BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2022

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP β-GLUCAN TỪ CÁC CHỦNG NẤM MEN (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Thuộc nhóm ngành: Khoa học Tự nhiên

Lâm Đồng, 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

BÁO CÁO TỔNG KẾT

ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC SINH VIÊN NĂM 2022

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP β-GLUCAN TỪ CÁC CHỦNG NẤM MEN (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

Thuộc nhóm ngành: Khoa học Tự nhiên

Sinh viên thực hiện: Đinh Võ Tú Anh Nam, Nữ: Nữ

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: SHK44CLC – Khoa Sinh học Năm thứ: 02/Số năm đào tạo: 04

Ngành học: Công nghệ sinh học

Người hướng dẫn: Th.S. Nguyễn Khoa Trưởng

Lâm Đồng, tháng 5 năm 2022

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Lâm Đồng, ngày 20 tháng 05 năm 2022

BÁO CÁO KẾT QUẢ TỰ ĐÁNH GIÁ
ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ SINH VIÊN 2022

I. Thông tin chung về đề tài:

1. Tên đề tài: Nghiên cứu tổng hợp β-glucan từ các chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*)

2. Mục tiêu đề tài: Nghiên cứu tuyển chọn các chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) và xác định được các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy, lên men để tổng hợp β-glucan.

3. Chủ nhiệm đề tài: Đinh Võ Tú Anh

4. Giáo viên hướng dẫn: ThS. Nguyễn Khoa Trưởng

5. Tổng kinh phí thực hiện: 5.000.000 VNĐ (Bằng chữ: năm triệu đồng).

6. Thời gian thực hiện:

Bắt đầu: tháng 11 năm 2021

Kết thúc: tháng 05 năm 2022

7. Danh sách thành viên chính thực hiện đề tài nêu trên gồm:

STT	Họ và tên	Mã số SV	Lớp/ Khoa
1	Nguyễn Thị Như Hà	1812583	CSK42 – Khoa Sinh học
2	Dương Thị Cẩm Vân	1910236	CSK43 – Khoa Sinh học
3	Vũ Trung Duy	1911274	CSK43 – Khoa Sinh học
4	Trần Thị Tường Vân	2011319	SHK44CLC – Khoa Sinh Học
5	Đinh Võ Tú Anh	2012325	SHK44CLC – Khoa Sinh Học

II. Nội dung tự đánh giá về kết quả thực hiện đề tài:

1. Về sản phẩm khoa học:

1.1. Danh mục sản phẩm đã hoàn thành:

STT	Tên sản phẩm	Số lượng			Khối lượng			Chất lượng		
		Xuất sắc	Đạt	Không đạt	Xuất sắc	Đạt	Không đạt	Xuất sắc	Đạt	Không đạt
1	Chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (kí hiệu B2)		X			X			X	
2	Bảng số liệu các điều kiện lên men chủng nấm men B2		X			X			X	

Minh chứng:

- Bột β-glucan thô từ chủng nấm men *S. cerevisiae* (kí hiệu B2).

1.2. Danh mục sản phẩm khoa học dự kiến ứng dụng, chuyển giao (nếu có):

STT	Tên sản phẩm	Thời gian dự kiến ứng dụng	Cơ quan dự kiến ứng dụng	Ghi chú
1	Bảng số liệu các điều kiện lên men để nhân sinh khối, thu sản phẩm β-glucan của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*	Từ tháng 6 năm 2022	Khoa Sinh học – Trường Đại học Đà Lạt	

1.3. Danh mục sản phẩm khoa học đã được ứng dụng (nếu có):

STT	Tên sản phẩm	Thời gian dự kiến ứng dụng	Cơ quan dự kiến ứng dụng	Ghi chú
1	Bột β-glucan thô từ chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (kí hiệu B2)	Từ tháng 6 năm 2022	Khoa Sinh học – Trường Đại học Đà Lạt.	

2. Về những đóng góp mới của đề tài:

Đề tài đã làm đa dạng hóa nguồn nguyên liệu từ chủng nấm men *S. cerevisiae* để tổng hợp β-glucan, tiến hành sản xuất β-glucan trên hệ thống Bioreactor để sản xuất trên quy mô lớn và tách chiết β-glucan bằng phương pháp sinh học nhằm tạo ra nguồn β-glucan với chi phí sản xuất thấp, đa dạng hóa thêm nguồn sản xuất và mục đích sử dụng β-glucan cho người tiêu dùng.

3. Về hiệu quả của đề tài:

3.1. Hiệu quả kinh tế

Việc khảo sát các điều kiện nhân nuôi sinh khối nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có khả năng sinh tổng hợp β-glucan. Từ đó nâng cao nguồn nguyên liệu và đa dạng hóa sản phẩm β-glucan từ nấm men mang lại giá trị kinh tế, phục vụ cho các lĩnh vực nông nghiệp, thực phẩm.

3.2. Hiệu quả xã hội

Góp phần làm hạn chế ô nhiễm môi trường do sử dụng các phương pháp hóa lý. Đa dạng hóa thêm nguồn nấm men tự nhiên, mang lại ý nghĩa khoa học cũng như thực tiễn.

III. Tự đánh giá, xếp loại kết quả thực hiện đề tài

1. Về tiến độ thực hiện: *(đánh dấu √ vào ô tương ứng*):

- Nộp hồ sơ đúng hạn ☐

- Nộp chậm từ trên 30 ngày đến 06 tháng ☐

- Nộp hồ sơ chậm trên 06 tháng ☐

2. Về kết quả thực hiện đề tài:

- Xuất sắc ☐

- Đạt ☐

- Không đạt ☐

Giải thích lý do:

- Đề tài đã thực hiện đúng 03 nội dung đã đăng ký trong thuyết minh đề tài và đáp ứng được mục tiêu của đề tài.

Cam đoan nội dung của báo cáo là trung thực; Chủ nhiệm và các thành viên tham gia thực hiện đề tài không sử dụng kết quả nghiên cứu của người khác trái với quy định của pháp luật.

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI	**GIÁO VIÊN HƯỚNG DẪN**
	
Đinh Võ Tú Anh	Nguyễn Khoa Trưởng

LỜI CAM ĐOAN

Chúng tôi xin cam đoan nghiên cứu này là do chúng tôi thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, trường Đại học Đà Lạt. Những hình ảnh, kết quả, số liệu chưa được công bố trên bất kỳ tài liệu nào.

Chúng tôi xin chịu trách nhiệm với lời cam đoan này.

Đà Lạt, ngày 20 tháng 05 năm 2022

Nhóm nghiên cứu



Đinh Võ Tú Anh

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành đề tài này không chỉ bằng cố gắng và nỗ lực của bản thân chúng tôi mà còn bằng sự dạy dỗ tận tình của thầy cô, sự giúp đỡ các anh chị, bạn bè đã luôn ủng hộ, động viên và giúp đỡ chúng tôi trong quá trình nghiên cứu, học tập. Là chỗ dựa tinh thần, là động lực và mục tiêu để chúng tôi học tập và hoàn thiện tốt đề tài, chúng tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến:

Thầy Nguyễn Khoa Trưởng, người đã đồng hành, hỗ trợ và giúp đỡ chúng tôi trong quá học tập, nghiên cứu, đặc biệt trong thời gian chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học "*Nghiên cứu tổng hợp β-glucan từ các chủng nấm men (Saccharomyces cerevisiae)*".

Cùng tất cả các thầy cô là giảng viên Trường Đại học Đà Lạt, là những người đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện để sinh viên có thể thực hiện các đề tài nghiên cứu của mình.

Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi không thể tránh khỏi những thiếu sót. Vì vậy chúng tôi rất mong nhận được sự góp ý của quý thầy cô và những định hướng phát triển đề tài.

Xin chân thành cảm ơn!

Nhóm nghiên cứu

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN v
LỜI CẢM ƠN vi
DANH MỤC BẢNG ix
DANH MỤC BIỂU ĐỒ x
DANH MỤC HÌNH ẢNH xi
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT xii
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Tổng quan về β- glucan 3
1.1.1. Lịch sử phát hiện, nghiên cứu 3
1.1.2. Cấu trúc hóa học 3
1.1.3. Tác dụng của β-glucan 5
1.1.4. Ứng dụng của β-glucan 6
1.2. Quá trình sinh tổng hợp β-glucan 7
1.3. Nguồn nguyên liệu chứa β - glucan từ nấm men 8
1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men thu sinh khối từ các chủng nấm men *S. cerevisia* 9
1.4.1. Nhiệt độ 9
1.4.2. pH môi trường 9
1.4.3. Thời gian 9
1.5. Công nghệ, phương pháp tách chiết và thu hồi β-glucan 10
1.6. Một số tình hình nghiên cứu về β-glucan 10
1.6.1. Tình hình nghiên cứu về β-glucan trên thế giới 10
1.6.2. Tình hình nghiên cứu về β-glucan ở Việt Nam 11
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 12
2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu 12
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu 12

2.1.2. Địa điểm nghiên cứu 12
2.2. Phương pháp nghiên cứu 12
2.2.1. Phương pháp tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng tạo β-glucan 12
2.2.2. Phương pháp định lượng tế bào nấm men 12
2.2.3. Phương pháp bảo quản giống vi sinh vật 12
2.2.4. Phương pháp chiết xuất β-glucan bằng phương pháp sinh học 12
2.2.5. Phương pháp khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện để nhân sinh khối nấm men 13
2.2.6. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của EDTA và SDS đến khả năng tổng hợp β-glucan của nấm men 15
2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu 16
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 17
3.1. Kết quả tuyển chọn các chủng nấm men *S. cerevisiae* có khả năng sinh tổng hợp β-glucan 17
3.2. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi β glucan 19
3.2.1. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường lên men đến hiệu suất thu hồi β glucan 19
3.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện pH đối với hiệu suất thu hồi β glucan 20
3.2.3. Ảnh hưởng của điều kiện thời gian đối với với hiệu suất thu hồi β glucan 22
3.2.4. Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ đối với hiệu suất thu hồi β glucan 23
3.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của EDTA và SDS 24
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 27
1. Kết luận 27
2. Kiến nghị 27
TÀI LIỆU THAM KHẢO 28
PHỤ LỤC 35

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số dạng β - glucan được phân lập từ tự nhiên…… 8

Bảng 3.1. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng *S. cerevisiae*……..…17

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát sinh trưởng của các chủng *S. cerevisiae* đối với hiệu suất thu hồi β-glucan……...18

Bảng 3.3. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của môi trường đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan ……20

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của pH đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan…….21

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian đối với quá trình sinh trưởng nấm men và thu nhận hàm lượng β-glucan…….22

Bảng 3.6. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan……..23

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của EDTA và SDS đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan……..25

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi của các chủng nấm men 19
Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng điều kiện môi trường đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan 20
Biểu đồ 3.3. Ảnh hưởng điều kiện pH đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan 21
Biểu đồ 3.4. Ảnh hưởng điều kiện thời gian đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan 22
Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng điều kiện nhiệt độ đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan.....23
Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng điều kiện EDTA và SDS đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan 25

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1. Cấu trúc hóa học chung của β-glucan……4

Hình 2. Cấu trúc hóa học của β-glucan từ những nguồn khác nhau……...4

Hình 3. Cấu trúc hóa học không gian của β-glucan trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* ……5

Hình 4. Cấu trúc của thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*……5

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

EDTA:	Ethylene Diamine Tetraacetic Axit
GTP:	Guanosine-5'-triphosphate
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
IBD (*Inflammatory bowel disease):*	Viêm loét đại tràng
LDL:	Low density lipoprotein
SDS:	Sodium Dodecyl Sulphate
SGLH3:	The sodium-glucose cotransporter type 1
ĐC:	Đối chứng

Mẫu 1. Thông tin kết quả nghiên cứu của đề tài

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Nghiên cứu tổng hợp β-glucan từ các chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Sinh viên thực hiện: Đinh Võ Tú Anh Lớp: SHK44CLC
- Khoa: Sinh học Năm thứ: 2 Số năm đào tạo: 4
- Người hướng dẫn: ThS. Nguyễn Khoa Trưởng

2. Mục tiêu đề tài:

Nghiên cứu tuyển chọn các chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) và xác định được các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy, lên men để tổng hợp β-glucan.

3. Tính mới và sáng tạo:

Với những ý nghĩa về giá trị dinh dưỡng của β-glucan đối với con người, động vật, thủy hải sản cũng như là đối với vi sinh vật thì việc nghiên cứu sản xuất β-glucan có chất lượng cao là một việc làm hết sức cần thiết. Bên cạnh đó, việc sản xuất β-glucan từ nấm lớn có nhiều hạn chế như tốc độ sinh trưởng, phát triển chậm, hàm lượng không cao dẫn đến trở ngại khi sản xuất với quy mô lớn. Nhận thấy các chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) có tốc độ sinh trưởng và phát triển nhanh, hàm lượng β-glucan cao đặc biệt là dễ nuôi cấy và tách chiết cho ra sản phẩm β-glucan có chất lượng tốt. Xuất phát từ những vấn đề trên, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài "Nghiên cứu tổng hợp β-glucan từ các chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*)" nhằm tuyển chọn các chủng nấm men, xác định được các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy, lên men để tổng hợp β-glucan. Sử dụng Bioreactor còn giúp tăng hiệu quả nuôi cấy, từ đó tiết kiệm được thời gian và chi phí sản xuất.

4. Kết quả nghiên cứu:

Đề tài đã xác định được chủng nấm men kí hiệu B2 (*S. cerevisiae*) thích hợp với điều kiện nuôi cấy và cho hiệu suất thu hồi β-glucan cao. Nghiên cứu môi trường dinh dưỡng, điều kiện lên men như pH, nhiệt độ, thời gian thích hợp để thu nhận sinh khối

nấm men trên hệ thống Bioreactor. Tách chiết và thu hồi β-glucan từ sinh khối nấm men bằng phương pháp sinh học.

5. **Đóng góp về mặt kinh tế - xã hội, giáo dục và đào tạo, an ninh, quốc phòng và khả năng áp dụng của đề tài:**

Kinh tế - xã hội: Việc khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình nhân nuôi sinh khối nấm men. Từ đó nâng cao giá trị kinh tế, làm đa dạng hóa thêm các sản phẩm trong việc ứng dụng để làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật nói riêng cũng như trong các lĩnh vực nông nghiệp, thực phẩm nói chung. Góp phần làm hạn chế ô nhiễm môi trường do sử dụng các phương pháp tách chiết hóa lý khác.

6. **Công bố khoa học của sinh viên từ kết quả nghiên cứu của đề tài** *(ghi rõ tên tạp chí nếu có)* hoặc nhận xét, đánh giá của cơ sở đã áp dụng các kết quả nghiên cứu *(nếu có)*:

Ngày 20 tháng 05 năm 2022

Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài



Đinh Võ Tú Anh

Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài *(phần này do người hướng dẫn ghi):*

Đề tài đã tuyển chọn được chủng một nấm men *Saccharomyces cerevisiae* và xác định được các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy. Đây là nghiên cứu ban đầu và là bước đầu để làm các nghiên cứu sau này, tạo ra các sản phẩm β-glucan phục vụ cho môi trường nuôi cấy và dễ dàng tiếp cận với người tiêu dùng phổ thông, mạng lại ý nghĩa về khoa học lẫn thực tiễn. Qua đó, làm đa đạng thêm nguồn nguyên liệu dồi dào sẵn có từ tự nhiên, nhằm góp phần hạn chế ô nhiễm môi trường và nâng cao giá trị kinh tế.

Ngày 24 tháng 05 năm 2022

Xác nhận của trường đại học

(ký tên và đóng dấu)

Người hướng dẫn



Nguyễn Khoa Trưởng

Mẫu 2. Thông tin về sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN
CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI



I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Họ và tên: Đinh Võ Tú Anh

Sinh ngày: 16/09/2002

Nơi sinh: Nha Trang, Khánh Hòa

Lớp: SHK44CLC Khóa: 44

Khoa: Sinh học

Địa chỉ liên hệ: 10A Lý Nam Đế, Phường 8, Đà Lạt, Lâm Đồng

Điện thoại: 0329249627 Email: 2012325@dlu.edu.vn

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP (kê khai thành tích của sinh viên từ năm thứ 1 đến năm đang học):

**** Năm thứ 1:***

Ngành học: Công nghệ sinh học Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: Giỏi

Sơ lược thành tích:

**** Năm thứ 2 (học kì 1):***

Ngành học: Công nghệ sinh học Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: Giỏi

Sơ lược thành tích:

Ngày 20 tháng 05 năm 2022

Xác nhận của trường đại học
(ký tên và đóng dấu)

Sinh viên chịu trách nhiệm chính thực hiện đề tài
(ký, họ và tên)

Đinh Võ Tú Anh

MỞ ĐẦU

β-glucan là một nhóm polysaccharide bao gồm các đơn vị glucose liên kết với nhau bằng liên kết β-glycoside (Klis et al., 2002). Chúng đã được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp, chẳng hạn như ngành dược phẩm, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và mỹ phẩm (Naruemon et al., 2013). Ngoài ra, β-glucan cũng thể hiện các đặc tính y học như các hoạt động chống khối u, kháng khuẩn và chống oxy hóa cộng với sự hấp thụ độc tố nấm mốc cũng như sử dụng trong việc giảm mức cholesterol và glucose trong máu (Magnani et al., 2011). Hơn thế nữa, β-glucan còn được sử dụng như là một chất dinh dưỡng bổ sung trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật, nuôi cấy mô thực vật và cả nuôi trồng nấm ăn hoặc nấm dược liệu như *Cordyceps militaris*. Bên cạnh những thuận lợi có ích về nhiều mặt thì việc sản xuất, xác định hiệu suất thu hồi β-glucan cần đòi hỏi chi phí cao về công nhân, thiết bị máy móc và công nghệ, do đó giá thành sản phẩm khá đắt, khó tiếp cận được với người tiêu dùng phổ thông.

Được biết, β-glucan được tìm thấy trong các thành tế bào của vi khuẩn, nấm lớn, nấm men, tảo, địa y và thực vật. Đặc biệt, β-glucan - một trong những thành phần chính của thành tế bào nấm men *S. cerevisiae* được biết đến như một chất hoạt động diệt nấm, sản xuất cytokine và hoạt động tiêu diệt tự nhiên (Pelizon et al., 2005). Trong tế bào nấm men, thành tế bào chiếm khoảng 10 - 20% trọng lượng khô của tế bào, trong đó β-glucan chiếm khoảng 50 - 60% lượng chất khô (Nguyễn Ngọc Sơn, 2013; Walker, 1999; Klis, 1994). Bên cạnh đó, *S. cerevisiae* phát triển dễ dàng và nhanh chóng trong nhiều loại môi trường nuôi cấy khác nhau với chi phí sản xuất thấp. Vì vậy, chủng nấm men *S. cerevisiae* là nguồn nguyên liệu dồi dào, phổ biến, cung cấp một lượng lớn β-glucan có ý nghĩa cả về khoa học và thực tiễn.

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu nhằm thu nhận được β-glucan với các phương pháp tách chiết khác nhau. Tuy nhiên với nguồn nguyên liệu là bã men bia thì kết quả tách chiết không được cao vì đó là những nguyên liệu hỗn hợp (Trần Minh Tâm, 2013; Lý Thị Minh Hiền, 2015). Việc lựa chọn nguồn nguyên liệu mới là sinh khối nấm men sẽ cải thiện được các vấn đề về thu hồi và hàm lượng của β-glucan thành phẩm. Do đó, với việc nghiên cứu khả năng thu nhận β-glucan từ các chủng nấm men *S. cerevisiae* là

sự lựa chọn phù hợp nhằm mang lại hiệu quả thu hồi sản phẩm cao cũng như tiết kiệm lợi ích kinh tế cho người dân.

Từ những vấn đề trên chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài "***Nghiên cứu tổng hợp β-glucan từ các chủng nấm men (Saccharomyces cerevisiae)***" nhằm tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng sinh tổng hợp β-glucan và xác định một số điều kiện ảnh hưởng đến quá trình lên men để tổng hợp β-glucan, từ đó tạo ra nguồn β-glucan với chi phí sản xuất thấp, đa dạng hóa thêm nguồn sản xuất và mục đích sử dụng β-glucan cho người tiêu dùng.

Nội dung nghiên cứu:

- Tuyển chọn các chủng nấm men *S. cerevisiae* có khả năng sinh tổng hợp β-glucan.
- Nghiên cứu môi trường dinh dưỡng, pH, nhiệt độ, thời gian để nhân sinh khối nấm men *S. cerevisiae* trên hệ thống Bioreactor.
- Đánh giá ảnh hưởng của EDTA và SDS đến khả năng tổng hợp β-glucan của nấm men.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về β- glucan

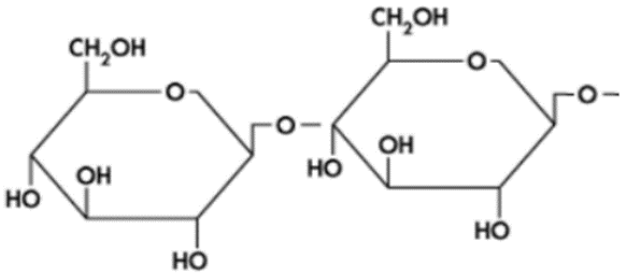
1.1.1. Lịch sử phát hiện, nghiên cứu

Lịch sử của β-glucan được bắt đầu từ việc nghiên cứu về khả năng đặc biệt của một hợp chất thô được chiết xuất từ thành tế bào nấm men bánh mì, gọi là Zymosan vào năm 1940 của Louis Pillemer và cộng sự. Các tác giả đã tìm thấy những bằng chứng khoa học về khả năng kích hoạt phản ứng miễn dịch, tiêu diệt các tác nhân gây bệnh hoặc mầm bệnh bao gồm cả virus, vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng,…. Tuy nhiên, chế phẩm này đã bị cấm sử dụng do những tác dụng phụ trên bệnh nhân và tại thời điểm đó Pillemer và cộng sự của ông chưa lý giải được tại sao và bằng cách nào Zymosan có thể kích hoạt hệ thống miễn dịch từ đó tăng cường sức đề kháng bẩm sinh của cơ thể hay thành phần nào đó trong chế phẩm này đóng vai trò kích hoạt phản ứng miễn dịch (BCC Pharma, 2021). Mãi tới năm 1960, các nhà khoa học tại Đại học Tulane, Hoa Kỳ đã phát hiện ra thành phần chính có tác dụng kích thích miễn dịch trong Zymosan là β-glucan. Kể từ bước đột phá quan trọng này, một lượng lớn các nghiên cứu khoa học về β-glucan đã và đang được thực hiện ngày càng nhiều trên thế giới (Riggi & Di Luzio, 1961; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

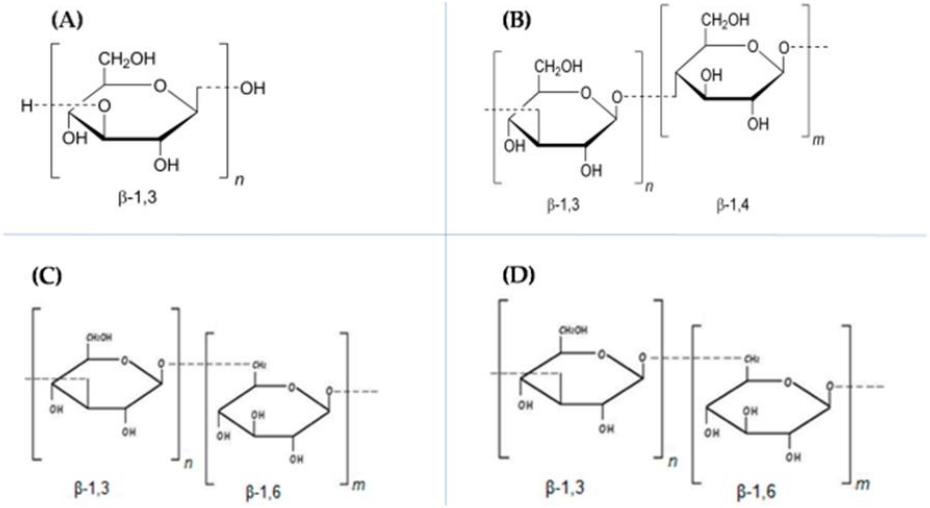
Có rất nhiều nghiên cứu liên quan đến hoạt tính sinh học của β-glucan nhưng kết quả đôi khi trái ngược nhau. Điều này chủ yếu là do sử dụng β-glucan với trọng lượng phân tử khác nhau và sự thay đổi hóa học do β-glucan được nhận từ các nguồn nấm khác nhau, bao gồm các loại nấm nói chung và nấm men.

1.1.2. Cấu trúc hóa học

β-glucan là một polysaccharide với đơn phân là các phân tử đường β-D-glucose gắn với nhau thông qua liên kết β-glucoside. Phân tử glucose này có thể gắn với phân tử glucose khác tại các vị trí khác nhau trong cấu trúc vòng 6 carbon. Các chỉ số 1, 3, 4, 6 thể hiện vị trí của nguyên tử cacbon có liên kết glycoside và được đánh số bắt đầu từ vị trí nhóm oxi thuộc vòng carbon kế tiếp (Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).



Hình 1. Cấu trúc hóa học chung của β-glucan (Du et al ., 2019; Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, 2015)



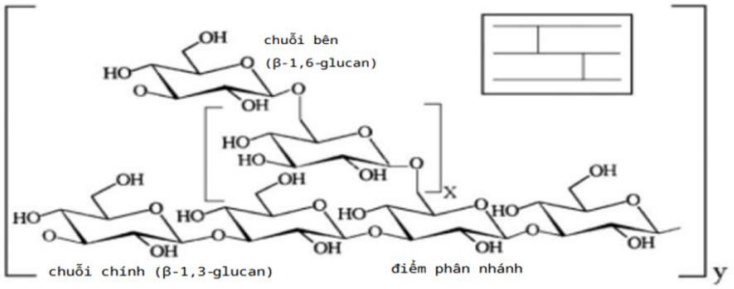
Hình 2. Cấu trúc hóa học của β-glucan từ những nguồn khác nhau

(A) β-glucan từ vi khuẩn; β-1,3 không phân nhánh; (B) β-glucan từ ngũ cốc hoặc địa y, β-glucan 1-3, 1-4 không phân nhánh; (C) β-glucan từ tảo (e.g *Laminaria* spp), β-1-3 với phân nhánh β-1-6 (D) β-glucan từ nấm hoặc nấm men, β-1-3 với nhánh β-1-6 ngắn (nấm) nhánh 1-6 dài (nấm men) (Du et al ., 2015)

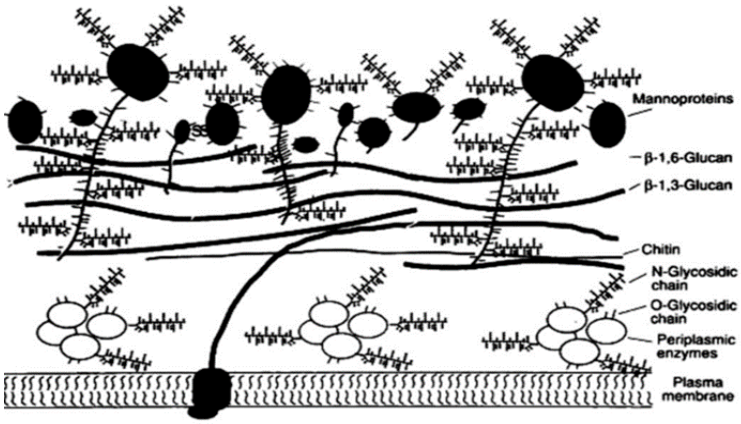
Hơn thế nữa, β-glucan là một trong những polysaccharide phong phú nhất trong thành tế bào nấm men và tồn tại như chất trùng hợp đường glucose liên kết qua β (1,3)-D-glycosidic hoặc β (1,3)-D-glycosidic (Lý Thị Minh Hiền và cộng sự., 2015). Trong nấm men *S. cerevisiae*, thành tế bào chủ yếu chứa β-1,3-glucan, β -1,6-glucan, chitin và mannoprotein, chúng liên kết với nhau bằng liên kết cộng hóa trị. Mối liên kết này có vai trò trung tâm trong cấu trúc của thành tế bào nấm men (Osumi, 1998).

Một sự biến đổi khác đó là một vài hợp chất này tồn tại dưới dạng chuỗi sợi đơn, trong khi trục chính của những β-1,3-glucan khác tồn tại ở dạng các chuỗi sợi đôi hoặc sợi ba. Trong một vài trường hợp, các protein gắn vào trục β-1,3-glucan cũng có thể tạo

nên hoạt tính kháng thể. Mặc dù các hợp chất này có tiềm năng để phát triển hệ thống kháng thể, tuy nhiên đó chỉ là những nghiên cứu sơ khai, và có nhiều ý kiến khác nhau về trọng lượng phân tử, hình dạng, cấu trúc và loại nào sẽ tạo ra hoạt tính sinh học mạnh nhất (Pillemer & Ecker, 1941).



Hình 3. Cấu trúc hóa học không gian của β-glucan trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Kath & Kulicke, 1999)



Hình 4. Cấu trúc của thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Osumi, 1998)

1.1.3. Tác dụng của β-glucan

β-glucan được biết đến nhiều nhất với những tác động tới hệ thống kháng thể con người, ví dụ như tăng cường miễn dịch toàn thân: β-glucan giúp tăng cường miễn dịch cho tất cả các đối tượng từ người già, trẻ nhỏ đến người bị suy giảm miễn dịch do ốm, bệnh ung thư, tiểu đường (Du et al ., 2015). Bên cạnh đó, β-glucan giúp khống chế sự phát triển của khối u và ngăn ngừa di căn nhờ khả năng điều hòa cả miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch đặc hiệu nên chúng có tác dụng với tế bào khối u – một tế bào lạ, phân chia theo cấp số nhân và phát triển thành khối u (Du et al ., 2015).

β-glucan có thể làm giảm các dấu hiệu viêm toàn thân trong các bệnh lý như gút, viêm ruột IBD, viêm nha chu, viêm đường hô hấp (Garba et al., 2014). β-glucan giảm

đường huyết, cholesterol máu, β-glucan giảm đường huyết qua cơ chế ức chế thụ thể SGLT-1 ở niêm mạc ruột – thụ thể giúp hấp thu đường tại ruột, thúc đẩy quá trình tổng hợp glycogen tại gan, ức chế sự tích tụ chất béo trong gan. β-glucan có tác dụng điều hòa miễn dịch, điều chỉnh phản ứng của tế bào Lympho T với kháng nguyên tế bào đảo tụy. Do đó đảo ngược tình trạng tăng đường huyết giai đoạn đầu ở bệnh nhân tiểu đường tuýp I (Yuan et al., 2020).

β-glucan còn giúp chống oxy hóa, thu dọn các gốc tự do dư thừa nên ức chế stress oxy hóa, ngăn ngừa tiến triển biến chứng tiểu đường. β-glucan giảm cholesterol máu nhờ khả năng kích hoạt các tế bào thực bào giúp bắt giữ LDL-cholesterol trong máu. β-glucan còn hoạt động như một chất xơ trong đường tiêu hóa. Do đó giảm hấp thu chất béo tại ruột. β-glucan kích hoạt thực bào các mảng bám trên thành mạch (mảng bám là dị vật). Vì vậy có thể ngăn ngừa xơ vữa và các bệnh lý tim mạch như thiếu máu não, đau thắt ngực, … Ngoài những tác dụng trên, β-glucan giúp vết thương mau lành bằng cách tăng sự xâm nhập của đại thực bào, kích thích tạo mô hạt, lắng đọng collagen và tái tạo biểu mô. Do đó giúp vết thương mau lành, đặc biệt là ở bệnh nhân tiểu đường (Garba et al., 2014).

1.1.4. Ứng dụng của β-glucan

β-glucan được ứng dụng nhiều lĩnh vực khác nhau chẳng hạn như trong lĩnh vực dược phẩm, β-glucan được sử dụng làm thuốc tiêm dưới da trong điều trị ung thư da với mục đích giảm kích thước các khối u, tiêm tĩnh mạch nhằm tăng cường hệ thống miễn dịch với bệnh nhân nhiễm HIV/AIDS (những người bị suy giảm miễn dịch). Hay việc sử dụng β-glucan trong đồ uống trong các trường hợp cholesterol cao, tiểu đường, suy giảm miễn dịch, cảm lạnh, cảm cúm, cúm H_1N_1, bệnh dị ứng, viêm gan, hen suyễn, viêm tai, lão hóa, viêm loét đại tràng và bệnh Crohn, đau cơ, viêm khớp dạng thấp,.... Vì hoạt tính sinh học giúp tăng cường hệ thống miễn dịch cho vật chủ nên trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, β-glucan có tác dụng giúp tăng cường sức đề kháng, chống lại dịch bệnh gây ra bởi các nhóm vi khuẩn gây bệnh, thậm chí ngăn chặn tác động của virus đốm trắng trên tôm, β-glucan còn có tác dụng kích thích hệ miễn dịch không đặc hiệu (non-specific immunity) của cá (Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

Ngoài ra, β- glucan còn được sử dụng trong chăn nuôi gia súc gia cầm (Anwar, et al., 2017) cho biết bổ sung β-glucan với tỷ lệ 0,1% vào thức ăn của gà sẽ hạn chế sự xâm nhập, phát triển của *Salmonella* trong gan. Trong đề tài "ảnh hưởng của các khẩu phần bổ sung β-glucan lên năng suất sinh trưởng và sức đề kháng của gà Hisex Brown", Nguyễn Thị Kim Khang và cộng sự (2011) cho biết bổ sung β-glucan với tỷ lệ 0,05%, 0,10%; 0,15% trong khẩu phần đều có tác động tốt đến khối lượng, tăng trọng, hệ số chuyển hóa thức ăn của gà.

Bên cạnh đó, β-glucan có tác động tích cực đối với heo theo Dritz et al. (1995) đề xuất bổ sung β-glucan vào khẩu phần của heo con sau cai sữa với hàm lượng 0,025% cải thiện tốc độ tăng trưởng và khả năng chống lại *Streptococcus suis.* Kết quả nghiên cứu của Li et al. (2006) khẳng định việc bổ sung β-glucan vào khẩu phần ăn cho heo con có lợi về hiệu suất tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch chống lại *E.coli.* Tuy nhiên, β-glucan sản xuất bằng các phương pháp sản xuất khác nhau có thể có hiệu ứng khác nhau về hiệu suất tăng trưởng và chức năng miễn dịch ở heo (Garba et al., 2014) .

1.2. Quá trình sinh tổng hợp β-glucan

β-glucan có thể được tổng hợp từ các loại nấm mũ như *Giifola frondosa, Cordyceps sinensis, Hericium erinaceus, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes*.... hoặc từ các loại vi nấm như nấm, các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Ngoài ra, β-glucan cũng được chiết xuất từ lúa mạch không vỏ (Storsley et al., 2003) và từ vỏ cám của các loại ngũ cốc và một số loại tảo biển như chi tảo *Laminaria*. Trong ngũ cốc, hàm lượng B-glucan cao nhất (tính theo trọng lượng khô) đã được công bố ở lúa mạch từ 2 - 20 gam (khoảng 65% ở dạng tan trong nước), yến mạch từ 3 - 8 gam (82% ở dạng tan trong nước). Các loại ngũ cốc khác cũng chứa β-glucan nhưng với hàm lượng thấp hơn gồm cao lương 1,1 - 6,2 gam; lúa mạch đen 1,3-2,7 gam; ngô 0,8 - 1,7 gam; lúa mạch trắng 0,312g, lúa mì 0,5-1,0g, lúa mì cứng 0,5- 0,6g và gạo 0,13g (Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

Bảng 1.1. Một số dạng β - glucan được phân lập từ tự nhiên

Nguồn: Du et al. (2019)

Nhóm	Nguồn phân lập	Cấu trúc
Nấm lớn	*Grifola frondosa*	Mạch phân nhánh chứa liên kết β-1,3:1,6
	Lentinus edodes	Mạch phân nhánh chứa liên kết β-1,3:1,6
	Ganoderma lucidum	Mạch phân nhánh chứa liên kết β-1,3:1,6
	Agaricus blazel	Mạch phân nhánh chứa liên kết β-1,3:1,6
	Auricularia auricula-judae	Mạch không phân nhánh gồm các liên kết β- 1,3
	Cordyceps sinensis	Mạch không phân nhánh gồm các liên kết β- 1,3
	Hericium erinaceus	Mạch không phân nhánh gồm các liên kết β- 1,3
	Schizophyllum commune	Mạch phân nhánh chứa liên kết β-1,3:1,6
	Sclerotinia Sclerotiorum	Mạch có độ phân nhánh cao chứa liên kết β- 1,3:1,6
Nấm men	*Saccharomyces serevisiae*	Bao gồm tất cả các kiểu liên kết trong cấu trúc β - glucan

1.3. Nguồn nguyên liệu chứa β - glucan từ nấm men

Con người hiểu biết về nấm men *S. cerevisiae* và những tính chất của nó mới được hơn 150 năm. Nấm men phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong các môi trường có chứa đường, có pH thấp, chẳng hạn như trong hoa quả, rau dưa, mật mía, rỉ đường, mật ong, trong đất vườn trồng cây ăn quả, trong đất có nhiễm dầu mỏ…. Trong tế bào nấm men thì thành tế bào chiếm khoảng 10 - 20% trọng lượng khô của tế bào,

hàm lượng β-glucan chiếm khoảng 50 - 60% lượng chất khô của thành tế bào nấm men (Nguyễn Ngọc Sơn, 2013), do đó việc sử dụng nấm men để làm nguyên liệu chiết xuất β-glucan là một trong những hướng đi có nhiều ứng dụng trong thực tiễn hiện nay. Hợp chất β-glucan được tìm thấy ở nhiều nhóm sinh vật từ nhân sơ (vi khuẩn) đến nhân thực (tảo, nấm, thực vật), nhưng đối với nấm men thì vẫn là nguồn cho hiệu suất thu hồi là cao nhất so với các loại nấm khác. Theo Du et al. (2015) thì nấm men có quá trình sinh trưởng nhanh, lượng sinh khối dồi dào, chúng có khả năng sinh tổng hợp nhiều β-glucan (1,3/1,6 β-glucan) và cho hiệu suất thu hồi cao. Vì thế, sử dụng nấm men *S. cerevisiae* để chiết xuất β-glucan là một trong những lựa chọn mang lại hiệu quả kinh tế và hiệu quả sử dụng cho người tiêu dùng.

1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men thu sinh khối từ các chủng nấm men *S. cerevisia*

1.4.1. Nhiệt độ

Nấm men có thể sinh trưởng và phát triển ở dãi nhiệt độ 4-45°C nhưng thích hợp nhất là 22-28°C. Nhiệt độ càng thấp thì nấm men sinh sản càng chậm, thời gian lên men kéo dài, tuy nhiên lại hạn chế được sự nhiễm khuẩn và ngược lại nhiệt độ càng cao thì nấm men sinh sản nhanh hơn nên thời gian lên men rút ngắn hơn nhưng khả năng nhiễm khuẩn sẽ rất cao (Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2006).

1.4.2. pH môi trường

Nấm men có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường có pH từ 2.5 – 7.5, tuy nhiên nhiều chủng nấm men sinh trưởng và phát triển tốt ở độ pH phù hợp nhất là 4-6, nhiều chủng nấm men có thể sinh trưởng và phát triển tốt ở pH 3-3.5 (Lương Đức Phẩm, 2009).

1.4.3. Thời gian

Thời gian lên men lỏng có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và phát triển của nấm men. Nấm men có thể phát triển trong khoảng thời gian từ 12 – 48 giờ, tuy nhiên phù hợp nhất là 18 giờ, sau 22 giờ khối lượng khô nấm men hầu như không thay đổi (Ngô Thị Huyền Trang và Vũ Văn Hạnh, 2017).

1.5. Công nghệ, phương pháp tách chiết và thu hồi β-glucan

Các phương pháp thu nhận β-glucan từ tế bào nấm men khá đa dạng từ các phương pháp hóa học (Thammakiti et al., 2004; Kim & Yun, 2006), phương pháp vật lý (Wenger et al., 2008; Liu et al., 2013) đến phương pháp enzyme (Milic et al., 2007; Freimund et al., 2003; Jaehrig et al., 2008). Phương pháp hóa học sử dụng các dung dịch kiềm, acid để tách chiết β-glucan làm ảnh hưởng tới cấu trúc liên kết, dẫn đến việc ảnh hưởng tới hoạt tính sinh học của β-glucan, tạo ra β-glucan bị lẫn nhiều tạp chất, phá vỡ cấu trúc nên làm giảm hoạt tính sinh học của phân tử β-D-glucan. Đồng thời, quá trình tách chiết còn thải ra nhiều sản phẩm phụ gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Với phương pháp sinh học, các nhà khoa học sử dụng enzyme để tách chiết β-glucan, ưu điểm của phương pháp enzyme là bảo toàn được cấu trúc nguyên bản của β-1,3/1,6-D glucan nên giữ nguyên được hoạt tính sinh học của hoạt chất này. Sử dụng enzyme còn giảm thiểu các chất thải gây ô nhiễm nên rất thân thiện với môi trường (Javmen et al., 2012). Việc bổ sung một số hoạt chất như SDS, EDTA vào môi trường nuôi cấy cũng góp phần kích thích sản sinh β-glucan của các chủng nấm men (Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

1.6. Một số tình hình nghiên cứu về β-glucan

1.6.1. Tình hình nghiên cứu về β-glucan trên thế giới

Trường Đại học Regensburg (Đức) cũng đã thực hiện 4 thử nghiệm β-glucan từ nấm men có hiệu quả trên khối u Sarcoma 180 ở chuột. Một thử nghiệm khác, khi chuột có khối u Sarcoma 180 cũng được chữa trị thành công với nhiều loại β-glucan từ nấm khác nhau. Khối lượng của khối u giảm từ 72 - 99% chỉ trong 30 ngày mà không cần dùng một phương pháp điều trị nào khác (Zhang et al., 2003).

Viện Nghiên cứu Dinh dưỡng ở Bratislava (Slovakia) cũng chỉ ra rằng, chuột được cho ăn β-glucan từ nấm đã giúp ngăn chặn khả năng phát triển ung thư của các nốt sần trong ruột non. Qua đó có thể thấy, β-glucan có tác dụng kháng u và chống ung thư rất hiệu quả. Bất kỳ ai cũng có thể sử dụng kết hợp hoạt chất này với thuốc cổ truyền hay với các phương pháp chữa trị tự nhiên khác (Wang et al., 2006). Ngoài ra, một phân tích tài liệu năm 2014 đã xác nhận β-glucan có thể giúp kiểm soát bệnh tiểu đường bằng cách kiểm soát lượng đường trong máu, giảm cholesterol và giữ huyết áp trong tầm kiểm

soát. Nhưng lưu ý rằng chỉ riêng β-glucan là không đủ để đạt được chỉ số đường huyết bình thường ở bệnh nhân tiểu đường và nó chỉ nên được sử dụng như một chất hỗ trợ cho các phương pháp điều trị tiêu chuẩn mà không phải là liệu pháp thay thế hoàn toàn. Dhingra et al. (2012) cho biết tiêu thụ 4-7g β-glucan hàng ngày giúp giảm cảm giác đói và tăng cảm giác no.

1.6.2. Tình hình nghiên cứu về β-glucan ở Việt Nam

Trước đó, Việt Nam đã nghiên cứu thành công để tách chiết β-glucan từ thành tế bào nấm men *S. cerevisiae* bằng công nghệ enzyme (BCC Pharma, 2020). Nghiên cứu về chiết xuất β-glucan từ nấm Thái Dương và thử nghiệm khả năng tăng cường miễn dịch động vật (Trương Bình Nguyên, 2014). Nghiên cứu quy trình tách chiết β-glucan từ tế bào *S. cerevisiae* trong bã men bia (Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, 2015). Nghiên cứu tối ưu hóa việc chiết xuất β-glucan từ rác thải men *S. cerevisiae* sử dụng autolysis, enzyme, enzyme siêu âm và kết hợp - điều trị siêu âm (Trần Minh Tâm, 2013). Nghiên cứu sản xuất β-glucan hòa tan từ thành tế bào của nấm men *S. cerevisiae* (Đỗ Thị Ánh Hòa, 2018).

Tóm lại, β-glucan là một hoạt chất có giá trị cao đối với sức khỏe và nhiều ứng dụng trong nghiên cứu, sản xuất các sản phẩm dinh dưỡng cho con người, động vật, cũng như là đối với vi sinh vật thì việc nghiên cứu sản xuất β-glucan có chất lượng cao là một việc làm hết sức cần thiết và đã được rất nhiều nơi trên thế giới quan tâm và nghiên cứu. Bên cạnh đó, việc sản xuất β-glucan từ nấm lớn có nhiều hạn chế như tốc độ sinh trưởng, phát triển chậm, hiệu suất thu hồi không cao dẫn đến trở ngại khi sản xuất với quy mô lớn. Đồng thời, đến nay việc nghiên cứu tách chiết β-glucan từ nấm men *S. cerevisiae* với hiệu suất thu hồi còn chưa cao. Do đó, việc thực hiện nghiên cứu tổng hợp β-glucan từ nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) nhằm đa dạng hóa nguồn nguyên liệu cung cấp β glucan từ nấm men là một việc làm hết sức cần thiết hiện nay.

CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng nấm men *S. cerevisiae* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt.

2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, khoa Sinh học, trường Đại học Đà Lạt.

Thời gian nghiên cứu: tháng 11 năm 2021 đến tháng 05 năm 2022.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tuyển chọn các chủng nấm men có khả năng tạo β-glucan

Tiến hành nuôi cấy nấm men trong môi trường H1 (phụ lục 3) ở điều kiện nhiệt độ 30℃, pH 5.5, thời gian 24 giờ. Sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy gốc chuyển sang môi trường H3 (phụ lục 3) được điều chỉnh pH về 5.5 và khử trùng ở điều kiện 121℃, 15 phút (Phan Trung Trực, 2020). Nhân nuôi ở điều kiện 30℃ trong 24 giờ với tốc độ lắc là 150 rpm. Kết thúc quá trình nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối nấm men và tiến hành xác định β-glucan (Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.2. Phương pháp định lượng tế bào nấm men

Định lượng tế bào nấm men bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu (Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2006).

2.2.3. Phương pháp bảo quản giống vi sinh vật

Tiến hành lưu giống các chủng nấm men trên môi trường thạch nghiêng Hansen và bảo quản ở 4 – 5℃. Sau 1 tháng tiến hành lưu lại nhằm tránh thoái hoá giống (Nguyễn Đức Lượng và cộng sự, 2006).

2.2.4. Phương pháp chiết xuất β-glucan bằng phương pháp sinh học

Tách chiết β-glucan bằng phương pháp sinh học có bổ sung enzyme protease.

Chủng nấm men khi được nuôi cấy sau 24 giờ, ở pH = 5.5, nhiệt độ 30℃. Sinh khối nấm men thu được đem đi bổ sung với enzyme protease ở nồng độ 0,5%, sau đó để ở nhiệt độ 50℃ trong 6 giờ để enzyme protease sẽ thủy phân đi những liên kết protein phá vỡ tế bào giải phóng tối đa các chất có trong thành tế bào giúp quá trình tách chiết diễn ra dễ dàng hơn. Sau khi kết thúc tiến hành bổ sung thêm nước cất ly tâm thu cặn để rửa đi enzyme.

Tiếp theo lấy cặn vừa thu được xử lý với 7% NaOH 1M để trong vòng 1 giờ 30 phút ở nhiệt độ 90℃ nhằm phá vỡ thành tế bào. Bổ sung thêm nước cất rồi tiến hành ly tâm 3 lần để rửa NaOH nhằm thu cặn loại bỏ những thành phần có bản chất protein bị hòa tan trong kiềm loãng.

Rửa cặn với aceton nguyên chất theo tỉ lệ 1:4, sau đó lọc qua giấy lọc nhằm loại bỏ lipid và nước ra khỏi β-glucan. Tiếp sau đó rửa cặn với ethanol 70% theo tỉ lệ 1:3 nhằm loại bỏ những thành phần tạp cặn tan trong cồn và sấy khô sản phẩm ở nhiệt độ 70℃ cho đến khi có màu vàng nhạt thu được β-glucan (Czop & Austen, 1985; Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, 2015).

2.2.5. Phương pháp khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện để nhân sinh khối nấm men

2.2.5.1. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường đến nhân sinh khối nấm men

Chuẩn bị các môi trường sau:

Môi trường Hansen (H1)

Môi trường Hansen cải tiến (H2)

Môi trường giá khoai rỉ (Môi trường H3)

Các môi trường trên được pha chế theo thành phần công thức (Phụ lục 3), điều chỉnh pH đạt 5.5 và khử trùng ở nhiệt độ 121℃/15 phút.

Sau khi tuyển chọn được chủng nấm men có hàm lượng β-glucan trong tế bào cao. Tiến hành nhân giống cấp 1 trên môi trường H1 lỏng ở điều kiện 30℃ trong 24 giờ, sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy chuyển sang lần lượt ba môi trường là H1, H2, H3. Nuôi có bổ sung khí ở nhiệt độ 30℃ sau 24 giờ, tiến hành định lượng mật độ tế bào bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu để kiểm tra mật độ nấm men.

Sau quá trình nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối nấm men, tiến hành tách chiết và xác định β-glucan, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần (Lê Gia Hy & Khuất Hữu Thành, 2010; Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, 2015; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.5.2. Đánh giá ảnh hưởng của pH đến nhân sinh khối nấm men

Tiến hành nuôi cấy nấm men trong môi trường H1 ở điều kiện nhiệt độ 30℃, pH 5.5, thời gian 24 giờ. Sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy gốc chuyển sang môi trường H3 với các điều kiện pH lần lượt là 5.0, 5.5, 6.0. Nuôi ở 30℃ trong 24 giờ, tiến hành định lượng tế bào bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu để kiểm tra mật độ nấm men. Sau quá trình nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối nấm men, tiến hành tách chiết và xác định hiệu suất thu hồi β-glucan, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần (Lê Gia Hy & Khuất Hữu Thành, 2010; Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, 2015; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.5.3. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian đến nhân sinh khối nấm men

Tiến hành nuôi cấy nấm men ở môi trường H1 ở điều kiện nhiệt độ 30℃, pH 5.5, thời gian 24 giờ. Sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy gốc vào môi trường H3 với pH 5.5, nhiệt độ 30℃, ở các mốc thời gian 16 giờ, 20 giờ và 24 giờ. Tiến hành đếm mật độ trên buồng đếm hồng cầu để kiểm tra mật độ nấm men. Sau quá trình nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối nấm men, tiến hành tách chiết và xác định β-glucan, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần (Lê Gia Hy & Khuất Hữu Thành, 2010; Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, 2015; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.5.4. Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến nhân sinh khối nấm men

Tiến hành nuôi cấy nấm men ở môi trường H1 ở điều kiện nhiệt độ 30℃, pH 5.5, thời gian 24 giờ. Sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy gốc vào môi trường H3 với pH bằng 5.5. Nuôi cấy ở các mốc nhiệt độ lần lượt là 20, 25, 30℃. Sau 20 giờ tiến hành kiểm tra mật độ của nấm men bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu. Sau quá trình nuôi cấy, ly tâm thu sinh khối nấm men, tiến hành tách chiết và xác định β-glucan, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần (Lê Gia Hy & Khuất Hữu Thành, 2010; Lý Thị Minh Hiền và cộng sự, 2015; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.6. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của EDTA và SDS đến khả năng tổng hợp β-glucan của nấm men

2.2.6.1. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của EDTA đến khả năng tổng hợp β-glucan của nấm men

Tiến hành nhân giống cấp 1 trên môi trường H1 lỏng ở điều kiện 30°C, pH 5.5, trong 24 giờ, sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy gốc chuyển sang môi trường H3. Bổ sung thêm EDTA là 30 pg/L vào môi trường nuôi cấy. EDTA được chuẩn bị dưới dạng dung dịch gốc, nồng độ 100µg/mL. Lượng dung dịch EDTA bổ sung vào môi trường là 100µL trong 100mL môi trường. Nuôi có bổ sung khí ở 25°C trong 20 giờ ở pH 5.5, tiến hành định lượng mật độ tế bào bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu để kiểm tra mật độ nấm men.

Sau quá trình nuôi cấy thu được sinh khối nấm men, tiến hành tách chiết và xác định β-glucan, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần để tính số liệu trung bình (Kimura, 1980; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.6.2. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của SDS đến khả năng tổng hợp β-glucan của nấm men

Tiến hành nhân giống cấp 1 trên môi trường H1 lỏng ở điều kiện 30°C, pH 5.5, trong 24 giờ, sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy gốc chuyển sang môi trường H3. Bổ sung thêm SDS là 80 pg/l vào môi trường nuôi cấy. SDS được chuẩn bị dưới dạng dung dịch gốc, nồng độ 100 ug/mL. Lượng dung dịch SDS bổ sung vào môi trường là 100 ul trong 100 mL môi trường. Nuôi có bổ sung khí ở 25°C trong 20 giờ ở pH 5.5, tiến hành định lượng mật độ tế bào bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu để kiểm tra mật độ nấm men.

Sau quá trình nuôi cấy thu được sinh khối nấm men, tiến hành tách chiết và xác định β-glucan, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần để tính số liệu trung bình (Kimura, 1980; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.6.3. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của kết hợp EDTA và SDS đến khả năng tổng hợp β-glucan của nấm men

Tiến hành nhân giống cấp 1 trên môi trường H1 lỏng ở điều kiện 30°C, pH 5.5, trong 20 giờ, sau đó hút 5% dung dịch nuôi cấy gốc chuyển sang môi trường H3. Bổ sung thêm EDTA là 30 pg/L và SDS là 80 pg/L vào môi trường nuôi cấy. EDTA và SDS được chuẩn bị dưới dạng dung dịch gốc, nồng độ 100 ug/mL. Lượng dung dịch EDTA và SDS bổ sung vào môi trường là 100 ul trong 100 mL môi trường. Nuôi có bổ sung khí ở 25°C trong 20 giờ ở pH 5.5, tiến hành định lượng mật độ tế bào bằng phương pháp đếm trên buồng đếm hồng cầu để kiểm tra mật độ nấm men.

Sau quá trình nuôi cấy thu được sinh khối nấm men, tiến hành tách chiết và xác định β-glucan, mỗi mẫu được lặp lại 3 lần để tính số liệu trung bình (Kimura, 1980; Nguyễn Phú Thu Thủy, 2017).

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel bằng công cụ Data Analysis.

Xử lý ý nghĩa thống kê bằng phép thử Tukey trên phần mềm ***R***.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tuyển chọn các chủng nấm men *S. cerevisiae* có khả năng sinh tổng hợp β-glucan

Các chủng nấm men được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, khoa Sinh học, trường Đại học Đà Lạt đã được định danh là chủng *S. cerevisiae* có đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào như sau:

Bảng 3.1. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào của các *chủng S. cerevisiae*

Tên chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình thái tế bào
B1	Khuẩn lạc tròn, lồi cao so với mặt thạch. Màu trắng sữa, bề mặt khuẩn lạc lõm xuống ở vị trí trung tâm. Viền khuẩn lạc đều	Tế bào hình cầu, có một số hơi nhọn về một phía. Nảy chồi 1 hướng, tạo một chồi (tế bào con) trên tế bào mẹ.
B2	Khuẩn sục tròn, lồi cao so với mặt thạch. Màu trắng sữa, bề mặt khuẩn sục lõm sâu (như hình ống). Tại vị trí lõm, viền trên rất mỏng. Viền khuẩn sục đều.	Tế bào hình cầu, đều, có một số hơi nhọn về một phía. Nảy chồi 1 hướng, 1 tế bào chồi hình elip hoặc cầu trên tế bào mẹ.
B3	Khuẩn lạc tròn, bề mặt khô, màu trắng trong, viền không đều, có tua bao quanh khuẩn lạc.	Tế bào hình bầu dục đến que, sinh sản bằng hình thức nảy chồi, nhiều hướng, mỗi tế bào chỉ nảy một chồi.
B4	Khuẩn lạc tròn, nhô cao so với mặt thạch, màu trắng sữa, viền khuẩn lạc đều.	Tế bào hình bầu dục, sinh sản bằng hình thức nảy chồi, nhiều hướng, mỗi tế bào chỉ nảy một chồi

B5	Khuẩn lạc vô định hình, màu trắng đục. Viền xẻ thuỳ, trung tâm có bề mặt hơi nhăn, rộp lên; viền nhẵn bóng.	Tế bào từ elip đến cầu lớn, nhọn 1 phía. Tế bào nảy chồi 1 hướng, 1 tế bào chồi hình elip hoặc cầu trên tế bào mẹ.

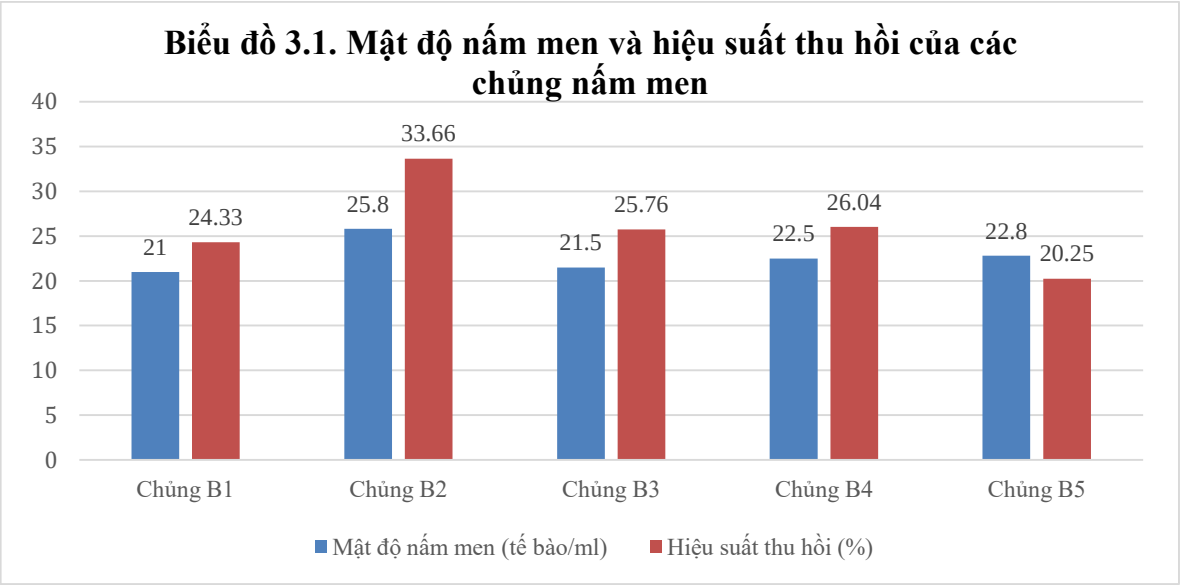
Để tuyển chọn nấm men để tách chiết β-glucan chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chủng *S. cerevisiae* ở cùng điều kiện, sau đó tiến hành tách chiết và thu hồi β-glucan để chọn ra chủng nấm men có khả năng sinh tổng hợp β-glucan cao hơn, kết quả chi tiết được trình bày tại bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát sinh trưởng của các chủng *S. cerevisiae* đối với hiệu suất thu hồi β-glucan

Chủng nấm men	Mật độ nấm men (10^9 tế bào/mL)	Hiệu suất thu hồi (%)
B1	$21^{c} \pm 0,6$	$24,45^{d} \pm 0,85$
B2	**$25,8^{a} \pm 0,58$**	**$33,66^{a} \pm 0,58$**
B3	$21,5^{c} \pm 0,21$	$25,77^{cd} \pm 0,78$
B4	$22,5^{b} \pm 0,3$	$26,4^{c} \pm 0,22$
B5	$22,8^{b} \pm 0,39$	$30,25^{b} \pm 0,41$

(Các số trong cùng một cột có ký tự chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu với mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey)

Kết quả từ bảng 3.2 cho thấy rằng trong các chủng nấm men được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, khoa Sinh học, trường Đại học Đà Lạt thì chủng nấm men có ký hiệu B2 cho mật độ sinh khối và hiệu suất thu hồi β-glucan cao hơn so với các chủng nấm men còn lại với mật độ đạt 25,8 x 10^9 tế bào/mL và hiệu suất thu hồi là 33,66%.



Thành tế bào nấm men được cấu tạo chủ yếu từ β-glucan, mannan, protein, lipid và một lượng rất nhỏ chitin,… Protease sẽ thủy phân những liên kết protein phá vỡ tế bào giải phóng tối đa các chất có trong thành tế bào giúp quá trình tách chiết và tinh sạch diễn ra dễ dàng hơn. Theo nghiên cứu của Nguyen et al. (1998) và Suphantharika et al. (2003), các tác giả đã báo cáo rằng họ chiết xuất được 27,5% trọng lượng khô của vách, điều này là khác biệt đáng kể so với nghiên cứu của Yiannikouris et al. (2004) là 42% trọng lượng khô. Sự khác biệt này có thể phụ thuộc vào chủng giống sử dụng, điều kiện nuôi cấy và phương pháp tách chiết (Rice, 2004). Quá trình xử lý protein theo phương pháp enzyme cho thấy sự khác biệt đáng kể trong thành phần của sản phẩm, khi hàm lượng protein giảm đi 9 lần, tỷ lệ nghịch với hàm lượng β-glucan tăng gần gấp đôi (Jaehrig et al., 2008).

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi chọn chủng nấm men B2 để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo của đề tài.

3.2. Kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi β glucan

3.2.1. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường lên men đến hiệu suất thu hồi β glucan

Tiến hành khảo sát chủng nấm men B2 trên 3 môi trường H1, H2 và H3 (xem phụ lục 3) ở điều kiện pH = 5.5, nhiệt độ 30°C, 24 giờ. Sau quá trình nuôi cấy tiến hành thu nhận sinh khối, tách chiết và xác định hiệu suất thu hồi β-glucan. Kết quả ghi nhận được thể hiện trong bảng 3.3.

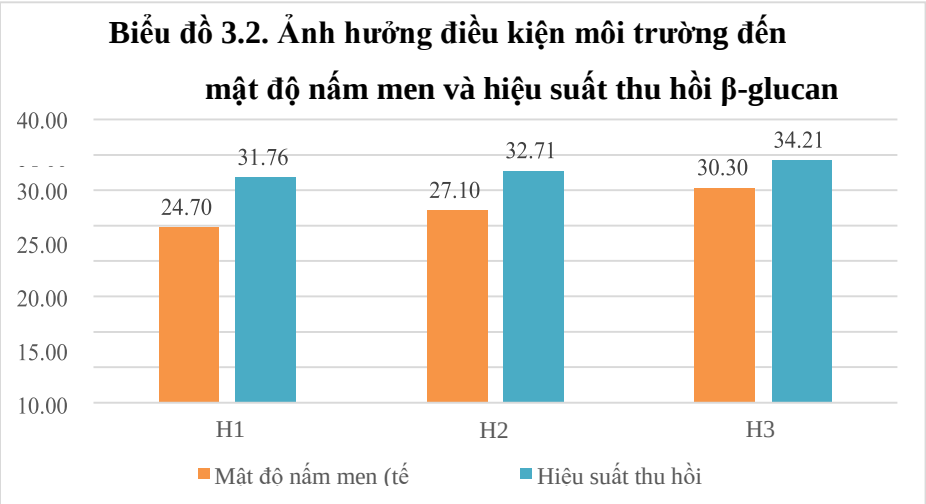
Bảng 3.3. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của môi trường đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan

Môi trường	H1	H2	H3
Mật độ nấm men 10^9 (tế bào/mL)	$24,7^{c} \pm 0,22$	$27,1^{b} \pm 0,33$	**$30,3^{a} \pm 0,29$**
Hiệu suất thu hồi (%)	$31,76^{b} \pm 0,91$	$32,71^{b} \pm 0,32$	**$34,21^{a} \pm 0,99$**

(Các số trong cùng một hàng có ký tự chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu với mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey)

Kết quả từ bảng 3.3 cho thấy rằng môi trường H3 thích hợp cho chủng nấm men B2 với mật độ sinh khối đạt 30,3 x 10^9 (tế bào/mL) với hiệu suất thu hồi β-glucan đạt 34,21%. Còn ở 2 môi trường H1 và H2 không có sự chênh lệch lớn giữa 2 môi trường về hiệu suất thu hồi β-glucan.

Biểu đồ 3.2. Ảnh hưởng điều kiện môi trường đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan



Như vậy, với việc khảo sát môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình nhân sinh khối chủng nấm men B2, để nâng cao mật độ nấm men cũng như hiệu suất thu hồi chúng tôi chọn môi trường H3 cho khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Ảnh hưởng của điều kiện pH đối với hiệu suất thu hồi β glucan

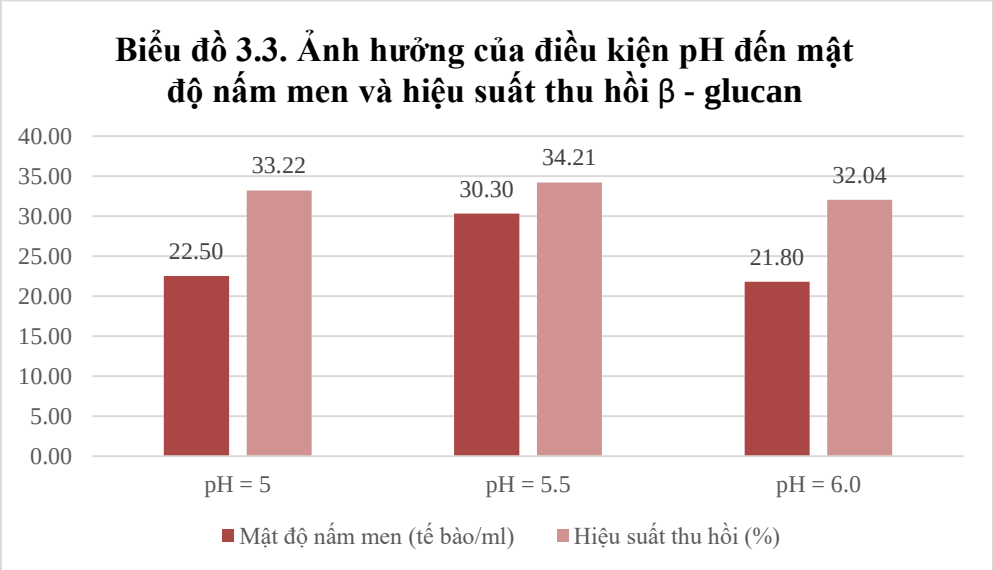
Tiến hành khảo sát chủng nấm men B2 trên 3 nồng độ pH 5.0, 5.5, 6.0 và ở điều kiện môi trường H3, nhiệt độ 30°C, 24 giờ. Sau quá trình nuôi cấy tiến hành thu nhận sinh khối, tách chiết và xác định hiệu suất thu hồi β-glucan. Kết quả ghi nhận được thể hiện trong bảng 3.4 dưới đây:

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của pH đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan

pH	5.0	5.5	6.0
Mật độ nấm men 10^9 (tế bào/mL)	$22,5^b \pm 0,69$	**$30,3^a \pm 0,29$**	$21,8^b \pm 0,53$
Hiệu suất thu hồi (%)	$33,22^a \pm 0,41$	**$34,21^a \pm 0,99$**	$32,04^b \pm 0,67$

(Các số trong cùng một hàng có ký tự chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu với mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey)

Kết quả từ bảng 3.4 trên cho thấy rằng pH môi trường ở mức 5.5 là pH thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm men B2.



Theo nghiên cứu của Medawar et al. (2003) thì pH có ảnh hưởng nhất định tới quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm men. Qua số liệu thực nghiệm thu được bảng 3.4 và biểu đồ 3.3 cho thấy khi điều chỉnh pH là 5.0, 5.5, 6.0 đã dẫn đến sự thay đổi về hiệu suất thu hồi sản phẩm. Tại pH 5.5 cho thấy sinh khối nấm men là 30,3 x 10^9 (tế bào/mL) và đạt 34,42% hiệu suất thu hồi trên môi trường H3 tương ứng. Theo kết quả nghiên cứu của Ngô Thị Huyền Trang & Vũ Văn Hạnh (2017), sinh khối nấm men tăng dần khi giá trị pH tăng dần và cao nhất tại pH 6, đạt 10,43 g sinh khối khô/L. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lamees et al. (2013). Tuy nhiên, tùy những chủng

nấm men khác nhau mà sự ảnh hưởng của điều kiện pH đến mật độ và hiệu suất thu hồi β-glucan là khác nhau.

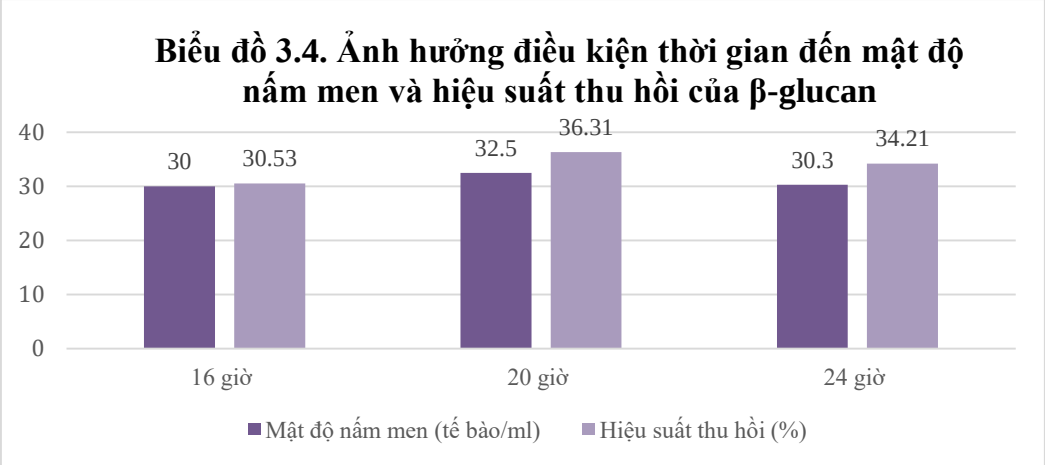
3.2.3. Ảnh hưởng của điều kiện thời gian đối với với hiệu suất thu hồi β glucan

Tiến hành khảo sát quá trình sinh trưởng chủng nấm men B2 ở điều kiện môi trường H3, pH = 5.5, nhiệt độ 30°C. Xác định mât độ nấm men, hiệu suất thu hồi β-glucan sau mỗi 4 giờ. Kết quả ghi nhận được thể hiện trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan

Thời gian	16 giờ	20 giờ	24 giờ
Mật độ nấm men 10^9 (tế bào/mL)	$30^b \pm 0,72$	**$32,5^a \pm 0,45$**	$30,3^b \pm 0,29$
Hiệu suất thu hồi (%)	$30,53^c \pm 0,89$	**$36,31^a \pm 0,53$**	$34,21^b \pm 0,99$

(Các số trong cùng một hàng có ký tự chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu với mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey)



Kết quả từ bảng 3.5 và biểu đồ 3.4 cho thấy sinh khối nấm men cao nhất sau 20 giờ lên men với mật độ là 32,5 x 10^9 (tế bào/mL) và hiệu suất thu hồi là 36,21% và giảm dần sau đó. Theo nghiên cứu của Ngô Thị Huyền Trang & Vũ Văn Hạnh (2017) thì thời gian lên men lỏng có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và phát triển của nấm men cụ thể sinh khối nấm men cao nhất sau 18 giờ lên men. Kết quả này cũng phù hợp với quá trình

sinh trưởng và phát triển trong nuôi cấy liên tục của nấm men. Sau 22 giờ, khối lượng khô nấm men hầu như không thay đổi.

3.2.4. Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ đối với hiệu suất thu hồi β glucan

Tiến hành khảo sát chủng nấm men B2 trên 3 khoảng nhiệt độ 20, 25, 30°C và ở điều kiện môi trường H3, pH = 5.5, 20 giờ. Sau quá trình nuôi cấy tiến hành thu nhận sinh khối, tách chiết và xác định hiệu suất thu hồi β-glucan. Kết quả ghi nhận được thể hiện trong bảng 3.6.

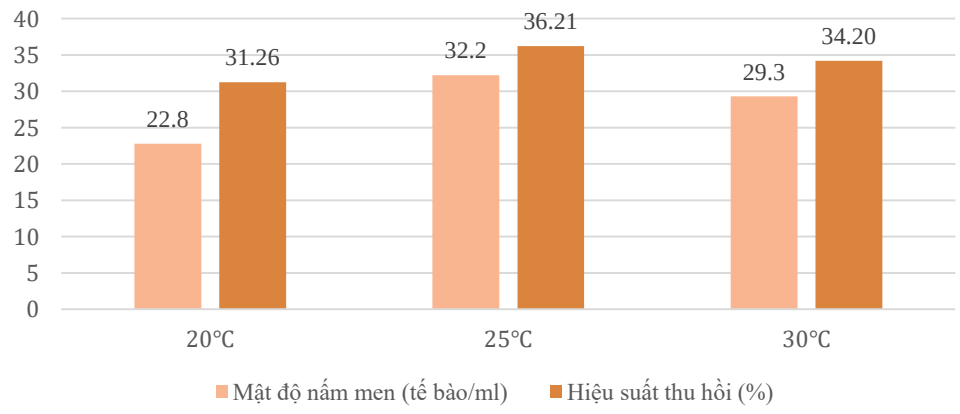
Bảng 3.6. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan

Nhiệt độ	20°C	25°C	30°C
Mật độ nấm men 10^9 (tế bào/mL)	$22,8^{c} \pm 0,42$	**$32,2^{a} \pm 0,51$**	$29,3^{b} \pm 0,38$
Hiệu suất thu hồi (%)	$31,26^{c} \pm 0,97$	**$36,21^{a} \pm 0,99$**	$34,2^{b} \pm 0,89$

(Các số trong cùng một hàng có ký tự chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu với mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey)

Từ kết quả bảng 3.6 cho thấy nhiệt độ ảnh hưởng trực tiếp đến mật độ sinh khối và hiệu suất thu hồi β-glucan của chủng nấm men B2. Với nhiệt độ 25°C thì mật độ sinh khối đạt 32,2 x 10^9 (tế bào/mL) và hiệu suất thu hồi đạt 36,21% là cao hơn so với các mốc nhiệt độ khác mà chúng tôi đã khảo sát.

Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng điều kiện nhiệt độ đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan



Kết quả này tương đồng với Deed et al. (2017), người đã báo cáo rằng ở nhiệt độ cao hơn có lợi cho quá trình lên men, trong khi nhiệt độ thấp dẫn đến quá trình lên men chậm hơn có thể làm giảm khả năng chịu đựng của nấm men đối với các chất ức chế khác. Chúng bị ảnh hưởng đáng kể bởi nhiệt độ lên men, khi nhiệt độ tăng từ 25℃ đến 30℃ thì cho mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi cao hơn khi lên men dưới 25℃.

Qua quá trình khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đối với quá trình sinh trưởng và phát triển của nấm men cho kết quả tại nhiệt độ 25℃ thì tốt hơn so với 2 nhiệt độ còn lại. Do đó chúng tôi chọn nhiệt độ 25℃ để tiếp tục thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của EDTA và SDS

Tiến hành khảo sát chủng nấm men B2 trên môi trường H3 ở điều kiện pH = 5.5, nhiệt độ 25℃, 20 giờ. Sau quá trình nuôi cấy tiến hành thu nhận sinh khối, tách chiết và xác định hiệu suất thu hồi β-glucan. Kết quả ghi nhận được thể hiện trong bảng 3.7 dưới đây:

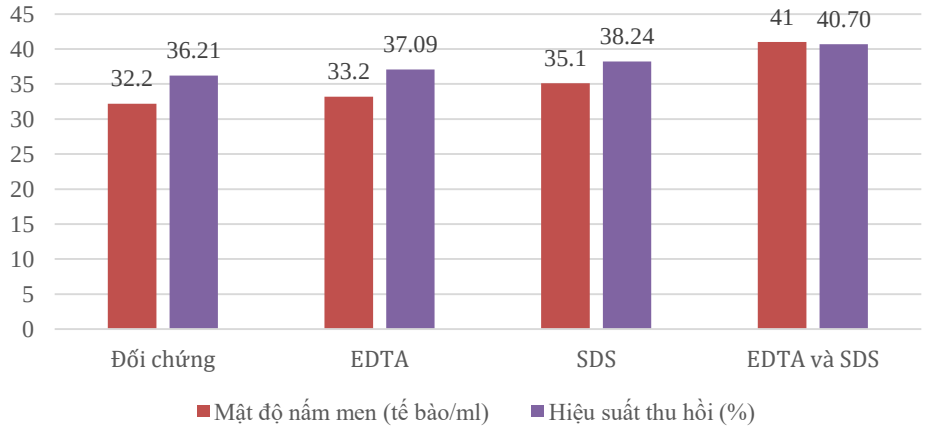
Bảng 3.7. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của EDTA và SDS đối với quá trình sinh trưởng nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan

	Đối chứng	**EDTA**	**SDS**	**EDTA và SDS**
Mật độ nấm men 10^9 (tế bào/mL)	$32,2^{d} \pm 0,51$	$33,2^{c} \pm 0,2$	$35,1^{b} \pm 0,6$	**$41^{a} \pm 0,75$**
Hiệu suất thu hồi (%)	$36,21^{c} \pm 0,99$	$37,09^{bc} \pm 0,69$	$38,24^{b} \pm 0,54$	**$40,7^{a} \pm 0,72$**

(Các số trong cùng một hàng có ký tự chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu với mức ý nghĩa 5% theo phép thử Tukey)

Kết quả từ bảng 3.7 cho thấy rằng sự kết hợp giữa SDS và EDTA giúp thúc đẩy sinh trưởng và phát triển của nấm men trong môi trường cũng như là tăng cường quá trình tổng hợp β-glucan trong tế bào và tăng hiệu suất thu hồi sản phẩm. Với các chỉ số về mật độ và hiệu suất thu hồi lần lượt đạt 41 x 10^9 tế bào/mL và 40,7% thì chúng tôi chọn điều kiện kết hợp này để lên men thu sinh khối nấm men và β-glucan.

Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng điều kiện EDTA và SDS đến mật độ nấm men và hiệu suất thu hồi β-glucan



Người ta thấy rằng hàm lượng β-glucan của nghiệm thức có bổ sung 100 ppm SDS cho thấy hàm lượng β-glucan cao nhất, cao hơn so với đối chứng (cao hơn khoảng 39%). Kết quả tương ứng tốt với các nghiên cứu trước đó báo cáo rằng chất tẩy rửa, SDS, có thể hoạt động trên màng sinh chất, có thể làm tăng hoạt động tổng hợp β-1,3-glucan và kích thích sự khử cực của gen tổng hợp β-glucan (Frost et al, 1992; Frost et al, 1994; Delley & Hall, 1999; Casano et al, 2001; Lesage & Bussey, 2006). Do đó, quá trình nảy chồi, tổng hợp thành tế bào, số lượng tế bào và hàm lượng β-glucan được tăng lên, thành tế bào được sinh tổng hợp chủ yếu trong quá trình nảy chồi (Frost et al, 1994; Cabib, 2001). Tỷ lệ polysaccharide trên protein cho thấy cao hơn so với đối chứng và các nghiệm thức khác khi nấm men được nuôi cấy với 100 ppm SDS, nghĩa là hàm lượng protein trong tế bào nấm men thấp hơn. Bởi vì một số protein trong thành tế bào có thể được chiết xuất bằng SDS, do đó, protein thấp đã được quan sát thấy (Montijn et al, 1999). Số lượng polysaccharide cao hơn được tìm thấy khi nấm men được nuôi cấy với một số chất phụ gia. Ngoại trừ khi nấm men được nuôi cấy với 50 ppm EDTA thì tỷ lệ glucan thấp hơn một chút so với SDS. Kết quả này có thể được giải thích rằng EDTA kích thích β- (1,3) glucan tổng hợp, vì vậy việc có bổ sung thêm EDTA thì hiệu suất đạt cao hơn, do đó tỷ lệ đối chứng thấp nhất so với việc bổ sung EDTA và SDS đã được quan sát (Leal et al, 1984; Guillen et al, 1985).

Đã có báo cáo rằng việc bổ sung EDTA, florua và GTP vào môi trường nuôi cấy sẽ kích thích hoạt động tổng hợp β-1,3-glucan ở *S. cerevisiae* (Leal et al., 1984). Do đó,

rõ ràng là các chất phụ gia có thể kích hoạt sự hình thành β-glucan và tổng hợp thành tế bào của tế bào nấm men (Delley & Hall, 1999; Smits et al., 2001; Klis et al., 2002; Hohmann, 2003). Như vậy, việc nấm men được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung SDS và EDTA cho thấy rằng các chất phụ gia có thể kích hoạt sản sinh thành tế bào, phân nhánh và tổng hợp β-glucan trong tế bào nấm men (Naruemon et al, 2013).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

1. Từ 5 chủng nấm men *S. cerevisiae* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, khoa Sinh học, trường Đại học Đà Lạt chúng tôi đã tuyển chọn được chủng nấm men ký hiệu là B2 cho mật độ sinh khối và hiệu suất thu hồi β-glucan cao hơn so với các chủng nấm men còn lại với mật độ đạt 25,8 x 10^9 tế bào/mL và hiệu suất thu hồi là 33,66%.

2. Điều kiện thích hợp để nhân nuôi sinh khối nấm men có khả năng sinh tổng hợp β-glucan là: môi trường H3, nhiệt độ 25°C, pH 5.5, và thời gian nuôi cấy là 20 giờ.

3. Sự kết hợp giữa SDS và EDTA với hàm lượng lần lượt là 80 pg/L và 30 pg/L vào môi trường nuôi cấy có khả năng thúc đẩy sự phát triển của nấm men và kích thích quá trình sinh tổng hợp β-glucan có trong thành tế bào nấm men. Với các chỉ số về mật độ và hiệu suất thu hồi lần lượt đạt 41 x 10^9 tế bào/mL và 40,7%.

2. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa các thông số: pH, thời gian, nhiệt độ trong quá trình lên men bằng hệ thống Bioreactor.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anwar, M. I., Muhammad, F., Awais, M. M., & Akhtar, M. (2017). A review of β-glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal*, *73*(3), 651-661.

BCC Pharma (10/06/2020). "Nghiên cứu tách chiết thành công Beta Glucan: Tin vui cho bệnh nhân ung thư". Truy cập ngày 21 tháng 09 năm 2021.

Cabib, E., Roh, D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B. and Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 276(23): 19679–19682.

Casano, I. C., Martiń, H., Flandez, M., Nombela, C. and Molina, M. (2001). Pim1, a MAP kinase involved in cell wall intergrity in Pichia pastoris. *Molecular Genetics and Genomics* 265: 604- 614.

Czop, J. K., & Austen, K. F. (1985). A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *The Journal of Immunology*, *134*(4), 2588-2593.

Deed, R. C., Fedrizzi, B., & Gardner, R. C. (2017). Influence of fermentation temperature, yeast strain, and grape juice on the aroma chemistry and sensory profile of Sauvignon blanc wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, *65*(40), 8902-8912.

Delley, P. A., & Hall, M. N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *The Journal of cell biology*, *147*(1), 163-174.

Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., & Patil, R. T. (2012). Dietary fibre in foods: a review. *Journal of food science and technology*, *49*(3), 255–266.

Du, B., Lin, C., Bian, Z., & Xu, B. (2015). An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 49-59.

Du, B., Meenu, M., Liu, H., & Xu, B. (2019). A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β-Glucan. *International journal of molecular sciences.*

Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O., & Dutler, H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1, 3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae. *Carbohydrate Polymers*, *54*(2), 159-171.

Frost, D. J., Brandt, K., Capobianco, J., & Goldman, R. (1994). Characterization of (1, 3)-β-glucan synthase in Candida albicans: microsomal assay from the yeast or mycelial morphological forms and a permeabilized whole-cell assay. *Microbiology*, *140*(9), 2239-2246.

Frost, D. J., Drake, R. R., & Wasserman, B. P. (1992). (1, 3)-β-Glucan synthase fromSaccharomyces cerevisiae: In vitro activation byβ-lactoglobulin or Brij-35, and photoaffinity labeling of enriched microsomal fractions with 5-azido-UDP-Glc and 8-azido-GTP. *Current Microbiology*, *24*(5), 295-300.

Garba, U., & Kaur, S. (2014). Protein isolates: Production, functional properties and application. *International journal of current research and review*, *6*(3), 35.

Guillien, A., Leal, F., Andaluz, E. and Larriba, G. (1985). Endogenous factors that modulate yeast glucan synthetase in cell-free extracts. Biochimica et Biophysica Acta 842: 151-161

Hohmann, S. (2003). Yeast Stress Response. First edition, Springer-Verlag Berlin Heideberg. Germany.

Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Wildenauer, F. X., Lisdat, F., Fleischer, L. G., & Kurz, T. (2008). Antioxidative activity of (1→ 3),(1→ 6)-β-d-glucan from Saccharomyces cerevisiae grown on different media. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(5), 868-877.

Javmen, A., Grigiškis, S., & Gliebutė, R. (2012). β-glucan extraction from Saccharomyces cerevisiae yeast using Actinomyces rutgersensis 88 yeast lyzing enzymatic complex. *Biologija*, *58*(2).

Kath, F., & Kulicke, W. M. (1999). Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, *268*(1), 59-68.

Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M., & Agyei, D. (2019). Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. *Fibers*, *8*(1), 1.

Kim, K. S., & Yun, H. S. (2006). Production of soluble β-glucan from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(3), 496-500.

Kimura, M. (1980). "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences", *Journal of molecular evolution*, 16(2), pp. 111-120.

Klis, F. 1994. Cell wall assembly in yeast. Yeast 10: 851- 869

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS microbiology reviews*, *26*(3), 239-256.

Lamees, MRA., Nadhem, HH., Reem, W. (2013). Optimum conditions for Biomass and lytic enzyme production by Sacharomyces cerevisiae and removal of tatal solids from waste of processing. J Biotechnol Res Cent 7(3): 61-73

Lê Gia Hy & Khuất Hữu Thành (2010). *Cơ sở Công nghệ vi sinh vật và ứng dụng*. NXB Giáo dục Việt Nam, 94-102.

Leal, F., Ruiz-Herrera, J., Villanueva, J.R. and Larriba, G. (1984). An examination of factors affecting the instability of Saccharomyces cerevisiae glucan synthetase in cell free extracts. *Archives of Microbiology* 137: 209 - 214.

Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology and Molecular Biology* Reviews 70: 317–343.

Li, W., Cui, S. W., & Kakuda, Y. (2006). Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat β-D-glucans. *Carbohydrate Polymers*, *63*(3), 408-416.

Liu, D., Zeng, X. A., Sun, D. W., & Han, Z. (2013). Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *18*, 132-137.

Liu, X. Y., Wang, Q., Cui, S. W., & Liu, H. Z. (2008). A new isolation method of β-D-glucans from spent yeast Saccharomyces cerevisiae. *Food Hydrocolloids*, *22*(2), 239-247.

Lý Thị Minh Hiền, Đoàn Hạnh Kiểm & Trần Thị Thu Chi (2015). Nghiên cứu quy trình tách chiết Beta glucan từ tế bào *Saccharomyces cerevisiae* trong bã men bia. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học mở T.p Hồ Chí Minh*, 10(1), 14-20.

Magnani, M., Castro-Gomez, R. J. H., Mori, M. P., Kuasne, H., Gregório, E. P., Libos Jr, F., & Cólus, I. M. D. S. (2011). Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. *Genetics and Molecular Biology*, *34*(1), 131-135.

Medawar, W., Strehaiano, P., & Délia, M. L. (2003). Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media. *Food Microbiology*, *20*(5), 527-532.

Milic, T. V., Rakin, M. & Marinkovic, S. S. (2007). Utilization of baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery", *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(5), 451–457.

Montijn, R. C., Vink, E., Muller, W. H., Verkleij, A. J., Ende, H. V. D. E, Henrissat, B. and Klis, F. M. (1999). Localization of synthesis of β-1,6-glucan in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Bacteriology* 181(24): 7414–7420

Naruemon, M., Romanee, S., Cheunjit, P., Xiao, H., McLandsborough, L. A., & Pawadee, M. (2013). Influence of additives on Saccharomyces cerevisiae [Beta]-glucan production. *International food research journal*, *20*(4), 1953.

Ngô Thị Huyền Trang & Vũ Văn Hạnh (2017). Nghiên cứu tối ưu điều kiện sản xuất sinh khối nấm men *saccharomyces cerevisiae* SC2.75. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 15(3): 581 – 588

Nguyễn Ngọc Sơn (2013). Luận văn Thạc sĩ: Nghiên cứu tách chiết beta glucan từ thành tế bào nấm men bia. Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

Nguyễn Phú Thu Thủy (2017). Nghiên cứu thu hồi vách tế bào giàu β-glucan từ nấm men. Luận văn Thạc sĩ. Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học quốc gia Hà Nội.

Nguyễn Thị Kim Khang, Phạm Ngọc Du, Đỗ Võ Anh Khoa & Sơn Ngọc Thái (2016). Ảnh hưởng của bổ sung Beta-glucan lên năng suất và chất lượng trứng gà đẻ thương phẩm Hisex Brown. *Tạp chí Khoa hoc Trường Đai học Cần Thơ.*

Nguyen, T. H., Fleet, G. H., & Rogers, P. L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied microbiology and biotechnology*, *50*(2), 206-212.

Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, *29*(2-3), 207-233.

Othman, R. A., Moghadasian, M. H., & Jones, P. J. (2011). Cholesterol-lowering effects of oat β-glucan. *Nutrition reviews*, *69*(6), 299-309.

Pelizon, A. C., Kaneno, R., Soares, A. M. V. C., Meira, D. A., & Sartori, A. (2005). Immunomodulatory activities associated with β-glucan derived from Saccharomyces cerevisiae. *Physiological Research*, 557-564.

Phan Trung Trực (2020). Nghiên cứu tuyển chọn và nhân sinh khối các chủng nấm men có khả năng lên men quả cà phê tươi

Pillemer, L. and Ecker (1941). "Anticomplementary factor in fresh yeast", *Journal of Biological Chemistry*, 137, pp. 139 – 142

Pillermer, L. and E.E. Ecker (1941), “Anticomplementary factor in fresh yeast”, *Journal of Biological Chemistry*, 137, pp, 139-142.

Riggi, S. J. and N. R. Di Luzio (1961). “Identification of a reticuloendothelial stimulating ahent in zymosan”, *The American journal of physiology*, 200, pp. 297- 300.

Riggi, S.J. and N.R. Di Luzio (1961). “Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan”, *The American journal of physiology*, 200, pp, 297-300.

Smits, G.J., Ende, H. and Klis, F.M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. Microbiology 147: 781-794.

Steve Dritz, Jishu Shi, T L Kielian, R G Goodband (1995). Influence of Dietary b-Glucan on Growth Performance, Nonspecific Immunity, and Resistance to Streptococcus suis Infection in Weanling Pigs1,2 *Journal of Animal Science*, 73(11): 3341-50

Storsley, J. M., Izydorczyk, M. S., You, S., Biliaderis, C. G., & Rossnagel, B. (2003). Structure and physicochemical properties of β-glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley. *Food Hydrocolloids*, *17*(6), 831-844.

Suphantharika, M., Thammakiti, S., Phaesuwan, T., & Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry. *International journal of food science & technology*, *39*(1), 21-29.

Tâm, T. M., Duy, N. Q., Minh, N. P., & Dao, D. T. A. (2013). Optimization of Beta-Glucan extraction from waste brewer’s yeast Saccharomyces cerevisiae using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme-ultrasonic treatment. *American Journal of Research Communication*, *1*(11), 149-158.

Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T., & Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry. *International journal of food science & technology*, *39*(1), 21-29.

Trần Minh Tâm (2013). Optimization of βeta-glucan extraction from waste brewer's yeast saccharomyces cerevisiae using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme – ultrasonic treatment, *American Journal of Research Communication*, 1(11): 149- 158

Trương Bình Nguyên (2014). Luận văn Thạc sĩ: Nghiên cứu tách chiết beta glucan từ nấm Thái Dương *Agaricus blazei* và thử nghiệm khả năng tăng cường miễn dịch động vật. Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học quốc gia TP.HCM

Walker, GM 1999. Sinh lý học nấm men và công nghệ sinh học. Ấn bản đầu tiên. John Wiley & Sons Ltd. Hoa Kỳ.

Wang Y., Zhang L. (2006). Chain conformation of carboxymethylated derivatives of (1 - 3)-*β*-d-glucan from *Poria cocos sclerotium*. *Carbohydr. Polym.* 65:504–509.

Wenger, M. D., DePhillips, P., & Bracewell, D. G. (2008). A microscale yeast cell disruption technique for integrated process development strategies. *Biotechnology Progress*, *24*(3), 606-614.

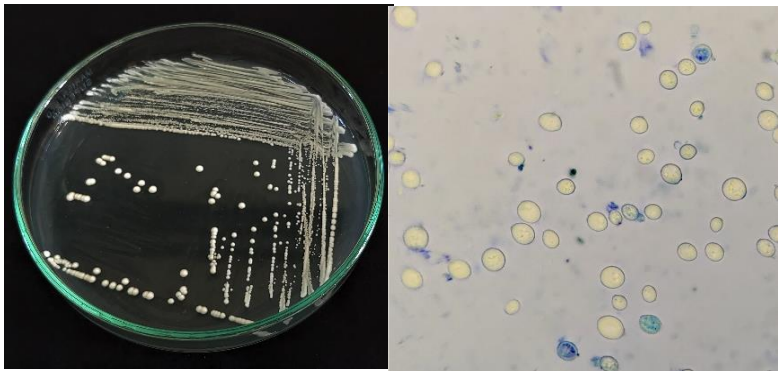
Yiannikouris, A., Francois, J. E. A. N., Poughon, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., & Jouany, J. P. (2004). Alkali extraction of β-D-glucans from Saccharomyces cerevisiae cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(11), 3666-3673. Doi: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf035127x

Yuan, H., Lan, P., He, Y., Li, C., & Ma, X. (2020). Effect of the modifications on the physicochemical and biological properties of β-glucan—a critical review. *Molecules*, *25*(1), 57.

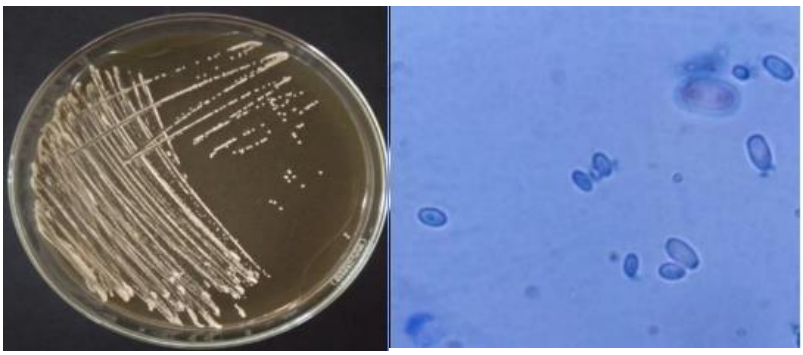
Zhang, M., Zhang, L., Wang, Y., & Cheung, P. C. K. (2003). Chain conformation of sulfated derivatives of β-glucan from sclerotia of Pleurotus tuber-regium. *Carbohydrate Research*, *338*(24), 2863-2870.

PHỤ LỤC

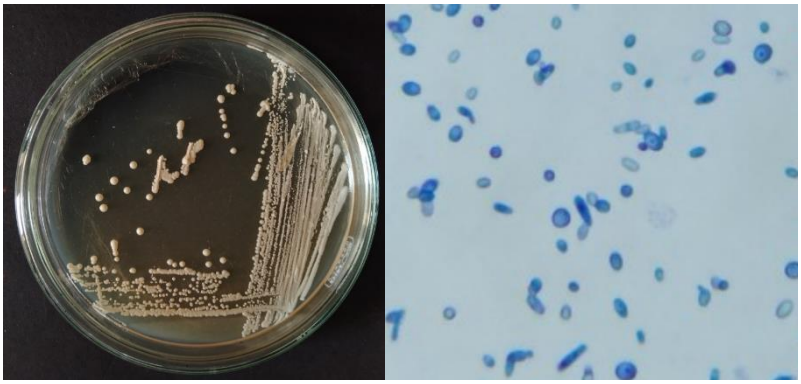
Phụ lục 1: Hình ảnh các chủng nấm men *S. cerevisiae*



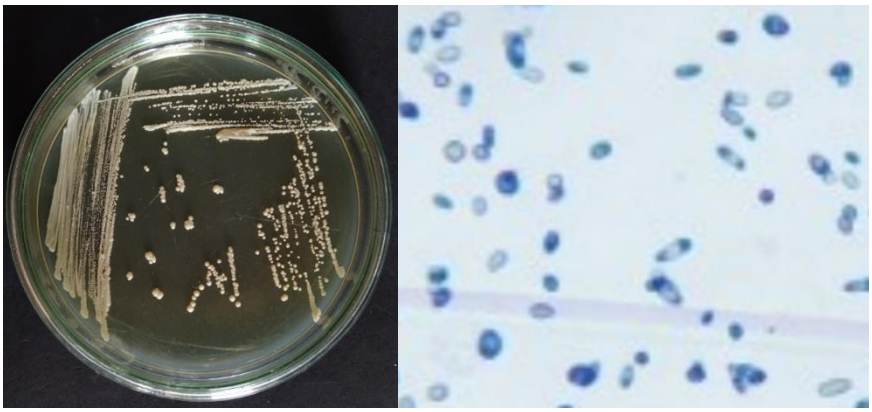
Hình 1.1. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng B1



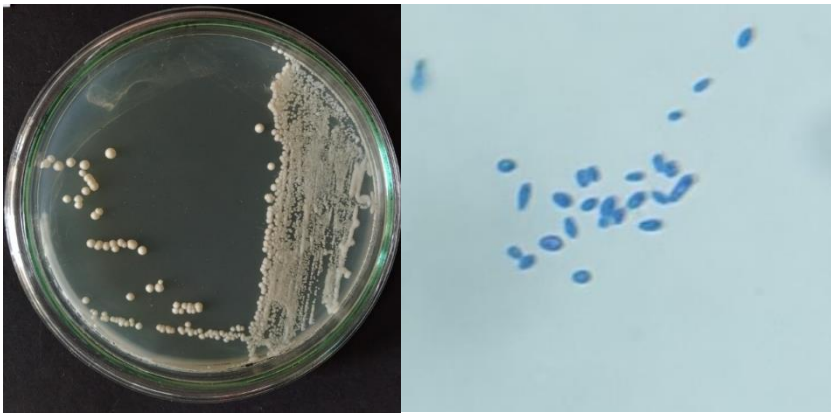
Hình 1.2. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng B2



Hình 1.3. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng B3

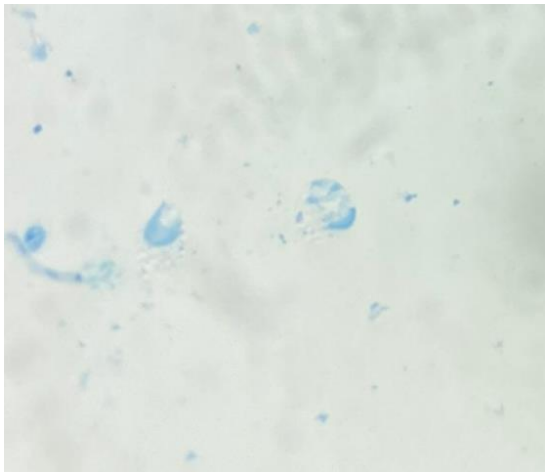


Hình 1.4. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng B4



Hình 1.5. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng B5

Phụ lục 2: Hình ảnh các thí nghiệm tách chiết β – glucan



Hình ảnh tế bào nấm men bị phá vỡ



Hình ảnh mẫu sau khi xử lý với enzyme



Qúa trình thủy phân β – glucan



Hình ảnh mẫu β – glucan sau khi được

Phụ lục 3: Môi trường nuôi cấy

Môi trường Hansen (H1)

Sucrose	50g
Peptone	10g
K_2HPO_4	3g
$MgSO_4.7H_2O$	2g
Nước cất	1000mL

Môi trường Hansen cải tiến (H2)

Sucrose	50g
Nước chiết thịt	100mL
K_2HPO_4	3g
$MgSO_4.7H_2O$	2g
Nước chiết giá	200mL
Vitamin B1	1%
Nước cất	700mL

Môi trường H3

Dịch chiết giá	50%
Dịch chiết khoai	25%
Gỉ đường	25%

Dịch chiết khoai: cắt nhỏ 1 kg khoai tây, cho vào 1l nước, đun trong 30 phút sau đó lọc bỏ bã lấy dịch chiết.

Dịch chiết giá: bóp vụn 1kg giá, cho vào 1l nước, đun trong 30 phút sau đó lọc bỏ bã lấy dịch chiết.

Dịch chiết thịt: cắt nhỏ 100g thịt nạc, cho vào 1l nước, đun trong 1 giờ sau đó lọc bỏ bã lấy dịch chiết.

Gỉ đường: pha loãng 100mL gỉ đường trong 500mL nước, đun sôi cho tan hết dịch rỉ đường, sử dụng H_2SO_4 tủa các chất khó tan tồn tại trong dung dịch, lọc bỏ tủa sau đó đưa pH dung dịch về 5.0.

Phụ lục 4: Xử lý số liệu

Số liệu về mật độ nấm men của các chủng nấm men *S. cerevisiae*

Chủng nấm men	Mật độ (10^9 tế bào/ml)			Trung bình
B1	21.53	21.12	20.35	21
B2	25.86	25.19	26.35	25.8
B3	21.33	21.74	21.43	21.5
B4	22.74	22.59	22.17	22.5
B5	22.93	22.36	23.11	22.8

Số liệu về khối lượng sinh khối ban đầu của các chủng nấm men *S. cerevisiae*

Chủng nấm men	Khối lượng sinh khối ban đầu (g)			Trung bình
B1	19	18.85	18.34	18.73
B2	23.2	24.05	23.7	23.65
B3	19.12	18.73	18.97	18.94
B4	19.26	20.73	19.65	19.88
B5	22.1	21.85	21.3	21.75

Số liệu về khối lượng sinh khối khô của các chủng nấm men *S. cerevisiae*

Chủng nấm men	Khối lượng sinh khối khô (g)			Trung bình
B1	4.78	4.65	4.31	4.58
B2	7.87	7.96	8.05	7.96
B3	4.98	4.91	4.75	4.88
B4	5.45	5.24	5.06	5.25
B5	6.59	6.54	6.61	6.58

Số liệu về hiệu suất thu hồi của các chủng nấm men *S. cerevisiae*

Chủng nấm men	Hiệu suất thu hồi (%)			Trung bình
B1	25.16	24.67	23.50	24.44
B2	33.21	34.31	33.47	33.66
B3	26.59	25.68	25.04	25.77
B4	26.29	26.67	26.27	26.41
B5	30.16	30.70	29.91	30.26

Số liệu về mật độ nấm men của ảnh hưởng điều kiện môi trường

Môi trường	Mật độ (10^9 tế bào/ml)			Trung bình
H1	24.85	24.8	24.45	24.7
H2	27.24	26.72	27.34	27.1
H3	29.99	30.57	30.34	30.3

Số liệu về khối lượng sinh khối ban đầu của ảnh hưởng điều kiện môi trường

Môi trường	Khối lượng sinh khối ban đầu (g)			Trung bình
H1	19.97	19.47	18.85	19.43
H2	21.73	20.93	21.99	21.55
H3	23.44	24.13	23.98	23.85

Số liệu về khối lượng sinh khối khô của ảnh hưởng điều kiện môi trường

Môi trường	Khối lượng sinh khối khô (g)			Trung bình
H1	6.54	6.13	5.84	6.17
H2	7.03	6.87	7.25	7.05
H3	7.76	8.45	8.27	8.16

Số liệu về hiệu suất thu hồi của ảnh hưởng điều kiện môi trường

Môi trường	Hiệu suất thu hồi (%)			Trung bình
H1	32.75	31.48	30.98	31.74
H2	32.35	32.82	32.97	32.71
H3	33.11	35.02	34.49	34.21

Số liệu về mật độ nấm men của ảnh hưởng điều kiện pH

pH	Mật độ (10^9 tế bào/ml)			Trung bình
5,0	23.1	22.65	21.75	22.5
5,5	30.34	29.99	30.57	30.3
6,0	21.25	22.31	21.84	21.8

Số liệu về khối lượng sinh khối ban đầu của ảnh hưởng điều kiện pH

pH	Khối lượng sinh khối ban đầu (g)			Trung bình
5	23.01	22.46	22.18	22.55
5,5	23.98	23.44	24.13	23.85
6	19.76	20.51	20.12	20.13

Số liệu về khối lượng sinh khối khô của ảnh hưởng điều kiện pH

pH	Khối lượng sinh khối khô (g)			Trung bình
5	6.56	6.32	6.47	6.45
5,5	7.51	7.26	7.7	7.49
6	7.76	8.45	8.27	8.16

Số liệu về hiệu suất thu hồi của ảnh hưởng điều kiện pH

pH	Hiệu suất thu hồi (%)			Trung bình
5	28.51	28.14	29.17	28.61
5,5	31.32	30.97	31.91	31.40
6	39.27	41.20	41.10	40.52

Số liệu về mật độ nấm men của ảnh hưởng điều kiện thời gian

Thời gian	Mật độ (10^9 tế bào/ml)			Trung bình
16 giờ	30.6	30.2	29.2	30
20 giờ	32.48	32.06	32.96	32.5
24 giờ	29.99	30.57	30.34	30.3

Số liệu về khối lượng sinh khối ban đầu của ảnh hưởng điều kiện thời gian

Thời gian	Khối lượng sinh khối ban đầu (g)			Trung bình
16 giờ	23.89	23.34	23.12	23.45
20 giờ	24.31	23.42	24.57	24.1
24 giờ	23.44	24.13	23.98	23.85

Số liệu về khối lượng sinh khối khô của ảnh hưởng điều kiện thời gian

Thời gian	Khối lượng sinh khối khô (g)			Trung bình
16 giờ	7.43	7.23	6.82	7.16
20 giờ	8.87	8.36	9.02	8.75
24 giờ	7.76	8.45	8.27	8.16

Số liệu về hiệu suất thu hồi của ảnh hưởng điều kiện thời gian

Thời gian	Hiệu suất thu hồi (%)			Trung bình
16 giờ	31.10	30.98	29.50	30.53
20 giờ	36.49	35.70	36.71	36.30
24 giờ	33.11	35.02	34.49	34.20

Số liệu về mật độ nấm men của ảnh hưởng điều kiện nhiệt độ

Nhiệt độ	Mật độ (10^9 tế bào/ml)			Trung bình
20°C	23.17	22.89	22.34	22.8
25°C	32.32	31.64	32.64	32.2
30°C	28.87	29.61	29.42	29.3

Số liệu về khối lượng sinh khối ban đầu của ảnh hưởng điều kiện nhiệt độ

Nhiệt độ	Khối lượng sinh khối ban đầu (g)			Trung bình
20°C	23.16	22.89	22.29	22.78
25°C	24.32	23.72	24.86	24.3
30°C	22.91	23.93	23.51	23.45

Số liệu về khối lượng sinh khối khô của ảnh hưởng điều kiện nhiệt độ

Nhiệt độ	Khối lượng sinh khối khô (g)			Trung bình
20℃	7.32	7.32	6.72	7.12
25℃	8.98	8.32	9.1	8.8
30℃	7.6	8.34	8.12	8.02

Số liệu về hiệu suất thu hồi của ảnh hưởng điều kiện nhiệt độ

Nhiệt độ	Hiệu suất thu hồi (%)			Trung bình
20℃	31.61	31.98	30.15	31.24
25℃	36.92	35.08	36.60	36.20
30℃	33.17	34.85	34.54	34.19

Số liệu về mật độ nấm men của ảnh hưởng EDTA và SDS

	Mật độ (10^9 tế bào/ml)			Trung bình
ĐC	32.64	32.32	31.64	32.2
EDTA	33.12	33.05	33.43	33.2
SDS	34.48	35.67	35.15	35.1
EDTA và SDS	41.58	41.27	40.15	41

Số liệu về khối lượng sinh khối ban đầu của ảnh hưởng EDTA và SDS

	Khối lượng sinh khối ban đầu (g)			Trung bình
ĐC	24.86	24.32	23.72	24.3
EDTA	25.51	24.94	25.99	25.48
SDS	25.3	26.66	26.34	26.1
EDTA và SDS	27.56	27.32	26.27	27.05

Số liệu về khối lượng sinh khối khô của ảnh hưởng EDTA và SDS

	Khối lượng sinh khối khô (g)			Trung bình
ĐC	9.1	8.98	8.32	8.8
EDTA	9.54	9.05	9.76	9.45

SDS	9.82	10.18	9.94	9.98
EDTA và SDS	11.02	11.32	10.69	11.01

Số liệu về hiệu suất thu hồi của ảnh hưởng EDTA và SDS

	Hiệu suất thu hồi (%)			Trung bình
ĐC	36.60	36.92	35.08	36.20
EDTA	37.40	36.29	37.55	37.08
SDS	38.81	38.18	37.74	38.25
EDTA và SDS	39.99	41.43	40.69	40.70