

Evaluation of fermentative activities of yeasts isolated from guava fruit (*Psidium guajava* L.)**Nhu Q. Lam, Dat Q. Le, Thien D. Nguyen, Minh N. Le, Phong V. Nguyen, & Thanh T. L. Bien***

Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO**Research Paper**

Received: December 11, 2023

Revised: April 02, 2024

Accepted: April 15, 2024

Keywords

Evaluation

Fermentation

Guava

Isolation

Yeast

***Corresponding author**

Bien Thi Lan Thanh

Email:

bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The study was conducted to isolate and screen yeast strains having good fermentative activities for wine production from guava (*Psidium guajava* L.). Yeasts were isolated from 22 samples of ripe guava fruits (including 4 varieties: Cattley, Taiwan, Ruby Supreme and Queen), which were collected from 6 provinces in the Mekong Delta. The yeast isolates were examined for biological characteristics, including colonial morphology and cell shape, after 48 h of culture, and investigated for fermentative characteristics including production of H₂S gas, temperature and ethanol tolerance, ability to flocculate, production of extracellular enzymes, and fermentation of carbohydrate sources. The results showed that 33 yeast strains were isolated based on colony and cell morphologies. There were 9 isolates from the Taiwan variety, 13 isolates from the Queen variety, 7 isolates from the Cattley variety, and 4 isolates from Ruby supreme. Ten out of 33 isolates did not produce H₂S gas and had good flocculent ability in the fermentative solution after 7 days. Among them, the five yeast isolates (named NHCB1, NHCL4, NHCB4, DLCL1, and NHCB2) had good temperature tolerance at 39°C - 43°C, and high ethanol tolerance at 6% - 8% within 24 h. Three isolates (NHCL4, NHCB2, and NHCB4) with good ability to ferment glucose and fructose were selected for sequencing. The internal transcribed spacer sequences of all three strains were identical to those of *Hanseniaspora opuntiae* (> 99% identity). Briefly, this yeast strain can tolerate ethanol, ferment, and produce an appealing smell, bringing the potential for the production of wine or other fermented products.

Cited as: Lam, N. Q., Le, D. Q., Nguyen, T. D., Le, M. N., Nguyen, P. V., & Bien, T. T. L. (2024). Evaluation of fermentative activities of yeasts isolated from guava fruit (*Psidium guajava* L.). *The Journal of Agriculture and Development* 23(5), 45-60.

Đánh giá hoạt tính lên men của các mẫu nấm men phân lập từ quả ổi (*Psidium guajava* L.)

Lâm Quỳnh Như, Lê Quốc Đạt, Nguyễn Đông Thiên, Lê Nhật Minh, Nguyễn Vũ Phong & Biện Thị Lan Thanh*

Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 11/12/2023

Ngày chỉnh sửa: 02/04/2024

Ngày chấp nhận: 15/04/2024

Từ khóa

Khảo sát

Lên men

Nấm men

Phân lập

Quả ổi

*Tác giả liên hệ

Biện Thị Lan Thanh

Email:

bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm phân lập và tuyển chọn các mẫu nấm men có các hoạt tính lên men tốt để phục vụ cho nghiên cứu rượu vang ổi (*Psidium guajava* L.). Nấm men được phân lập từ 22 mẫu ổi chín (gồm 4 giống: Sẻ, Đài Loan, Trân châu ruột đỏ và Nữ hoàng) được thu thập tại 6 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Các mẫu nấm men phân lập được khảo sát đặc điểm sinh học bao gồm đặc điểm khuẩn lạc và tế bào sau 48 giờ nuôi cấy; và khảo sát đặc điểm lên men gồm: khả năng sinh khí H_2S , khả năng kết lắng, khả năng chịu nhiệt và chịu ethanol, khả năng sinh enzyme ngoại bào và khả năng lên men các nguồn đường khác nhau. Kết quả đã phân lập được tổng số 33 mẫu nấm men dựa theo những đặc điểm về khuẩn lạc và tế bào. Trong đó, 9 mẫu từ giống ổi Đài Loan, 13 mẫu từ giống ổi Nữ hoàng, 7 mẫu từ giống ổi Sẻ và 4 mẫu từ giống ổi Trân châu ruột đỏ. Sau quá trình khảo sát các đặc điểm lên men đã tuyển chọn được 10/33 mẫu không sinh khí H_2S và có khả năng kết lắng tốt trong dịch lên men sau 7 ngày. Trong đó, năm mẫu nấm men kí hiệu NHCB1, NHCL4, NHCB4, DLCL1 và NHCB2 có khả năng chịu nhiệt tốt ở $39^\circ C - 43^\circ C$ và chịu ethanol với nồng độ cao 6% - 8% trong 24 giờ. Qua khảo sát khả năng lên men các nguồn đường, ba mẫu NHCL4, NHCB2 và NHCB4 có khả năng lên men với đường glucose và fructose được tuyển chọn để giải trình tự định danh. Kết quả giải trình tự cho thấy cả 3 mẫu đều tương đồng cao ($> 99\%$) với *Hanseniaspora opuntiae*. Đây là loài nấm men có khả năng chịu ethanol, lên men và tạo mùi hương tốt mang đến tiềm năng cho việc sản xuất rượu vang hoặc các sản phẩm lên men khác.

1. Đặt Vấn Đề

Rượu vang là một loại thức uống có độ cồn nhẹ, giá trị dinh dưỡng cao, hương vị thơm ngon đặc trưng và có lợi cho sức khỏe khi được sử dụng một cách điều độ (German & ctv., 2000). Trong quá trình sản xuất rượu vang, việc đổi mới nguồn

nguyên liệu cùng với cải tiến nguồn men giống nhằm nâng cao chất lượng sản phẩm giữ vai trò vô cùng quan trọng. Nguồn nấm men đóng vai trò then chốt trong quá trình sản xuất rượu vang, tạo ra một môi trường lên men ổn định và hiệu suất cao. Mỗi chủng nấm men sở hữu những đặc tính riêng biệt, ảnh hưởng đến hương vị, cấu trúc

và độ cồn của rượu vang. Sử dụng nguồn nấm men tự nhiên được phân lập từ nguyên liệu chính của quá trình sản xuất rượu vang là một trong những phương pháp hiệu quả đảm bảo sự đồng nhất trong quá trình lên men, giữ nguyên được bản chất tự nhiên của nguyên liệu và giúp tạo ra sản phẩm có độ cồn cao, chất lượng ổn định và mùi vị đặc trưng (Pham & ctv., 2019). Chính vì vậy, những nghiên cứu tuyển chọn nguồn nấm men tự nhiên mang các đặc tính lên men vượt trội hứa hẹn trở thành một xu hướng phát triển được quan tâm trong hiện tại và tương lai.

Việt Nam là một nước có đa dạng về các loại trái cây, song nguyên liệu dùng để sản xuất rượu vang hầu như chỉ xoay quanh các loại trái cây như: nho, dâu, sơ ri. Trong khi đó, ổi (*Psidium guajava* L.) là một trong những loại trái cây nhiệt đới phổ biến, đang được trồng rộng rãi ở nhiều nơi, nhưng quả chủ yếu dùng để ăn tươi. Thành phần dinh dưỡng có trong quả ổi chín như một môi trường lý tưởng cho quần thể nấm men tự nhiên phát triển vì pH thấp, hàm lượng đường cao, giàu các loại acid hữu cơ, protein, pectin, các loại vitamin và khoáng chất (Kamath & ctv., 2008; Qin & ctv., 2017). Đây là những thành phần đặc trưng vốn có để sử dụng cho sản xuất rượu vang. Nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc phân lập, tuyển chọn và ứng dụng chủng nấm men phù hợp cho từng loại trái cây, nhằm tạo ra những sản phẩm rượu vang đặc trưng như rượu vang khóm (Nguyen & ctv., 2013), rượu vang thanh long (Ho, 2011), rượu vang dưa hấu (Ngo & ctv., 2011). Tuy nhiên, lĩnh vực sản xuất rượu vang từ ổi còn khá hạn chế về mặt nghiên cứu, đặc biệt là việc xác định chủng nấm men thích hợp cho quá trình lên men. Vì vậy, có thể thấy rằng quả ổi vừa là một nguồn nguyên liệu lên men rượu vang triển vọng, vừa là một nguồn cung cấp men giống tiềm năng cho sản xuất. Trên hết, lên men rượu vang từ quả ổi còn là một phương pháp giúp tận dụng hiệu quả nguồn nguyên liệu dồi dào sẵn có. Từ đó, góp phần giải quyết các vấn đề khó khăn về thị trường tiêu thụ, hạn chế trong bảo quản và

chế biến quả ổi sau thu hoạch cũng như đa dạng hóa các sản phẩm thương mại từ quả ổi trên thị trường nhằm nâng cao giá trị kinh tế cho nông sản Việt. Tất cả những vấn đề cấp thiết trên, đề tài được thực hiện nhằm tuyển chọn các mẫu nấm men có hoạt tính lên men tốt được phân lập từ quả ổi hướng đến ứng dụng trong lên men rượu vang ổi.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thu mẫu ổi chín và phân lập nấm men

Mẫu quả ổi chín được thu hái trực tiếp, ngẫu nhiên tại vườn ở các địa phương thuộc 6 tỉnh, bao gồm: Bến Tre, Đồng Tháp, Long An, Trà Vinh, Tiền Giang và Cần Thơ. Các giống ổi thu thập bao gồm: Sẻ, Trân châu ruột đỏ, Đài Loan và Nữ hoàng. Quả ổi được lựa chọn phải chín, có màu vàng xanh, trơn bóng, mùi thơm đặc trưng, độ mềm tương đương nhau và được hái ngẫu nhiên trên các cây khác nhau trong một vườn. Mẫu sau khi thu thập được cho vào túi zip vô trùng, dán nhãn kí hiệu và bảo quản lạnh (< 10°C), vận chuyển về phòng thí nghiệm và phân tích trong vòng 24 giờ.

Cho 10 g mẫu ổi được cắt nhỏ thành từng lát có cả phần vỏ và thịt quả vào 90 mL môi trường YPD (yeast extract, peptone, dextrose) lỏng bổ sung Chloramphenicol (100 mg/L) đã được khử trùng (121°C trong 15 phút). Pha loãng 1 mL dịch ổi đã tăng sinh với 9 mL dung dịch đệm PBS thành dãy nồng độ 10^{-1} đến 10^{-5} . Cấy trải 100 μ L dịch pha loãng trên môi trường YPD agar có bổ sung Chloramphenicol (100 mg/L) (Pereira & ctv., 2014). Sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ phòng, các khuẩn lạc đặc trưng của nấm men có hình thái khác nhau được chọn lọc và làm thuần đến khi thu được khuẩn lạc nấm men thuần nhất. Nhuộm và quan sát đặc điểm hình thái, hình dạng tế bào các mẫu nấm men dưới kính hiển vi ở vật kính 100X. Các mẫu nấm men phân lập được bảo quản trong glycerol 20% và trữ ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Khảo sát hoạt tính lên men của các mẫu nấm men phân lập

2.2.1. Khảo sát khả năng sinh khí hydrogen sulfide (H₂S)

Khuẩn lạc đơn của các mẫu nấm men phân lập được nuôi cấy trên môi trường Luria Agar (LA) ở 30°C trong khoảng 7 ngày. Xác định khả năng sinh H₂S bằng cách quan sát màu sắc khuẩn lạc bề mặt môi trường LA (Ono & ctv., 1991; Guimarães & ctv., 2006). Loại bỏ các mẫu nấm men sinh H₂S.

2.2.2. Khảo sát khả năng kết lắng

Các mẫu nấm men tuyển chọn được tăng sinh trong 5 mL môi trường YPD lỏng ở 30°C, lắc 120 vòng/phút trong 24 giờ. Hút 500 µL dịch tăng sinh và đưa vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường Sabouraud lỏng (18° Brix), ủ tĩnh ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày. Đo chiều cao của đoạn dịch trong sau thời gian ủ rồi so sánh với tổng chiều cao của khối môi trường lên men trong ống nghiệm. Nếu tỉ lệ giữa chiều cao của đoạn dịch trong so với chiều cao của khối môi trường lên men dưới 25% (không có khả năng kết lắng), 25% - 50% (kết lắng yếu), 50% - 75% (kết lắng trung bình) và trên 75% (kết lắng tốt) (Guimarães & ctv., 2006; Nguyen & ctv., 2012).

2.2.3. Khảo sát khả năng chịu nhiệt

Hút 500 µL dịch tăng sinh các mẫu nấm men tuyển chọn và cấy vào ống nghiệm chứa 10 mL môi trường YPD lỏng và ủ với dãy nhiệt độ lần lượt từ 30°C, 35°C, 37°C, 39°C, 41°C, 43°C và 45°C trong 24 giờ. Xác định sự tăng trưởng của nấm men bằng cách đo mật độ quang (OD) của dịch tăng sinh ở bước sóng 600 nm tại hai thời điểm trước khảo sát (0 giờ) và sau khảo sát (24 giờ). Song song đó, cấy ria các chủng nấm men phân lập lên môi trường YPD agar và ủ ở các nhiệt độ khác nhau trong 24 giờ. Quan sát sự tạo thành khuẩn lạc của các chủng nấm men khác nhau trên đĩa thạch để tuyển chọn các chủng

nấm men có khả năng phát triển mạnh trên môi trường ở nhiệt độ cao (Doan, 2020).

2.2.4. Khảo sát khả năng chịu ethanol

Hút 500 µL dịch tăng sinh các mẫu nấm men vào từng ống nghiệm chứa 10 mL môi trường YPD lỏng có bổ sung ethanol tinh khiết thành các nồng độ 0, 4, 6, 8 và 10% (v/v). Ủ ở nhiệt độ 30°C, lắc 120 vòng/phút trong 24 giờ. Sự tăng trưởng của nấm men được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) của dịch tăng sinh ở bước sóng 600 nm tại hai thời điểm trước khảo sát (0 giờ) và sau khảo sát (24 giờ) (Lee & ctv., 2011; Doan, 2020).

2.2.5. Khảo sát khả năng lên men các loại đường khác nhau

Các mẫu nấm men tuyển chọn được tăng sinh trong môi trường YPD, tốc độ lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 24 giờ đến khi mật số tế bào nấm men đạt 10⁸ tế bào/mL. Cho 9 mL các dung dịch đường là glucose, saccharose, fructose, maltose (2% w/v) vào từng ống nghiệm có ống Durham (đã hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút), tiếp tục cho vào 1 mL dịch tăng sinh nấm men, lắc đều và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Đánh giá khả năng lên men bằng cách đo cột khí CO₂ trong ống Durham, bắt đầu sau 2 giờ cho đến khi CO₂ đầy ống Durham (chiều cao tối đa là 25 mm), mỗi thời điểm đo cách nhau 2 giờ (Yabaya & ctv., 2016; Pham & ctv., 2019; Nguyen & ctv., 2021).

2.2.6. Khả năng sinh enzyme ngoại bào

a. Khảo sát khả năng sinh pectinase

Nấm men được nuôi cấy trên môi trường khoáng: MnSO₄ (0,05 g/L), KH₂PO₄ (0,2 g/L), (NH₄)₂SO₄ (1,0 g/L), CaCl₂ (0,05 g/L), MgSO₄ (0,8 g/L), yeast extract (1,0 g/L), citric pectin (2,0 g/L) và agar (15 g/L). Khả năng sinh enzyme Pectinase được thể hiện bằng vòng phân giải xung quanh các khuẩn lạc sau khi được nhuộm bằng dung dịch (Haile & Kang, 2019).

b. Khảo sát khả năng sinh protease

Khả năng sinh protease ngoại bào được xác định bằng cách cấy các khuẩn lạc nấm men lên đĩa YPD chứa 2% casein. Các đĩa được ủ trong 5 ngày ở 30°C. Nấm men thể hiện hoạt tính được xác định bằng một vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc do hoạt động của Protease (Strauss & ctv., 2001).

c. Khảo sát hoạt tính cellulase

Khả năng sinh enzyme cellulase được xác định bằng cấy nấm men lên các đĩa YPD chứa 0,4% carboxymethylcellulose (CMC, Sigma). Các đĩa được ủ trong 5 ngày ở 30°C. Các khuẩn lạc được rửa sạch khỏi đĩa bằng nước cất trước khi nhuộm đĩa bằng dung dịch Congo Red và khử màu bằng NaCl 1M (Strauss & ctv., 2001).

d. Khảo sát hoạt tính amylase

Khả năng sinh enzyme amylase được xác định bằng cấy nấm men lên các đĩa YPD với 2% tinh bột. Nấm men được cấy điểm vào bề mặt của thạch bằng que cấy vô trùng và các đĩa được ủ ở 25°C trong 2 - 3 ngày. Tiếp theo ủ, các đĩa được nhuộm với dung dịch lugol. Các vùng trong suốt được hình thành xung quanh các khuẩn lạc nấm men thủy phân tinh bột trong khi phần còn lại của đĩa có màu xanh đậm do iốt tạo phức màu với tinh bột (Charoenchai & ctv., 1997).

2.3. Định danh các mẫu nấm men được tuyển chọn

Các mẫu nấm men có hoạt tính lên men tốt tuyển chọn được định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng Internal Transcribed Spacer (ITS) với cặp mỗi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3') (Martin & Rygielwicz, 2005) và sau đó sử dụng chương trình Nucleotide BLAST để so sánh mức độ tương đồng của trình tự các mẫu nấm men trên ngân hàng gen NCBI.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các khảo sát thực hiện trong quá trình nghiên cứu sử dụng chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* phân lập từ nguồn nước trái cây lên men làm mẫu đối chứng (ĐC). Mỗi thí nghiệm đều được bố trí với 3 lần lặp lại và kết quả của thí nghiệm được trình bày dưới dạng trung bình của 3 lần lặp lại $\pm$ SD. Kết quả thí nghiệm được thống kê bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2010 và xử lý bằng phần mềm Minitab 16 với sự khác biệt của các giá trị trung bình được so sánh bằng cách phân tích ANOVA đơn yếu tố với độ tin cậy trên 99%.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Thu mẫu và phân lập nấm men từ quả ổi chín ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long

Từ 22 mẫu quả ổi chín thuộc 4 giống ổi khác nhau thu thập tại 6 tỉnh khu vực đồng bằng sông Cửu Long (Bến Tre, Cần Thơ, Đồng Tháp, Long An, Tiền Giang và Trà Vinh) đã phân lập được 33 khuẩn lạc mang những đặc điểm đặc trưng của nấm men được thống kê tại Bảng 1. Trong đó, trên giống ổi Nữ hoàng phân lập được số lượng nấm men nhiều nhất là 13 mẫu và thấp nhất là giống ổi Trân châu ruột đỏ với 4 mẫu.

Bảng 1. Các mẫu nấm men phân lập từ bốn giống ổi khác nhau

Giống ổi	Ký hiệu mẫu	Nguồn phân lập	Số mẫu phân lập
Đài Loan	DLCL1, DLCL2	Chợ Lách, Bến Tre	2
	DLCT1, DLCT2, DLCT3	Châu Thành, Đồng Tháp	3
	DLTT1, DLTT2, DLTT3, DLTT4	Thủ Thừa, Long An	4
Nữ hoàng	NHCB1, NHCB2, NHCB3, NHCB4, NHCB5	Chợ Lách, Bến Tre	5
	NHCL1, NHCL2, NHCL3, NHCL4, NHCL5	Châu Thành, Đồng Tháp	5
	NHCT1, NHCT2, NHCT3	Thủ Thừa, Long An	3
Sẻ	SCG1, SCG2, SCG3, SCG4	Cần Giuộc, Long An	4
	STC1, STC2, STC3	Tiểu Cần, Trà Vinh	3
Trần châu ruột đỏ	TCTL1, TCTL2, TCTL3, TCTL4	Thới Lai, Cần Thơ	4
Tổng			33

Trung bình mỗi mẫu ổi chín chỉ phân lập được từ 1 đến 2 khuẩn lạc nấm men có đặc điểm kiểu hình khác nhau. Abranches & ctv. (2000) đã phân lập 257 khuẩn lạc nấm men thuộc 133 loài khác nhau từ 50 mẫu ổi chín rụng tại Brazil và vùng rừng ven Đại Tây Dương. Nhiều nghiên cứu cũng đã phân lập được các chủng nấm men khác nhau từ những loại trái cây nhiệt đới khác. Pham & ctv. (2019) đã phân lập 29 chủng nấm men từ 12 mẫu thanh long ruột đỏ.

Bề mặt vỏ các loại trái cây chín là môi trường lý tưởng để nấm men sinh trưởng. Theo Vadkertiová & ctv. (2012), mật độ nấm men trên quả chín cao hơn 2,5 lần so với hoa hay các bộ phận khác của cây. Việt Nam có nhiều loại trái cây nhiệt đới, cận nhiệt hay ôn đới có lợi thế lớn trong việc phân lập và nghiên cứu về nấm men. Từ đó, các đặc tính vượt trội của nấm men sẽ được khám phá và khai thác hiệu quả cho quá trình lên men công nghiệp thực phẩm, sản xuất các chế phẩm y sinh và một số lĩnh vực khác.

3.2. Đặc điểm sinh học của nấm men phân lập

Ba mươi ba mẫu nấm men phân lập được cấy ria trên môi trường YPD agar, ủ ở nhiệt độ phòng

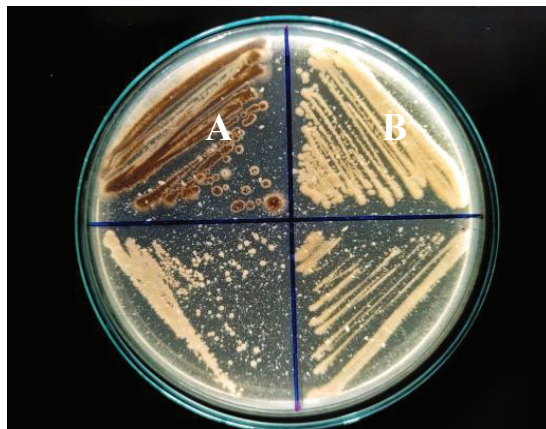
sau 48 giờ để mô tả các đặc điểm về khuẩn lạc và tế bào. Kết quả cho thấy, đặc điểm chung của đa số các mẫu nấm men phân lập đều có khuẩn lạc với màu trắng đục hoặc trắng trong, hình dạng khuẩn lạc tròn, bề mặt khô sần hoặc trơn láng, rìa khuẩn lạc nguyên hoặc răng cưa và phát triển nhô cao lên trên bề mặt môi trường. Kích thước của các khuẩn lạc nấm men phân lập dao động khoảng từ 1,2 mm đến 3,8 mm. Tế bào của các mẫu nấm men phân lập có ba loại hình dạng chính gồm hình ovan, hình elip và hình cầu. Đối với các tế bào ovan có khả năng nấm men thuộc các chi như *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Candida* hay *Brettanomyces*. Nấm men *Pichia*, *Hanseniaspora* hay *Saccharomyces* thường nhận diện với tế bào hình elip. Trong trường hợp các tế bào hình cầu có khả năng nấm men thuộc chi *Hansenula*, *Torulopsis* hay *Saccharomyces* (Luong, 2009). Việc định danh sơ bộ nấm men dựa vào đặc điểm sinh học tế bào như trên chỉ mang tính chất định tính, cần thực hiện kết hợp đồng thời mô tả hình thái khuẩn lạc, khảo sát sinh hóa cùng với giải trình tự để ghi nhận kết quả chính xác hơn.

3.3. Khảo sát hoạt tính lên men của các mẫu nấm men phân lập

3.3.1. Khả năng sinh khí hydrogen sulfide (H_2S)

Khả năng sinh khí hydrogen sulfide (H_2S) của 33 mẫu nấm men phân lập được khảo sát trên môi trường LA. Kết quả được ghi nhận bằng cách quan sát màu sắc của khuẩn lạc nấm men phát triển trên bề mặt môi trường thạch: khuẩn lạc sinh khí H_2S có màu nâu nhạt đến đậm, khuẩn lạc không sinh khí H_2S thì không đổi màu

(Hình 1). Kết quả khảo sát có 10 mẫu nấm men (DLCL1, DLCL2, DLCT1, NHCB1, NHCB2, NHCB4, NHCL4, NHCT2, TCTL2 và TCTL4) không sinh khí H_2S với khuẩn lạc màu trắng và không có sự thay đổi về màu sắc trong suốt thời gian nuôi cấy, các mẫu này được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Tỷ lệ nấm men sinh H_2S trong khảo sát khoảng 69,70% (23/33) thấp so với nghiên cứu tại Ethiopia theo Tsegaye & ctv. (2018) có tỷ lệ 80% (8/10).

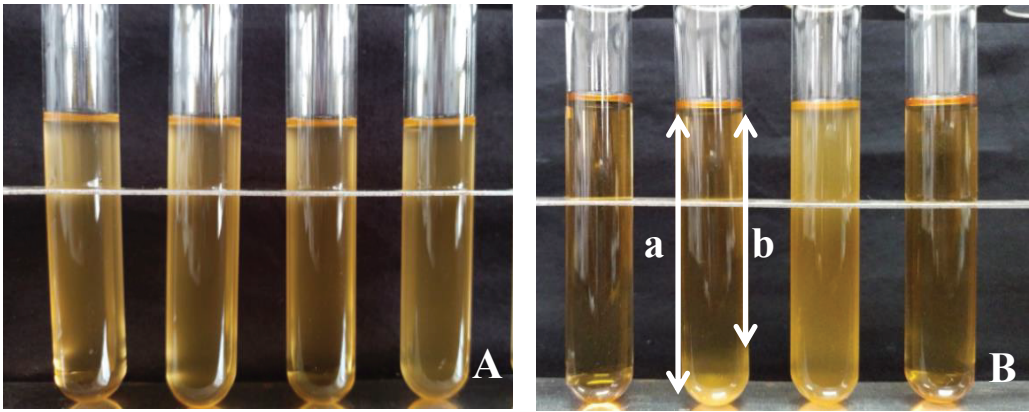


Hình 1. Khuẩn lạc nấm men phát triển trên môi trường Luria Agar sau 7 ngày.
A: Khuẩn lạc dương tính với H_2S ; B: Khuẩn lạc âm tính với H_2S .

3.3.2. Khả năng kết lắng

Với 10 mẫu nấm men không sinh khí H_2S được tuyển chọn khảo sát về khả năng kết lắng. Kết quả ghi nhận tại Hình 2 và Bảng 2 cho thấy, sau 7 ngày lên men thì 9 mẫu (DLCL1, DLCL2, DLCT1, NHCB1, NHCB2, NHCB4, NHCL4, NHCT2 và TCTL2) tạo ra dịch lên men trong và mức độ vẩn đục rất thấp với chiều cao đoạn dịch trong dao động từ 6,07 cm đến 7,17 cm (chiếm tỷ lệ 76% - 90% so với chiều cao khối môi trường lên men là 8 cm). Trong đó, mẫu có khả năng kết lắng tốt nhất với chiều cao đoạn dịch trong đạt 7,17 cm (chiếm tỷ lệ 90%). Ngược lại, mẫu TCTL4 lại cho ra dịch lên men vẩn đục với chiều cao đoạn dịch trong rất thấp là 0,66 cm (chiếm tỷ lệ 8% so với chiều cao đoạn dịch lên

men). Thông qua kết quả của thí nghiệm trên, số lượng nấm men tuyển chọn có khả năng kết lắng tốt đạt tỷ lệ tương đối cao là 90% (9/10 mẫu khảo sát). Theo báo cáo của Guimarães & ctv. (2006), trên 15 mẫu nấm men *Saccharomyces* phân lập từ các nhà máy rượu tỷ lệ nấm men kết lắng đạt 6,67%. Trong khi đó, kết quả khảo sát của Nguyen & ctv. (2012) trên 30 mẫu nấm men từ bánh men rượu thì tỷ lệ này đạt giá trị tuyệt đối là 100% (30/30). Các mẫu men kết lắng tốt không chỉ giảm lượng cặn trong sản phẩm cuối cùng mà còn cải thiện tính ổn định và đồng nhất của rượu vang. Chín mẫu nấm men trên cần được tiếp tục thực hiện các khảo sát sinh hóa cũng như khảo sát về đặc điểm lên men để có thể sử dụng làm nguồn giống cho các quá trình lên men bia và rượu vang một cách hiệu quả nhất.

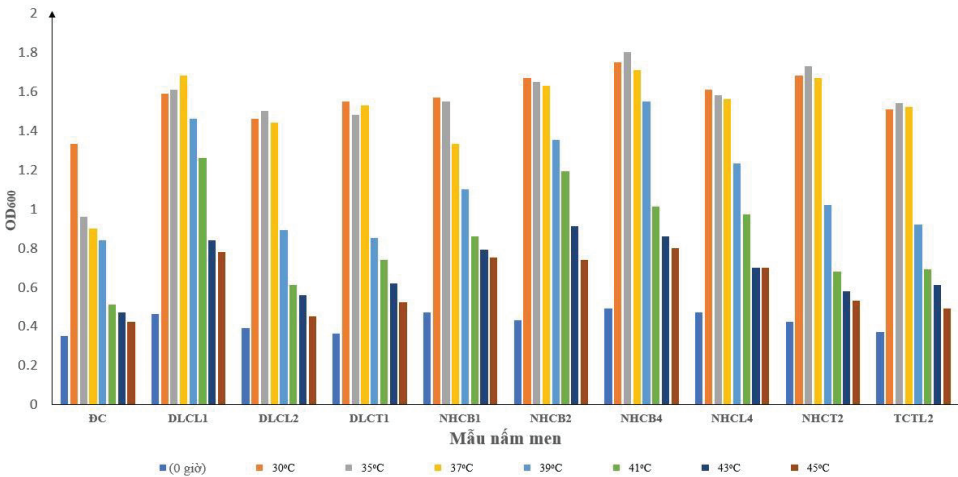


Hình 2. Môi trường Sabouraud trước (A) và sau lên men (B). a: Chiều cao khối môi trường lên men (8 cm); b: Chiều cao đoạn dịch trong.

Bảng 2. Khả năng kết lắng của các mẫu nấm men tuyển chọn

Mẫu nấm men	Đối chứng	DLCL1	DLCL2	DLCT1	NHCB1	NHCB2	NHCB4	NHCL4	NHCT2	TCTL2	TCTL4
Tỉ lệ giữa chiều cao đoạn dịch trong và chiều cao khối môi trường lên men (%)	19	87	83	83	76	85	87	84	90	86	8
Khả năng kết lắng	Không	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	Không

3.3.3. Khả năng chịu nhiệt

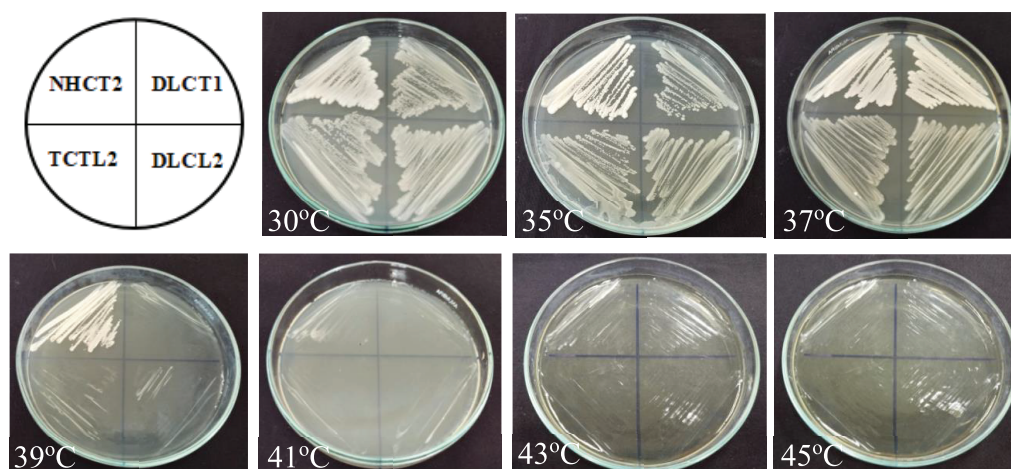


Hình 3. Khả năng chịu nhiệt của các mẫu nấm men tuyển chọn.

Bảng 3. Khả năng phát triển của khuẩn lạc nấm men ở các nhiệt độ khác nhau

Mẫu nấm men	Nhiệt độ						
	30°C	35°C	37°C	39°C	41°C	43°C	45°C
Đối chứng	+	+	+	-	-	-	-
DLCL1	+	+	+	+	+	+	-
DLCL2	+	+	+	+	-	-	-
DLCT1	+	+	+	+	-	-	-
NHCB1	+	+	+	+	+	+	-
NHCB2	+	+	+	+	+	+	-
NHCB4	+	+	+	+	+	+	-
NHCL4	+	+	+	+	+	+	-
NHCT2	+	+	+	+	-	-	-
TCTL2	+	+	+	+	-	-	-
Tổng cộng	10	10	10	9	5	5	0

+: Phát triển; -: Không phát triển.

**Hình 4.** Sự phát triển của các mẫu nấm men ở các nhiệt độ khác nhau.

Kết quả ở Hình 3, Hình 4 và Bảng 3 cho thấy, các mẫu nấm men tuyển chọn đều có khuẩn lạc phát triển tốt ở dãy nhiệt độ từ 30°C - 39°C. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 41°C - 45°C các khuẩn lạc nấm men có xu hướng phát triển yếu dần đi. Ở nhiệt độ 41°C và 43°C có 5 mẫu (DLCL1, NHCB2, NHCB4, NHCL4 và NHCB1) phát triển trên môi trường nhưng số lượng khuẩn lạc quan sát được là rất thấp. Ở nhiệt độ 45°C, cả 9 mẫu đều không thể phát triển sau 24 giờ nuôi cấy.

Trong quá trình lên men các loại rượu vang, một trong những yếu tố quan trọng nhất chính là nguồn nấm men. Đối với nấm men, nhiệt độ có ảnh hưởng quan trọng đến quá trình chuyển hóa đường thành ethanol (Doan & ctv., 2018). Lên men ethanol ở nhiệt độ cao là chìa khóa yêu cầu sản xuất ethanol hiệu quả ở vùng nhiệt đới có nhiệt độ trung bình ban ngày thường cao quanh năm. Ưu điểm của quá trình lên men nhanh ở nhiệt độ cao không chỉ là giảm nguy cơ tạp

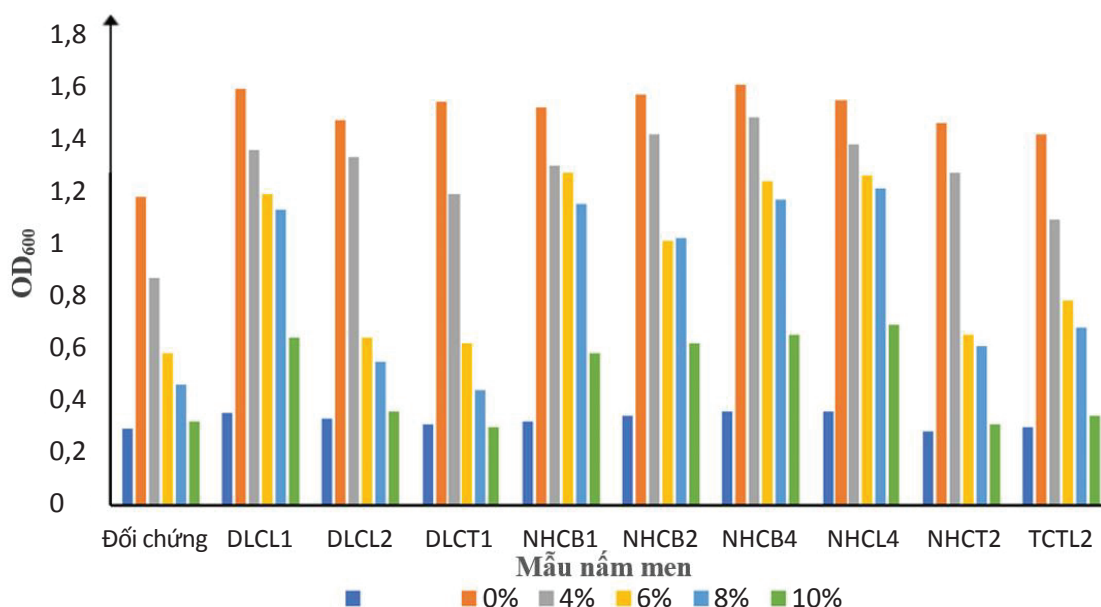
nhằm mà còn giảm chi phí làm mát (Limtong & ctv., 2007). Vì vậy, việc lựa chọn nấm men chịu nhiệt mang lại nhiều lợi ích đáng kể như tận dụng được nhiệt độ cao để lên men và giảm chi phí đầu tư cho thiết bị làm mát, từ đó tạo ra nhiều lợi ích kinh tế trong sản xuất (Yuangsard & ctv., 2013).

Thông qua kết quả ghi nhận từ khảo sát khả năng chịu nhiệt của các mẫu nấm men tuyển chọn trên cả hai môi trường YPD agar và YPD lỏng đều tương đồng với nhau. Qua khảo sát thấy năm mẫu nấm men gồm DLCL1, NHCB2, NHCB4, NHCL4 và NHCB1 có khả năng chịu nhiệt tốt nhất lên đến 43°C. Đồng thời, tuyển

chọn toàn bộ 9 mẫu nấm men có khả năng chịu nhiệt từ 37°C trở lên để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.3.4. Khả năng chịu ethanol

Khả năng chịu ethanol của các mẫu nấm men tuyển chọn được khảo sát trong môi trường YPD lỏng có bổ sung ethanol tinh khiết với các nồng độ ethanol lần lượt là 0%, 4%, 6%, 8% và 10% ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Tốc độ sinh trưởng của nấm men được ghi nhận bằng cách đo mật độ quang của dịch tăng sinh ở bước sóng 600 nm (Hình 5).



Hình 5. Khả năng chịu ethanol của các mẫu nấm men tuyển chọn.

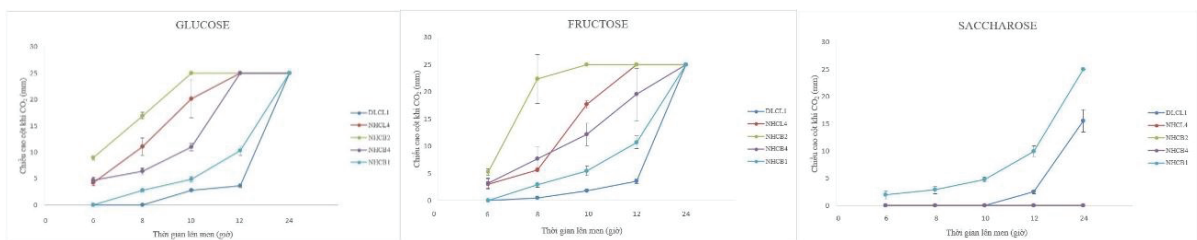
Khả năng chịu ethanol của các mẫu nấm men được xem là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng phát triển và sinh ethanol. Mặc dù ethanol là sản phẩm chính của quá trình lên men rượu từ đường, nhưng ở một nồng độ nhất định thì ethanol sẽ ức chế quá trình lên men. Trong quá trình lên men, mật số tế bào thay đổi đáng kể là do nấm men nhạy cảm với ethanol, một số mẫu không thể sống sót trong điều kiện ethanol cao (Doan & ctv.,

2018). Trong 9 mẫu nấm men được tuyển chọn đều tăng trưởng tốt trong môi trường có nồng độ ethanol 0% - 4% sau 24 giờ nuôi cấy, trong đó có 5 mẫu nấm men (NHCB1, NHCL4, NHCB4, DLCL1 và NHCB2) có khả năng phát triển trong môi trường có nồng độ ethanol 6% - 8%. Ở nồng độ ethanol cao nhất trong khảo sát là 10% thì hầu hết các mẫu nấm men đều giảm tốc độ tăng trưởng và sinh trưởng yếu.

3.3.5. Khả năng lên men các loại đường khác nhau

Đường là nguồn dinh dưỡng quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động và quá trình lên men của nấm men. Khả năng lên men các loại đường là một trong những chỉ tiêu quan trọng được sử dụng để phân loại nấm men. Các mẫu nấm men tuyển chọn được khảo sát khả năng lên men các loại đường gồm glucose, fructose, saccharose, maltose, lactose và mannitol ở nồng độ 2% (w/v) trong môi trường carbohydrate broth. Kết quả chưa ghi nhận sự lên men của các mẫu nấm men khảo sát đối với mannitol,

maltose và lactose sau 24 giờ. Đối với đường glucose, fructose và saccharose, sự lên men được ghi nhận sau 6 giờ (Hình 6). Các mẫu nấm men NHCL4, NHCB4 và NHCB2 có khả năng lên men nhanh và mạnh hơn các 2 mẫu còn lại. Đối với đường glucose, sau 12 giờ lên men chiều cao cột khí CO₂ đều đạt được chiều cao đối đa (25 mm). Tuy nhiên, mẫu NHCB1, DLCL1 có khả năng lên men đường saccharose nhưng lên men đường glucose và fructose thấp hơn so với 3 mẫu còn lại.



Hình 6. Khả năng lên men đường của các mẫu nấm men tuyển chọn.

Theo Doan & ctv. (2018), các mẫu nấm men *Saccharomyces* spp. phân lập từ trái giác ở Kiên Giang có thời gian lên men nhanh nhất với chiều cao cột khí CO₂ đạt 25 mm chỉ sau 6 giờ lên men và có khả năng lên men rượu vang tốt ở 37°C. Như vậy, kết quả khảo sát đã tuyển chọn được 3 mẫu nấm men NHCL4, NHCB4, NHCB2 cho kết quả lên men tốt với nguồn đường glucose và fructose. Các nguồn đường còn lại cho kết quả không lên men đối với tất cả các mẫu nấm men. Điều này bởi vì nấm men dễ dàng sử dụng các loại đường monosaccharide như glucose, fructose. Muốn sử dụng được đường disaccharide như saccharose, maltose, lactose hay oligosaccharide như manitol thì nấm men phải sử dụng enzyme invertase để thủy phân thành monosaccharide, sau đó mới vận chuyển được vào tế bào (Doan & ctv., 2018).

3.3.6. Khả năng sinh các enzyme ngoại bào

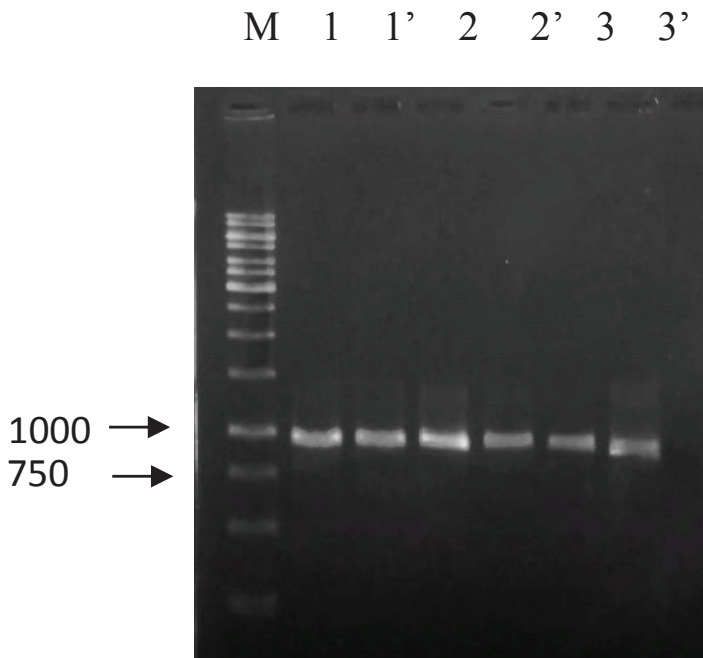
Các mẫu nấm men có hoạt tính enzyme có thể là một tác nhân quan trọng để cải thiện quá trình chế biến đồ uống và tiềm năng nguồn sản xuất enzyme thương mại. Tuy nhiên, kết quả khảo sát khả năng sinh pectinase, protease, cellulase và amylase của 3 mẫu nấm men tuyển chọn (NHCL4, NHCB4, NHCB2) đều cho kết quả âm tính.

Những nghiên cứu trước đó chỉ cho thấy có rất ít chủng nấm men có khả năng sinh các enzyme ngoại bào. Theo nghiên cứu của Strauss & ctv. (2001) đã phân lập được 245 chủng nấm men nhưng chỉ có 9 chủng sinh enzyme pectinase, 11 chủng sinh enzyme cellulase, 8 chủng sinh enzyme protease. Silva & ctv. (2022)

đã báo cáo rằng trong tổng số 144 chủng phân lập được sàng lọc, 109 chủng nấm men (76%) tạo ra ít nhất một trong số các hydrolase được thử nghiệm, với hầu hết các hoạt tính đối với protease 59 mẫu (41%), cellulase 58 mẫu (40%), amylase 23 mẫu (16%) và pectinase 20 mẫu (14%) và Yang & ctv (2013) cũng đã phân lập được 257 chủng nấm men những cũng chỉ có 14 chủng sinh enzyme protease.

3.4. Định danh các mẫu nấm men tuyển chọn

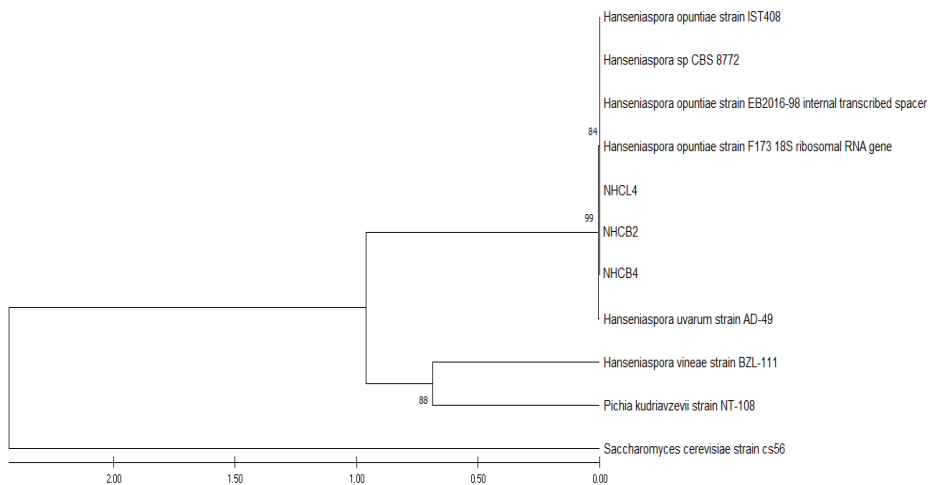
Ba mẫu nấm men tuyển chọn (NHCL4, NHCB4, NHCB2) được ly trích DNA tổng số và khuếch đại vùng ITS bằng PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR (750 - 1000 bp) với cặp mồi ITS1 và ITS4 của 3 mẫu nấm men tuyển chọn cho thấy các sản phẩm khuếch đại rõ ràng và không có sản phẩm phụ (Hình 7). Sau khi giải trình tự vùng ITS của 3 mẫu nấm men được so sánh trên ngân hàng gene, các mức độ tương đồng được thể hiện ở Bảng 4 và cây phát sinh loài ở Hình 8.



Hình 7. Kết quả khuếch đại vùng internal transcribed spacer của 3 mẫu nấm men tuyển chọn. M: thang DNA chuẩn 1000 bp; 1,1': NHCL4; 2,2': NHCB2; 3,3': NHCB4.

Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự vùng internal transcribed spacer của 3 mẫu nấm men trên ngân hàng gen

Mẫu nấm men	Mô tả	Số hiệu truy cập	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)
NHCL4	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> strain F173 18S	KY497945.1	99	99,69
NHCB2	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> strain EB2016-98	MN378465.1	100	99,70
NHCB4	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> strain EB2016-98	MN378465.1	100	99,85



Hình 8. Cây phát sinh loài của các mẫu nấm men tuyển chọn và các chủng non-*Saccharomyces* đại diện dựa trên phân tích trình tự của vùng internal transcribed spacer bằng phương pháp UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) Tree. Các giá trị Bootstrap được ước tính dựa trên 1000 lần lặp lại và được hiển thị trên các nhánh (> 50%). Loài ngoài nhóm là *Saccharomyces cerevisiae*.

Kết quả định danh đã xác định mẫu nấm men NHCL4, NHCB2, NHCB4 có độ tương đồng cao (trên 99%) với loài *Hanseniaspora opuntiae*. Các mẫu nấm men phân lập có sự phân tách rõ ràng với các giá trị bootstrap đáng tin cậy (84 - 99%). Để có thêm thông tin liên quan đến việc xác định các chủng, vùng ITS được bảo tồn của tập hợp các chủng được chọn ngẫu nhiên đại diện cho nhóm non-*Saccharomyces* trong hệ vi sinh vật của các vùng rượu vang (Seixas & ctv., 2019; Zhao & ctv., 2021). Thanh tỷ lệ là khoảng cách di truyền thể hiện mức độ tương đồng của các mẫu nấm men phân lập so với các chủng tham chiếu trên ngân hàng NCBI (Hình 5). *Hanseniaspora* spp. thường được tìm thấy nhiều ở vỏ quả chín, đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn đầu của quá trình lên men ethanol (Martin & ctv., 2018) và sản sinh ra các enzyme và hợp chất tạo mùi thơm tạo nên sự đa dạng về màu sắc và hương vị của rượu. Sự hiện diện của *H. opuntiae* giúp tạo ra rượu vang có hàm lượng monoterpene cao hơn, bao gồm cả limonene, tạo giá trị cảm quan cho rượu vang cũng như các loại đồ uống lên men khác. Ngoài

ra, các loài thuộc chi *Hanseniaspora* đã được chứng minh có thể kết hợp với *S. cerevisiae* tăng khả năng trong việc định hình mùi thơm của rượu vang (Moreira & ctv., 2008; Lleixà & ctv., 2016; Bourbon & ctv., 2021).

4. Kết Luận

Từ 22 mẫu quả ổi chín thuộc 4 giống ổi thu thập tại 6 tỉnh khu vực đồng bằng sông Cửu Long đã phân lập được 33 khuẩn lạc mang những đặc điểm đặc trưng của nấm men. Qua kết quả khảo sát đặc điểm lên men đã chọn được 3 mẫu (NHCL4, NHCB2 và NHCB4) có khả năng kết lắng (84 - 87%), chịu nhiệt (30 - 43°C), chịu ethanol (6% - 8%) và có khả năng lên men đường glucose và fructose. Kết quả định danh cho thấy cả 3 mẫu nấm men tuyển chọn đều tương đồng cao (> 99%) với *Hanseniaspora opuntiae*. Đây là loài nấm men có khả năng chịu ethanol, lên men ethanol và tạo mùi hương tốt mang đến tiềm năng cho việc sản xuất rượu vang hoặc các sản phẩm lên men khác từ trái cây địa phương, góp phần tạo nguồn giống mới

và đa dạng hóa nông sản Việt.

Lời Cam Đoan

Các tác giả cam đoan không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả

Lời Cảm Ơn

Công trình này là kết quả nghiên cứu của đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở mã số CS-SV23-KHSH-04 được cấp kinh phí bởi Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abranches, J., Vital, M. J., Starmer, W. T., Hagler, L. C. M., & Hagler, A. N. (2000). The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycologia* 92(1), 16-22. <https://doi.org/10.2307/3761445>.
- Bourbon, M. N., Palma, M., Rocha, M. P., Ferreira, A., Bronze, M. R., Elias, H., & Correia, I. S. (2021). Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 95, 103678. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103678>.
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., & Todd, B. E. N. T. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 3(1), 2-8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>.
- Doan, T. K. T. (2020). *Isolation, selection of thermotolerant yeasts and evaluation of fermentation capacity from three-leaf cayratia (Cayratia trifolia L.) in the Mekong Delta* (Unpublished doctoral dissertation). Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Doan, T. K. T., Bui, L. H. Đ., Vien, Y. T. H., Ha, T. T., Huynh, P. X., & Ngo, D. T. P. (2018). Selection of thermotolerant yeasts and application in wine production from three-leaf cayratia (*Cayratia trifolia* L.) in Hau Giang. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development* 54(4), 64-71. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.071>.
- German, J. B., & Walzem, R. L. (2000). The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition* 20(1), 561-593.
- Guimarães, T. M., Moriel, D. G., Machado, I. O., Picheth, C. M. T. F., & Bonfim, T. M. B. (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 42(1), 119-126. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000100013>.
- Haile, M., & Kang, W. H. (2019). Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. *Microorganisms* 7(10), 401-416. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>.
- Ho, T. T. (2011). *Isolation and selection of natural yeast for application in dragon fruit wine production*. (Unpublished master's thesis). Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Kamath, J. V., Rahul, N., Ashok Kumar, C. K., & Mohana Lakshmi, S. (2008). *Psidium guajava* L: A review. *International Journal of Green Pharmacy* 2(1), 9-12.
- Lee, J. Y., Choi, R. Y., Lee, Y. S., Park, T. J., Shim, H. J., Park, H. K., & Kim, W. J. (2011). Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology* 39(1), 33-39. <https://doi.org/10.4489%2FMYCO.2011.39.1.033>.
- Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M. D. C., Carrau, F., Beltran, G., & Mas, A. (2016). Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00338>.
- Limtong, S., Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology* 98(17), 3367-3374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.011>.

- org/10.1016/j.biortech.2006.10.044.
- Luong, P. D. (2009). *Industrial yeast*. Ha Noi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.
- Martin, K. J., & Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>.
- Martin, V., Jose Valera, M., Medina, K., Boido, E., & Carrau, F. (2018). Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines - A review. *Fermentation* 4(3). <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation4030076>.
- Moreira, N., Mendes, F., Pinho, P. G. D., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* 124(3), 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025>.
- Ngo, D. T. P., Ly, H. H. L., & Huynh, P. X. (2011). Isolation, selection of yeasts and determination of factors affecting watermelon wine fermentation. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development* 18B, 137-145.
- Nguyen, T. H., Nguyen, D. T. K., Bang, L. H., & Nguyen, T. Q. (2012). Characterization of yeast isolated from rice wine starter cakes in Mekong Delta. *Journal of Science and Development* 10(2), 340-349.
- Nguyen, T. N., Huynh, K.V., Le, T. T., Luu, C. M., & Huynh, P. X. (2021). Isolation and selection of yeasts for soursop (*Annona muricata* L.) wine production. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development* 57(4), 131-138. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.121>.
- Nguyen, T. V., Nguyen, T. M., Tran, Q. T., & Nguyen, T. M. T. (2013). Isolation, selection and identification of yeast strains for pineapple wine fermentation. *Series B of CTU Journal of Innovation and Sustainable Development* 25, 27-35.
- Ono, B. I., Ishi, N., Fujino, S., & Aoyama, I. (1991). Role of hydrosulfide ions (HS⁻) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 57(11), 3183-3186. <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3183-3186.1991>.
- Pereira, G. V. D. M., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Lara, J. M. R. A., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology* 188, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.008>.
- Pham, T. T. T., Nguyen, T. N. A., Le, D. T., Nguyen, T. N., Bui, L. H. Đ., & Huynh, P. X. (2019). Isolation and selection of yeast for wine fermentation from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Series B of Vietnam Journal of Science and Technology* 61(8), 54-59.
- Qin, J. X., Yu, Q., Yan, H., Khan, A., Feng, Y. M., Li, P. P., Hao, J. X., An, K. L., & Liu, Y. H. (2017). Meroterpenoids with antitumor activities from guava (*Psidium guajava*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(24), 4993-4999. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01762>.
- Seixas, I., Barbosa, C., Faia, A. M., Güldener, U., Tenreiro, R., Ferreira, A. M., & Mira, N. P. (2019). Genome sequence of the non-conventional wine yeast *Hanseniaspora guilliermondii* UTAD222 unveils relevant traits of this species and of the *Hanseniaspora* genus in the context of wine fermentation. *DNA Research* 26(1), 67-83. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy039>.
- Silva, M. K. D., Silva, A. V. D., Fernandez, P. M., Montone, R. C., Alves, R. P., Queiroz, A. C. D., Oliveira, V. M. D., Santos, V. P. D., Putzke, J., Rosa L. H., & Duarte, A. W. F. (2022). Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts from Antarctic lichens. *Annals of The Brazilian Academy of Sciences* 94(suppl.1). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202202010540>.
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., & Rensburg, P. V. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes

- by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91(1), 182-190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>.
- Tsegaye, Z., Tefera, G., Gizaw, B., & Abatenh, E. (2018). Characterization of yeast species isolated from local fruits used for bakery industrial application. *Journal of Applied Microbiological Research* 1(1), 21-26.
- Vadkertiová, R., Molnárová, J., Vránová, D., & Sláviková, E. (2012). Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Canadian Journal of Microbiology* 58(12), 1344-1352. <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2012-0468>.
- Yabaya, A., Bobai, M., & Adebayo, L. R. (2016). Production of wine from fermentation of *Vitis vinifera* (grape) juice using *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from palm wine. *International Journal of Information Research and Review* 3(10), 2834-2840.
- Yang, X. Q., Zhang, H., Li, L. X., Wang, Z., Xu, Y., Ren, W. S., Chen, Y. X., Xu, Y. Y., Hao, X. H., & Wang L. H. (2013). Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. *Bioresource Technology* 129, 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.101>.
- Yuangsaard, N., Yongmanitchai, W., Yamada, M., & Limtong, S. (2013). Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103(3), 577-588. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9842-8>.
- Zhao, Y., Sun, Y. Q., Zhu, S. S., Du, F., Mao, Z. R., Liu, J. L., Tian, B. & Zhu, F. Y. (2021). Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts associated with spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon wines from Shangri-La wine region, China. *Scientific Reports* 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83216-x>.