

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ SÀI GÒN

KHOA CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

PHÒNG TN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

## SẢN XUẤT SINH KHỐI NẤM MEN

### 1. VẬT LIỆU

– Giống nấm men được sử dụng là *Saccharomyces cerevisiae* được nuôi và giữ trong ống nghiệm thạch nghiêng

– Thiết bị lắc ổn nhiệt

– Kính hiển vi

– Buồng đếm hồng cầu

– Dung dịch Methylene blue (đã lọc qua giấy lọc)

✚ Môi trường nhân giống: tương tự môi trường lên men **M2**

✚ Môi trường lên men: 500ml

– Môi trường lên men **M1**:

Dịch chiết giá	500ml
Peptone	1%
Saccharose	5%
Ampicilline	0,5ml (phòng TN đã chuẩn bị)

*Cách làm dịch chiết giá: 100g giá đậu (đã rửa sạch), thêm 500ml nước. Đun sôi 30 phút. Lọc qua vải mỏng (hoặc rây) lấy phần dịch trong*

– Môi trường lên men **M2** :

Peptone	1%
Yeast extract	0,5%
NaCl	0,5%

Saccharose	5%
Nước	cho đủ 500ml
Ampicilline	0,5ml (phòng TN đã chuẩn bị)

– Môi trường lên men **M3** :


Saccharose	5%
Peptone	1%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3%
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2%
Nước	cho đủ 500ml
Ampicilline	0,5ml (phòng TN đã chuẩn bị)

– Môi trường lên men **M4** :

Dịch chiết cà chua	500ml
Glucose	5%
Ampicilline	0,5ml (phòng TN đã chuẩn bị)

*Cách pha chế dịch chiết cà chua: 150g cà chua được lột vỏ, cắt nhỏ và đun sôi với 500 ml nước trong 30 phút. Lọc qua vải mỏng (hoặc rây) lấy phần dịch trong*

## 2. CÁCH THỰC HIỆN

 **Nhân giống** (do cán bộ PTN thực hiện):

- Giống từ ống nghiệm thạch nghiêng được chuyển vào 0,5l môi trường M2 được chứa trong 02 bình tam giác 500 ml (đã thanh trùng, để nguội)
- Tiến hành nuôi cấy trong 72 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng.

 **Sản xuất sinh khối:**

- Chuẩn bị môi trường lên men (M1, M2, M3 hoặc M4)
- Chuyển giống vào bình tam giác 1000ml chứa 500ml môi trường lên men. Tỷ lệ cấy giống từ 5 – 20% (tùy theo yêu cầu của giáo viên hướng dẫn)
- Cho bình tam giác vào thiết bị lắc ổn nhiệt, lắc với tốc độ 220 rpm

- Nhiệt độ: 28 – 35°C; pH 4.5 - 7.0 (tùy theo yêu cầu của giáo viên hướng dẫn).

### 3. THEO DÕI CÁC CHỈ TIÊU KHI TIẾN HÀNH NUÔI CẤY THU SINH KHỐI

Theo dõi các chỉ tiêu sau: *mỗi 1 giờ/lần*

- Tổng số tế bào / ml (sử dụng buồng đếm hồng cầu)
- Độ hấp thu của dịch nuôi cấy sinh khối ở  $\lambda = 600\text{nm}$
- Tỉ lệ tế bào chết
- Tỉ lệ tế bào nấm men nảy chồi

#### CÁCH TIẾN HÀNH

🔧 Đo độ hấp thu  $A_{600\text{nm}}$

- Pha loãng dịch nuôi cấy nấm men: lấy 1ml dịch nuôi cấy pha loãng với 4 ml nước trong ống nghiệm . Lắc đều. Đo độ hấp thu của dung dịch này ở bước sóng  $\lambda = 600\text{nm}$

🔧 Đếm trên buồng đếm hồng cầu

- Tiến hành pha loãng dịch nuôi cấy nấm men theo các độ pha loãng khác nhau (tùy thuộc vào thời điểm nuôi cấy, thông thường ta pha loãng từ 1 đến 20 lần).

- Lấy 1ml dung dịch mẫu đã pha loãng cho vào ống nghiệm. Bổ sung 1 giọt methylen blue. Lắc đều trong 1 phút. Cho dung dịch trong ống nghiệm lên buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi

+ Đếm tổng số tế bào trên 5 ô vuông lớn

+ Đếm tổng số tế bào chết (*màu xanh*) trên 5 ô vuông lớn

+ Đếm tổng số nấm men nảy chồi trên 5 ô vuông lớn

*Lưu ý: chỉ tính những tế bào có chồi < 1/2 tế bào mẹ; các chồi > 1/2 tế bào mẹ được tính là một tế bào riêng lẻ; thời gian từ khi lấy mẫu đến khi đếm xong phải < 15 phút*

$$N = \{a/b \times 400/0.1\} \times 10^3 \times n$$

$$N_1 = \{a_1/b \times 400/0.1\} \times 10^3 \times n$$

$$N_2 = \{a_2/b \times 400/0.1\} \times 10^3 \times n$$

Tỉ lệ tế bào nấm men chết (%) =  $N_1 / N \times 100$ ; Tỉ lệ nảy chồi (%) =  $N_2 / N \times 100$

Trong đó:

N: tổng số tế bào trong 1ml mẫu nghiên cứu

$N_1$ : tổng số tế bào chết trong 1ml mẫu nghiên cứu

$N_2$ : tổng số tế bào nảy chồi trong 1ml mẫu nghiên cứu

a: tổng số tế bào trong 5 ô vuông lớn

$a_1$ : tổng số tế bào chết trong 5 ô vuông lớn

$a_2$ : tổng số tế bào nảy chồi trong 5 ô vuông lớn

b: số ô vuông nhỏ trong 5 ô vuông lớn ( $16 \times 5 = 80$  ô vuông nhỏ)

400: tổng số ô vuông nhỏ

0.1: thể tích dịch tế bào (tính bằng  $\text{mm}^3$ ) chứa trên ô trung tâm

$10^3$ : số chuyển  $\text{mm}^3$  thành ml ( $1000\text{mm}^3 = 1\text{ml}$ )

n: độ pha loãng của mẫu dung dịch nuôi cấy nấm men

#### 4. CÁC THÔNG SỐ VỀ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM MEN TRONG MẪU THÍ NGHIỆM

##### ✚ Thời gian thế hệ (g)

Nếu số tế bào ban đầu không phải là 1 mà là  $N_0$  thì sau n lần phân chia ta sẽ có tổng số tế bào là N, với  $t = (t_2 - t_1)$  biểu thị sự sai khác giữa thời gian  $t_1$  và thời gian  $t_2$  (*trong trường hợp của bài thí nghiệm này,  $t = t_2 - t_1 = 1$  giờ*).

$$g = t/n = \log_2 (t_2 - t_1) / (\log N - \log N_0)$$

##### ✚ Hằng số tốc độ phân chia (c)

Giá trị nghịch đảo của thời gian thế hệ hay là số lần phân chia sau một đơn vị thời gian (tức sau 1 giờ) gọi là hằng số tốc độ phân chia (c). Hằng số tốc độ phân chia phụ thuộc vào: loài vi sinh vật, nhiệt độ nuôi cấy, môi trường nuôi cấy, ...

$$c = 1/g = n/t$$

##### ✚ Hằng số tốc độ sinh trưởng ( $\mu$ )

Mối quan hệ giữa hằng số tốc độ sinh trưởng ( $\mu$ ), hằng số tốc độ phân chia (c) và thời gian thế hệ (g):

$$\mu = 0.69 c = 0.69/g$$

## 5. TRÌNH BÀY KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

Từ các kết quả thu nhận và tính toán được tiến hành lập bảng kết quả và vẽ các đồ thị sau:

**Bảng kết quả thí nghiệm**

Thời gian (giờ)	$A_{600nm}$	lgN (tb/ml)	lgN <sub>1</sub> (tb/ml)	lgN <sub>2</sub> (tb/ml)	Tỉ lệ chết (%)	Tỉ lệ nảy chồi (%)	g	c (giờ)	$\mu$
0									
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									

0 giờ: thời điểm ngay khi vớt cho giống vào môi trường nuôi cấy

- Tổng số tế bào theo thời gian (giờ)
- Tỉ lệ tế bào chết (%), tỉ lệ nảy chồi (%) theo thời gian (giờ)
- $A_{600nm}$  theo thời gian (giờ),  $A_{600nm}$  theo tổng số tế bào
- g, c,  $\mu$  theo thời gian (giờ)

### Ghi chú:

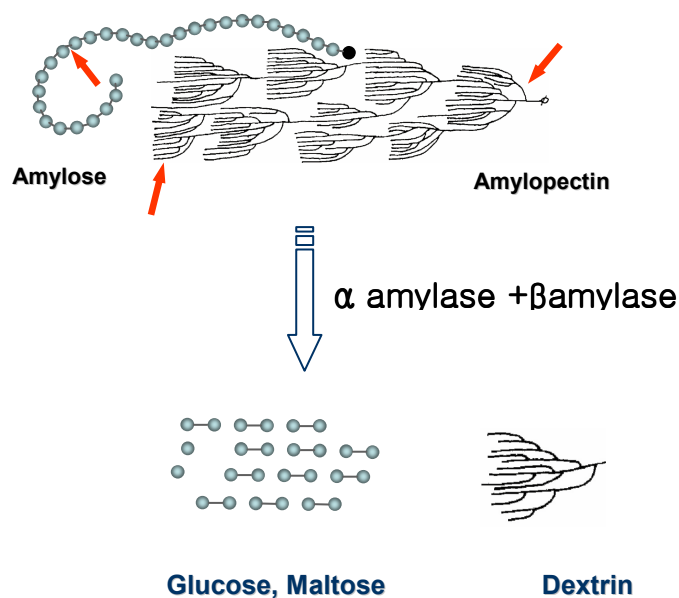
- Sinh viên tham khảo thêm tài liệu: Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản giáo dục, 1997. Trang 375 - 378.
- Sinh viên chuẩn bị môi trường tại phòng TN Công nghệ sinh học trước 1 ngày.

# ỨNG DỤNG ENZYME $\alpha$ -AMYLASE VÀ $\beta$ -AMYLASE TRONG SẢN XUẤT ĐƯỜNG MẠCH NHA

## 1. Giới thiệu

Đường mạch nha (hỗn hợp maltose, glucose, dextrin mạch ngắn,) được dùng rộng rãi trong sản xuất bánh kẹo.

Mạch nha là sản phẩm thủy phân tinh bột (sắn, bắp, gạo...). Hiện nay công nghệ sản xuất mạch nha bằng enzyme amylase được ứng dụng phổ biến trên thế giới



## 2. Nguyên vật liệu

Tinh bột khoai mì

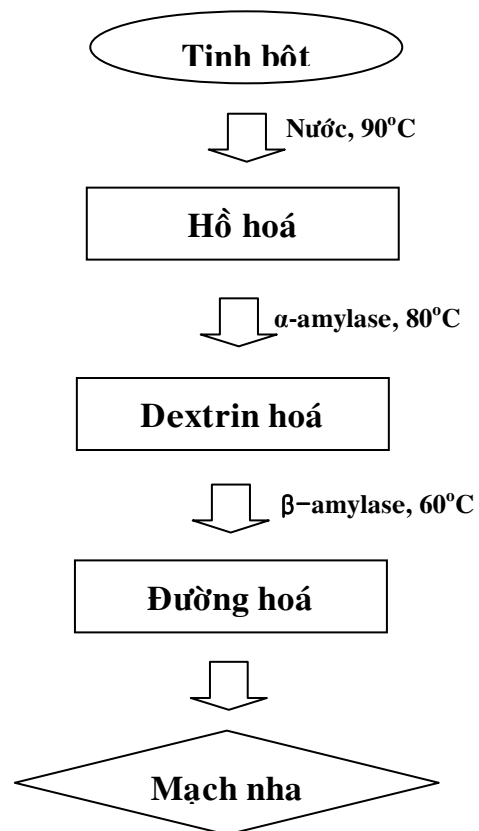
Enzyme  $\alpha$ -amylase và  $\beta$ -amylase

Máy quang phổ

Thiết bị ổn nhiệt

Bếp điện từ

## 3. Tiến hành



### **3.1 Hồ hoá tinh bột**

Cân tinh bột, cho tinh bột vào nước, khuấy đều và đun cách thủy đến khi nhiệt độ dung dịch đạt nhiệt độ hồ hoá (tùy vào loại tinh bột, thông thường > 65°C). Duy trì nhiệt độ đến khi dung dịch hồ hoá hoàn toàn.

### **3.2 Thủy phân tinh bột**

4 nhóm tiến hành thủy phân tinh bột với 4 điều kiện khác nhau.

1. 50 ml dung dịch tinh bột nồng độ 8%, enzyme  $\alpha$ -amylase 50 U/g tinh bột (80°C x 30 phút) và  $\beta$ -amylase 50 U/g tinh bột (60°C x 30 phút).
2. 50 ml dung dịch tinh bột nồng độ 8%, enzyme  $\alpha$ -amylase 100 U/g tinh bột (80°C x 30 phút) và  $\beta$ -amylase 100 U/g tinh bột (60°C x 30 phút).
3. 50 ml dung dịch tinh bột nồng độ 15%, enzyme  $\alpha$ -amylase 50 U/g tinh bột (80°C x 30 phút) và  $\beta$ -amylase 50 U/g tinh bột (60°C x 30 phút).
4. 50 ml dung dịch tinh bột nồng độ 15%, enzyme  $\alpha$ -amylase 100 U/g tinh bột (80°C x 30 phút) và  $\beta$ -amylase 100 U/g tinh bột (60°C x 30 phút).

Dừng phản ứng bằng cách đun mẫu trên bếp từ đang sôi trong 15 phút.

### **3.3 Xác định hàm lượng đường khử trong dịch sau thủy phân**

#### **3.3.1 Xây dựng đường chuẩn**

- Pha maltose trong nước với các nồng độ khác nhau: 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%.
- Cho 0.3 ml dung dịch chuẩn vừa pha vào 0.9 ml dung dịch DNS, đun sôi 5 phút, để nguội (cho nhanh ống nghiệm vào nước lạnh), đo độ hấp thụ bằng máy quang



phổ ở bước sóng 575 nm. Dùng excel vẽ đường thẳng quan hệ giữa nồng độ maltose và độ hấp thu. Viết phương trình đường chuẩn.

### 3.3.2 Xác định nồng độ đường khử

- Lấy 1 ml dung dịch vừa thủy phân pha loãng 2 đến 10 lần (a). Cho 0.3 ml dung dịch vừa pha loãng vào 0.9 ml dung dịch DNS, đun sôi 5 phút, để nguội và đo độ hấp thu bằng máy quang phổ ở bước sóng 575 nm.
- So sánh với đường chuẩn. Xác định nồng độ đường khử (b).
- Nồng độ đường khử trong dịch sau thủy phân ( $a \times b$ ).