam	++
143	B450	1076	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Việt Nam	++
144	B451	1077	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Việt Nam	++
145	RV228	2073	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Tự nhiên	++
146	RV229	2074	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Nhật	++
147	RV240	2075	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Nhật	++
148	RC231	2076	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
149	RC232	2077	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
150	RC233	2078	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
151	RC234	2079	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
152	RC235	2080	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Trung Quốc	++
153	RC236	2081	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Đức	++
154	RC237	2082	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>	Sản xuất	++
155	RC238	2083	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Sản xuất	++
156	RC239	2084	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Sản xuất	++
157	RC DM1	2085	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Sản xuất	++
158	RC DM2	2086	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Sản xuất	++
159	RLN219	2087	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BML	++
160	RLN220	2088	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BMTB	++
161	RLN221	2089	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BML	++
162	RLN222	2090	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BMTB	++
163	RLN223	2091	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BMTB	++
164	RLN224	2092	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	BMTB	++
165	L3314	5044	<i>L. plantarum</i> <sup>3</sup>	Thái Lan	Chết
166	L3324	5046	<i>L.bungaricus</i> <sup>3</sup>	Tự nhiên	Chết
167	B452	1078	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Hải Dương	++
168	B453	1079	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Ba Lan	++

TT	Ký hiệu	Mã số RIB	Tên khoa học	Nguồn gốc	Tình trạng
169	B454	1080	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Hải Phòng	++
170	B458	1081	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Quảng Bình	++
171	B464	1082	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Hà Bắc	++
172	B466	1083	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Na Da	++
173	B472	1084	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Đức	Không có
174	B493	1085	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Tiệp	Không có
175	B494	1086	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Úc	++
176	B495	1087	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	++
177	RV241	2093	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Trung Quốc	++
178	RV242	2094	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Trung Quốc	++
179	RC240	2095	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	++
180	RC241	2096	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	++
181	RC245	2097	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trung Quốc	++
182	RC253	2098	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>2</sup>	Trong nước	++
183	RC254	2099	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Trong nước	++
184	LN221	2100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm lá	++
185	LN222	2101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Bm lá	++
186	LN223	2102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>1</sup>	Men rượu VN	Không có
187	LN224	2103	Cxd	Bm thuốc bắc	Không có
188	LN227	2104		Men rượu TQ	Không có
189		4011	<i>Endomycopsis fibuliger</i>	Không rõ	++
190		4012	Cxd	Không rõ	++
191		4013	Cxd	Không rõ	++
192		4016	Cxd	Không rõ	++
193		4017	Cxd	Không rõ	++
194		4018	Cxd	Không rõ	++

Ghi chú: Cxd- chưa xác định tên khoa học; 1-Phân loại bằng phương pháp truyền thống; 2-Phân loại bằng phương pháp sinh học phân tử; 3-Đã có tên; BML- Bánh men lá; BMTB-Bánh men thuốc bắc, Bm- Bánh men; +++ phát triển rất tốt; ++ Phát triển khá tốt; + phát triển trung bình

#### 2.2.1.2. Thu thập 10 chủng nấm men có khả năng chịu áp suất thẩm thấu cao

Từ các nguồn khác nhau đã phân lập được 10 chủng *Zygosaccharomyces* ký hiệu như sau.

**Bảng 2.** Danh sách các chủng nấm men mới thu thập từ mật ong.

TT	Kí hiệu chủng	Sơ bộ định tên	Nguồn phân lập
1	2.1	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
2	2.5	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
3	2.6	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
4	2.7	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
5	2.8	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
6	2.9	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
7	2.10	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
8	2.13	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
9	2.17	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men
10	6.2	<i>Zygosaccharomyces</i>	Mật ong lên men

#### 2.2.1.3. Tiếp nhận các chủng nấm mốc

Trong năm 2008 sưu tập giống đã tiếp nhận được 5 chủng nấm mốc từ các sưu tập khác. Dưới đây là danh sách các chủng nấm mốc tiếp nhận được.

**Bảng 3.** Danh sách các chủng nấm mốc tiếp nhận từ các sưu tập giống khác.

Ký hiệu	Ký hiệu gốc	Tên giống	Phương pháp bảo quản	Tình trạng
CNTP 5099	CPK 160	<i>Trichoderma reesei</i>	Cát	Tốt
CNTP 5100	CPK 634	<i>Trichoderma reesei</i>	Cát	Tốt
CNTP 5101	CPK 665	<i>Trichoderma reesei</i>	Cát	Tốt
CNTP 5102	CPK 717	<i>Trichoderma reesei</i>	Cát	Tốt
CNTP 5103	JCM 6934	<i>Monascus purpureus</i>	Paraffin	Tốt

#### 2.2.1.4. Phân lập tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng sinh enzyme cellulase

Việc phân lập và tuyển chọn các chủng nấm mốc sinh enzyme cellulase vẫn là một mục tiêu tìm kiếm các chủng vi sinh vật mới, có nguồn gen quý hiếm của sưu tập giống năm 2008. Mẫu phân lập được lấy từ 26 địa điểm khác nhau và được bảo quản trong tủ 4°C. Tiến hành phân lập trên môi trường Czapeck cơ bản không cacbon bổ sung thêm 0,2% saccharose, 1% bột giấy, 2% agar kết phân lập được 277 chủng nấm mốc có khả năng sinh cellulase.

**Bảng 4.** Danh sách và nguồn gốc các các chủng nấm mốc phân lập được.

TT	Địa điểm lấy mẫu	Chủng phân lập được
1	Kim Tiến - Phú Thọ	FEC165- FEC175
2	Ân Thi - Hưng Yên	FEC176-182; FEC212-FEC228; FEC230-FEC236; FEC442-FEC447
3	Phù Đồng, Gia Lâm	FEC183 - FEC187; FEC197- FEC199; FEC 203-FEC211
4	Hà Đông - Hà Tây	FEC 188-FEC196;
5	Bần – Yên Nhân - Hưng Yên	FEC200 - FEC202;
6	Kim Đức, Phú Thọ	FEC 229
7	Núi Sòng, Phú Thọ	FEC 237 - FEC239
8	Hợp Thành, Vĩnh Yên, Vĩnh Phúc	FEC 240 - FEC249; FEC 275
9	Kim Tiến, Phú Thọ	FEC250 - FEC253
10	Bồ Hồn, Kim Đức, Phú Thọ	FEC 254 - FEC262
11	Phổ Kiệu, Vĩnh Yên, Vĩnh Phúc	FEC 263 - FEC 272;
12	Bờ Gia, Kim Đức, Phú Thọ	FEC 273-FEC274
13	Phú Thọ	FEC 276 - FEC 283
14	Từ Liêm, Hà Nội	FEC 284- FEC 285
15	Thường, Tín Hà Tây	FEC 286-FEC 290
16	Vị thuốc Trung Quốc	FEC 291-FEC295; FEC422

TT	Địa điểm lấy mẫu	Chủng phân lập được
17	Nhân Chính, Hà Nội	FEC 296-FEC301
18	Thanh Trì, Hà Nội	FEC302-FEC310
19	Hà Đông, Hà Tây	FEC311-FEC334
20	Lương Sơn, Hoà Bình	FEC 335-FEC344
21	Thanh Xuân trung, Hà Nội	FEC345-FEC359; FEC 432- FEC437
22	Lăng Minh Mạng, Huế	FEC360 - FEC378; FEC 394-397
23	Lăng Tự Đức, Huế	FEC379-FEC393
24	Nam Định	FEC398-FEC413
25	Kỳ Anh, Hà Tĩnh	FEC414- FEC418
26	Bồ Trách, Quảng Bình	FEC 438- FEC 441

#### 2.2.1.5. Thu thập 10 chủng vi khuẩn *Bacillus* từ mẫu thức ăn gia súc

Từ mẫu thức ăn gia súc, chúng tôi đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn *Bacillus*. Kết quả được thể hiện ở bảng 5

**Bảng 5.** Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được.

STT	Ký hiệu	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào
1	LEE	$\Phi=4.5\text{mm}$ , khuẩn lạc tròn, bóng, bề mặt trơn nhẵn	Trực khuẩn mập, thường xếp đơn lẻ
2	NOVA 2	$\Phi=4\text{mm}$ , khuẩn lạc, dẹt, tròn, bề mặt khô	Trực khuẩn nhỏ, thường xếp đơn lẻ
3	NOVA3	$\Phi=3\text{ mm}$ , khuẩn lạc tròn, khi già sinh sắc tố nâu đen trên môi trường thạch dinh dưỡng	Trực khuẩn nhỏ, thường xếp đơn lẻ
4	NOVA 4	$\Phi=2\text{mm}$ , khuẩn lạc tròn, bề mặt khô	Trực khuẩn nhỏ, thường xếp đơn lẻ
5	NOVA 6	$\Phi=2\text{mm}$ , khuẩn lạc tròn, bề mặt bóng	Trực khuẩn nhỏ, thường xếp đơn lẻ
6	BMZ1	$\Phi=7\text{mm}$ , khuẩn lạc lồi, tâm lõm, bề mặt bóng ướt	Trực khuẩn, dài, nhỏ, thường xếp đơn lẻ
7	BMZ2	$\Phi=8\text{mm}$ , khuẩn lạc dẹt, bề mặt ướt	Trực khuẩn, dài, nhỏ, thường xếp đơn lẻ
8	BMZ3	$\Phi=4\text{mm}$ , khuẩn lạc tròn, bề mặt bóng ướt	Trực khuẩn nhỏ, thường xếp chuỗi dài
9	BMZ5	$\Phi=7\text{mm}$ , khuẩn lạc lồi, hơi lõm, bề mặt ướt	Trực khuẩn dài, nhỏ, thường xếp đơn lẻ
10	PP	$\Phi=8\text{mm}$ , khuẩn lạc tròn, bề mặt trơn, bóng	Trực khuẩn dài, nhỏ, thường xếp đơn lẻ

#### 2.2.2. Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen

Trong năm 2008, chúng tôi tiếp tục bảo tồn 907 chủng giống chính thức của sưu tập, 171 chủng từ quỹ gen của Viện Rượu Bia Nước giải khát, những chủng được chọn

lọc từ năm trước và những chủng mới thu thập trong năm 2008. Toàn bộ 171 chủng mới tiếp nhận từ RIB đã được bảo quản bằng đông khô và trong ni tơ lỏng. Hiện nay chúng tôi định hướng chuyển việc bảo quản phần lớn sưu tập giống bằng hai phương pháp này. Những kỹ thuật khác như cấy truyền, bảo quản trong parafin, trong cát chỉ là những phương pháp hỗ trợ. Hiện tại có 750 chủng đã được bảo quản trong ni tơ lỏng và 530 chủng đã được bảo quản bằng đông khô. Bảo quản trong lạnh sâu được duy trì cho 120 chủng, trong cát 65 chủng, trong paraffin 50 chủng.

Bảo quản vi sinh vật trong ni tơ lỏng là kỹ thuật bảo quản an toàn nhất hiện nay. Ưu điểm của kỹ thuật là cho phép bảo quản tất cả các vi sinh vật trong thời gian dài (một vài chục năm) và không làm ảnh hưởng tới sức sống cũng như trạng thái của chủng giống. Hiện nay Bảo tồn gen đã bảo quản được 750 chủng trong ni tơ lỏng. Phương pháp bảo quản sử dụng các ống nhỏ bằng polypropylene hàn kín bằng ngọn lửa được áp dụng vì giá thành thấp và độ tiện dụng cao. Kỹ thuật này hiện cũng đang được áp dụng tại sưu tập giống CBS (Hà Lan). Quy trình bảo quản bằng ni tơ lỏng được trình bày cụ thể trong phần phương pháp.

Trong quá trình thực hiện chúng tôi gặp phải một số khó khăn về nguồn cung cấp ni tơ lỏng thường xuyên. Trung bình cứ 2 tuần phải bổ sung ni tơ một lần và không phải cơ sở sản xuất ni tơ nào cũng có thể đảm bảo việc cung cấp theo đúng định kỳ. Để khắc phục khó khăn chúng tôi phải liên hệ đồng thời với nhiều cơ quan, tuy vậy rủi ro tiềm ẩn về nguồn ni tơ vẫn khá cao. Dưới đây là một số kết quả bảo quản và kiểm tra sức sống của chủng sau bảo quản bằng các phương pháp khác nhau.

Kết quả cho thấy: Các phương pháp bảo quản dưới dầu parafin, lạnh sâu hay ni tơ lỏng, các chủng nấm men có khả năng sống sau bảo quản là rất tốt. Tuy nhiên, các ống giống bảo quản dưới dầu paraffin, sau một năm bảo quản, hầu hết các chủng bảo quản bị chuyển từ màu trắng ngà sang màu nâu. Do vậy, việc kết hợp các phương pháp bảo quản khác nhau như bảo quản đông khô hay trong ni tơ lỏng là rất cần thiết.

2.2.2.1. Bảo quản và kiểm tra mức độ sống sót của các chủng nấm men

**Bảng 6.** Bảo quản dưới dầu paraffin lỏng 30 chủng nấm men

TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học	Khả năng phát triển	
			Trước BQ	Sau BQ
1	7043	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
2	7050	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
3	7052	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
4	7062	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
5	7065	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
6	7073	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
7	7079	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
8	7081	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
9	7091	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
10	7092	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
11	7097	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
12	7098	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
13	7010	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
14	714	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
15	716	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
16	718	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
17	7120	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
18	7121	<i>S. cerevisiae</i>	+++	++
19	7123	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
20	7132	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
21	7154	<i>S. carlsbergensis</i>	+++	++
22	7157	<i>S. carlsbergensis</i>	+++	++
23	7158	<i>S. carlsbergensis</i>	+++	++
24	7159	<i>S. chevalieri</i>	+++	+++
25	7165	<i>S. payanus</i>	+++	+++
26	7166	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
27	7168	<i>S. cerevisiae</i>	+++	+++
28	7169	<i>S. pastorianus</i>	+++	++
29	7170	<i>S. pastorianus</i>	+++	++
30	7172	<i>S. uvarum</i>	+++	+++

**Bảng 7.** Bảo quản lạnh sâu 120 chủng nấm men.

TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học	TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học
1	701	<i>S. cerevisiae</i>	61	7073	<i>S. cerevisiae</i>
2	702	<i>S. cerevisiae</i>	62	7074	<i>S. cerevisiae</i>
3	703	<i>S. cerevisiae</i>	63	7075	<i>S. cerevisiae</i>
4	704	<i>S. cerevisiae</i>	64	7076	<i>S. cerevisiae</i>
5	705	<i>S. cerevisiae</i>	65	7077	<i>S. cerevisiae</i>
6	706	<i>S. cerevisiae</i>	66	7078	<i>S. cerevisiae</i>
7	707	<i>S. cerevisiae</i>	67	7079	<i>S. cerevisiae</i>

TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học	TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học
8	708	<i>S. cerevisiae</i>	68	7080	<i>S. cerevisiae</i>
9	709	<i>S. cerevisiae</i>	69	7081	<i>S. cerevisiae</i>
10	7010	<i>S. cerevisiae</i>	70	7082	<i>S. cerevisiae</i>
11	7011	<i>S. cerevisiae</i>	71	7083	<i>S. cerevisiae</i>
12	7012	<i>S. cerevisiae</i>	72	7084	<i>S. cerevisiae</i>
13	7013	<i>S. cerevisiae</i>	73	7085	<i>S. cerevisiae</i>
14	7014	<i>S. cerevisiae</i>	74	7086	<i>S. cerevisiae</i>
15	7015	<i>S. cerevisiae</i>	75	7087	<i>S. cerevisiae</i>
16	7016	<i>S. cerevisiae</i>	76	7088	<i>S. cerevisiae</i>
17	7017	<i>S. cerevisiae</i>	77	7089	<i>S. cerevisiae</i>
18	7018	<i>S. cerevisiae</i>	78	7090	<i>S. cerevisiae</i>
19	7019	<i>S. cerevisiae</i>	79	7091	<i>S. cerevisiae</i>
20	7020	<i>S. cerevisiae</i>	80	7092	<i>S. cerevisiae</i>
21	7021	<i>S. cerevisiae</i>	81	7093	<i>S. cerevisiae</i>
22	7022	<i>S. cerevisiae</i>	82	7094	<i>S. cerevisiae</i>
23	7023	<i>S. cerevisiae</i>	83	7095	<i>S. cerevisiae</i>
24	7024	<i>S. cerevisiae</i>	84	7096	<i>S. cerevisiae</i>
25	7025	<i>S. cerevisiae</i>	85	7097	<i>S. cerevisiae</i>
26	7026	<i>S. cerevisiae</i>	86	7098	<i>S. cerevisiae</i>
27	7027	<i>S. cerevisiae</i>	87	7099	<i>S. cerevisiae</i>
28	7028	<i>S. cerevisiae</i>	88	70100	<i>S. cerevisiae</i>
29	7029	<i>S. cerevisiae</i>	89	70101	<i>S. cerevisiae</i>
30	7030	<i>S. cerevisiae</i>	90	70102	<i>S. cerevisiae</i>
31	7031	<i>S. cerevisiae</i>	91	7120	<i>S. cerevisiae</i>
32	7032	<i>S. cerevisiae</i>	92	7121	<i>S. cerevisiae</i>
33	7033	<i>S. cerevisiae</i>	93	7122	<i>S. cerevisiae</i>
34	7034	<i>S. cerevisiae</i>	94	7123	<i>S. cerevisiae</i>
35	7035	<i>S. cerevisiae</i>	95	7124	<i>S. cerevisiae</i>
36	7036	<i>S. cerevisiae</i>	96	7125	<i>S. cerevisiae</i>
37	7037	<i>S. cerevisiae</i>	97	7126	<i>S. cerevisiae</i>
38	7038	<i>S. cerevisiae</i>	98	7127	<i>S. cerevisiae</i>
39	7039	<i>S. cerevisiae</i>	99	7128	<i>S. cerevisiae</i>
40	7040	<i>S. cerevisiae</i>	100	7129	<i>S. cerevisiae</i>
41	7041	<i>S. cerevisiae</i>	101	7130	<i>S. cerevisiae</i>
42	7042	<i>S. cerevisiae</i>	102	7131	<i>S. cerevisiae</i>
43	7044	<i>S. cerevisiae</i>	103	7132	<i>S. cerevisiae</i>
44	7045	<i>S. cerevisiae</i>	104	7133	<i>S. carlsbergensis</i>
45	7046	<i>S. cerevisiae</i>	105	7134	<i>S. cerevisiae</i>
46	7047	<i>S. cerevisiae</i>	106	7135	<i>S. carlsbergensis</i>
47	7048	<i>S. cerevisiae</i>	107	7136	<i>S. carlsbergensis</i>
48	7049	<i>S. cerevisiae</i>	108	7137	<i>S. carlsbergensis</i>
49	7053	<i>S. cerevisiae</i>	109	7138	<i>S. carlsbergensis</i>
50	7054	<i>S. cerevisiae</i>	110	7139	<i>S. carlsbergensis</i>
51	7055	<i>S. cerevisiae</i>	111	7140	<i>S. carlsbergensis</i>
52	7056	<i>S. cerevisiae</i>	112	7141	<i>S. carlsbergensis</i>
53	7057	<i>S. cerevisiae</i>	113	7142	<i>S. carlsbergensis</i>



TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học	TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học
54	7058	<i>S. cerevisiae</i>	114	7143	<i>S. carlsbergensis</i>
55	7059	<i>S. cerevisiae</i>	115	7144	<i>S. carlsbergensis</i>
56	7060	<i>S. cerevisiae</i>	116	7145	<i>S. carlsbergensis</i>
57	7061	<i>S. cerevisiae</i>	117	7146	<i>S. carlsbergensis</i>
58	7064	<i>S. cerevisiae</i>	118	7147	<i>S. carlsbergensis</i>
59	7066	<i>S. cerevisiae</i>	119	7148	<i>S. carlsbergensis</i>
60	7067	<i>S. cerevisiae</i>	120	7149	<i>S. carlsbergensis</i>

**Bảng 8.** Bảo quản đông khô và trong nitơ lỏng 20 chủng nấm men

TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học	Tình trạng giống
1	701	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
2	702	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
3	703	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
4	704	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
5	705	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
6	706	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
7	707	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
8	708	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
9	709	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
10	7010	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
11	7011	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
12	7012	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
13	7013	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
14	7014	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
15	7015	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
16	7016	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
17	7017	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
18	7018	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
19	7019	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường
20	7020	<i>S. cerevisiae</i>	Phát triển bình thường

#### 2.2.2.2. Bảo quản và kiểm tra mức độ sống sót của các chủng nấm mốc

Chúng tôi đã bảo quản an toàn 65 chủng giống nấm mốc bằng các phương pháp khác nhau.

**Bảng 9.** Tình trạng của các chủng được bảo quản bằng cát.

TT	Ký hiệu	Ký hiệu cũ	Tên sơ bộ chủng giống	Trước BQ	Sau BQ
1	CNTP 5001	70	<i>A. niger</i> (awamori Nakazawa)	+++	+++
2	CNTP 5002	772	<i>A. niger</i> (awamori Nakazawa)	++	++
3	CNTP 5003	1922f1	<i>A. awamori</i> Nakazawa	++	++
4	CNTP 5004	Wa-p, Wa-p1,2	<i>A. awamori</i> Nakazawa	++	++
5	CNTP 5006	Wa-am	<i>A. awamori</i> Nakazawa	++	++
6	CNTP 5007	9-76	<i>A. awamori</i> Nakazawa	++	++
7	CNTP 5008	R <sub>3</sub>	<i>A. awamori</i> Nakazawa	++	++
8	CNTP 5009	Đ	<i>A. awamori</i> Nakazawa	++	++
9	CNTP 5010	K <sub>1</sub>	<i>A. awamori</i> Nakazawa	++	++
10	CNTP 5011	3324	<i>A. niger</i> (awamori Nakazawa)	++	++
11	CNTP 5012	Cl	<i>A. niger</i> (awamori Nakazawa)	++	++
12	CNTP 5013	9-94	<i>A. niger</i> (awamori Nakazawa)	++	++
13	CNTP 5014	7	<i>A. niger</i> (awamori Nakazawa)	++	++
14	CNTP 5015	K <sub>10</sub>	<i>A. niger</i> (batatae Saito)	++	++
15	CNTP 5016	P25	<i>A. niger</i> (batatae Saito)	++	++
16	CNTP 5017	R <sub>1</sub>	<i>A. niger</i> (batatae Saito)	+++	+++
17	CNTP 5018	R <sub>2</sub>	<i>A. batatae</i> Saito	++	++
18	CNTP 5019	758	<i>A. batatae</i> Saito	++	++
19	CNTP 5020	A <sub>1</sub>	<i>A. niger</i> (Batatae Saito)	+++	+++
20	CNTP 5021	A <sub>2</sub>	<i>A. niger</i> (Batatae Saito)	+++	+++
21	CNTP 5022	9-4	<i>A. niger</i> (carbonavinus) Thom	+++	+++
22	CNTP 5023	A <sub>52</sub>	<i>A. niger</i> (cinamomeus n.comb)	++	++
23	CNTP 5024	A <sub>20</sub>	<i>A. ficuum</i> (reich) Hennings	++	++
24	CNTP 5025	13N	<i>A. flavus</i> Link	++	++
25	CNTP 5026	29B	<i>A. sojae</i>	+++	+++
26	CNTP 5027	29A	<i>A. sojae</i>	+++	+++
27	CNTP 5029	45A	<i>A. foetidus</i> Nakazawa	+++	+++
28	CNTP 5032	599	<i>A. niger</i> var Tieghem	+++	++
29	CNTP 5033	1920f	<i>A. niger</i> var Tieghem	+++	++
30	CNTP 5034	770	<i>A. niger</i> var Tieghem	++	++
31	CNTP 5037	1923f2	<i>A. niger</i> var Tieghem	++	++
32	CNTP 5039	KC	<i>A. oryzae</i>	++	++
33	CNTP 5042	9-35	<i>A. oryzae</i>	++	++
34	CNTP 5043	Jo	<i>A. oryzae</i>	++	++
34	CNTP 5043	Jo	<i>A. oryzae</i>	++	++
35	CNTP 5045	9-38 <sub>1</sub>	<i>A. parasiticus</i> Speare (oryzae)	++	++
36	CNTP 5047	9-123	<i>A. parasiticus</i> Speare (flavus)	++	++
37	CNTP 5048	T.5066	<i>A. sojae</i> Sakaguchi Yamada	++	++

TT	Ký hiệu	Ký hiệu cũ	Tên sơ bộ chủng giống	Trước BQ	Sau BQ
38	CNTP 5049	0.4244	<i>A. sojae</i> f. sp. <i>flavoviridis</i> Ohmasa	++	++
39	CNTP 5052	NG-75	<i>A. niger</i> ( <i>japonicus</i> var <i>viridi flavus</i> )	++	++
40	CNTP 5053	A <sub>3</sub>	<i>A. niger</i>	++	++
41	CNTP 5054	9-74	<i>A. niger</i>	+++	+++
42	CNTP 5055	SZKC	<i>A. niger</i>	++	++
43	CNTP 5079	A5	<i>A. niger</i> ( <i>ficuum</i> )	++	++
44	CNTP 5080	JC	<i>A. candidus</i> ( <i>flavus</i> Link)	++	++
45	CNTP 5081	F081	<i>A. oryzae</i>	+++	+++
46	CNTP 5082	ATQ	<i>A. oryzae</i>	+++	+++
47	CNTP 5083	9-38 <sub>2</sub>	<i>A. paraciticus</i> Speare	++	++
48	CNTP 5084	K <sub>2</sub>	<i>A. batatae</i>	++	++
49	CNTP 5086	JCM 1863	<i>A. niger</i> var <i>intermedius</i>	+++	+++
50	CNTP 5087	JCM 1864	<i>A. niger</i> var <i>niger</i>	+++	+++
51	CNTP 5088	JCM 1865	<i>A. niger</i> var <i>niger fhennebergii</i>	+++	+++
52	CNTP 5089	JCM 1922	<i>A. niger</i> var <i>phoenicis</i>	+++	+++
53	CNTP 5090	JCM 1925	<i>A. niger</i> var <i>usami</i>	+++	+++
54	CNTP 5091	JCM 2261	<i>A. niger</i> var <i>awamori</i>	+++	+++
55	CNTP 5092	Wa-J	<i>A. awamori</i>	+++	+++
56	CNTP 5093	FEC93	<i>Penicillium oxalicum</i>	+++	+++
57	CNTP 5094	FEC128	<i>Penicillium oxalicum</i>	++	++
58	CNTP 5095	FEC130	<i>Aspergillus niger</i>	+++	+++
59	CNTP 5096	FEC147	<i>Trichoderma inhamatum</i>	++	++
60	CNTP 5097	FEC156	<i>Aspergillus japonicus</i>	++	++
61	CNTP 5098	RB2	<i>Rhizopus</i> sp.	+++	+++
62	CNTP 5099	CPK 160	<i>Trichoderma reesei</i>	++	++
63	CNTP 5100	CPK 634	<i>Trichoderma reesei</i>	++	++
64	CNTP 5101	CPK 665	<i>Trichoderma reesei</i>	++	++
65	CNTP 5102	CPK 717	<i>Trichoderma reesei</i>	++	++

Ký hiệu: Phát triển tốt: +++; Phát triển khá: ++; Phát triển yếu: +

**Bảng 10.** Tình trạng của các chủng nấm mốc bảo quản bằng phương pháp paraffin.

TT	Ký hiệu	Ký hiệu cũ	Tên sơ bộ chủng giống	Trước BQ	Sau BQ
1	CNTP 5057	MD	<i>Monascus purpureus</i>	++	++
2	CNTP 5058	RC	<i>Mucor</i> sp.	++	++
3	CNTP 5065	R31	<i>Rhizopus</i> ( <i>oryzae</i> )	+	+
4	CNTP 5071	RHN8-RN8	<i>Rhizopus</i>	+	+
5	CNTP 5073	RHT-RT	<i>Rhizopus</i>	+	+
6	CNTP 5085	3403	<i>Monascus purpureus</i>	++	++
7	CNTP 5103	JCM 6934	<i>Monascus purpureus</i>	++	++

**Bảng 11.** Tình trạng của các chủng nấm mốc bảo quản bằng phương pháp lạnh sâu.

TT	Ký hiệu	Ký hiệu cũ	Tên sơ bộ chủng giống	Trước BQ	Sau BQ
1	CNTP 5057	MD	<i>Monascus purpureus</i>	++	++
2	CNTP 5058	RC	<i>Mucor</i> sp.	++	++
3	CNTP 5065	R31	<i>Rhizopus (oryzae)</i>	+	+
4	CNTP 5071	RHN8-RN8	<i>Rhizopus</i>	+	+
5	CNTP 5073	RHT-RT	<i>Rhizopus</i>	+	+
6	CNTP 5085	3403	<i>Monascus purpureus</i>	++	++
7	CNTP 5098	RB2	<i>Rhizopus</i>	++	++

**Bảng 12.** Tình trạng của các chủng nấm mốc bảo quản bằng đông khô.

TT	Ký hiệu	Ký hiệu cũ	Tên sơ bộ chủng giống	Trước BQ	Sau BQ
1	CNTP 5001	70	<i>A. niger (awamori Nakazawa)</i>	+++	+++
2	CNTP 5002	772	<i>A. niger (awamori Nakazawa)</i>	++	++
3	CNTP 5003	1922f1	<i>A. awamori Nakazawa</i>	++	++
4	CNTP 5004	Wa-p, Wa-p1,2	<i>A. awamori Nakazawa</i>	++	++
5	CNTP 5006	Wa-am	<i>A. awamori Nakazawa</i>	++	++
6	CNTP 5007	9-76	<i>A. awamori Nakazawa</i>	++	++
7	CNTP 5008	R <sub>3</sub>	<i>A. awamori Nakazawa</i>	++	++
8	CNTP 5009	Đ	<i>A. awamori Nakazawa</i>	++	++
9	CNTP 5010	K <sub>1</sub>	<i>A. awamori Nakazawa</i>	++	++
10	CNTP 5011	3324	<i>A. niger (awamori Nakazawa)</i>	++	++
11	CNTP 5012	Cl	<i>A. niger (awamori Nakazawa)</i>	++	++
12	CNTP 5013	9-94	<i>A. niger (awamori Nakazawa)</i>	++	++
13	CNTP 5014	7	<i>A. niger (awamori Nakazawa)</i>	++	++
14	CNTP 5015	K <sub>10</sub>	<i>A. niger (batatae Saito)</i>	++	++
15	CNTP 5016	P25	<i>A. niger (batatae Saito)</i>	++	++
16	CNTP 5017	R <sub>1</sub>	<i>A. niger (batatae Saito)</i>	+++	+++
17	CNTP 5018	R <sub>2</sub>	<i>A. batatae Saito</i>	++	++
18	CNTP 5019	758	<i>A. batatae Saito</i>	++	++
19	CNTP 5020	A <sub>1</sub>	<i>A. niger (batatae Saito)</i>	+++	+++
20	CNTP 5021	A <sub>2</sub>	<i>A. niger (batatae Saito)</i>	+++	+++
21	CNTP 5022	4-9	<i>A. niger (carbonavinus (Bainier) Thom)</i>	+++	+++
22	CNTP 5023	A <sub>52</sub>	<i>A. niger (cinamomeus n.comb)</i>	++	++
23	CNTP 5024	A <sub>20</sub>	<i>A. ficuum (Reich) Hennings</i>	++	++
24	CNTP 5025	13N	<i>A. flavus Link</i>	++	++
27	CNTP 5029	45A	<i>A. foetidus Nakazawa</i>	+++	+++
25	CNTP 5026	29B	<i>A. sojae</i>	+++	+++

TT	Ký hiệu	Ký hiệu cũ	Tên sơ bộ chủng giống	Trước BQ	Sau BQ
26	CNTP 5027	29A	<i>A. sojae</i>	+++	+++
28	CNTP 5032	599	<i>A. niger</i> var <i>tieghem</i>	+++	++
29	CNTP 5033	1920f	<i>A. niger</i> var <i>tieghem</i>	+++	++
30	CNTP 5034	770	<i>A. niger</i> var <i>tieghem</i>	++	++
31	CNTP 5037	1923f2	<i>A. niger</i> var <i>tieghem</i>	++	++
32	CNTP 5039	KC	<i>A. oryzae</i>	++	++
33	CNTP 5042	9-35	<i>A. oryzae</i>	++	++
34	CNTP 5043	Jo	<i>A. oryzae</i>	++	++
35	CNTP 5045	9-38 <sub>1</sub>	<i>A. paraciticus</i> Speare ( <i>oryzae</i> )	++	++
36	CNTP 5047	9-123	<i>A. paraciticus</i> Speare ( <i>flavus</i> )	++	++
37	CNTP 5048	T.5066	<i>A. sojae</i> Sakaguchi Yamada	++	++
38	CNTP 5049	0.4244	<i>A. sojae f.sp. flavoviridis</i> Ohmasa	++	++
39	CNTP 5052	NG-75	<i>A. niger</i> ( <i>japonicus</i> var <i>viridi flavus</i> )	++	++
40	CNTP 5053	A <sub>3</sub>	<i>A. niger</i>	++	++
41	CNTP 5055	SZKC	<i>A. niger</i>	++	++
42	CNTP 5079	A5	<i>A. niger</i> ( <i>ficuum</i> )	++	++
43	CNTP 5080	JC	<i>A. candidus</i> ( <i>flavus</i> Link)	++	++
44	CNTP 5081	F081	<i>A. oryzae</i>	+++	+++
45	CNTP 5082	ATQ	<i>A. oryzae</i>	+++	+++
46	CNTP 5083	9-38 <sub>2</sub>	<i>A. paraciticus</i> Speare	++	++
47	CNTP 5084	K <sub>2</sub>	<i>A. batate</i>	++	++
48	CNTP 5086	JCM 1863	<i>A. niger</i> var <i>intermedius</i>	+++	+++
49	CNTP 5087	JCM 1864	<i>A. niger</i> var <i>niger</i>	+++	+++
50	CNTP 5088	JCM 1865	<i>A. niger</i> var <i>niger fhennebergii</i>	+++	+++
51	CNTP 5089	JCM 1922	<i>A. niger</i> var <i>phoenicis</i>	+++	+++
52	CNTP 5090	JCM 1925	<i>A. niger</i> var <i>usami</i>	+++	+++
53	CNTP 5091	JCM 2261	<i>A. niger</i> var <i>awamori</i>	+++	+++
54	CNTP 5092	Wa-J	<i>A. awamori</i>	+++	+++
55	CNTP 5098	RB2	<i>Rhizopus</i>	+++	+++

#### 2.2.2.3. Bảo quản các chủng vi khuẩn

Trong năm 2008, chúng tôi tiếp tục bảo tồn những chủng giống chính thức của sưu tập, những chủng được chọn lọc từ năm trước và những chủng mới thu thập trong năm 2008. Ngoài các phương pháp bảo quản đã thực hiện trong những năm trước, 30 chủng chính thức trong Sưu tập giống đã được bảo quản bổ sung bằng phương pháp nitơ lỏng, 15 chủng được bảo quản bổ sung bằng phương pháp lạnh sâu và 15 chủng được bảo quản bổ sung bằng phương pháp đông khô.

**Bảng 13.** Danh sách các chủng bổ sung bảo quản theo phương pháp đông khô, lạnh sâu và nitơ lỏng năm 2008.

TT	Tên chủng	Ký hiệu	Phương pháp bảo quản bổ sung		
			đông khô	lạnh sâu	nitơ lỏng
1	<i>Bacillus subtilis</i>	CNTP 6001			+
2	<i>Bacillus subtilis</i>	CNTP 6006			+
3	<i>Bacillus subtilis</i>	CNTP 6008			+
4	<i>Bacillus subtilis</i>	CNTP 6013			+
5	<i>Bacillus subtilis</i>	CNTP 6015			+
6	<i>Bacillus megaterium</i>	CNTP 6019			+
7	<i>Bacillus mensentericus</i>	CNTP 6022			+
8	<i>Acetobacter aceti</i>	CNTP 6063			+
9	<i>Acetobacter aceti</i>	CNTP 6064			+
10	<i>Acetobacter aceti</i>	CNTP 6065			+
11	<i>Acetobacter aceti</i>	CNTP 6066			+
12	<i>Acetobacter xylinum</i>	CNTP 6067			+
13	<i>Acetobacter xylinum</i>	CNTP 6068			+
14	<i>Bacillus cereus</i>	CNTP 6089			+
15	<i>Bacillus subtilis</i>	CNTP 6087			+
16	<i>Lactobacillus</i>	CNTP 6500	+	+	+
17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNTP 6501	+	+	+
18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNTP 6502	+	+	+
19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNTP 6504	+	+	+
20	<i>Lactobacillus</i>	CNTP 6506	+	+	+
21	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNTP 6507	+	+	+
22	<i>Lactobacillus</i>	CNTP 6509	+	+	+
23	<i>Lactobacillus</i>	CNTP 6510	+	+	+
24	<i>Lactobacillus</i>	CNTP 6512	+	+	+
25	<i>Lactobacillus brevis</i>	CNTP 6503	+	+	+
26	<i>Lactobacillus</i>	CNTP 6513	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNTP 6508	+	+	+
28	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNTP 6505	+	+	+
29	<i>Lactobacillus</i>	CNTP 6511	+	+	+
30	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CNTP 6514	+	+	+

### 2.2.3. Đánh giá nguồn gen

#### 2.2.3.1. Khảo sát khả năng chịu muối của 15 chủng nấm men mới thu thập

Tất cả 10 chủng nấm men mới phân lập được và 5 chủng *Zygosaccharomyces* sẵn có trong sưu tập được lên men trong môi trường có nồng độ muối 12%, 14%, 16%. Tiến hành lên men trong 5 ngày. Đánh giá khả năng lên men của mỗi chủng dựa vào lượng CO<sub>2</sub> sinh ra và lượng đường tiêu thụ. Kết quả được trình bày trong bảng 14.

**Bảng 14.** Khả năng lên men của các chủng *Zygosaccharomyces* trong môi trường có nồng độ muối cao.

TT	Ký hiệu chủng	Tên khoa học	Nồng độ NaCl (%)	Lượng CO <sub>2</sub> tạo ra (g/l)	Lượng đường dư (g/l)
1	HBM23	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	12.0	13.81
			14	8.0	18.50
			16	4.0	29.06
2	HBM27	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	16.0	6.49
			14	8.0	22.28
			16	4.0	30.70
3	HBM28	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	0.0	33.49
			14	0.0	35.58
			16	0.0	36.73
4	HBM34	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	20.0	15.26
			14	20.0	18.45
			16	4.0	32.23
5	765	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	12.0	22.44
			14	8.0	33.01
			16	4.0	51.80
6	2.1	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	24.0	1.35
			14	20.0	1.82
			16	52.0	2.50
7	2.5	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	32.0	0.94
			14	24.0	1.23
			16	24.0	1.54
8	2.6	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	20.0	1.35
			14	24.0	1.60
			16	16.0	1.78
9	2.7	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	20.0	1.32
			14	24.0	1.76
			16	24.0	1.74
10	2.8	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	24.0	1.38
			14	24.0	0.85
			16	28.0	1.84
11	2.9	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	28.0	0.70
			14	28.0	0.95
			16	20.0	1.48
12	2.10	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	20.0	1.02
			14	20.0	1.29
			16	20.0	1.35
13	2.13	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	32.0	0.85
			14	24.0	0.86
			16	24.0	1.01
14	2.17	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	20.0	1.04
			14	20.0	1.82
			16	20.0	1.93
15	6.2	<i>Zygosaccharomyces</i>	12	16.0	24.00
			14	28.0	17.03
			16	20.0	19.63

Kết quả ở bảng 14 cho thấy, trong 15 chủng nấm men được kiểm tra, chỉ có duy nhất 1 chủng ký hiệu HBM28 không có khả năng lên men được trong môi trường có nồng độ muối cao, các chủng còn lại đều có thể lên men khá tốt trong môi trường chứa đến 16% NaCl.

Khả năng lên men tạo cồn của 10 chủng *Zygosaccharomyces* mới bổ sung và 4 chủng trong sưu tập được khảo sát. Thí nghiệm được thực hiện trong môi trường có nồng độ muối 12-16%, glucose 6%, cao nấm men 1%. Sau 5 ngày lên men, dịch thu được đem phân tích hàm lượng cồn. Kết quả được trình bày trong bảng 15.

**Bảng 15.** Khả năng tạo cồn của các chủng *Zygosaccharomyces* thu thập được.

TT	Ký hiệu chủng	Nồng độ NaCl (%)	Khả năng lên men	Nồng độ cồn, % (v/v)
1	HBM23	12	+	0.00
		14	+	0.00
		16	-	0.00
2	HBM27	12	+	0.72
		14	+	0.00
		16	-	0.00
3	HBM34	12	+	0.40
		14	+	0.00
		16	-	0.00
4	765	12	+	0.00
		14	+	0.00
		16	-	0.00
5	2.1	12	++	1.60
		14	++	1.50
		16	+	0.73
6	2.5	12	++	1.40
		14	++	1.70
		16	+	0.20
7	2.6	12	++	1.38
		14	++	0.83
		16	+	0.95
8	2.7	12	++	1.28
		14	++	1.28
		16	+	0.73
9	2.8	12	+++	1.80
		14	++	1.15
		16	++	1.05
10	2.9	12	++	1.50
		14	+	0.95
		16	-	0.40
11	2.10	12	++	1.80
		14	++	1.15
		16	+	0.95
12	2.13	12	+++	2.03
		14	++	1.15
		16	++	0.95



TT	Ký hiệu chủng	Nồng độ NaCl (%)	Khả năng lên men	Nồng độ cồn, % (v/v)
13	2.17	12	++	1.50
		14	++	1.15
		16	+	0.95
14	6.2	12	+	0.00
		14	+	0.00
		16	-	0.00

Kết quả cho thấy, trong số 14 chủng *Zygosaccharomyces* trên, chỉ có 3 chủng không có khả năng tạo cồn trong môi trường có nồng độ muối cao (12%). Riêng chủng *Zygosaccharomyces* ký hiệu 2.8 có khả năng lên men trong môi trường có nồng độ muối khá cao (16%) và hàm lượng cồn tạo thành đạt 1.05% v/v. Cần tiếp tục khảo sát thêm một số đặc tính của các chủng *Zygosaccharomyces* này.

#### 2.2.3.2. Đánh giá 12 chủng nấm men có trong bộ sưu tập giống của Viện CNTP

Khả năng tạo hương của 12 chủng nấm men có khả năng lên men trong môi trường pH thấp và nồng độ đường cao được khảo sát. Kết quả được trình bày trong bảng 16.

**Bảng 16.** Khả năng tạo hương của 12 chủng nấm men trong STG.

TT	Chủng	Thành phần hợp chất thơm (mg/ml)					
		Metanol	Acetaldehyt	Etanol	Acetone	n-propanol	Iso-butanol
1	<b>7012</b>	0.118	0.017	68.116	0.001	0.019	0.064
2	<b>7020</b>	0.127	0.029	103.74	0.001	0.098	0.094
3	<b>7039</b>	0.131	0.016	102.34	0.002	0.036	0.078
4	<b>7043</b>	0.076	0.02	57.08	0.014	0.025	0.031
5	<b>7052</b>	0.131	0.03	106.08	0.003	0.045	0.128
6	<b>7079</b>	0.178	0.014	97.44	0.002	0.036	0.104
7	<b>7098</b>	0.119	0.028	105,35	0.002	0.053	0.167
8	<b>Z323</b>	0,159	0.015	82.22	0.001	0.036	0.069
9	<b>CSZ</b>	0.171	0.026	78.48	0.001	0.028	0.044
10	<b>MC</b>	0.151	0.016	87.26	0.002	0.034	0.068
11	<b>K1</b>	0.188	0.018	101.55	0.001	0.048	0.096
12	<b>W27</b>	0.139	0.021	78.48	0.001	0.031	0.067

TT	Chủng	Thành phần hợp chất thơm (mg/ml)				
		Etylacetate	Iso- amylancol	Furfurol	Iso-amylacetate	Etylhexanonat
1	<b>7012</b>	0.031	0.229	0.003	0.003	0.003
2	<b>7020</b>	0.066	0.453	0.004	0.007	0.007
3	<b>7039</b>	0.063	0.348	0.007	0.008	0.007
4	<b>7043</b>	0.045	0.119	0.002	0.002	0.002
5	<b>7052</b>	0.103	0.482	0.016	0.059	0.061
6	<b>7079</b>	0.045	0.404	0.013	0.006	0.008

TT	Chủng	Thành phần hợp chất thơm (mg/ml)				
		Etylacetate	Iso- amylancol	Furfurol	Iso-amylacetate	Etylhexanonat
7	<b>7098</b>	0.078	0.599	0.013	0.033	0.039
8	<b>Z323</b>	0.056	0.243	0.002	0.004	0.003
9	<b>CSZ</b>	0.043	0.16	0.001	0.003	0.003
10	<b>MC</b>	0.048	0.307	0.022	0.011	0.015
11	<b>K1</b>	0.065	0.345	0.003	0.006	0.005
12	<b>W27</b>	0.045	0.236	0.0007	0.003	0.002

#### 2.2.3.3. Đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của một số chủng nấm men

Nhiều nghiên cứu cho rằng, đa số nấm men sinh trưởng phát triển tốt nhất ở điều kiện nhiệt độ tương đối thấp từ 22-25°C, và nhiệt độ tối ưu cho lên men ethanol thường dưới 25°C. Nhiệt độ càng cao khả năng sinh cồn của nấm men càng kém. Tuy nhiên trong quá trình sản xuất việc duy trì nhiệt độ thấp ở điều kiện nhiệt đới như Việt Nam là khá tốn kém. Ngoài ra, một số quy trình công nghệ đòi hỏi nhiệt độ cao trong quá trình lên men. Một trong những ví dụ là quy trình lên men và thủy phân đồng thời (SSF) thường được ứng dụng trong lên men các polysaccharide thiên nhiên. Trong quá trình đường hóa enzyme được dùng để thủy phân, chuyển hóa các cấu trúc polymer phức tạp thành đường đơn (glucose). Nhiệt độ tối thích được dùng để thủy phân bằng enzyme thường cao (khoảng 50°C). Trong trường hợp này các chủng nấm men có khả năng lên men ở nhiệt độ cao có thể được sử dụng. Những chủng nấm men từ Sưu tập giống Viện Công nghiệp Thực phẩm được thử nghiệm phần lớn là nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau. Một số chủng nấm men được biết là có khả năng phát triển ở nhiệt độ cao như *Kluyveromyces marxianus* và một số chủng phân lập từ thiên nhiên cũng được sử dụng để so sánh.

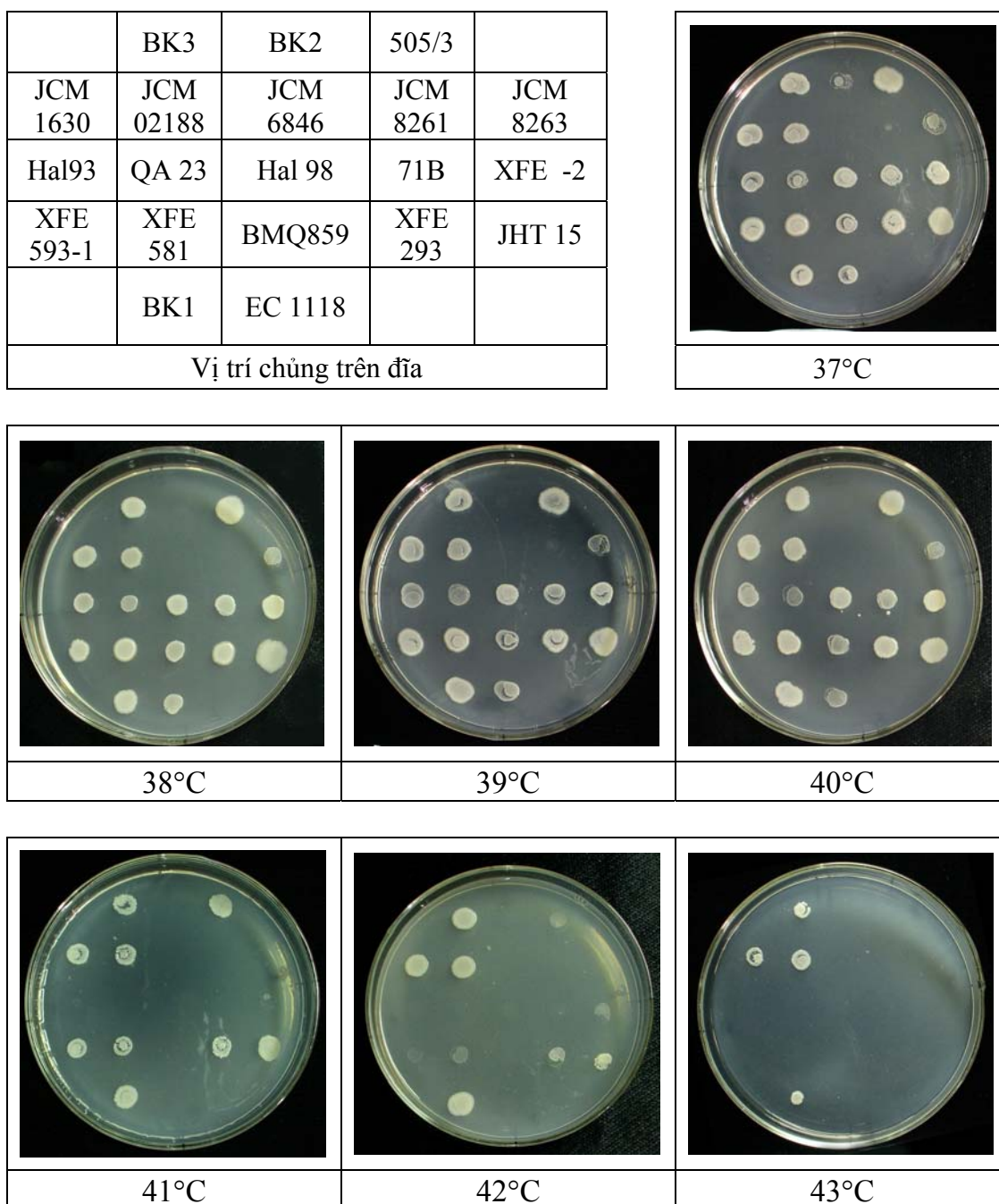
**Bảng 17.** Danh sách các chủng đã lựa chọn trong nghiên cứu đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của nấm men.

TT	Chủng	Tên loài	Ghi chú
1	BK3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Phân lập từ kefir
2	BK2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Phân lập từ kefir
3	505/3	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Nhận từ CLIB
4	JCM 1630	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Nhận từ JCM
5	JCM 02188	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Nhận từ JCM
6	JCM 6846	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	Nhận từ JCM
7	JCM 8261	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	Nhận từ JCM
8	JCM 8263	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	Nhận từ JCM
9	Hal 93	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Phân lập từ bánh men
10	QA23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
11	Hal 98	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Phân lập từ bánh men.
12	71B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)

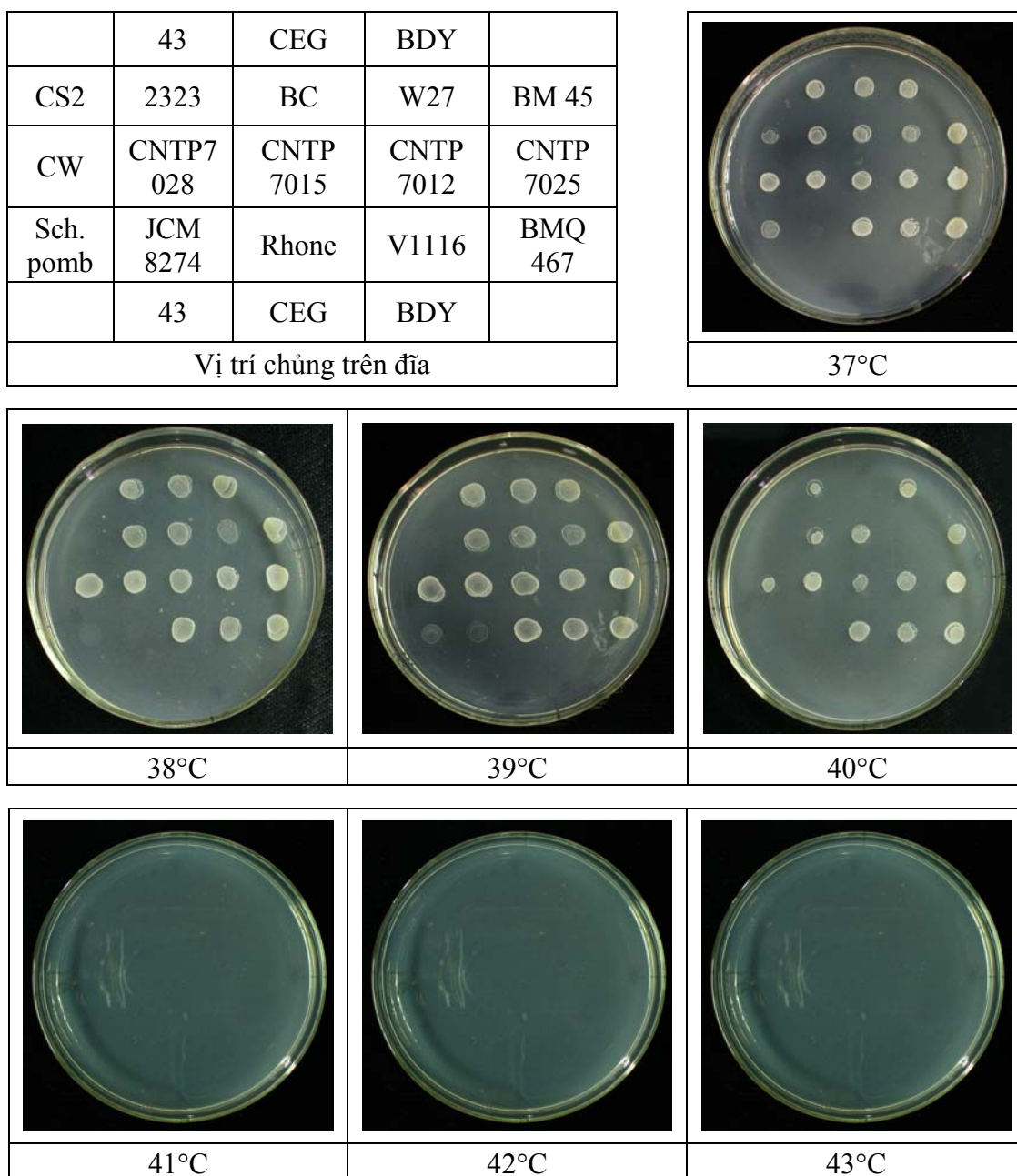
TT	Chủng	Tên loài	Ghi chú
13	XFE- 2	<i>Candida tropicalis</i>	Phân lập từ thiên nhiên
14	XFE 593-1	<i>Candida tropicalis</i>	Phân lập từ thiên nhiên
15	XFE 581	<i>Candida tropicalis</i>	Phân lập từ thiên nhiên
16	BMQ 859	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Phân lập từ bánh men
17	XFE 293	<i>Candida tropicalis</i>	Phân lập từ thiên nhiên
18	JHT 15	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Phân lập từ thiên nhiên
19	BK1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Phân lập từ kefir
20	EC 1118	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
21	43	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
22	CEG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
23	BDY	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
24	CS2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
25	2323	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
26	BC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
27	W27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
28	BM45	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
29	CW	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
30	CNTP 7028	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chủng sản xuất
31	CNTP 7015	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chủng sản xuất
32	CNTP 7012	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chủng sản xuất
33	CNTP 7025	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chủng sản xuất
34	Sch. pombe	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Nhận từ GBF
35	JCM 8274	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Nhận từ JCM
36	Rhone	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Men rượu vang (JICA)
37	V1116	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Men rượu vang (JICA)
38	BMQ 467	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	Phân lập từ bánh men

### Khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men

Từ 38 chủng nấm men đã chọn lọc trong sưu tập, nuôi cấy theo phương pháp đĩa đánh dấu. Hình 2, 3 và bảng 18 cho thấy rằng ở nhiệt độ 37°C hầu hết các chủng đều mọc chỉ có các chủng JCM 6846 và JCM 8274 là không mọc. Nuôi cấy ở nhiệt độ 38°C, 39°C có 32 chủng mọc và 6 chủng không mọc là BK2, JCM 6848, JCM 8262, CS2, *Sch. pombe*, JCM 8274. Nuôi cấy ở nhiệt độ 40°C có 31 chủng mọc và 7 chủng không mọc là BK2, JCM 6848, JCM 8262, CS2, *Sch. pombe*, JCM 8274, CEG. Nuôi cấy ở nhiệt độ 41°C có 10 chủng mọc và 18 chủng không mọc. Nhiệt độ 42°C có 8 chủng mọc và 30 chủng không mọc. Nuôi cấy ở nhiệt độ 43 °C chỉ có 4 chủng mọc và 34 chủng không mọc. Như vậy nhiệt độ càng cao khả năng mọc của các chủng nấm men càng yếu.



**Hình 2.** Nghiên cứu khả năng mọc của các chủng nấm men ở nhiệt độ cao từ 37° C đến 43°C theo phương pháp đánh dấu đĩa.



**Hình 3.** Nghiên cứu khả năng mọc của các chủng nấm men ở nhiệt độ cao từ 37° C đến 43°C theo phương pháp đánh dấu đĩa.

**Bảng 18.** kết quả nghiên cứu khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm men.

TT	Chủng	Tên loài	Nhiệt độ (°C)						
			37	38	39	40	41	42	43
1	BK3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	+	+	+	+	+
2	BK2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	-	-	-	-
3	505/3	<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	+	+	+	+	+	-
4	JCM 1630	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	+	+	+	+	+
5	JCM 02188	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	+	+	+	+	+
6	JCM 6846	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-
7	JCM 8261	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	+	-	-	-	-	-	-
8	JCM 8263	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	+	+	+	+	-	-	-
9	Hal 93	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
10	QA23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
11	Hal 98	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
12	71B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
13	XFE- 2	<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	-	-	-
14	XFE 593-1	<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	-	-
15	XFE 581	<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	-
16	BMQ 859	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
17	XFE 293	<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	-
18	JHT 15	<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	+	+	+	+	+	-
19	BK1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	+	+	+	+	+
20	EC 1118	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	+	-	-
21	43	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
22	CEG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	-	-	-	-
23	BDY	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
24	CS2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	-	-	-	-	-	-
25	2323	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
26	BC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
27	W27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	-	-	-	-
28	BM45	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
29	CW	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
30	CNTP 7028	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-	-
31	CNTP 7015	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-	-
32	CNTP 7012	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-	-
33	CNTP 7025	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-	-
34	Sch. pombe	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	-	-	-	-	-	-
35	JCM 8274	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	-	-	-	-	-
36	Rhone	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-
37	V1116	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-	-
38	BMQ 467	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (?)	+	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: “+” dương tính (mọc), “-” âm tính (không mọc)

**Khả năng lên men tạo cồn của các chủng giống ở nhiệt độ cao**

Kết quả ở bảng 19 cho thấy lên men ở nhiệt độ càng cao độ cồn càng thấp và lượng đường sót trong dịch tăng. Ở nhiệt độ 42°C trong số các chủng nghiên cứu, chủng lên men cao nhất là chủng JCM 1630 và JCM 02188 có khả năng lên men cồn được 1.8 % cồn. Ở nhiệt độ 41°C chủng có khả năng lên men cao nhất là các chủng JCM 1630 được 2.4% cồn và chủng BK 1 được 2.3 % cồn. Ở nhiệt độ 40°C các chủng có khả năng lên

men cao là chủng BMQ 467 đạt 6.0 % cồn, chủng Hal 93 đạt 5.9 % alcohol, chủng CNTP 7028 đạt 5.4 % cồn. Ở nhiệt độ 39°C chủng có khả năng lên men cao nhất là Hal 93 đạt 6.4%, chủng BMQ 467 đạt 6.2%, chủng CNTP 7028 đạt 6.0% cồn. Ở nhiệt độ 38°C chủng có khả năng lên men cao là Hal 93 đạt 8.8 % cồn, chủng BMQ 467 đạt 8.7% cồn, chủng Hal 98 đạt 8.2% cồn. Như vậy các chủng Hal 93, BMQ 467 và Hal 98 có khả năng lên men đạt độ cồn cao từ 5.9 đến 8.8 % độ cồn ở các nhiệt độ cao 38°C đến 40°C.

**Bảng 19.** Nồng độ cồn và nồng độ chất khô sau khi lên men ở nhiệt độ cao.

TT	Ký hiệu	Nồng độ cồn và Bx ở các nhiệt độ khác nhau									
		38°C		39°C		40°C		41°C		42°C	
		Cồn	Bx	Cồn	Bx	Cồn	Bx	Cồn	Bx	Cồn	Bx
1	BK3	4.8	13.5	3.6	16	3.5	16	1.2	17	1.2	16.5
2	BK2	-		-		-		-	-	-	-
3	505/3	3.4	15	3.3	15.5	2.3	15.5	1.1	17	1.1	16.5
4	JCM 1630	5.3	12.4	5.1	12.5	4.0	14	2.4	15.5	1.8	15.5
5	JCM 02188	3.8	14.4	4.2	14.5	3.8	14	1.8	16	1.8	16
6	JCM 6846	-		-		-		-	-	-	-
7	JCM 8261	-		-		-		-	-	-	-
8	JCM 8263	2.3	15	2.7	16	2.7	16	-	-	-	-
9	Hal 93	8.8	10	6.4	12.5	5.9	12.5	-	-	-	-
10	QA23	4.5	13.8	2.9	16.5	2.6	16	-	-	-	-
11	Hal 98	8.2	10.2	5.9	11	3.4	14.5	-	-	-	-
12	71B	6.8	10	6.2	11	3.3	14	-	-	-	-
13	XFE- 2	3.6	14.8	1.6	16.5	0.5	17	-	-	-	-
14	XFE 593-1	2.4	15.9	2.1	15.1	1.1	17	0	18	-	-
15	XFE 581	2.5	15.6	3.7	14.5	1	16.5	0	18	0	18
16	BMQ 859			5.6	13	3.8	14	-	-	-	-
17	XFE 293	2.0	16.3	2.0	16.5	1.7	16	0.4	18	0.2	18
18	JHT 15	3.4	15.2			1.8	16	0.9	18	0.9	18
19	BK1	6.4	12.2	5.7	12.5	4.4	13.5	2.3	16	1.5	16
20	EC 1118	4.7	13.4	3.9	14	0.7	17	1.1	17	-	-
21	43	3.2	15.4	3.2	15.5	2.7	15	-	-	-	-
22	CEG	4.2	14.5	1.2	16	-		-	-	-	-
23	BDY	6.6	11.6	4.0	13	4.1	14.5	-	-	-	-
24	CS2	-		-		-	-	-	-	-	-
25	2323	3.8	14.6	4.6	11	4.6	14	-	-	-	-
26	BC	6.4	12	2.5	16	1.8	15	-	-	-	-
27	W27	4.1	14.2	2.9	17	-		-	-	-	-
28	BM45	5.6	12.4	2.7	16	2.2	16	-	-	-	-
29	CW	5.3	12.2	4.5	14.5	4.7	13	-	-	-	-
30	CNTP 7028	5.5	13	6.0	12.5	5.4	12	-	-	-	-
31	CNTP 7015	4.2	14.4	2.6	16	1.8	16	-	-	-	-
32	CNTP 7012	5.3	12.6	2.7	16	2.3	16	-	-	-	-
33	CNTP 7025	3.8	13.2	4.1	15	2.0	16	-	-	-	-
34	Sch. pomb	-		-		-		-	-	-	-
35	JCM 8274							-	-	-	-
36	Rhone	4.5	12.8	2.7	16	2.6	17	-	-	-	-
37	V1116	6.8	12	4.2	14.5	4.8	15	-	-	-	-
38	BMQ 467	8.7	9.9	6.2	12.5	6.0	12	-	-	-	-

Như vậy, từ 38 chủng giống nấm men trong sưu tập giống của Viện Công nghiệp Thực phẩm chúng tôi đã lựa chọn được 3 chủng Hal 93, BMQ 467 và Hal 98 có khả năng lên men ở nhiệt độ cao từ 38- 40°C đạt độ cồn từ 5.8 đến 8.8. Nhưng chủng này có tiềm năng rất lớn trong ứng dụng lên men ở nhiệt độ cao.

#### 2.2.3.4. *Đánh giá khả năng sinh cellulase của các chủng nấm mốc*

Các chủng nấm mốc chúng tôi phân lập được trên môi trường đặc hiệu đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase nhưng dưới các mức độ khác nhau. Ngay cả những chủng cùng giống, cùng loài cũng có thể rất khác nhau về lượng enzyme do chúng sản sinh ra. Vì vậy việc tuyển chọn vi sinh vật tạo enzyme cần phải luôn luôn kết hợp chặt chẽ với sự kiểm tra hoạt lực enzyme để tìm ra những chủng có khả năng sinh tổng hợp enzyme cao nhất.

Chúng tôi đã kiểm tra khả năng sinh cellulase của các chủng nấm mốc mới phân lập được sơ bộ bằng phương pháp đục lỗ trên đĩa thạch. Dựa vào vòng thủy phân chúng tôi chọn chủng đem phân tích hoạt lực enzyme bằng phân tích đường khử tạo ra sau phản ứng của enzyme với CMC theo phương pháp Somogy - Nelson.

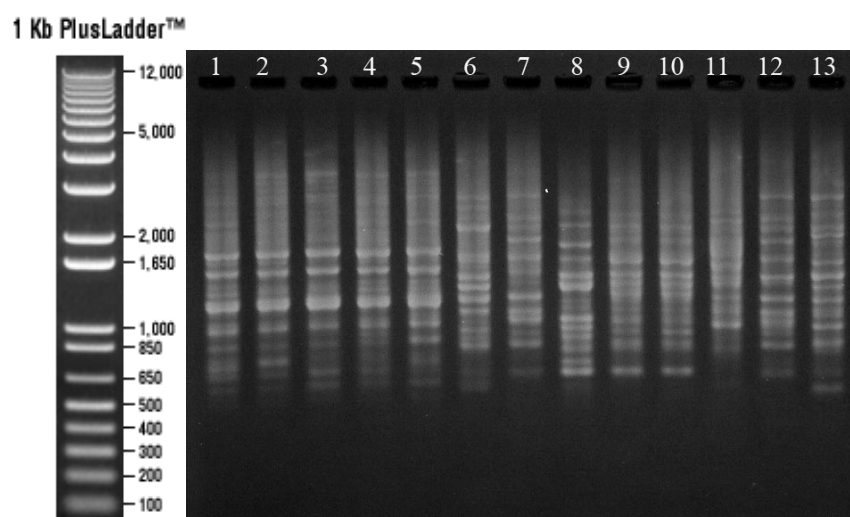
**Bảng 20.** Hoạt lực enzyme của các chủng nấm mốc.

TT	Kí hiệu	IU	TT	Kí hiệu	IU
1	FEC35	19.73	25	FEC245	14.65
2	FEC37	18.88	26	FEC246	16.98
3	FEC53	18.61	27	FEC248	10.91
4	FEC57	17.83	28	FEC252	18.88
5	FEC74	23.29	29	FEC258	8.43
6	FEC93	10.79	30	FEC263	19.97
7	FEC94	22.67	31	FEC264	16.65
8	FEC98	16.40	32	FEC269	5.14
9	FEC110	17.18	33	FEC274	13.54
10	FEC114	20.77	34	FEC278	17.34
11	FEC125	20.86	35	FEC289	9.38
12	FEC128	13.55	36	FEC297	19.73
13	FEC130	28.05	37	FEC300	7.94
14	FEC147	9.77	38	FEC324	18.84
15	FEC152	14.86	39	FEC340	8.42
16	FEC156	13.87	40	FEC342	19.03
17	FEC158	7.24	41	FEC361	14.29
18	FEC168	11.20	42	FEC378	20.02
19	FEC178	12.69	43	FEC383	6.64
20	FEC179	15.96	44	FEC385	16.83
21	FEC189	14.02	45	FEC392	10.76
22	FEC209	6.14	46	FEC393	13.57
23	FEC225	14.62	47	FEC407	23.87
24	FEC228	18.65	48	Đối chứng	0

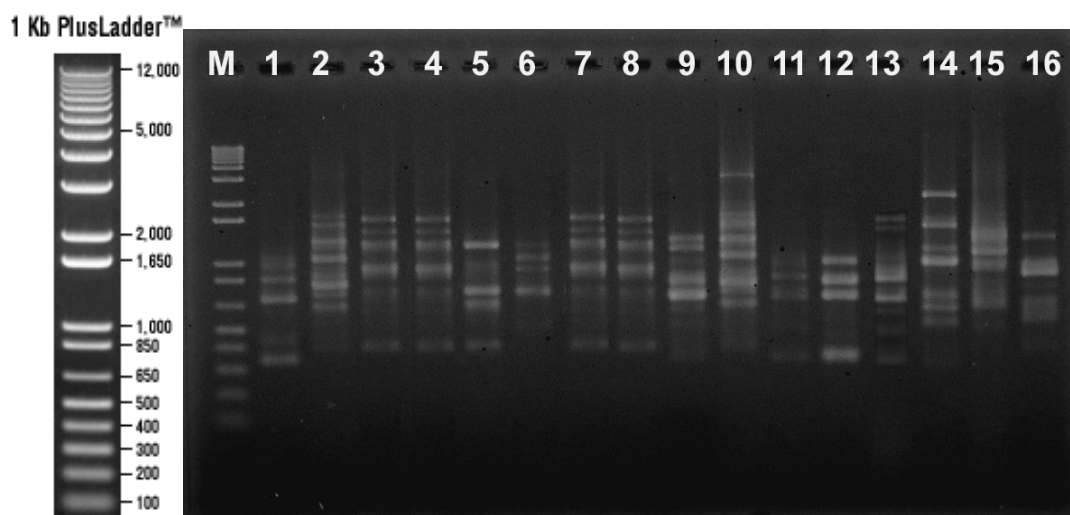


Chúng tôi nhận thấy rằng các chủng phân lập được đều có khả năng sinh cellulase, có một số chủng có khả năng sinh cellulase khá cao có thể tiếp tục ứng dụng được trong các nghiên cứu về sinh tổng hợp và ứng dụng cellulase

Các chủng nấm mốc có khả năng sinh cellulase cao được phân nhóm bằng PCR fingerprinting sử dụng mồi MST1.



**Hình 4.** Phổ fingerprinting của các chủng nấm mốc sử dụng mồi MST1. 1: FEC 93; 2: FEC179; 3: FEC128; 4: FEC248; 5: FEC 385; 6: FEC383; 7: FEC274; 8: FEC158; 9: FEC74; 10: FEC110; 11: FEC156; 12: FEC258; 13: FEC147.



**Hình 5.** Phổ fingerprinting của các chủng nấm mốc sử dụng mồi MST1. Kí hiệu: 1- FEC53; 2 - FEC93; 3 - FEC57; 4 - FEC110; 5 - FEC98; 6 - FEC102; 7 - FEC74; 8 - FEC94; 9 - FEC105; 10 - FEC128; 11 - FEC95; 12 - FEC114; 13 - FEC130; 14 - FEC147; 15 - FEC156; 16 - FEC158.

Dựa trên phổ PCR fingerprinting những chủng nấm mốc chọn lọc có thể được phân thành các nhóm sau:

**Bảng 21.** Phân nhóm dựa trên phổ PCR fingerprinting.

Nhóm	Các chủng trong nhóm
1	FEC93, FEC179, FEC128, FEC248 và FEC 385
2	FEC383, FEC147
3	FEC 274
4	FEC158
5	FEC74, FEC110, FEC 57, FEC 94
6	FEC156
7	FEC258
8	FEC 53
9	FEC 93
10	FEC 98
11	FEC 102
12	FEC 105
13	FEC 128
14	FEC 95
15	FEC 114
16	FEC 130
17	FEC 147
18	FEC 156
19	FEC 158

Từ các nhóm chúng tôi chọn 05 chủng và 01 chủng từ Suu tập giống để phân loại tới loài bằng giải trình tự vùng D1/D2. Kết quả phân loại định tên như sau:

>FEC98 - VT399 EU867292 *Aspergillus tubingensis* (991/991); EF661191.1 *Aspergillus niger* (991/991)

ACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCC  
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT  
TGGGTCGCGGTCCTCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGG  
GGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGA  
TCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAAC  
GGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGAGTCCGCATTGTAATTTGCAGAGGATGCTT  
TGGGTGCGGCCCCCGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCGCTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGGGTGTCCG  
TGCCCGTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAG  
CTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAA  
CAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCCCGCGGGTTTCAGCCGGCATTCGTGCCGGTG  
TACTTCCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTGGAATGTAGTACCTCCGGGGTAC  
CTTATAGCCAGGGGTGCAATGCGGCCAGCTTGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCTGCATAGCGAATGG

>FEC110 - VT401 EU867248 *Aspergillus tubingensis* 1011/1011 (100%), EF661191 *Aspergillus niger* 1011/1011 (100%),

AGCGCGTTCTCGGTCCAGGCTGGCCGCATTGCACCCCTGGCTATAAGGTACCCCGGAGGGTACTACATTCCAGGGG  
CCTTTGACCGGCCGCCCAAACCGACGCTGGCCCGCCACGGGGAAGTACACCGGCACGAATGCCGGCTGAACCCCGC  
GGGCGAGTCTGGTCGAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACAGTGCTGTTTAACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCAT  
CTTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGGCCAGTATTTAGCTTTAGATGAAATTTACCACCCATTTAGA  
GCTGCATTCCCAAACAACCTGACTCGTCAAGGAGCTTTACACGGGCACGGACACCCCGCCCAAGACGGGATTCTCA  
CCCTCTCTGACGGCCCGTTCAGGGCACTTAGACGGGGGCCGACCCAAAGCATCCTCTGCAAATTTACAATGCGGAC  
TCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTT  
TTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTACAGCGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAATGGTTGG  
AAAACGTCCGCAGGCGCCGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCC

GCCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAAT  
GACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACCTGAATTC  
TGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTT  
TAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCAGGGC  
CCGGGGGGCA

>FEC158 - VT402 FJ430784 *Trichoderma koningiopsis* 982/1001 (98%), EF417482  
*Trichoderma atroviride* 983/1003 (98%)

TTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTATTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGG  
ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT  
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTGTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAAC  
CCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCTAATAACAGTGGCGGTCTCGCCG  
CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTT  
CTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAA  
CAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCCTCCGGGTCCGAGTTGT  
AATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCGCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGT  
CTGGCTGGCCACCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGGGAGGTA  
TATGCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTG  
AAAAGAGGGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCG  
GGGTTCTCTCCGGTGCACTTCGCCGCGTTCAGGCCAGCATCAGTTTCGTGCGGGGGGAAAAGGCTTCGGGAACGTGG  
CTCCTCCGGGAGTGTTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGC

>FEC258 - VT403 AB027384 *Hypocrea lutea* 944/975 (96.8%), FJ430784 *Trichoderma*  
*koningiopsis* 921/949 (97%), AF510497 *Hypocrea jecorina* 941/976 (96.4%)

TTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG  
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG  
CCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTGTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGG  
GATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGCGCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTT  
TGACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGG  
TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGA  
GTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGTCCCTAGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTG  
GGTGCCGCCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGTGAGAGCCCGTCTGGCTGGCCGCCGAGCCTCTGTAA  
AGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGGGAGGTATATGCTTCTAAAGCTAAATATTGG  
CCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAGAGAGGGTTAAATAGTACGTGA  
ATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCGGGGTTCTCTCCGGTGCACTTCGCCG  
CGTCTAGGCCAGCATCAGTTTCGTGCGGGGGGAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAGTGTTATAGCCCGT  
TGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTG

>FEC383 - VT404 AB027384 *Hypocrea lutea* 939/974 (96%), FJ430784 *Trichoderma*  
*koningiopsis* 912/947 (96%)

TTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG  
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG  
CCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTGTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGG  
GATCGGCCCTGCCTTTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGT  
TTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG  
GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCG  
AGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGTCCCTAGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTG  
AGGTGCCGCCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTCTGGCTGGCCGCCGAGCCTCTGTAA  
AAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGGGAGGTATATGCTTCTAAAGCTAAATATTG  
GCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAGAGAGGGTTAAATAGTACGTGA  
AATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCGGGGTTCTCTCCGGTGCACTTCGCC  
GCGTCTAGGCCAGCATCAGTTTCGTGCGGGGGGAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAGTGTTATAGCCCG  
TTGCATAATACCCTGCGGKG-ACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGC

>CNTP 5098 - VT395 *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* 574/574 (100%)

AAAATATTCCAGCCAACCTCGCCAAATAGCATTCGCTGCGTACCTCAATCCAGCCCAAGGTATTTTCTAAGGGACTA  
TAACACCCACGAATGGGCCACATTTCCCTAGTTTTTTCCCTCAAGCCAAATTTGTCGTTGGCAGGCATAGCCTGCAA  
GTGCATCCAAGCCGAAACTTAGACTGATTACAGACAAGCCAGTCTGGCTCCAAACGGTTCCCTTTTAAACAATTTTAC  
ATACTGTTTAACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTTTCTCGCCAAT

ATTTAGCTTTAGGTGAGATTTACCAACCAATTTAGGCTGCATTCACCAACCAACCTGACTCTTTGAAAGTGTATCGCA  
AAAGGCAAATGCTCAGACCGAAGACGGGATTCACCTCTATGATGCCCTGTTCCAAAGGACTTATCGGTCCGGCT  
TGCCTGGAAAACACTTCTACAGTTTACAATCCGGTTTAGCTAGGCCAAACAGGTTCCAACCTTTGAGCTTTTCTCTGT  
TCACTCGCCGTTACTAGGGAAATCATTGTTATTTCTTTCTCTCCGCTTATTGATATG

### 2.2.3.5. Đánh giá một số chủng vi khuẩn *Bacillus*

Đánh giá nguồn gen của một số chủng vi khuẩn *Bacillus* theo các đặc điểm sau:

- Khả năng sinh catalase
- Khả năng oxi hoá các nguồn cacbon khác nhau
- Khả năng lên men các nguồn cacbon khác nhau
- Khả năng sinh lecithinase (phản ứng Egg Yolk – EY)
- Thử nghiệm Voges – Proskauer (VP)
- Nhuộm Gram
- Đặc điểm bào tử tạo thành

Kết quả được thể hiện ở bảng 3, 4, và 5.

**Bảng 22.** Đặc điểm bào tử tạo thành của các chủng *Bacillus* nghiên cứu

STT	Tên	Ký hiệu	Đặc điểm bào tử tạo thành
1	<i>Bacillus</i> sp.	LEE	Bào tử lớn nằm ở 1 đầu của tế bào
2	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA 2	Bào tử nhỏ nằm ở 1 đầu của tế bào
3	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA3	Bào tử nhỏ nằm ở 1 đầu của tế bào
4	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA 4	Bào tử nhỏ nằm ở 1 đầu của tế bào
5	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA 6	Bào tử nhỏ nằm ở 1 đầu của tế bào
6	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ1	Bào tử dài, nhỏ, nằm ở 1 đầu của tế bào
7	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ2	Bào tử dài, nhỏ, nằm ở 1 đầu của tế bào
8	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ3	Bào tử dài, nhỏ, nằm ở 1 đầu của tế bào
9	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ5	Bào tử dài, nhỏ, nằm ở 1 đầu của tế bào
10	<i>Bacillus</i> sp.	PP	Bào tử dài, nhỏ nằm ở 1 đầu của tế bào

**Bảng 23.** Một vài đặc điểm sinh lý sinh hoá của các chủng *Bacillus* nghiên cứu.

STT	Tên	Ký hiệu	Gram	Catalase	EY	VP
1	<i>Bacillus</i> sp.	LEE	+	+	-	-
2	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA 2	+	+	-	-
3	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA3	+	+	-	-
4	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA 4	+	+	-	+
5	<i>Bacillus</i> sp.	NOVA 6	+	+	-	+
6	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ1	+	+	-	+
7	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ2	+	+	-	+
8	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ3	+	+	-	+
9	<i>Bacillus</i> sp.	BMZ5	+	+	-	+
10	<i>Bacillus</i> sp.	PP	+	+	-	-

**Bảng 24.** Xác định khả năng lên men hoặc oxi hoá các nguồn cacbon khác nhau của các chủng *Bacillus* nghiên cứu

Chủng	O/F	Rib	Mal	Gal	Mse	Tre	Sor	Raf	Na-glu
LEE	F	+	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+
	O	+	+	+/-	+	+	-	-	-
NOVA 2	F	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
	O	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-
NOVA3	F	+	+	+/-	+/-	+	+	-	-
	O	-	-	+	-	-	-	-	-
NOVA 4	F	-	-	+/-	+	-	-	-	-
	O	-	-	+/-	+	-	-	-	-
NOVA 6	F	+	+-	+/-	+	+	+	+/-	+/-
	O	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+/-
BMZ1	F	+	+	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-
	O	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-
BMZ2	F	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-
	O	-	-	+/-	+	-	-	-	-
BMZ3	F	-	+	+	+	+	+/-	+-	-
	O	-	+	+/-	+	+	-	+/-	+/-
BMZ5	F	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
	O	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-
PP	F	+	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-
	O	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-

Chủng	O/F	Lac	Sac	Ara	Fru	Xyl	Man	Rha	Glu
LEE	F	-	-	-	+	-	+	+/-	+
	O	-	-	-	+	+/-	+	-	+
NOVA 2	F	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+
	O	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+
NOVA3	F	-	-	-	+	-	+/-	-	+
	O	-	-	-	+	-	-	-	+
NOVA 4	F	-	+/-	-	+	-	-	-	+
	O	-	-	-	+/-	-	-	-	+
NOVA 6	F	-	+-	+/-	+	+	+	+/-	+
	O	-	-	-	+	+	+	+/-	+
BMZ1	F	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+
	O	+/-	-	-	-	-	-	-	+
BMZ2	F	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	O	-	-	-	+	-	-	-	+
BMZ3	F	-	+	+	+	-	+	+	+
	O	-	+	+	+	+	+	+/-	+
BMZ5	F	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+
	O	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+
PP	F	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+
	O	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+

Ký hiệu: O: oxi hoá, F: lên men, +: lên men/oxi hoá tốt, -: không lên men/ không oxi hoá, +/-: lên men/oxi hoá khá, Glu: glucose, Raf: Raffinose, Rib: Ribose, Na-glu: Natri gluconate, Fru: Fructose, Ara: Arabinose, D-Xyl: D-Xylose, Man: Mannitol, Rha: Rhamnose, Mse: Mannose, Lac: Lactose, Suc: Sucrose, Mal: Maltose, Tre: Trehalose, Gal: Galactose, Sor: Sorbitol.

#### 2.2.3.6. *Đánh giá đa dạng vi sinh vật trong bánh men rượu bằng phương pháp DGGE*

Sự tồn tại của các vi sinh vật trong bánh men truyền thống là kết quả của một quá trình chọn lọc lâu dài và mỗi loại bánh men được xem như là một phần bí quyết gia truyền của nghề sản xuất rượu gạo Việt Nam. Bánh men là nguồn vi sinh vật đa dạng, có thể sử dụng chúng để phân lập và lựa chọn các chủng hữu ích ứng dụng trong các ngành công nghiệp thực phẩm. Điển hình, *Saccharomyces cerevisiae* và *Amylomyces rouxii* đã được sử dụng như những thành phần chính trong bánh men dùng để sản xuất rượu chất lượng cao (Dung, 2004; Dung et al., 2005). Trong thập kỷ qua, những thành công trong sản xuất cồn công nghiệp cũng như quá trình sản xuất bánh men trên quy mô bán công nghiệp đã có tác động rất lớn đến sự đa dạng của sản xuất rượu truyền thống. Hệ quả tất yếu là bắt đầu có sự phân hoá và thất thoát dần đa dạng sinh học trong bánh men. Để góp phần khắc phục và bảo tồn tính đa dạng sinh học của bánh men truyền thống, một ngân hàng lưu trữ giống khởi động được thiết lập. Ngân hàng này bao gồm các loại bánh men khác nhau được thu thập từ các vùng trong cả nước và bảo quản dưới dạng đông khô.

Hiện tại chưa có tài liệu nào nói về các thành phần vi sinh vật không thể nuôi cấy có mặt trong bánh men. Việc làm sáng tỏ bức tranh toàn cảnh về sự đa dạng sinh học trong một loại bánh men nào đó là rất khó khăn, nó đòi hỏi người nghiên cứu phải thông thạo một mảng rộng bao gồm cả nấm men, nấm sợi và vi khuẩn. Công việc này liên quan đến quá trình phân lập và xác định lượng lớn các chủng và đòi hỏi hàng loạt các môi trường phân lập khác nhau. Chính vì lý do trên, trong hầu hết các nghiên cứu về mức độ đa dạng sinh học của bánh men truyền thống, việc đánh giá các chủng vi sinh vật phụ thuộc rất lớn vào kỹ thuật phân lập. Để khắc phục hạn chế này, chúng tôi tiến hành xác định độ đa dạng sinh học của bánh men truyền thống dựa vào phương pháp DGGE, đây là phương pháp cho phép phát hiện lượng lớn vi sinh vật mà không cần đến quá trình nuôi cấy.

#### *Bộ sưu tập bánh men*

Tổng số 116 mẫu bánh men thu thập, các mẫu này được lấy từ khắp các vùng trên cả nước, nhưng đa số trong đó có nguồn gốc từ các tỉnh vùng đồng bằng sông Hồng và lưu vực sông Mekong. Qua việc thu thập mẫu cho thấy sự giao lưu và trao đổi buôn bán bánh men giữa các vùng đã diễn ra một thời gian dài. Rất nhiều trường hợp bánh men được tạo ra từ các loại bánh men khác, việc này dẫn đến tình trạng các loại bánh men mất đi tính đặc trưng và đồng thời độ đa dạng của sản phẩm cũng bị giảm dần. Trong số 116 mẫu bánh men, chỉ có 45 mẫu được sản xuất tại vị trí thu thập mẫu, số bánh men còn lại không phải bánh men bản địa. Về đặc điểm và quy mô sản xuất, có 4 mẫu bánh men được tạo ra bởi những người vùng dân tộc thiểu số men lá, 10 bánh men đã được sản xuất trong các nhà máy nhỏ, 8 mẫu dạng bột và đặc biệt có 4 mẫu có nguồn gốc từ Trung Quốc, 4 mẫu chuyên dụng trong sản xuất rượu nếp.

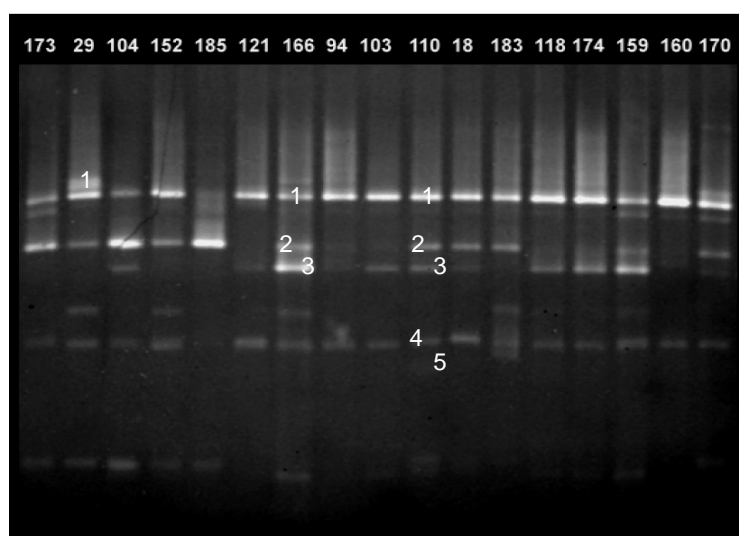
Một trong những nhiệm vụ quan trọng là bảo tồn sự đa dạng nguồn gene các vi sinh vật trong bánh men truyền thống. Để làm được điều này, cách thông thường là phân lập các chủng vi sinh vật và bảo quản các chủng trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên đối với mẫu có độ đa dạng sinh học cao như bánh men, để phân lập toàn bộ hệ vi sinh là rất khó. Một trở ngại nữa là chúng ta khó có thể tái tạo bánh men từ các chủng riêng rẽ. Tính bền vững của mỗi loại bánh men phụ thuộc lớn vào quan hệ cộng sinh giữa các loài. Điều đó được chi phối bởi tỉ lệ các loài cũng như thành phần vô cơ đặc trưng cho mỗi quần xã vi sinh vật. Cho đến nay, việc tái sản xuất một số loại men truyền thống từ các loài vi sinh đã được chứng minh là không thể, ví dụ như hệ thống giống khởi động dùng trong lên men kefir (Lopitz-Otsoa et al., 2006). Chính vì lý do này, chúng tôi quyết định chọn một hướng khác nhằm bảo tồn toàn bộ quần thể vi sinh vật có trong bánh men thông qua kỹ thuật đông khô. Kỹ thuật này có thể bảo quản các chủng khởi động trong bánh men từ 20 đến 30 năm. Kết quả nghiên cứu cho thấy quá trình đông khô không ảnh hưởng đến lượng vi sinh vật tổng số trong bánh men.

#### *Phân tích DGGE*

Thành phần cấu trúc các loài nấm và vi khuẩn được đánh giá trên cơ sở các môi DGGE hoàn toàn khác nhau. Dựa trên mức độ phân hoá cao và một tập hợp lượng lớn gene trên GeneBank, đầu 3' của DNA ribosome 16S và vùng D2 của LSU được sử dụng. Đối với trường hợp của nấm, cặp môi NL3A - NL4GC có thể dùng trong phân biệt các loài có sự khác biệt từ 4 nucleotide trở lên. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các đoạn dài hơn (320 bp với nấm và 470 bp với vi khuẩn) so với một số tác giả khác (Haruta et al., 2006; Yoshida et al., 2005). Điều này làm tăng tính chính xác trong quá trình phân loại. Tuy nhiên, việc dùng các đoạn dài hơn nữa ( $\geq 600$  bp) làm giảm khả năng phân giải của DGGE.

#### *Thành phần nấm và nấm men*

Kết quả DGGE của các sản phẩm PCR nhân lên từ cặp môi NL3A - NL4GC cho thấy chúng có độ tái lập cao. Các mẫu DNA được tách chiết từ cùng một loại bánh men và các lần phản ứng PCR khác nhau từ cùng một mẫu đều cho ra kết quả tương đồng cao. Phổ DGGE của nấm trong bánh men khá rõ ràng và tương đối đơn giản. Một số băng DNA chính đều tìm thấy trong các mẫu, chỉ có một số nhỏ là đặc trưng cho sự khác biệt giữa các mẫu. Các mẫu thông thường chứa không quá 10 băng DNA. Phổ DGGE của nấm được thể hiện trong hình 6. Danh sách các băng được xác định ở bảng 25. Việc đánh giá mức tương đồng được dựa trên vị trí di chuyển của các băng DNA trên phổ DGGE. Từ một trình tự đại diện bằng phương pháp ngoại suy có thể xác định các trình tự ở vị trí tương đồng khác, vì vậy cấu trúc các loài vi sinh vật trong các mẫu bánh men có thể được sáng tỏ. Tỉ lệ của các loài nấm (bao gồm cả nấm men) được liệt kê trong bảng 26.



**Hình 6.** Phổ điện di DGGE đại diện thể hiện thành phần các loài nấm men và nấm sợi trong bánh men truyền thống. Mỗi giếng tương ứng với mỗi mẫu bánh men, các băng được đánh số được xác định và đọc trình tự.

**Bảng 25.** Danh sách và độ tương đồng của các băng DNA khuếch đại bằng môi trên phổ điện di NL3A-NL4GC.

Băng DNA	Tên loài	Mã số GenBank	Độ tương đồng
F-110.1	<i>Rhizopus oryzae</i>	AY213624	363/363 (100.0%)
F-166.1	<i>Rhizopus oryzae</i>	AY213624	362/363 (99.7%)
F-166.5	<i>Rhizopus microsporus</i>	AB363776	369/369 (100.0%)
F-34.2	<i>Rhizopus microsporus</i>	AB363776	79/79 (100.0%)
F-34.7	<i>Absidia corymbifera</i>	AF113446	331/331 (100.0%)
F-22.4	<i>Amylomyces</i> sp.	DQ466612	105/113 (92.9%)
F-166.3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	U09238	293/293 (100.0%)
F-5.5	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	U09238	275/275 (100.0%)
F-110.3	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	U09238	280/280 (100.0%)
F-34.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EU268656	273/273 (100.0%)
F-166.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EU268656	300/300 (100.0%)
F-110.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EU268656	298/298 (100.0%)
F-34.6	<i>Issatchenkia</i> sp.	EU268659	273/283 (96.5%)
F-29.1	<i>Pichia anomala</i>	DQ318803	284/285 (99.6%)
F-89.2	<i>Candida tropicalis</i>	AB281286	229/232 (98.7%)
F-5.4	<i>Pichia ranongensis</i>	AB334112	243/243 (100.0%)
F-110.5	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EF694616	239/239 (100.0%)
F-5.6	<i>Botryobasidium subcoronatum</i>	AY647212	267/269 (99.3%)
F-110.4	<i>Xeromyces bisporus</i>	AF365020	245/246 (99.6%)



**Bảng 26.** Phân bố các loài nấm trong bánh men truyền thống Việt Nam.

Tên loài	Số băng DNA	Tỉ lệ phân bố (trong 52 mẫu bánh men)
<b>Loài sinh amylase</b>	<b>9</b>	<b>49</b>
<i>Rhizopus oryzae</i>	2	47
<i>Rhizopus microsporus</i>	2	9
<i>Absidia corymbifera</i>	1	12
<i>Amylomyces</i> sp.	1	8
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	3	32
<b>Loài sinh ethanol</b>	<b>8</b>	<b>44</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	41
<i>Issatchenkia</i> sp.	1	18
<i>Pichia anomala</i>	1	7
<i>Clavispora lusitaniae</i>	1	3
<i>Candida tropicalis</i>	1	2
<i>Pichia ranongensis</i>	1	2
<b>Loài sống trên cơ chất/tạp nhiễm</b>	<b>2</b>	<b>35</b>
<i>Xeromyces bisporus</i>	1	35
<i>Botryobasidium subcoronatum</i>	1	2

Có 4 loài nấm sợi thuộc họ *Mucoraceae* (*Rhizopus oryzae*, *R. microsporus*, *Absidia corymbifera*, and *Amylomyces* sp.) rất phổ biến trong bánh men. Các loài này có đặc điểm chung là sinh tổng hợp enzyme amylase mạnh mẽ và chúng được tìm thấy khá nhiều trong các giống khởi động ở châu Á (Haard et al., 1999; Hesseltine, 1983; Hesseltine et al., 1988). *R. oryzae* là loại nấm phổ biến nhất trong số nấm có trong bánh men, theo kết quả thống kê có tới 47 trong tổng số 52 mẫu được kiểm tra là chứa loại này. Phổ biến thứ hai là loài nấm men sinh enzyme amylase *S. fibuligera*.

Trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi về các vi sinh vật chuyển hoá tinh bột liên quan đến bánh men truyền thống, *Mucoraceae* không hề nổi trội và *S. fibuligera* mới là loài chiếm ưu thế (Thanh et al., 2005). *S. fibuligera* cũng là loài sinh tổng hợp amylase chính trong *loog-pang*, một loại giống khởi động tương tự như bánh men dùng trong nấu rượu truyền thống của Thái Lan (Limtong et al., 2002). Điều này có vẻ mâu thuẫn với sự phổ biến của *R. oryzae* trong phổ DGGE. Một giải thích chúng tôi tạm thời đưa ra là thành tế bào của *Mucoraceae* yếu hơn so với nấm men, điều đó dẫn đến hiệu quả tách chiết DNA và sản phẩm PCR cao hơn. Tỉ lệ ưu thế của *Mucoraceae* trong bánh men cũng không đồng nghĩa với việc nó sẽ đóng vai trò chính trong quá trình lên men, vì điều kiện cơ chất và môi trường khác xa so với bánh men khô. Mặt khác, việc *Mucoraceae* không đóng vai trò chính trong lên men truyền thống không có nghĩa chúng không thể ứng dụng trong lên men cồn từ tinh bột. Trong thực tế *Amylomyces rouxii* được ứng dụng khá thành công trong sản xuất rượu từ nếp cẩm (Dung, 2004; Dung et al., 2005).

Các nấm men như *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia* sp., *Pichia anomala*, *Candida tropicalis*, *Pichia ranongensis*, và *Clavispora lusitaniae* là các loài đóng vai trò chính chuyển hoá đường và tạo thành ethanol. Trong số đó *Saccharomyces cerevisiae* là phổ biến nhất, có đến 41 trong số 52 mẫu có chứa loài trên. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đây dựa trên phương pháp nuôi cấy và phân lập (Thanh et al., 2005). Cho đến nay *Saccharomyces cerevisiae* vẫn được xem như là vi sinh vật tạo ethanol hiệu quả nhất (Vaughan-Martini and Martini, 1995). Phổ biến thứ hai là một loài thuộc *Issatchenkia* tương ứng với băng F-34.6. Nấm men này có mặt trong 18 mẫu bánh men và gần giống với *Issatchenkia orientalis*, nhưng có một số trình tự không tương đồng hoàn toàn. *Issatchenkia orientalis* là loài rất phổ biến trong *Loog-pang* của Thái Lan (Limtong et al., 2002) và *brem* của Indonesian (Sujaya et al., 2001). Loài này có khả năng lên men và chịu cồn cao, lượng ethanol trong dịch lên men có thể đạt tới 6% (w/v) (Limtong et al., 2002). *Pichia anomala* được tìm thấy trong 7 mẫu bánh men. Loại nấm men nang này cũng được phát hiện nhờ phương pháp phân lập (Thanh et al., 2005). *Pichia anomala* (syn. *Hansenula anomala*) là thành phần chính trong một số loại giống khởi động ở khu vực Châu Á – Thái Bình Dương (Haard et al., 1999; Limtong et al., 2002; Sujaya et al., 2001). Loài này có thể lên men tạo thành 5% ethanol (w/v) (Limtong et al., 2002). Còn lại 3 loài với tần số thấp nhất là *Candida tropicalis*, *Pichia ranongensis*, và *Clavispora lusitaniae* chỉ xuất hiện ở 2 hay 3 mẫu bánh men. *Candida tropicalis* và *Clavispora lusitaniae* là những loài rất phổ biến có thể tìm thấy trong hoa quả, đất, nước và cơ thể người (Lachance and Phaff, 1998; Meyer et al., 1998). *Pichia ranongensis* là một loại nấm men chưa được mô tả chính thức, phân lập từ rừng ngập mặn ở Thái Lan.

*Botryobasidium subcoronatum* là loại nấm không rõ chức năng trong bánh men, đây là một loài nấm đảm thuộc họ *Agaricomycetes*. Chúng phân bố rộng rãi trên toàn thế giới và có khả năng sống với phổ cơ chất rất rộng. Đây là loài nấm sống hoại sinh thường thấy trong phần thịt gỗ của cả cây hạt trần và cây hạt kín. Loài *Botryobasidium subcoronatum* chỉ có mặt trong một số mẫu và đây có thể chỉ là loài tạp nhiễm trong quá trình sản xuất bánh men. Một loài xuất hiện ngoài dự kiến là *Xeromyces bisporus*, chúng được tìm thấy trong 35 mẫu. Đây là loại nấm nang chịu áp suất thẩm thấu cao có điều kiện sinh trưởng tối ưu ở  $a_w=0.92$  và dừng lại ở  $a_w=0.97$  (tương đương với 24% w/w glucose; Gock et al., 2003; Pitt and Christian, 1968; Rosso and Robinson, 2001). Đặc điểm sinh học của loài nấm này cho ta thấy có thể chúng phát triển trong quá trình làm khô và bảo quản bánh men. Loài này không thể sống trong quá trình lên men do áp suất thẩm thấu quá thấp. Sự phổ biến của *Xeromyces bisporus* ở bánh men trong khi không có vai trò gì đối với quá trình lên men đã phát sinh câu hỏi về sự thích hợp khi đánh giá vai trò của loài chỉ dựa trên sự phổ biến, khả năng sinh enzyme/ethanol mà không theo dõi động học trong quá trình lên men, điều mà nhiều nghiên cứu đã gặp phải. Sự khác biệt lớn nhất giữa bánh

men truyền thống và giống khởi động công nghiệp nằm ở khả năng tự điều chỉnh trong điều kiện tạp nhiễm. Chỉ có một phần nhỏ các loài trong các bánh men truyền thống có chức năng trong quá trình lên men. Phần còn lại đóng vai trò duy trì sự ổn định của bánh men hoặc đơn thuần tồn tại trên bánh men như một cơ chất thích hợp (như trường hợp của *Xeromyces bisporus*). Bánh men truyền thống có thành phần phức tạp hơn rất nhiều so với giống khởi động công nghiệp. Để hiểu rõ vai trò của mỗi thành phần đòi hỏi phải có những nghiên cứu sâu hơn nữa.

#### *Thành phần vi khuẩn*

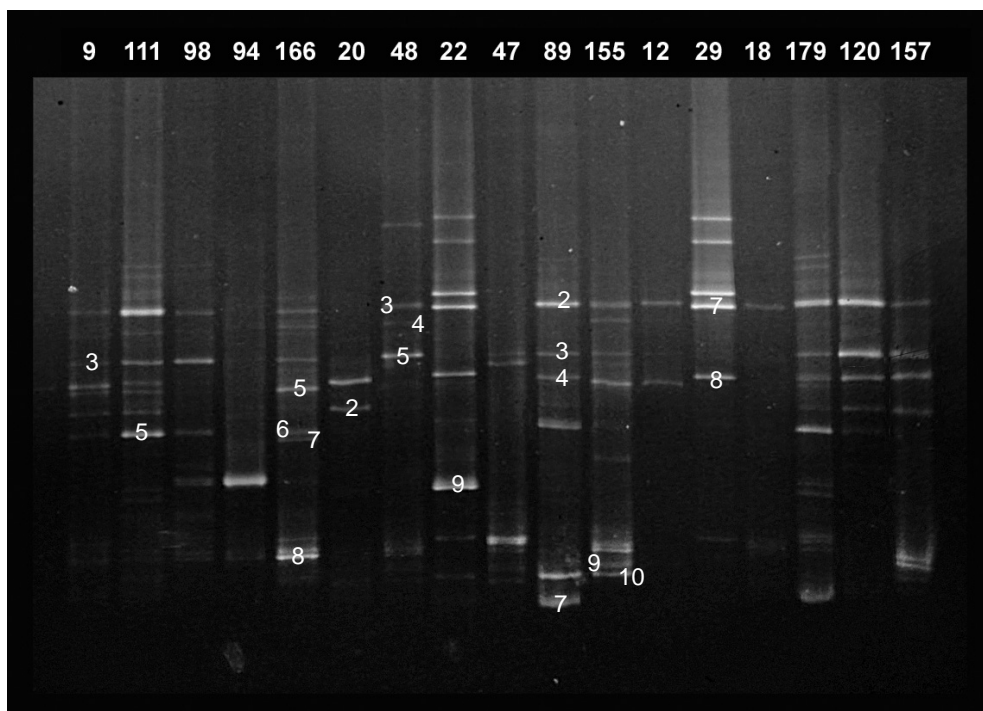
Phân tích về thành phần vi khuẩn trong bánh men được thực hiện trên 48 mẫu. Thành phần vi khuẩn trong bánh men phức tạp hơn nhiều so với thành phần nấm men và nấm mốc (Hình 6 và 7). Tần xuất có mặt của các loài trong 48 mẫu bánh men được thể hiện trong bảng 28.

Mặc dù tập hợp các loài vi khuẩn tương đối phức tạp, chúng vẫn có thể chia thành 5 nhóm khá rõ ràng. Nhóm thứ nhất bao gồm các loài thuộc *Bacillus*, có đặc điểm sinh trưởng và phát triển rất nhanh trong điều kiện hiếu khí, đồng thời có khả năng sinh tổng hợp amylase như *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens*, và *B. sporothermodurans*, trong đó *B. subtilis* là phổ biến nhất. Tất cả các loài *Bacillus* tìm thấy đều sử dụng tinh bột làm cơ chất và được ứng dụng trong sản xuất thực phẩm và trong công nghệ sinh học (Pirttijärvi et al., 2001).

Nhóm thứ hai gồm hai loài vi khuẩn tạo axit acetic là *Acetobacter orientalis* và *A. pasteurianus*. *Acetobacter* có khả năng chuyển hoá ethanol thành axit acetic trong điều kiện hiếu khí. *Acetobacter orientalis* từng được phân lập từ chuối, dưa, sữa đông, đậu phụ... Chúng có thể tạo axit từ cơ chất là tinh bột và có khả năng chịu cồn cao (7%) (Lisdiyanti et al., 2001). *A. pasteurianus* có mặt trong các sản phẩm lên men truyền thống và được xem như là vi khuẩn tạo acetic chủ yếu trong các sản phẩm này (Gandjar, 1999; Gullo et al., 2006). Trong bánh men, *Acetobacter* không phổ biến, nó chỉ có mặt trong 3 mẫu. Sự có mặt của *Acetobacter* là không mong đợi, vì chúng oxi hoá cồn và tạo vị chua và mùi dấm cho sản phẩm.

Nhóm thứ 3 là nhóm phổ biến nhất gồm các vi khuẩn sinh lactic. Trong 48 mẫu thì có tới 44 mẫu chứa nhóm này và thể hiện ở 32 băng được định tên (Bảng 27). Nhóm này bao gồm 6 chi và 14 loài khác nhau, phổ biến nhất là *P. pentosaceus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *W. confusa*, *W. paramesenteroides*. Vai trò của vi khuẩn lactic trong bánh men truyền thống được cho là có liên quan đến quá trình axit hoá môi trường, tạo thuận lợi cho sinh trưởng và phát triển của nấm men và nấm sợi. Hai quá trình tạo ethanol và lên men lactic là cạnh tranh lẫn nhau trong lên men rượu truyền thống. Sự phát triển quá mức của vi khuẩn lactic trong lên men rượu là không mong muốn.

Việc ứng dụng kỹ thuật DGGE đã phát hiện hai nhóm vi khuẩn không thể giải thích được vai trò trong bánh men. Đó là các loài gây bệnh ở thực vật như (*Burkholderia ubonensis* and *Ralstonia solanacearum*) và nhóm tạp nhiễm từ môi trường như *Pelomonas puraquae*. Vi khuẩn gây bệnh thực vật trong bánh men truyền thống có thể xuất phát từ nguyên liệu. *Pelomonas puraquae* vốn được phân lập từ nước thải công nghiệp (Gomila et al., 2007). Những nhóm vi sinh vật này tuy nhiên không thực sự phổ biến trong bánh men.



**Hình 7.** Phổ điện di DGGE thể hiện thành phần các loài vi khuẩn trong bánh men truyền thống. Mỗi giếng tương ứng với mỗi mẫu bánh men, các băng được đánh số được xác định và đọc trình tự.

**Bảng 27.** Danh sách các băng DNA 16S của vi khuẩn được xác định trên phổ DGGE.

Băng	Tên loài	Mã số GenBank	Độ tương đồng
B-89.6.1	<i>Acetobacter orientalis</i>	AB180930	167/167 (100.0%)
B-89.6.2	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB299165	446/448 (99.6%)
B-89.7	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB299165	232/233 (99.6%)
B-95.5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EF473131	412/416 (99.0%)
B-155.9	<i>Bacillus circulans</i>	DQ870737	450/451 (99.8%)
B-95.8	<i>Bacillus circulans</i>	DQ870737	452/453 (99.8%)
B-34.2	<i>Bacillus circulans</i>	DQ870737	176/176 (100.0%)
B-37.9	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	AB190039	97/99 (98.0%)
B-95.6	<i>Bacillus subtilis</i>	EU271854	453/454 (99.8%)
B-22.9	<i>Burkholderia ubonensis</i>	EU024179	159/159 (100.0%)
B-41.4	<i>Enterococcus faecium</i>	AB362603	408/408 (100.0%)
B-89.2	<i>Lactobacillus agilis</i>	M58803	323/326 (99.1%)
B-29.8	<i>Lactobacillus brevis</i>	EF120367	456/457 (99.8%)
B-37.8	<i>Lactobacillus brevis</i>	EF120367	376/378 (99.5%)
B-155.10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	EU287483	456/457 (99.8%)
B-95.7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DQ399352	449/450 (99.8%)
B-42.7	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	AF000162	446/447 (99.8%)
B-42.8	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	AF000162	455/456 (99.8%)
B-42.4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	EU273819	163/165 (99.0%)
B-29.7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	EU273819	456/457 (99.8%)
B-89.4	<i>Lactobacillus sp.</i>	AY445129	175/181 (96.7%)
B-155.8	<i>Lactococcus lactis</i>	EU104368	449/451 (99.6%)
B-42.5	<i>Lactococcus lactis</i>	EU104368	151/152 (99.3%)
B-166.5	<i>Lactococcus lactis</i>	EU104368	420/422 (99.5%)
B-42.3	<i>Leuconostoc citreum</i>	AB362723	431/439 (98.2%)
B-48.4	<i>Leuconostoc garlicum</i>	AB362722	110/110 (100.0%)
B-48.3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	AB023247	226/228 (99.1%)
B-48.5	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB362605	445/446 (99.8%)
B-89.3	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB362605	170/171 (99.4%)
B-91.2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	AB362605	456/457 (99.8%)
B-9.3	<i>Pelomonas puraquae</i>	AM501441	445/448 (99.3%)
B-95.4	<i>Pelomonas puraquae</i>	AM501441	386/391 (98.7%)
B-20.2	<i>Ralstonia solanacearum</i>	DQ924957	134/137 (97.8%)
B-42.9	<i>Weissella confusa</i>	AJ874741	455/456 (99.8%)
B-166.7	<i>Weissella confusa</i>	AJ874741	349/351 (99.4%)
B-166.8	<i>Weissella confusa</i>	AJ874741	456/456 (100.0%)
B-42.10	<i>Weissella confusa</i>	AJ874741	449/450 (99.8%)
B-166.6	<i>Weissella confusa</i>	AJ874741	196/198 (99.0%)
B-91.4	<i>Weissella confusa</i>	AJ874741	457/457 (100.0%)
B-47.4	<i>Weissella confusa</i>	AJ874741	444/445 (99.8%)
B-89.5	<i>Weissella paramesenteroides</i>	AB023238	449/449 (100.0%)
B-111.5	<i>Weissella paramesenteroides</i>	AB023238	434/436 (99.5%)
B-20.1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	AB023238	62/63 (98.4%)
B-91.3	<i>Weissella paramesenteroides</i>	AB023238	302/304 (99.3%)
B-42.6	<i>Weissella paramesenteroides</i>	AB023238	84/85 (98.8%)

**Bảng 28.** Phân bố các loài vi khuẩn trong bánh men truyền thống Việt Nam.

Loài	Số băng DNA	Tỉ lệ phân bố (trên tổng số 48 mẫu)
<b>Phân hủy tinh bột</b>	<b>6</b>	<b>11</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1
<i>Bacillus circulans</i>	3	3
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	8
<b>Sinh axit acetic</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<i>Acetobacter orientalis</i>	1	2
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	2	2
<b>Sinh axit lactic</b>	<b>32</b>	<b>44</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1
<i>Lactobacillus agilis</i>	1	5
<i>Lactobacillus brevis</i>	2	19
<i>Lactobacillus fermentum</i>	2	5
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	2	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	22
<i>Lactobacillus sp.</i>	1	5
<i>Lactococcus lactis</i>	3	14
<i>Leuconostoc citreum</i>	1	1
<i>Leuconostoc garlicum</i>	1	8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3	29
<i>Weissella confusa</i>	7	17
<i>Weissella paramesenteroides</i>	5	15
<b>Tạp nhiễm/bệnh thực vật</b>	<b>4</b>	<b>15</b>
<i>Burkholderia ubonensis</i>	1	8
<i>Ralstonia solanacearum</i>	1	6
<i>Pelomonas puraquae</i>	2	3

Thành phần vi khuẩn trong bánh men truyền thống Việt Nam tương đối giống với *ragi* của Indonesia. Người ta cũng tìm thấy một số loài như *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus curvatus*, *Weissella confusa*, *W. paramesenteroides* và trong *ragi* (Sujaya et al. (2001). Các loài tương tự cũng tìm thấy trong *tape ketan* (Ardhana and Fleet, 1989).

Một trong những điểm khác biệt chính giữa cấu trúc thành phần vi khuẩn và nấm trong bánh men là tính bảo thủ. Trong khi thành phần các loài nấm tương đối đồng đều giữa các mẫu bánh men thì thành phần vi khuẩn lại không ổn định. Điều này có thể giải thích bởi những áp lực công nghệ khác nhau lên hai hệ vi sinh vật. Sự biến đổi thành phần nấm trong bánh men sẽ ảnh hưởng lớn đến hiệu suất lên men và chất lượng sản phẩm. Bánh men nhập khẩu từ Trung Quốc chỉ chứa một loại nấm duy nhất là *S. cerevisiae* (Hình 6; bảng 185), kết quả này hoàn toàn đồng nhất với phương pháp phân

lập. Bánh men chuyên dụng trong lên men rượu nếp lại thiếu vắng nấm men *S. cerevisiae* (Hình 6; bảng 174) và điều này phù hợp với đặc thù của rượu nếp là tạo độ ngọt cao và nồng độ cồn nhẹ. Có một số khác biệt về hệ vi sinh khuẩn trong bánh men công nghiệp. Điển hình mẫu BM94 (Hình 7; bảng 94), chỉ có một băng duy nhất là *B. subtilis*, và rất có thể loại vi sinh vật này được đưa vào một cách chủ động.

Thông qua phương pháp điện di DGGE, chúng ta có hiểu biết tổng quan về quần xã vi sinh vật trong bánh men. Ưu điểm vượt trội của DGGE là có thể ứng dụng đồng thời cho nhiều mẫu và kết quả thu được trong thời gian tương đối ngắn. Tuy nhiên kỹ thuật này không phân biệt được giữa tế bào sống và chết. Cường độ của các băng DNA đại diện cho một loài nào đó trên phổ DGGE không tỉ lệ thuận với mật độ của loài đó trong mẫu vì hiệu quả tách chiết DNA của các loài là khác nhau (Ercolini, 2004; Prakitchaiwattana et al., 2004). Trong nghiên cứu này, các băng được xác định dựa trên phép ngoại suy từ một số băng đại diện đã được đọc trình tự có thể suy ra các băng có vị trí tương tự trên phổ DGGE. Chúng tôi nhận thấy cách tiếp cận này hiệu quả khi so sánh tập hợp loài gần tương tự, ví dụ như trong trường hợp của nấm và nấm men. Tuy nhiên, với những hệ bất ổn định như hệ vi khuẩn trong bánh men phép ngoại suy rất dễ gặp sai sót.

#### **2.2.4. Xây dựng cơ sở dữ liệu- Data Bank**

Hiện tại Viện Công nghiệp Thực phẩm đang bảo tồn và lưu giữ một nguồn gen quan trọng cho công nghiệp thực phẩm với 1078 chủng vi sinh vật có các ứng dụng khác nhau từ lên men rượu, bia, cồn, bánh mỳ, sản xuất axit lactic, axetic, chuyển hóa chất thơm, lipid, sinh kháng sinh, enzyme cho tới các ứng dụng trong bảo vệ môi trường, thức ăn gia súc, diệt trừ sâu bệnh cũng như làm vi sinh vật chuẩn phục vụ nghiên cứu. Việc khai thác nguồn gen này hiện chỉ tập trung vào một số chủng và mang tính truyền thống. Các ứng dụng thường xuất phát từ các đề tài triển khai của Viện và phụ thuộc vào điều kiện kinh phí, hợp đồng với khách hàng. Nói một cách khác, việc khai thác và ứng dụng nguồn gen hiện còn mang tính cục bộ và không thể hiện thực sự tầm vóc của bảo tồn gen. Một trong những nguyên nhân của vấn đề này xuất phát từ việc chúng ta chưa có một catalog thật sự có thể phục vụ cho việc khai thác và quảng bá nguồn gen tới các cơ sở sản xuất, các viện nghiên cứu và trường đại học. Catalog là bản chào hàng và là cam kết về sự tồn tại và hoạt động của bảo tồn gen. Do vậy có thể khẳng định, việc xuất bản một catalog chính thức cho bảo tồn gen là việc làm cấp thiết và không thể thiếu được cho hoạt động bảo tồn, lưu giữ và khai thác nguồn gen. Tuy nhiên, catalog không đơn thuần là danh sách các chủng giống đang được bảo tồn và lưu giữ mà phải chứa đựng những thông tin chính xác và đồng bộ về chủng giống. Đây là một công việc đòi hỏi nỗ lực và sự thống nhất hoạt động trong nhiều năm với một chi phí không nhỏ. Để khắc phục những khó khăn này và tiếp cận dần tới việc xuất bản catalog, trong năm 2007 sưu tập giống đã nỗ lực

thiết lập cơ sở dữ liệu chủng giống đang lưu giữ với các đặc thù cho từng nhóm vi sinh vật. Các đặc điểm quan tâm bao gồm:

- Tên chủng trong sưu tập Viện CNTP và tại các sưu tập khác
- Tên loài, người định danh, phương pháp định danh
- Nguồn gốc xuất xứ
- Ứng dụng công nghệ hoặc tiềm năng công nghệ
- Môi trường nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy
- Đặc tính hình thái (hình thái khuẩn lạc, tế bào, khả năng tạo bào tử, tạo sắc tố...)
- Các đặc tính sinh lý sinh hóa (khả năng lên men, sử dụng các nguồn cacbon, nitơ, vitamin, khả năng sinh enzyme, các test sinh lý sinh hóa khác).
- Các gen đã đọc trình tự
- Tài liệu tham khảo
- Các vấn đề về bản quyền, chủ sở hữu, phạm vi sử dụng

Trong năm 2008 chúng tôi bổ sung được cơ sở dữ liệu cho 40 chủng giống. Một vài mẫu của bảng biểu được trình bày trong phụ lục.



### 3. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

#### 3.1. Kết luận

Trong năm 2008 Suu tập giống Vi sinh vật Công nghiệp Thực phẩm đã hoàn thành những nhiệm vụ sau:

##### ***Điều tra khảo sát thu thập nguồn gen***

- Tiếp nhận 171 chủng vi sinh vật từ Viện Rượu Bia Nước giải khát.
- Thu thập thêm 40 chủng vi sinh vật

##### ***Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen***

- Bảo quản bổ sung 171 chủng từ Viện Rượu Bia Nước giải khát bằng cả đông khô và trong nitor lỏng.
- Bảo quản an toàn 927 chủng giống chính thức của suu tập chủ yếu bằng đông khô 530 chủng và trong nitor lỏng 750 chủng.
- Bảo quản lạnh sâu 120 chủng, trong cát 65 chủng, trong paraffin 50 chủng, cấy truyền 430 chủng.

##### ***Đánh giá nguồn gen***

- Khảo sát khả năng chịu muối, sinh cồn của 15 chủng *Zygosaccharomyces*
- Khả năng tạo hương của 12 chủng nấm men công nghiệp
- Đánh giá khả năng lên men ở nhiệt độ cao của 38 số chủng nấm men
- Hoạt tính cellulase của 48 chủng nấm mốc
- Fingerprinting 27 chủng nấm mốc, định tên 6 chủng bằng giải trình tự DNA
- Đánh giá đặc tính của 10 chủng *Bacillus*
- Đánh giá đa dạng vi sinh vật trong bánh men rượu bằng phương pháp DGGE

##### ***Xây dựng cơ sở dữ liệu***

- Đã bổ sung bảng số liệu cho 40 chủng giống

#### 3.2. Kiến nghị

Để việc khai thác, bảo tồn nguồn gen được hiệu quả hơn, Bảo tồn gen mong muốn nhận được sự hỗ trợ của các cấp quản lý trong việc xây dựng một catalog chính thức phục vụ nhu cầu quảng bá và lưu trữ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aidoo, K.E., Nout, M.J., Sarkar, P.K., 2006. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research* 6, 30-39.
2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
3. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
4. Ardhana, M.M., Fleet, G.H., 1989. The microbial ecology of tape ketan fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 9, 157-165.
5. Davies, C.E., Hill, K.E., Wilson, M.J., Stephens, P., Hill, C.M., Harding, K.G., Thomas, D.W., 2004. Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3549-3557.
6. Dung, N.T.P., 2004. Defined fungal starter granules for purple glutinous rice wine, Ph.D. Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, p. 110.
7. Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., Nout, M.J.R., 2005. Development of defined mixed-culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6, 429-441.
8. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 49, 329-337.
9. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
10. Gandjar, I., 1999. Fermented Foods - Fermentations of the Far East. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London, pp. 767-773.
11. Gock, M.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Poulos, P.G., 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 81, 11-19.
12. Gomila, M., Bowien, B., Falsen, E., Moore, E.R., Lalucat, J., 2007. Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2629-2635.

13. Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology* 106, 209-212.
14. Haard, N.F., Odunfa, S.A., Lee, C.H., Quintero-Ramírez, R., Lorence-Quinones, A., Wachter-Radarte, C., 1999. Fermented cereals a global perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin* No. 138, p. 97.
15. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 41, 95-98.
16. Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109, 79-87.
17. Hesseltine, C.W., 1983. Microbiology of oriental fermented foods. *Annual Review of Microbiology* 37, 575-601.
18. Hesseltine, C.W., Rogers, R., Winarno, F.G., 1988. Microbiological studies on amylolytic oriental fermentation starters. *Mycopathologia* 101, 141-155.
19. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111–120.
20. Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek* 73, 331-371.
21. Lachance, M.A., Phaff, H.J., 1998. *Clavispora* Rodrigues de Miranda. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 148-152.
22. Lee, A.C., Fujio, Y., 1999. Microflora of Banh Men, a fermentation starter from Vietnam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 57-62.
23. Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P., Lotong, N., 2002. Yeast diversity in Thai traditional alcoholic starter. *Kasetsart Journal (Natural sciences)* 36, 149–158.
24. Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2001. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* 47, 119-131.
25. Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J., 2006. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista iberoamericana de micología* 23, 67-74.

26. Meroth, C.B., Hammes, W.P., Hertel, C., 2003. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7453-7461.
27. Meyer, S.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1998. *Candida* Berkhout. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp. 454-573.
28. Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178, 5636-5643.
29. Pirttijärvi, T.S., Wahlström, G., Rainey, F.A., Saris, P.E., Salkinoja-Salonen, M.S., 2001. Inhibition of bacilli in industrial starches by nisin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 107-114.
30. Pitt, J.I., Christian, J.H., 1968. Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. *Applied Microbiology* 16, 1853-1858.
31. Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4, 865-877.
32. Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology* 63, 265-273.
33. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
34. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Mainiatis, T., 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
35. Sujaya, I.N., Amachi, S., Yokota, A., Asano, K., Tomita, F., 2001. Identification and characterization of lactic acid bacteria in ragi tape. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 349-357.
36. Thanh, V.N., Thu Huong, N.T., Quynh Anh, N.T., 2005. Conservation of the biodiversity of Vietnam traditional alcohol fermentation starters. *MSA Golden Jubilee International Science Congress (ISC) 2005*, August 3-6, 2005, Kuala Lumpur, Malaysia, 160-161.
37. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 25, 4786-4882.
38. Vaughan-Martini, A., Martini, A., 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 514-522.

## **PHỤ LỤC**

**BỘ CÔNG THƯƠNG**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**  
**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

Số: 06.08.06/HĐ-KHCN

Hà Nội, ngày 20 tháng 08 năm 2008

**HỢP ĐỒNG**  
**NGHIÊN CỨU KHOA HỌC VÀ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ**

Căn cứ Nghị định số 189/2007/NĐ-CP ngày 27 tháng 12 năm 2007 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Công Thương;

Căn cứ Quyết định số 419/TTg ngày 21 tháng 7 năm 1995 của Thủ tướng Chính phủ về cơ chế quản lý các hoạt động nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ;

Căn cứ Nghị định số 81/2002/NĐ-CP ngày 17 tháng 10 năm 2002 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 1999/QĐ-BCT ngày 03/12/2007 của Bộ trưởng Bộ Công Thương về việc giao kế hoạch KHCN năm 2008,

Chúng tôi gồm:

**1. Bên giao (Bên A) là: Bộ Công Thương**

Địa chỉ : 54, Hai Bà Trưng, Hà Nội.  
Điện thoại: 04-2202310  
Đại diện là ông: Nguyễn Phú Cường  
Chức vụ : Phó Vụ trưởng Vụ Khoa học và Công nghệ

**2. Bên nhận (Bên B) là: Viện Công nghiệp thực phẩm**

Địa chỉ : 301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội  
Điện thoại: 04-8584481  
Tài khoản: 30101004.1 Kho bạc Nhà nước Thanh Xuân - Hà Nội  
Đại diện là ông: Lê Đức Mạnh  
Chức vụ : Viện trưởng

Hai bên thoả thuận ký Hợp đồng thực hiện nhiệm vụ Quỹ gen năm 2008 như sau:

**Điều 1. Trách nhiệm bên B:**

1. Bên B cam kết thực hiện nhiệm vụ “**Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen vi sinh vật công nghiệp thực phẩm**”.

Nội dung, tiến độ và dự toán thực hiện nhiệm vụ được nêu trong Phụ lục 1 và 2 của Hợp đồng này.

2. Trong vòng 15 ngày kể từ ngày kết thúc hợp đồng. Bên B phải nộp cho Bên A báo cáo khoa học và quyết toán Hợp đồng này.

**Điều 2. Kinh phí thực hiện hợp đồng:**

- Kinh phí cấp từ ngân sách Nhà nước để thực hiện Hợp đồng là : **200 triệu** đồng (bằng chữ: **Hai trăm triệu** đồng chẵn).

**Điều 3. Thời hạn thực hiện hợp đồng**

- Thời gian thực hiện hợp đồng là: từ tháng 1/2008 đến hết tháng 12 năm 2008.

**Điều 4. Trách nhiệm Bên A**

- Bên A cam kết chuyển cho bên B số kinh phí thực hiện Hợp đồng nêu tại điều 2 theo quy định hiện hành về cấp phát kinh phí từ ngân sách Nhà nước.
- Trong thời gian 30 ngày kể từ ngày kết thúc hợp đồng. Bên A sẽ tổ chức đánh giá, nghiệm thu và thanh lý hợp đồng.

**Điều 5. Điều khoản thi hành**

- Hai bên cam kết thực hiện đầy đủ các điều khoản đã ghi trong hợp đồng. Nếu có yêu cầu cần thay đổi, hai bên sẽ thoả thuận để giải quyết.
- Hợp đồng này có hiệu lực kể từ ngày ký và được lập thành 6 bản. Bên B giữ 2 bản./.

**Đại diện Bên A**

**TL. BỘ TRƯỞNG BỘ CÔNG THƯƠNG  
KT. VỤ TRƯỞNG VỤ KHCN  
PHÓ VỤ TRƯỞNG**



**Nguyễn Phú Cường**

**Đại diện Bên B**

**VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM  
VIỆN TRƯỞNG**



**Lê Đức Mạnh**



**NỘI DUNG, TIẾN ĐỘ VÀ KẾT QUẢ THỰC HIỆN NHIỆM VỤ**

(Kèm theo hợp đồng số: /HĐ-KHCN, ngày tháng năm 2008)

TT	Nội dung	Thời gian thực hiện		Kết quả cụ thể (Số lượng, các chỉ tiêu cơ bản)	Ghi chú
		Từ tháng	Đến tháng		
1	Điều tra, khảo sát và thu thập vi sinh vật có nguồn gen quý hiếm thuộc đối tượng cần bảo tồn lưu giữ	1/2008	9/2008	Thu được 40 chủng mới	
2	Bảo tồn lưu giữ nguồn gen cho 927 chủng	1/2008	12/2008	Bảo tồn an toàn 927 chủng, gồm: - <i>Cấy truyền</i> 430 chủng - <i>Bảo quản trong paraffin</i> 50 chủng - <i>Lạnh sâu</i> 240 chủng - <i>Bảo quản cát bổ sung</i> 25 chủng - <i>Đông khô bổ sung</i> 50 chủng - <i>Bảo quản trong nitơ lỏng</i> 450 chủng (bổ sung 150 chủng)	
3	Đánh giá nguồn gen (40 chủng)	5/2008	11/2008	Đánh giá được 40 chủng 30 chỉ tiêu/ chủng gồm: <i>nấm men</i> 20 chủng, <i>nấm mốc</i> 10 chủng, <i>vi khuẩn</i> 10 chủng	
4	Xây dựng cơ sở dữ liệu (40 chủng)	9/2008	11/2008	Có cơ sở dữ liệu cho 40 chủng bổ sung	
5	Viết báo cáo tổng kết và nghiệm thu nhiệm vụ năm 2008	12/2008	12/2008	Có báo cáo tổng kết và nghiệm thu nhiệm vụ 2008	

10/10/2008



## Phụ lục 2

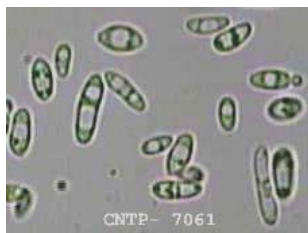
**DỰ TOÁN KINH PHÍ**

(Kèm theo hợp đồng số: /HĐ-KHCN, ngày tháng năm 2008)

<b>Mục lục NS</b>	<b>Nội dung</b>	<b>Kinh phí (triệu đồng)</b>
	<b>Nhóm 1 (Thanh toán cá nhân)</b>	<b>12,0</b>
102	Phụ cấp lương	12,0
	<b>Nhóm 2 (Chi nghiệp vụ chuyên môn)</b>	<b>178,0</b>
109	Thanh toán dịch vụ công cộng	4,0
110	Vật tư văn phòng	2,0
111	Thông tin tuyên truyền liên lạc	2,0
112	Hội nghị	4,0
113	Công tác phí	0,0
114	Chi phí thuê mướn	
	- Thu thập nguồn gen	20,0
	- Bảo tồn nguồn gen	20,0
	- Đánh giá nguồn gen	30,0
	- Lập cơ sở dữ liệu nguồn gen	10,0
115	Chi đoàn ra	0,0
116	Chi đoàn vào	0,0
117	Sửa chữa thường xuyên TSCĐ	0,0
119	Chi phí nghiệp vụ chuyên môn của ngành	
	- Hóa chất, dụng cụ nuôi cấy vi sinh vật	36,0
	- Hóa chất sinh học phân tử	30,0
	- Hóa chất phân tích	20,0
	<b>Nhóm 3 (Mua sắm, sửa chữa)</b>	<b>0,0</b>
145	Mua sắm TSCĐ	
	<b>Nhóm 4 (Các khoản chi khác)</b>	<b>10,0</b>
134	Chi khác	10,0
	<b>Tổng</b>	<b>200,0</b>



## *Saccharomyces cerevisiae*



Hình thái tế bào x 40

Kí hiệu: CNTP 7061

- Nguồn gốc: Nước ngoài.
- Ứng dụng trong sản xuất rượu
- Mô tả: Khuẩn lạc màu kem, trơn nhẵn bóng, mép nhẵn. Tế bào hình ovan sinh sản vô tính bằng nảy chồi nhiều phía, không tạo thành khuẩn ty.
- Bào tử: Hình tròn, trơn nhẵn, có từ 2-4 bào tử trong 1 túi bào tử
- Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp: 28°C
- Lên men.

D- Glucose +	Trehalose	Raffinose
D- Galactose	Melibiose	Inulin
Maltose +	Lactose	Starch
Sucrose +	Cellobiose	D- Xylose

### *Sinh trưởng*

D- Glucose	Melezitose	DL Lactate	Biotin
D- Galactose	Inulin	Succinate	Thiamin
L-Sorbose	Starch	Citrate	Biotin & Thiamin
D-Glucosamin	Glycerol	Methanol	Pyridoxine
D-Ribose	Erythritol	Ethanol	Pyridoxin&Thiamin
D-Xylose	Ribitol	Propane 1,2 diol	Niacine
L-Arabinose	Xylitol	Butane 2,3 diol	Sinh tr-êng 25°C
D-Arabinose	L-Arabinitol	Nitrate	Sinh tr-êng 30°C
L-Ramnose	D-Glucitol	Nitrite	Sinh tr-êng 35°C
Sucrose	D-Mannitol	Ethylamin	Sinh tr-êng 37°C
Maltose	Galactitol	L- Lysin	Sinh tr-êng 40°C
Trehalose	Inositol	Cadaverine	0.01% Cycloheximite
Cellobiose	Glucono-δ lactone	Creatine	0.1% Cycloheximite
Salicin	2- Keto D gluconate	Glucosamin	1% acetic acid
Arbutin	5- Keto D gluconate	Imidazole	50% D-Glucose
Melibiose	D- Gluconate	Vitamine	60% D-Glucose
Lactose	D- Glucoronate	Inositol	
Raffinose	D- Galacturonate	Pantothenate	

### *Những đặc tính khác:*

Tạo thành tinh bột	Sinh axit axetic	Thủy phân urê	Phản ứng với xanh Diazonium B
--------------------	------------------	---------------	-------------------------------

- Phương pháp bảo quản và thời gian bảo quản: Dưới dầu paraffin 1 năm ở 5°C; Lạnh sâu (-86°C) trong 2 năm; Đông khô trong 2 năm.

## Chủng CNTP 6001



Tên loài: *Bacillus subtilis*

Nguồn gốc: được bàn giao từ thể hệ trước

Ký hiệu cũ: BCK8

Ký hiệu mới: CNTP 6001

Trạng thái lưu trữ: lạnh sâu, đông khô, cấy truyền

Môi trường nuôi cấy Nutrient agar      nhiệt độ: 37

## Đặc tính

2-Keto- Gluconate	-
5-Keto- Gluconate	-/+
Adonitol	-
α-Metyl-D-Glucoside	+
α-Metyl-D-Mannoside	-
Amygdaline	+
Arbutine	+
β-Metyl-D-Xyloside	-
β-Gentiobiose	+
Cellobiose	+
D- Xylose	-
D-Arabinose	+
D-Arabitol	-
D-Fructose	+
D-Fucose	-
Nitrate reduction NO <sub>2</sub>	+
OFtest	F type
Rhamnose	+

Khuẩn lạc sau 16h/ 37°C: màu trắng, bóng, hơi ướt, φ 1.5 – 2.5mm, mép tròn, có ria ngoài mỏng

Tế bào: trực khuẩn mảnh, xếp đơn hoặc đôi

D-Glucose	+	Glycogene	+
D-Lyxose	-	Inositol	+
D-Mannose	+	Inuline	-
D-Raffinose	+	L- Sorbose	+
D-Tagatose	-	Lactose	+
D-Turanose	-/+	L-Arabinose	+/-
Dulcitol	+	L-Arabitol	-
Egg yolk reaction	-	L-Fucose	-
Erythritol	-	L-Xylose	-
Esculine	+	Maltose	+
Galactose	-/+	Mannitol	+
Gaspak test Anaer	-	Melezitose	-
Gaspaktest Aer	+	Melibiose	-/+
Gluconate	-/+	NaCl 7%	+/-
Glycerol	+	N-axetyl-Glucosamine	+
Sorbitol	+	Starch	+
Salicine	+	Saccharose	+
Ribose	+		

## Chủng CNTP 6003



Tên loài: *Bacillus subtilis*

Nguồn gốc: được bàn giao từ thể hệ trước

Ký hiệu cũ: D1

Ký hiệu mới: CNTP 6003

Trạng thái lưu trữ: lạnh sâu, đông khô, cấy truyền

Môi trường nuôi cấy Nutrient agar nhiệt độ: 37

### Đặc tính

2-Keto- Gluconate	-	D-Glucose	+	L- Sorbose	-
5-Keto- Gluconate	-	D-Lyxose	-	Lactose	-/+
Adonitol	-	D-Mannose	+	L-Arabinose	-
$\alpha$ -Metyl-D-Glucoside	+	D-Raffinose	+	L-Arabitol	-
$\alpha$ -Metyl-D-Mannoside	-	D-Tagatose	-	L-Fucose	-
Amygdaline	-/+	D-Turanose	-	L-Xylose	-
Arbutine	+/-	Dulcitol	-	Maltose	+
$\beta$ -Metyl-D-Xyloside	-	Erythritol	-	Mannitol	+
$\beta$ -Gentiobiose	+	Esculine	+	Melezitose	-
Cellobiose	+	Galactose	-	Melibiose	-
D- Xylose	-	Gluconate	-	N-axetyl-Glucosamine	+
D-Arabinose	-	Glycerol	-	Protease	+
D-Arabitol	-	Glycogene	-/+	Rhamnose	-
D-Fructose	+	Inositol	-/+	Ribose	+
D-Fucose	-	Inuline	-	Saccharose	+
Salicine	+/-	Trehalose	-	Xylitol	-
Sorbitol	+	Starch	+		

Khuẩn lạc sau 16h 37°C: từ trắng chuyển sang hồng nhạt, giữa bóng hơi nhô cao,  $\phi$  2- 5mm

Tế bào: trực khuẩn nhỏ, xếp đơn hoặc đôi có bào tử