

LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Ban Khoa học & HTQT và KOPIA đã hỗ trợ nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trần Bích Lam, Vương Bảo Thy**, 2003. Nghiên cứu chế tạo màng polyme sinh học. *Báo cáo khoa học - Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*. NXB Khoa học kỹ thuật Hà Nội 12/2003: 459-462.
- Miguel, G.A., and Álvarez-López, C.**, 2020. Extraction and antioxidant activity of sericin, a protein from silk. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23: e2019058. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.05819>.
- Puangphet, A., Tiyaboonchai, W. and Thongsook, T.**, 2015. Inhibitory effect of sericin hydrolysate on polyphenol oxidase and browning of fresh-cut products. *International Food Research Journal*, 22 (4): 1623-1630.
- Warwicker, J.O.**, 1954. The crystal structure of Silk fibroin. *Acta Crystallographica*, 7: 565.
- Sah, M.K., Pramanik, K.**, 2010. Regenerated Silk Fibroin from *B. mori* Silk Cocoon for Tissue Engineering Applications. *International Journal of Environmental Science and Development*, 1: 404.
- Sashina, E.S., Bochek, A.M., Novoselov, N.P., Kirichenko, D.A.**, 2006. Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 79: 869-876. 10.1134/S1070427206060012.
- Huang, W., Ling, S., Li, C., Omenetto, F.G., Kaplan, D.L.**, 2018. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chemical Society Reviews* 2018, 47: 6486-6504.

Study on extraction of silk protein from cocoon

Le Hong Van, Pham Thi Phuong, Nguyen Thi Nhài,
Hong Seung Gil, Hyun Jong Nae, Park Kwang Geun, Nguyen Huu Duong

Abstract

This paper presents the results of extracting sericin and fibroin which are proteins in silk and then processing them into powder form. After investigating 3 methods: using Na_2CO_3 salt, neutral soap, high temperature and high pressure, the method of heating at 126°C , 0.14 MPa pressure, after 5 hours was used to separate sericin and fibroin. Several methods of solubilization of fibroin have been studied, depending on the intended use, and the hydrolysis method using hydrochloric acid (HCl) as a solubilizing agent has been determined. The silk protein powder was obtained by freezing at -50°C for 24 hours. The obtained sericin and fibroin powders were dry, easily soluble in water, and ready for cosmetic industry applications.

Keywords: Cocoon, silk protein, sericin, fibroin

Ngày nhận bài: 08/12/2021

Ngày phản biện: 10/01/2022

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Thông

Ngày duyệt đăng: 15/02/2022

ẢNH HƯỞNG CỦA QUÁ TRÌNH LÊN MEN CẤP DƯỠNG TỚI SỰ TẠO SINH KHỐI VÀ CỒN CỦA *Saccharomyces boulardii* SỬ DỤNG DỊCH CHIẾT MALT ĐẠI MẠCH

Khuất Bích Phượng¹, Hồ Phú Hà¹, Từ Việt Phú¹,
Chu Kỳ Sơn¹, Nguyễn Tiến Thành^{1*}

TÓM TẮT

Saccharomyces boulardii là nấm men probiotic được sử dụng nhiều trong các sản phẩm thuốc hỗ trợ tiêu hoá. Cho tới nay cũng đã có khá nhiều nghiên cứu ứng dụng *Saccharomyces boulardii* làm chủng khởi động trong các sản phẩm thực phẩm lên men. Để có thể đánh giá khả năng ứng dụng *S. boulardii* cho việc tạo ra một sản phẩm đồ uống có độ cồn thấp, nghiên cứu này xác định ảnh hưởng của các phương án lên men theo mẻ (không cấp dưỡng) (batch fermentation) và lên men cấp dưỡng (fed-batch fermentation) tới sự tạo thành sinh

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

* E-mail: thanh.nguyentien@hust.edu.vn

khối và cồn của nấm men trong quá trình lên men. Dựa trên một dịch chiết malt, thực hiện các phương án cấp dưỡng với tốc độ khác nhau: 1 L/h, 0,5 L/h và 0,25 L/h kết hợp sục không khí vô trùng cho thấy, khi lên men cấp dưỡng với tốc độ 0,25 L/h, nồng độ cồn sinh ra giảm khoảng 20% so với lên men theo mẻ không cấp dưỡng, đồng thời mật độ nấm men tăng lên rõ rệt, cao nhất đạt $25,5 \times 10^7$ tế bào/mL, gấp 2,6 lần, so với lên men theo mẻ không cấp dưỡng đạt $9,1 \times 10^7$ tế bào/mL. Kết quả cũng cho thấy có thể sử dụng kỹ thuật lên men cấp dưỡng với dịch chiết malt để giảm độ cồn và tăng mật độ sinh khối nấm men probiotic *Saccharomyces boulardii* định hướng cho phát triển sản phẩm có độ cồn thấp trên nền dịch chiết malt đại mạch.

Từ khóa: *Saccharomyces boulardii*, độ uống độ cồn, probiotic, lên men cấp dưỡng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Saccharomyces boulardii (Sb) là loại nấm men duy nhất được coi là probiotic được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm thuốc hỗ trợ tiêu hoá và như một chất bổ sung vào chế độ ăn uống (Lazo-Vélez *et al.*, 2018). Các nghiên cứu ứng dụng của Sb trong sản xuất các sản phẩm thực phẩm cũng đã và đang được quan tâm, trong đó phổ biến là các sản phẩm từ sữa, nước trái cây và các loại đồ uống lên men có cồn, ngũ cốc, các loại đậu và sản phẩm từ chúng. Sb được chỉ ra có khả năng lên men tạo cồn và CO₂ tương đối phù hợp cho các sản phẩm lên men, ngoài ra chúng có thể tạo ra các thành phần khác có giá trị như axit gamma-amino butyric (GABA), các vitamin B, isoflavone và phenol (Lazo-Vélez *et al.*, 2018).

Nấm men nói chung và Sb nói riêng, khi chuyển hoá đường sẽ tạo sinh khối, ethanol và CO₂. Việc ứng dụng Sb vào các sản phẩm lên men với vai trò là chủng khởi động cũng như probiotics bổ sung thì cần chú ý tạo sinh khối cho sản phẩm, nhưng độ cồn vừa phải (hoặc thấp) để tăng lợi ích của sản phẩm. Hiệu ứng Crabtree được quan sát thấy với nấm men *Sacharomyces*, khi lên men được trong môi trường hàm lượng đường cao, các tế bào có xu hướng chuyển hoá đường thành ethanol (lên men), thay vì hô hấp (respiration) qua chu trình TCA, ngay cả khi có mặt oxy (Perez-Samper *et al.*, 2018). Do vậy, trong nuôi cấy thu nhận sinh khối nấm men, kỹ thuật cấp dưỡng (fed-batch) được áp dụng để duy trì hàm lượng đường trong dịch lên men thấp kết hợp sục khí để hạn chế sự lên men tạo cồn của nấm men, đồng thời tạo nhiều sinh khối hơn (El Enshasy and Shereef, 2008).

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật lên men cấp dưỡng kết hợp với sục khí được sử dụng để thực hiện quá trình lên men dịch đường trích ly từ malt đại mạch nhằm đánh giá sự tạo thành sinh khối

và cồn của chủng Sb, định hướng tạo sản phẩm đồ uống có cồn thấp chứa nấm men probiotic.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Khuẩn lạc chủng nấm men probiotic *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (viết tắt Sb) được thu nhận từ chế phẩm Bioflora (Biocodex, Pháp) thông qua phương pháp cấy vạch trên đĩa thạch YPD (cao nấm men 1%, peptone 2%, glucose 2%, agar 1%). Khuẩn lạc đã được kiểm chứng là *S. boulardii* thông qua đặc điểm phân giải galactose chậm đặc trưng của loài này kết hợp với giải trình tự ITS (không mô tả trong nghiên cứu này). Các khuẩn lạc được bảo quản ở 4°C trên môi trường thạch YPD để sử dụng cho hoạt hoá và lên men.

Môi trường hoạt hoá và nhân men là dịch chiết thu nhận từ malt Pilsner (Weyermann, Đức). Malt được nghiền và phối trộn với nước 65°C theo tỷ lệ malt : nước là 1 : 5, giữ ở nhiệt độ này trong 1 giờ. Hỗn hợp được nâng lên 76°C đem lọc thu dịch trong và bổ sung nước về nồng độ chất hoà tan 10°Bx. Khi sử dụng, dịch chiết này được tiệt trùng ở 110°C trong 30 phút. Khi hoạt hoá, khuẩn lạc nấm men được nuôi trong 50 mL môi trường này ở 25°C, lắc 120 vòng/phút trong 24 h. Từ dịch hoạt hoá này, nấm men tiếp tục được nhân giống ở thể tích 200 mL trong điều kiện tương tự nhưng với thời gian 10 - 12 h.

Để thu dịch đường cho lên men, malt nghiên cứu được phối trộn với nước ở 78°C theo tỷ lệ malt : nước = 1 : 5 trong 30 phút, sau đó lọc và rửa bã với nước 78°C đến khi thu được dịch đường có nồng độ chất hoà tan 5,5°P. Sau đó, dịch đường được sôi ở 100°C trong 60 phút để vô hoạt vi sinh. Kết thúc sôi, điều chỉnh nồng độ dịch đường về 5,5°P bằng nước vô trùng. Làm nguội dịch về 25°C, đưa vào

các bình lên men đã được sát khuẩn để tiến hành các thí nghiệm lên men tại nhiệt độ này.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lên men

Các thí nghiệm lên men cấp dưỡng được thực hiện ở 25°C, mật độ tế bào cấp vào đầu quá trình là 10^7 tế bào/mL. Tổng thể tích dịch lên men của các thí nghiệm đều là 5 L với lượng dịch ban đầu là 1,5 L. Tại thời điểm sau khi tế bào vào pha cân bằng, lúc hàm lượng đường lên men chính (gồm maltose và glucose) còn lại không đáng kể (tại 10 giờ – theo dữ liệu thu được từ thí nghiệm lên men theo mẻ không cấp dưỡng), phần dịch đường còn lại (3,5 L) bắt đầu được bổ sung vào với các tốc độ khác nhau: 1 L/giờ, 0,5 L/giờ và 0,25 L/giờ bằng bơm nhu động. Không khí vô trùng được cấp vào dịch lên men với tốc độ sục 0,5 L/phút trong 5 phút, sau đó nghỉ 5 phút trước khi sục khí trở lại, trong toàn bộ thời gian cấp dưỡng.

Song song với thí nghiệm lên men cấp dưỡng, thí nghiệm lên men theo mẻ không cấp dưỡng cũng được thực hiện, trong đó toàn bộ 5 L môi trường lên men được sử dụng ngay từ đầu và không sục khí trong quá trình lên men.

Các thí nghiệm được thực hiện lặp 2 lần. Trong quá trình làm các thí nghiệm lên men, tiến hành lấy mẫu định kỳ tới 24 - 30 h (tùy thuộc tốc độ cấp dưỡng) để đo các chỉ tiêu: pH, mật độ tế bào nấm men, phân tích thành phần đường chính có trong dịch lên men gồm maltose, glucose và ethanol.

2.2.2. Phương pháp phân tích

Mật độ tế bào nấm men được đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu. Nồng độ chất hoà tan (°P) được đo bằng dụng cụ Baume kế. Nồng độ đường maltose, glucose, axit hữu cơ và cồn trong mẫu được xác định bằng phương pháp Sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, sử dụng hệ thống Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA), cột Aminex HPX-87H (Biorad, USA), đầu đo tín hiệu RID. Pha động được sử dụng là dung môi H_2SO_4 10mM với tốc độ 0,5 mL/phút, nhiệt độ cột 60°C. Mẫu từ quá trình lên men được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong thời gian 10 phút ở 4°C, để thu dịch nổi. Dịch nổi được lọc qua màng 0,2 μm và dùng để phân tích HPLC.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

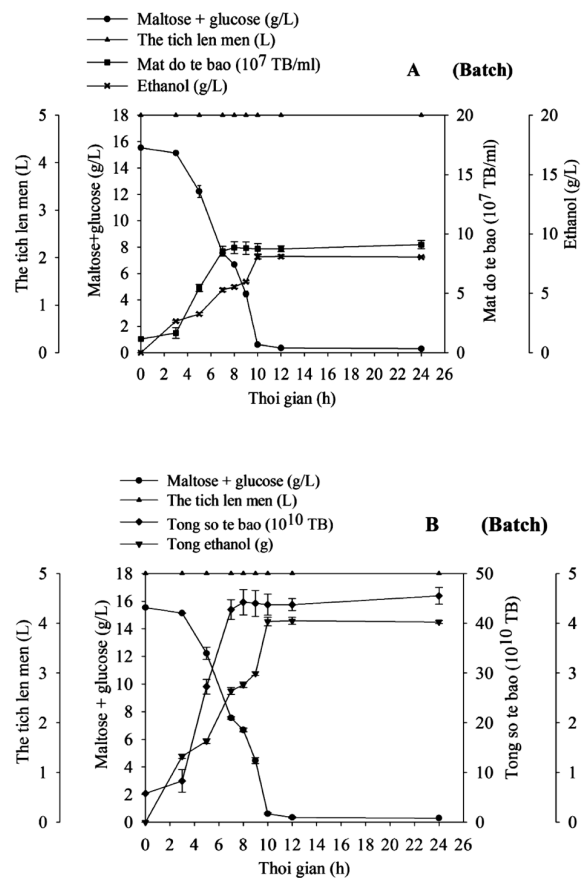
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 04 năm 2021 đến tháng 09 năm 2021 tại Trung tâm Nghiên

cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học - Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lên men gián đoạn

Chủng *S. boulardii* được lên men theo mẻ không cấp dưỡng trong 24 giờ theo dõi. Sự chuyển hóa đường maltose, glucose, sinh khối nấm men và cồn trong quá trình lên men này được thể hiện trên hình 1. Có thể thấy, đường maltose và glucose là các đường chính trong dịch đường, dễ sử dụng nên giảm nhanh từ 15,53 g/L xuống dưới 0,61 g/L tại thời điểm 10 giờ. Cùng với sự giảm đường, mật độ nấm men tăng từ 1×10^7 tế bào/mL lên $8,85 \times 10^7$ tế bào/mL tại 8 giờ và bước vào pha cân bằng.



Hình 1. Sự thay đổi của các thông số trong 24 giờ lên men theo mẻ không cấp dưỡng

Mật độ tế bào sau đó được duy trì trong khoảng $8,5 - 9,1 \times 10^7$ tế bào/mL đến hết 24 h theo dõi (Hình 1A). Trong điều kiện lên men theo mẻ không cấp dưỡng, nấm men lên men tạo cồn, thu năng lượng và hình

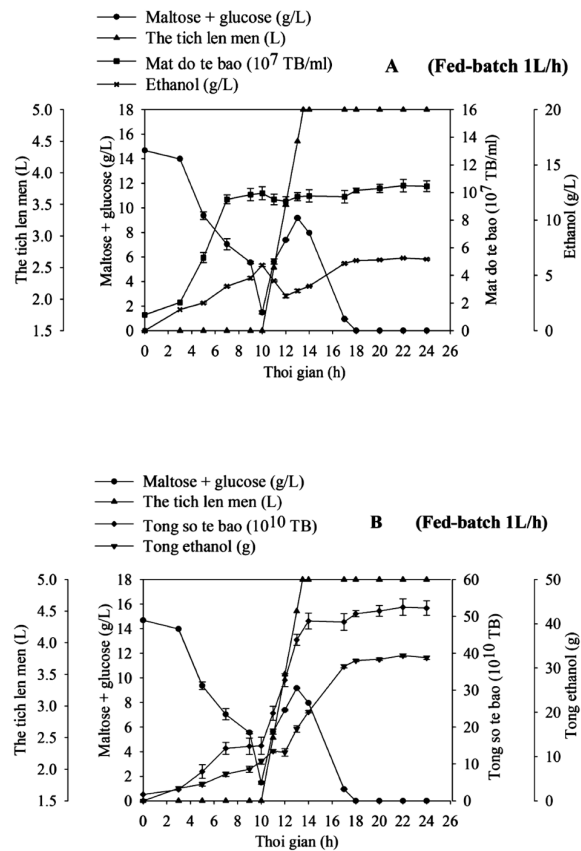
thành sinh khối, nên ethanol được tạo ra cùng với sự phát triển của nấm men nhưng chậm hơn và kết thúc tăng tại thời điểm 10 h (đạt 8,07 g/L). Với tổng 5 lít dịch lên men, lượng tế bào tạo ra đạt cao nhất 44×10^{10} - 45×10^{10} tế bào, tương ứng với tổng lượng ethanol tạo ra đạt 40,35 g (Hình 1B).

3.2. Lên men cấp dưỡng

Việc sử dụng nồng độ đường lên men cao thường ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm men, ngoài ra có thể gây hiệu ứng Crabtree hướng tế bào theo con đường lên men thay vì hô hấp ngay cả có mặt oxy, gây tăng hàm lượng cồn và giảm lượng sinh khối (Perez-Samper *et al.*, 2018). Trong phương án lên men cấp dưỡng, sau 10 h đầu lên men với lượng thể tích ban đầu 1,5 lít, tổng lượng đường maltose và glucose còn lại thấp (< 1 g/L) thì bắt đầu bổ sung dịch đường vào với các tốc độ khác nhau: 1 L/h, 0,5 L/h và 0,25 L/h, có kèm theo sục không khí vô trùng như đã mô tả. Quá trình cấp dưỡng diễn ra khi hết lượng dịch 3,5 lít còn lại cho tới khi đạt tổng lượng dịch 5 lít. Sự biến đổi các chỉ tiêu của quá trình lên men được thể hiện trên các hình 2, 3, 4.

Trong cả 3 thí nghiệm với các tốc độ cấp dưỡng sử dụng, 10 h trước khi bắt đầu cấp dưỡng, quá trình lên men diễn ra tương tự nhau. Đường maltose và glucose giảm nhanh từ ban đầu về dưới 1 g/L, mật độ tế bào nấm men tăng lên khoảng $9,0 \times 10^7$ - 10×10^7 tế bào/mL (Hình 2, 3, 4). Tương ứng hàm lượng cồn tạo ra trong khoảng 6 g/L (tại thời điểm 10 h). Sau thời điểm này, khi dịch đường được cấp vào dịch lên men với các tốc độ khác nhau thì sự vận động của các tế bào nấm men đã diễn ra khác nhau.

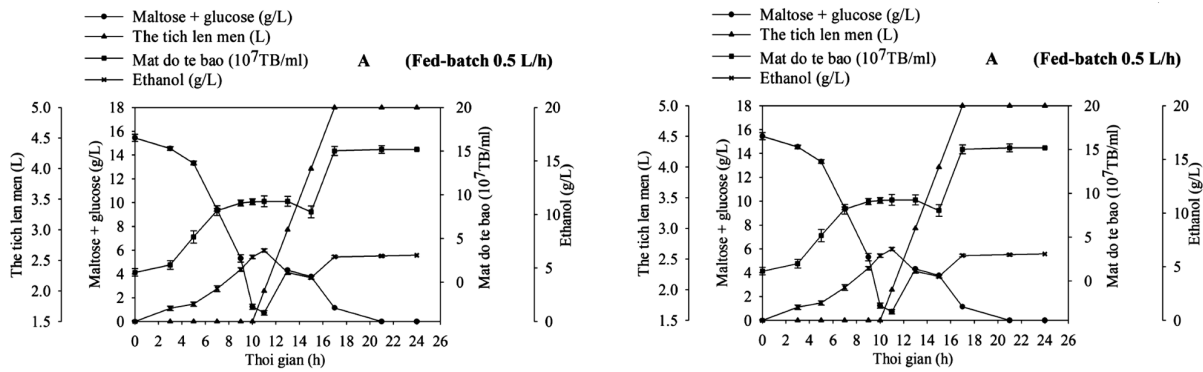
Đối với tốc độ 1 L/h, chỉ mất khoảng 3,5 h để cấp hết lượng dịch còn lại, lượng đường cấp thêm vào cho nấm men khá nhanh so với khả năng tiêu thụ của chúng nên lượng đường maltose + glucose tăng lên 9 g/L (tại thời điểm 13 h) (Hình 2A). Nấm men tiếp tục sử dụng đường này để tạo sinh khối và tạo cồn. Nồng độ ethanol sau khi tiếp dịch vào giảm đi do pha loãng và sau đó lại tăng trở lại khi nấm men tạo ra cồn từ đường bổ sung thêm, đạt nồng độ 6,5 g/L. Trong khi đó mật độ tế bào chỉ có sự giảm nhẹ và tiếp tục được duy trì trong khoảng $9 - 10,5 \times 10^7$ tế bào/mL (Hình 2A). Tính trên thể tích của dịch lên men, tổng lượng tế bào tăng dần và đạt $48 - 52 \times 10^{10}$ tế bào. Tổng lượng ethanol tạo ra đạt 32 - 33 g (Hình 2B).



Hình 2. Sự thay đổi của các thông số trong 24 giờ lên men cấp dưỡng tốc độ 1 L/h

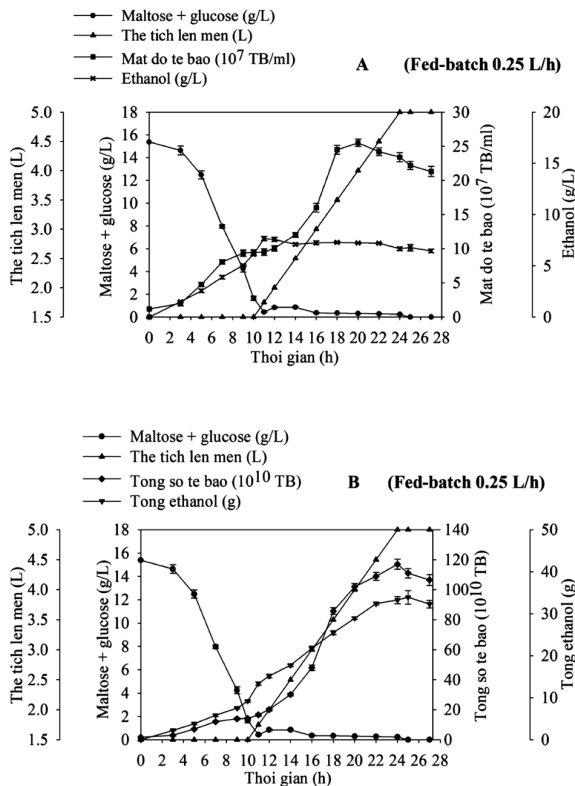
Với tốc độ cấp dưỡng 0,5 L/h (Hình 3), lượng đường được bổ sung thêm vào dịch chậm hơn, nên nồng độ đường maltose + glucose chỉ tăng lên 4 g/L sau đó giảm dần (Hình 3A). Mật độ tế bào giảm nhẹ từ 9×10^7 tế bào/mL, xuống khoảng 8×10^7 tế bào/mL, sau đó lại tăng nhanh và đạt 15×10^7 tế bào/mL (tại 17 h lên men). Cùng với đó là hàm lượng ethanol cũng giảm nhẹ về 6 g/L tại 15 h và sau đó tăng nhẹ lên khoảng 6,2 g/L từ 17 h trở đi. Tổng lượng tế bào tạo ra với tốc độ cấp dịch 0,5 L/h đạt 75×10^{10} - 76×10^{10} tế bào, cao hơn so với tốc độ cấp dịch 1 L/h và gián đoạn. Tổng lượng ethanol tạo ra (31 g) có sự giảm nhẹ không đáng kể so với tốc độ 1 L/h (Hình 3B).

Ở tốc độ cấp dịch thấp nhất trong nghiên cứu này là 0,25 L/h, thời gian cấp dịch kết thúc 24 h. Với tốc độ cấp dịch thấp, lượng đường được đưa vào chậm, kết hợp với việc nấm men sử dụng nên nồng độ đường maltose + glucose trong dịch gần như được duy trì ở mức quanh giá trị < 1 g/L, kết hợp với việc sục khí làm mật độ tế bào nấm men



Hình 3. Sự thay đổi của các thông số trong 24 giờ lên men cấp dưỡng tốc độ 0,5 L/h

tăng lên mạnh mẽ, đạt $25,5 \times 10^7$ tế bào/mL tại 20 h (Hình 4A). Cùng với đó, nồng độ cồn có xu hướng giảm nhẹ về cuối quá trình lên men (Hình 4A). Tính trên tổng thể tích dịch lên men, lượng tế bào nấm men tạo ra trong trường hợp này đạt 117×10^{10} tế bào (Hình 4B), gấp 2,6 lần so với lên men gián đoạn, tuy nhiên tổng lượng ethanol tạo ra tương đương so với các tốc độ cấp dịch lớn hơn (khoảng 32 g ethanol) (Hình 4B).



Hình 4. Sự thay đổi của các thông số trong 24 giờ lên men cấp dưỡng tốc độ 0,25 L/h

Với đặc tính probiotics, nấm men *Sb* đã được nghiên cứu nhiều về điều kiện nuôi cấy, kỹ thuật lên men (trong đó bao gồm cả cấp dưỡng) đối với khả năng tạo sinh khối của nấm men này (El Enshasy and Shereef, 2008). Các nghiên cứu hầu hết sử dụng môi trường lên men tổng hợp gồm đường glucose và các thành phần tổng hợp. Nghiên cứu này sử dụng dịch chiết malt đại mạch, nguyên liệu thường sử dụng để làm đồ uống có cồn để nuôi cấy *Sb*, định hướng sử dụng dịch sau lên men làm đồ uống có cồn chứa mật độ tế bào nấm men cao. *Sb* cũng đã được ứng dụng trong sản xuất đồ uống lên men có cồn (Capece *et al.*, 2018; Mulero-Cerezo *et al.*, 2019; Senkarcinova *et al.*, 2019; De Paula *et al.*, 2021). Tuy nhiên, chưa có công bố nào sử dụng kỹ thuật lên men cấp dưỡng trên nền dịch đường trích ly từ malt. Trong nghiên cứu này, việc cấp dưỡng với các tốc độ khác nhau kết hợp sục khí đã tăng đáng kể mật độ tế bào nấm men và giảm được nồng độ ethanol tạo thành so với lên men theo mẻ không cấp dưỡng. Đặc biệt, việc cấp dưỡng với tốc độ 0,25 L/h so với lên men gián đoạn đã tăng 2,6 lần lượng tế bào tạo (117×10^{10} tế bào so với 45×10^{10} tế bào), giảm được 20% lượng ethanol tạo thành (32 g ethanol so với 40 g ethanol). Việc sử dụng 1 nhiệt độ đường hóa ở 78°C/30 phút để hạn chế hoạt động của các enzyme thủy phân tinh bột có trong malt đại mạch (Evans *et al.*, 2005), nên lượng đường có thể lên men được tạo ra thấp, kết hợp với việc cấp dưỡng từ từ và sục khí đã giảm được lượng ethanol tạo ra trong dịch lên men dưới 1% v/v. Theo các khuyến cáo của Liên minh Châu Âu về dinh dưỡng và sức khỏe thì nồng độ cồn dưới 1,2% không gây ảnh hưởng tới sức khỏe. Nồng độ cồn dưới 1% cũng tạo giá trị cảm quan tốt cho sản phẩm. Ngoài ra, axit acetic tạo ra bởi *Sb* trong nghiên cứu này ở mức độ thấp (kết quả này không được báo cáo), do vậy sẽ không gây vị chua khó chịu cho đồ uống sau này.

IV. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, dựa trên nền dịch chiết malt đại mạch, kỹ thuật lên men cấp dưỡng kết hợp với sục khí đã được áp dụng cho quá trình lên men với chủng *Saccharomyces boulardii* nhằm đánh giá sự hình thành cồn và sinh khối của chúng. Việc lên men cấp dưỡng và kết hợp sục khí đã cải thiện đáng kể sự hình thành sinh khối nấm men và giảm lượng cồn tạo ra so với lên men theo mẻ không cấp dưỡng. Kết quả cho thấy tiềm năng của *Sb* để tạo đồ uống có cồn thấp chứa probiotic trên nền nguyên liệu malt đại mạch, mặc dù vậy vẫn cần có các đánh giá chi tiết về thành phần tạo hương được tạo ra bởi *S. boulardii*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Capece, A., R. Romaniello, A. Pietrafesa, G. Siesto, R. Pietrafesa, M. Zambuto and P. Romano, 2018. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*, 284: 22-30.
- De Paula, B., H. Lago, L. Firmino, W.J. Lemos Junior, M. Corrêa, A. Guerra, K. Pereira and M.A. Coelho, 2021. Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for potential probiotic wheat beer development. *LWT- Food Science and Technology*: 110233.
- El Enshasy, H. and A.A. Shereef, 2008. Optimization of high cell density cultivation of (Probiotic/Biotherapeutic) yeast *Saccharomyces boulardii* adapted to dryness stress. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht*, 104: 389-394.
- Evans, D.E., H. Collins, J. Eglinton and A. Wilhelmson, 2005. Assessing the Impact of the Level of Diastatic Power Enzymes and Their Thermostability on the Hydrolysis of Starch during Wort Production to Predict Malt Fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63 (4): 185-198.
- Lazo-Vélez, M. A., S.O. Serna-Saldívar, M.F. Rosales-Medina, M. Tinoco-Alvear and M. Briones-García, 2018. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 125 (4): 943-951.
- Mulero-Cerezo, J., Á. Briz-Redón and Á. Serrano-Aroca, 2019. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production. *Applied Sciences*, 9: 3250.
- Perez-Samper, G., B. Cerulus, A. Jariani, L. Vermeersch, N. Barrajon Simancas, M. Bisschops, J. Brink, D. Solis-Escalante, B. Gallone, D. Maeyer, E. Bael, T. Wenseleers, J. Michiels, K. Marchal, P. Daran-Lapujade and K. Verstrepen, 2018. The Crabtree Effect Shapes the *Saccharomyces cerevisiae* Lag Phase during the Switch between Different Carbon Sources. *mBio*, 9 (5): e01331-18.
- Senkarcinova, B., I.A. Graça Dias, J. Nespór and T. Branyik, 2019. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *LWT- Food Science and Technology*, 100: 362-367.

Effect of fed-batch fermentation on ethanol formation and biomass of *Saccharomyces boulardii* in barley malt-based wort

Khuat Bich Phuong, Ho Phu Ha, Tu Viet Phu,
Chu Ky Son, Nguyen Tien Thanh

Abstract

Saccharomyces boulardii is a well-known probiotic yeast used in digestive aid products. So far, there have been a lot of studies on applying *S. boulardii* as a starter strain in fermented food products. In this study, the effects of batch and fed-batch fermentation methods on ethanol formation and yeast biomass during fermentation were investigated to evaluate the applicability of *S. boulardii* for the production of low-alcohol malt-based beverages. Based on a malt extract, containing low percentage of fermentable sugars, fed-batch fermentations with different feeding rates of 1 L/h, 0.5 L/h and 0.25 L/h combined with aseptic air aeration were performed. The results showed that, in the fed-batch fermentation, especially with a feeding rate of 0.25 L/h, the alcohol yield was decreased by about 20% compared to the batch fermentation, meanwhile the yeast cell density was of 25.5×10^7 cells/mL, significantly increased by 2.6-fold higher than that obtained in batch fermentation. The results also showed that the fed-batch fermentation technique with malt extract can be used to reduce alcohol content and increase the density of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*, orienting the development of low alcohol beverages from malt extract.

Keywords: *Saccharomyces boulardii*, low alcohol beverage, fed-batch fermentation, probiotics

Ngày nhận bài: 07/12/2021
Ngày phản biện: 14/01/2022

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Thanh Thủy
Ngày duyệt đăng: 15/02/2022

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG TRONG KIỂM SOÁT NẤM *Neoscytalidium dimidiatum* GÂY BỆNH ĐỐM NÂU TRÊN CÂY THANH LONG

Nguyễn Thành Hiếu¹, Nguyễn Ngọc Anh Thu¹, Ngô Thị Kim Thanh¹,
Nguyễn Văn Hòa¹, Đặng Thùy Linh¹, Nguyễn Hồng Sơn²,
Nguyễn Văn Tuất², Phan Thị Thu Hiền³, Phạm Bích Hiền^{2*}

TÓM TẮT

Bệnh đốm nâu thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây hại làm giảm năng suất quả; sử dụng thuốc bảo vệ thực vật có thể giảm nhanh triệu chứng bệnh nhưng ảnh hưởng xấu đến môi trường và an toàn thực phẩm. Mục đích của nghiên cứu này là xác định vi sinh vật có khả năng đối kháng trong kiểm soát nấm *N. dimidiatum*. Kết quả nghiên cứu đã xác định được 4 chủng vi khuẩn đạt mức đối kháng cao với nấm *N. dimidiatum*; hiệu suất đối kháng của *Pseudomonas* sp. PS5, *Bacillus amyloliquefaciens* 199, *Bacillus amyloliquefaciens* VK2 và *Pseudomonas* sp. PS2 tương ứng lần lượt là 71,93%; 65,05%; 63,22% và 61,97%. Phun dịch vi sinh vật đối kháng làm giảm tốc độ gia tăng kích thước vết bệnh và giảm mật độ nấm gây bệnh, trong đó phun *B. amyloliquefaciens* 199 và *T. harzianum*⁵⁴ có hiệu quả ức chế nấm cao nhất; kích thước vết bệnh không tăng thêm tại 14, 21 và 28 ngày sau phun, tăng thấp nhất tại 42 ngày sau phun. Hai chủng *B. amyloliquefaciens* 199, và *T. harzianum*⁵⁴ có triển vọng sử dụng trong nghiên cứu chế phẩm phòng trừ bệnh đốm nâu thanh long.

Từ khóa: Cây thanh long, vi sinh vật đối kháng, *N. dimidiatum*, bệnh đốm nâu

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đốm nâu còn gọi là đốm trắng, tắc kè, đốm ma do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây hại trên cây thanh long, bệnh thường xuất hiện trong mùa mưa, tấn công trên cành và quả, gây thất thu năng suất, thiệt hại nặng nề về kinh tế và ảnh hưởng đến xuất khẩu. Trong những năm vừa qua, diện tích thanh long nhiễm bệnh đốm nâu gia tăng rất nhanh, chiếm khoảng 50% tổng diện tích và mức độ thiệt hại từ 10 - 50% tùy từng vườn (Cục Bảo vệ thực vật, 2014; Lương Thị Duyên và ctv., 2014).

Để quản lý bệnh đốm nâu, nông dân đã phun xịt nhiều thuốc hóa học bảo vệ thực vật với nồng độ cao nhằm đem lại hiệu quả trừ bệnh nhanh nhưng hiệu quả không như mong muốn, đồng thời gây nguy cơ mất an toàn thực phẩm, ảnh hưởng đến môi trường, sức khỏe người trồng thanh long và rất có khả năng gia tăng tính kháng thuốc đối với mầm bệnh (Cục Trồng trọt, 2019; Võ Thị Thu Oanh, 2015). Kế thừa các kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học, điều kiện phát sinh phát triển bệnh đốm nâu trên cây thanh long của Viện Cây ăn quả miền Nam, nhóm nghiên cứu thực hiện đánh giá khả năng đối kháng nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long của một số nhóm vi sinh vật, mục đích nghiên cứu nhằm xác định được các

vi sinh vật có tiềm năng trong sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh đốm nâu hại thanh long.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu: Sử dụng bộ chủng vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm có khả năng đối kháng với một số vi sinh vật gây bệnh cây trồng do Viện Cây ăn quả miền Nam lưu giữ, bảo quản gồm các chủng có ký hiệu: 142, PS5, BS, VK2, PS1, PS3, VKTL, 199, VK3, PS2, PS4, 197, 113, PNT và các chủng nấm *Tricoderma harzianum*, *T. harzianum*⁵², *T. harzianum*⁵⁴, *T. harzianum*⁵⁶ và *T. harzianum*⁵⁸; Chủng nấm gây bệnh đốm nâu thanh long *Neoscytalidium dimidiatum* do Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam phân lập, định danh, lưu giữ, bảo quản tại Viện.

- Các mẫu cây, quả, môi trường nuôi cấy vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. Thiết bị và dụng cụ phục vụ cho nuôi cấy và thực hiện thí nghiệm trong phòng, nhà lưới và ngoài đồng. Các thí nghiệm được thực hiện tại Viện Cây ăn quả miền Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá hiệu quả ức chế của một số chủng vi sinh vật đối kháng nấm *N. dimidiatum* ở điều kiện *in vitro*: Theo phương pháp Dual Culture Technique

¹ Viện Cây ăn quả miền Nam

² Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

³ Khoa Sinh - KTNN, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

* E-mail: bichhienvaas@gmail.com