

ĐA DẠNG SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA NẤM MEN ĐEN TRONG SẢN XUẤT ERYTHRITOL

ĐỖ THỊ THU HỒNG

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trước tình hình gia tăng của các chứng bệnh như tiểu đường, huyết áp cao, béo phì, nhu cầu về các loại thực phẩm “không béo”, “không đường”, “nghèo năng lượng” ngày càng trở nên cấp thiết. Erythritol là một trong các polyol được sử dụng để thay thế các loại đường giàu năng lượng trong nhiều loại thực phẩm và được coi là loại đường ăn kiêng cao cấp nhất hiện nay. Tác dụng của erythritol đã và đang được ứng dụng rộng rãi ở các nước trên thế giới như Mỹ, Nhật, Hàn Quốc, và một số nước châu Âu [6]. Việt Nam hiện chưa sản xuất được erythritol mà thường phải nhập khẩu từ nước ngoài để dùng làm nguyên liệu đầu vào cho một số ngành sản xuất bánh kẹo, thực phẩm chức năng, tuy nhiên giá nhập khẩu khá cao và nguồn cung thường không ổn định.

Erythritol có thể được sản xuất bằng con đường lên men nhờ vi sinh vật trong đó vi sinh vật thường dùng là một số chi nấm thuộc nhóm nấm men đen và một vài chủng vi khuẩn [1]. Do quá trình chuyển hóa glucose tạo erythritol ở vi khuẩn mất nhiều thời gian và không triệt để nên chúng tôi lựa chọn nghiên cứu đa dạng sinh học và khả năng sinh tổng hợp erythritol của nhóm nấm men đen phân lập trên địa bàn Hà Nội, Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Nấm men đen thường phân bố ở những nơi nhiều dầu, mỡ hoặc có nồng độ đường cao [1, 2]. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thu thập 93 mẫu ở các vị trí khác nhau trên địa bàn Hà Nội, trong đó gồm 66 mẫu mùn thối, 15 mẫu nhụy hoa, 12 mẫu dầu mỡ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu thu về được pha loãng tới nồng độ thích hợp sau đó cấy gạt trên môi trường malt-glucose 2°Bx (1% malt, 1% glucose, 1,5% agar, nước cất), nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong 7 ngày. Các khuẩn lạc nghi ngờ là nấm men đen được làm tiêu bản và soi dưới kính hiển vi Olympus BX51 ở độ phóng đại 400 lần, chụp ảnh thông qua camera kỹ thuật số Nikon 7.1 bằng phần mềm AMCap. Chọn lấy các khuẩn lạc đại diện tiến hành làm sạch và giữ giống.

Sau khi phân lập, chúng tôi phân nhóm các chủng nấm men dựa trên hình thái khuẩn lạc và tế bào. Các chủng có hình dạng, kích thước, màu sắc khuẩn lạc và tế bào tương đối giống nhau được đưa vào một nhóm. Tiếp theo, chọn ra các chủng đại diện cho mỗi nhóm khảo sát khả năng chuyển hóa đường tạo erythritol. Tiến hành theo các bước: làm giàu các chủng trong môi trường YM (3% cao malt, 3% cao nấm men, 5% pepton, 10% glucose, nước cất) ở nhiệt độ 30°C trong 3 ngày, bổ sung môi trường khảo sát khả năng chuyển hóa đường (3% cao nấm men, 5% pepton, 20% đường (glucose/sucrose/maltose), nước cất), phân tích canh trường bằng sắc ký bản mỏng tại các thời điểm: 0 ngày, 3 ngày, 5 ngày, 9 ngày với hệ dung môi ethyl acetate - acetic acid - H₂O (8:3:2, v/v/v), thuốc thử KMnO₄ 1%.

Chọn chủng có khả năng chuyển hóa đường tạo erythritol tốt nhất để khảo sát đặc điểm sinh lý, sinh hóa bao gồm: Ảnh hưởng của pH ban đầu, ảnh hưởng của nồng độ cơ chất glucose và ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy [5]. Tiến hành nuôi cấy các chủng trong điều kiện tối ưu vừa tìm được, thu canh trường sau đó xác định hàm lượng erythritol bằng phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng $\lambda = 210 \text{ nm}$ và phân tích trên sắc ký lỏng cao áp (Detector: RI, cột NH_2 dài 250 mm, tốc độ dòng 1 ml/phút, nhiệt độ phòng, hệ dung môi acetonitrile : $\text{H}_2\text{O} = 7 : 3$) [4].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và phân nhóm nấm men

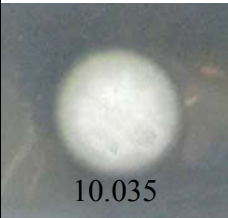
Các khuẩn lạc có màu sắc là các gam màu tối (nâu, xanh đen, đen...) hay các khuẩn lạc có màu trắng, nhưng bề mặt xốp, dễ gạt bằng que cấy được làm tiêu bản quan sát hình thái tế bào. Những chủng có tế bào gồm dạng hình cầu và hình que kèm theo đứt gãy nhiều được giữ lại để làm sạch và bảo quản trong các ống Cryotype sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Hình 1 mô tả kết quả phân lập mẫu 08, quan sát thấy có rất nhiều các khuẩn lạc có màu đen, bề mặt xốp phân bố đều trên bề mặt thạch, đây là hình thái khuẩn lạc điển hình của nhóm nấm men đen. Từ 93 mẫu khác nhau, chúng tôi đã phân lập được 161 chủng nấm men đen, trong đó mẫu mùn thối thu được số chủng nấm men nhiều hơn cả, mẫu dầu mỡ lấy trong các bếp nấu có rất ít có lẽ do đây là nơi nấu nướng có nhiệt độ cao nên nấm men phát triển kém.



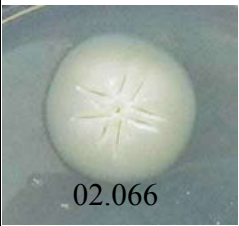
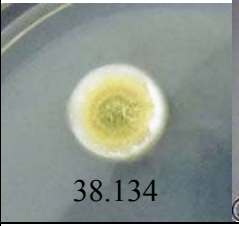
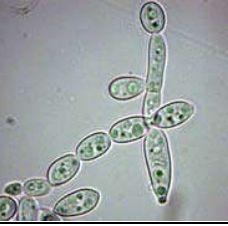
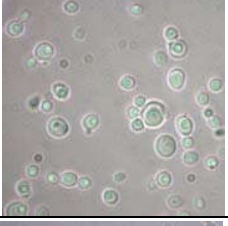
Hình 1. Kết quả phân lập mẫu 08 độ pha loãng 10^{-1}

Trong quá trình nghiên cứu thì phân nhóm là một bước quan trọng giúp việc khảo sát khả năng chuyển hóa đường đơn giản hơn. Các chủng được nuôi cấy trên cùng một loại môi trường, trong cùng một khoảng thời gian với các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm... tương tự để tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào dùng làm cơ sở để phân nhóm sơ bộ các chủng nấm men phân lập được.

Sau 1 tuần nuôi cấy, hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng khác nhau phân hóa khá rõ ràng và đa dạng, trong đó nhiều chủng có khuẩn lạc khác nhau nhưng tế bào lại có nhiều điểm tương đồng, ngược lại nhiều chủng có khuẩn lạc giống nhau nhưng lại có hình thái tế bào rất khác nhau. Kết quả đã thu được 24 nhóm nấm men đen. Hình 2 mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng đại diện cho mỗi nhóm. Như vậy, đối với nấm men đen, kết hợp quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào có thể đưa ra kết luận phân nhóm có độ tin cậy cao hơn.

TT	Khuẩn lạc	Tế bào	TT	Khuẩn lạc	Tế bào
1	 02.068		7	 39.190	
2	 63.153		8	 22.057	
3	 28.100		9	 39.191	
4	 78.047		10	 08.085	
5	 10.035		11	 17.042	
6	 11.028		12	 61.159	

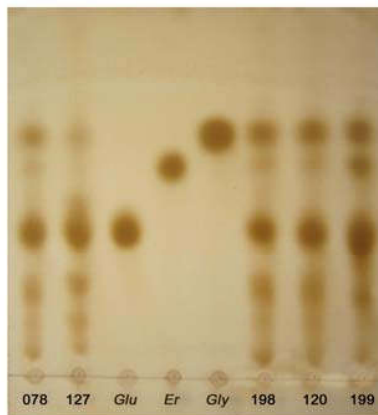
Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng nấm men đen đại diện cho các nhóm (độ phóng đại 400 lần)

TT	Khuẩn lạc	Tế bào	TT	Khuẩn lạc	Tế bào
13			19		
14			20		
15			21		
16			22		
17			23		
18			24		

Hình 2 (tiếp). Hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng nấm men đen đại diện cho các nhóm (độ phóng đại 400 lần)

3.2. Khảo sát khả năng chuyển hóa đường

Từ 24 nhóm, chúng tôi chọn ra 50 chủng đại diện để khảo sát khả năng chuyển hóa 3 loại đường gồm glucose, sucrose, maltose, thu canh trường ở các thời điểm khác nhau, sau đó tiến hành sắc ký bản mỏng để định tính và bán định lượng các polyol sinh ra. Qua khảo sát, thu được 12 chủng có khả năng chuyển hóa đường tạo erythritol trong đó chủng 38.131 chuyển hóa được cả 3 loại đường nhưng hiệu suất chuyển hóa không cao. Chủng 63.199 có hiệu suất chuyển hóa glucose tốt nhất, nên được chọn làm chủng đại diện để nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa.



Hình 3. Sắc ký đồ trên bản mỏng của một số chủng tạo Erythritol

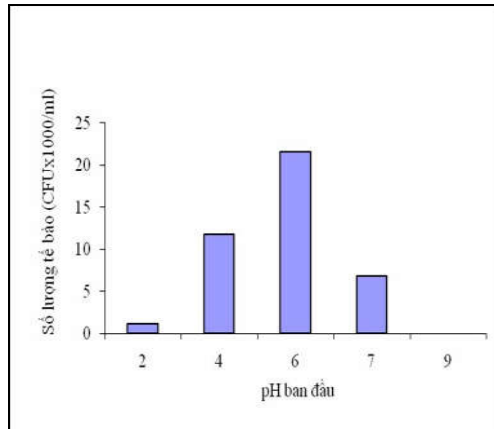
Bảng 1. Tổng hợp kết quả khảo sát khả năng chuyển hóa đường
(G - Glycerin; E - Erythritol; 0, 1, 2, 3 - Khả năng tạo polyol; Nd - Không phân tích)

TT	KH chủng	Glucose		Sucrose			Maltose
		5 ngày	9 ngày	3 ngày	5 ngày	9 ngày	5 ngày
1	31.108	G(1);E(1)	0	G(1)	G(1);E(1)	0	G(1)
2	54.198	G(1)	G(2);E(2)	Nd	G(1)	G(1)	G(1)
3	54.120	G(2);E(1)	0	G(3)	G(3)	0	G(3)
4	52.127	G(2)	G(2);E(1)	Nd	G(2)	0	G(1)
5	10.035	G(1)	G(1);E(1)	Nd	G(1)	G(1)	G(1)
6	63.153	G(2);E(1)	G(2);E(2)	0	G(2);E(1)	G(2);E(2)	G(1)
7	61.157	G(1)	0	G(1);E(1)	G(1);E(1)	0	G(1)
8	38.131	G(1);E(1)	G(2);E(2)	G(1)	G(1);E(1)	G(2);E(1)	G(1);E(1)
9	63.199	G(2);E(2)	G(3);E(3)	Nd	0	0	0
10	43.180	G(1);E(2)	G(2)	0	G(1);E(1)	0	0
11	56.129	G(2);E(1)	0	G(1)	G(2);E(1)	0	0
12	23.078	G(2);E(1)	G(3)	G(2);E(1)	G(2);E(2)	0	0
Tổng		8	6	2	7	2	1
		11		7			1

3.3. Nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hóa

3.3.1. Ảnh hưởng của pH ban đầu

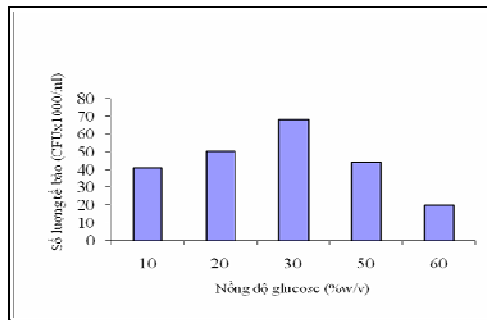
Tiến hành nuôi cấy chủng 63.199 như mô tả trong phần phương pháp. Bằng phương pháp pha loãng tới hạn, ghi nhận kết quả và xử lý số liệu chúng tôi xây dựng đồ thị ảnh hưởng của pH ban đầu lên quá trình sinh trưởng (hình 4). Như vậy, tại khoảng pH 6 chủng 63.199 phát triển tốt nhất. Đồng thời trong môi trường axit (tại khoảng pH từ 4 đến 6) chủng sinh trưởng tốt hơn hẳn so với môi trường trung tính và bazơ. Điều này hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu trước đây về tính ưa axit của các chủng thuộc chi *Moniliella* [3].



Hình 4. Ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh trưởng của chủng 63.199

3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ glucose

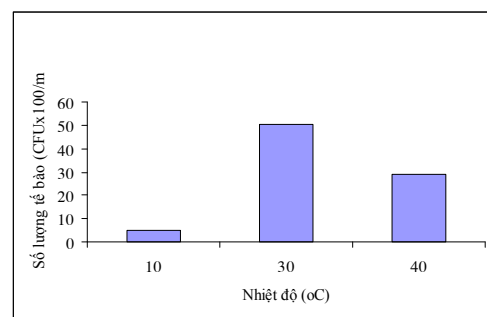
Các chủng nấm men thuộc chi *Moniliella* có khả năng sinh trưởng tại những nơi có nồng độ đường rất cao [3]. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn dải nồng độ glucose từ 10% đến 60% để khảo sát tìm khoảng nồng độ phù hợp. Qua đồ thị, có thể thấy chủng sinh trưởng tốt trong khoảng nồng độ glucose từ 10% đến 50%, trong đó nồng độ 30% cho kết quả tốt nhất và khả năng phát triển của chủng chỉ thực sự bị ảnh hưởng tại nồng độ 60%.



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ glucose đến khả năng sinh trưởng của chủng 63.199

3.3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Tương tự như các nhóm nấm men khác, nấm men thuộc chi *Moniliella* cũng bị tác động khá rõ rệt bởi nhiệt độ. Nghiên cứu cho thấy, nhiệt độ tối ưu cho quá trình sinh trưởng của chủng 63.199 là khoảng nhiệt độ 30°C. Kết quả này có thể dùng làm cơ sở trong việc chọn thời điểm thu thập mẫu cũng như chọn nhiệt độ cho quá trình lên men.



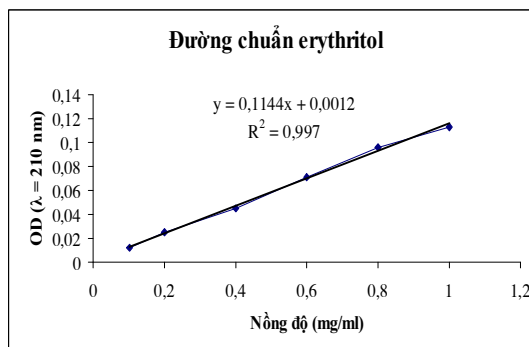
Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng của chủng 63.199

Như vậy, chủng 63.199 có nhiều đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào cũng như đặc tính sinh lý, sinh hóa điển hình của chi *Moniliella* như: khuẩn lạc xốp, ban đầu màu trắng kem sau chuyển sang vàng đậm và nâu, tế bào có kích thước lớn, đa hình gồm hình ovan và hình que xếp chuỗi kèm theo đứt gãy nhiều [7], chủng có khả năng sinh trưởng trong môi trường có pH axit, nồng độ đường cao, ở nhiệt độ khoảng 30°C. Vì vậy, có thể bước đầu khẳng định chủng 63.199 thuộc chi *Moniliella*.

3.4. Định lượng erythritol trong canh trường

Định lượng bằng phương pháp đo mật độ quang

Sau khi khảo sát các bước sóng trong dải từ 190 nm đến 850 nm, chúng tôi xác định bước sóng hấp thụ tốt nhất của erythritol là $\lambda = 210$ nm đồng thời, xây dựng phương trình tuyến tính $y = 0,1144x + 0,0012$ với độ tin cậy 99,7%. Trên cơ sở đó, xác định được nồng độ erythritol có trong canh trường là 41,78 mg/ml.



Hình 7. Đường chuẩn erythritol

Định lượng bằng sắc ký lỏng cao áp

Qua phân tích canh trường trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp chúng tôi thu được kết quả canh trường có chứa hàm lượng erythritol là 34,9 mg/ml. Kết quả này không khác nhiều so với kết quả định lượng bằng phương pháp đo mật độ quang, sự chênh lệch kết quả giữa hai phương pháp có thể do một số nguyên nhân như: Thao tác tiến hành thí nghiệm, dụng cụ và trang thiết bị, bước làm sạch canh trường trước khi đưa vào phân tích chưa triệt để nên canh trường có thể còn nhiều tạp chất có cùng bước sóng hấp thụ cực đại với erythritol mà phương pháp đo mật độ quang không phát hiện được... So sánh với các nghiên cứu tương tự trên thế giới, theo báo cáo của Hee Jung Moon và cộng sự (2010) sau 9 ngày lên men liên tục, đã thu được canh trường có hàm lượng erythritol là 95,7 mg/ml. Như vậy, kết quả đề tài có thể được ghi nhận là bước đầu nghiên cứu quy trình sản xuất erythritol ở quy mô phòng thí nghiệm.

IV. KẾT LUẬN

1. Đã phân lập được 161 chủng nấm men đen được phân thành 24 nhóm theo hình thái khuẩn lạc, tế bào nghi ngờ thuộc chi *Moniliella* từ 93 mẫu khác nhau.
2. Đã thu được 12 chủng có khả năng tạo erythritol, trong đó chủng 38.131 chuyển hóa được 3 loại đường, gồm glucose, sucrose, maltose, chủng 63.199 có hiệu suất chuyển hóa glucose cao nhất.
3. Chủng 63.199 có nhiều đặc điểm điển hình của chi *Moniliella*, sinh trưởng tốt nhất tại pH 6, nồng độ glucose 30% và nhiệt độ 30°C. Chủng tạo erythritol với nồng độ tương đối cao nên có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hee Jung Moon, In Won Kim, Jung Kul Lee, *Biotechnological production of erythritol and its applications*, Microbiol Biotechnol, 2010.
2. Waldermar Rymowicz, Matar Marcinkiewicz, *High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of Yarrowia lipolytica*, Biotechnol Lett, 2008.
3. Jung Kul Lee, *Increased erythritol production in fed-batch cultures of Torula sp. by controlling glucose concentration*, Journal of industrial Microbiology and Biotechnology, 2001.
4. Shie-Jea Lin, Chiou-Yen Wen, Pei-Ming Wang, *High-level production of erythritol by mutants of osmophilic Moniliella sp*, Process Biochemistry, 2010.
5. Laxman S. Savergave, Ramchandra V. Gadre, *Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from Candida magnoliae mutant R23*, Biochemical Engineering Journal, 2011.
6. European commission (3/2003), *Opinion of the scientific committee on food on erythritol*, Belgium.
7. L. Dooms, G. L. Hennebert and H. Verachtert, *Polyol synthesis and taxonomic character in the genus Moniliella*, Antonie van Leeuwenhoek, 1971, 37, tr.107-118.

SUMMARY

BIODIVERSITY AND THE APPLICATION OF BLACK YEASTS IN ERYTHRITOL PRODUCTION

This study isolated erythritol - producing yeast strains. A total of 161 strains of the black yeasts were isolated from dust scattered samples and pollens. Twelve yeast strains of the genus *Moniliella* produced erythritol, among which strain 63.199 produced erythritol in good yields. This strain was good grown in a medium containing 30% glucose, at pH 6 and temperate 30°C. We used thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and optical density (OD) method to analyse erythritol in the culture. After 9 days cultured, the strain 63.199 has high erythritol yield should be able to use it for further researchs.

Keywords: Erythritol, Moniliella, polyol, functional foods.

Nhận bài ngày 09 tháng 01 năm 2014

Hoàn thiện ngày 26 tháng 02 năm 2014

Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga