

CÁCH PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH NẤM MEN RƯỢU TRONG DẠY THỰC HÀNH SINH HỌC

PGS.TS. Biền Văn Minh

Trường ĐHSP - Đại học Huế

Nấm men (Yeasts), là những nấm có cấu tạo đơn bào, nhân có màng nhân, sinh sản chủ yếu theo hình thức nảy chồi. Tế bào nấm men có nhiều hình dạng khác nhau, có thể hình cầu, hình bầu dục, hình elip, hình ống... Kích thước tế bào thay đổi từ 1,5-12µm (micromet). Nếu tế bào dạng sợi thì chiều dài có thể tới 20µm hay hơn nữa, thường là sợi nấm giả gồm nhiều tế bào dính lại với nhau theo chiều dài hoặc dạng cành cây một cách lỏng lẻo.

Nấm men có mặt khắp mọi nơi, chúng phân bố nhiều trong đất vườn, trong bánh men rượu, trên bề mặt vỏ quả cũng như các dịch quả ép dứa, lê, táo, nho, mơ... Trong bài viết này chúng tôi muốn giới thiệu về cách phân lập và xác định nấm men rượu trong dạy thực hành sinh học.

1. Chuẩn bị

a. Dụng cụ, thiết bị

Buồng cấy vô trùng; cân kỹ thuật 1 cái; giá ống nghiệm 2 cái, mỗi giá có 10 ống nghiệm; đĩa thủy tinh; que trang 1 cái; que cấy 1 cái; đèn cồn 1 cái; bếp điện 1 cái; song 2 lít 1 cái; beshler loại 250 ml 1 cái; pipette loại 1ml 2 cái; ống nghiệm 50 ống; chai tam giác loại 250 ml 3 chai; kéo cắt giấy 1 cái; đĩa Petri 25 hộp; khăn lau 2 cái; bật lửa 1 cái; ống nhỏ giọt 1 cái.

b. Nguyên liệu và mẫu vật

- Bông không thấm nước 50g; nước cất 2 lít; cồn đốt 100 ml; bông thấm nước 20g; giấy thấm 1 hộp; giấy để gói đĩa Petri; dây buộc bằng nilon

- Đất vườn, trái cây chín, mỗi loại 30-50g. Các ống giống nấm men chuẩn.

* Môi trường Hansen có thành phần: đường glucose 50g; KH_2PO_4 3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3g; peptone 10g; thạch (agar-agar) 20g; pH=6,0; khử trùng 0,8 -1 atm/30 phút.

* Hoặc môi trường mạch nha có thành phần: mạch nha 150g, thạch 20g; pH=7,0; khử trùng 1 atm/30 phút.

2. Các bước tiến hành

a. Chuẩn bị môi trường Hansen thạch đĩa, thạch nghiêng. Các đĩa môi trường Hansen hoặc mạch nha có chứa 0,03g/l streptomycin hay rosebengal (1/3000) 100ml/l.

b. Thu mẫu, xử lý mẫu và pha loãng

- Thu mẫu: bánh men rượu, hoặc đất vườn, hoặc quả chín nho, táo, mơ, mận...

- Cân 1-2g mẫu trên thêm 1-2g đường saccharose thêm 2ml nước cất, trộn đều ủ 3-5 ngày.

- Lấy 1ml dịch huyền phù ở trên pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-10} lần.

c. Phân lập nấm men rượu

- *Cấy dịch huyền phù lên môi trường đặc trong hộp Petri*

+ Dùng pipet vô trùng nhỏ 1ml dịch huyền phù đã pha loãng ở nồng độ nhất định lên bề mặt của môi trường trong hộp Petri.

+ Dùng que trang dàn đều giọt dịch huyền phù trên toàn bộ bề mặt môi trường hộp thạch.

+ Đậy hộp Petri, gói lại và đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 48 - 72h.

- *Trộn dịch mẫu pha loãng trong các môi trường thạch nóng chảy*

Dùng pipet vô trùng nhỏ 1ml dịch huyền phù đã pha loãng ở nồng độ nhất định vào môi trường thạch đã nóng chảy và để nguội đến 45 - 50°C trong bình nón, lắc đều rồi đổ ra các hộp Petri mỗi hộp cỡ 15ml. Gói các hộp Petri lại và đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 48 - 72h.

- Nuôi nấm men mọc thành khuẩn lạc. Úp ngược các hộp Petri rồi đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 48 - 72h. Sau thời gian trên ở bề mặt thạch đĩa sẽ có các khuẩn lạc nấm men mọc tách biệt mắt thường quan sát được.

- *Thu nhận chủng nấm men rượu thuần khiết*

+ Cấy nấm men từ khuẩn lạc mọc tách rời vào ống môi trường thạch nghiêng.

+ Nuôi nấm men ở nhiệt độ và thời gian thích hợp (như trên).

+ Loại bỏ các ống bị nhiễm, chọn ra các ống có các chủng thuần khiết.

- *Phương pháp kiểm tra độ thuần khiết của một chủng nấm men mới phân lập*

Có nhiều cách kiểm tra:

1) Kiểm tra độ thuần khiết của các khuẩn lạc: màu sắc, bề mặt, hình dạng đặc trưng giống như khuẩn lạc chủng mẫu.

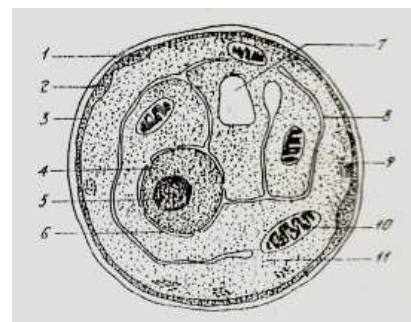
2) Quan sát nấm men: làm tiêu bản từ dịch lên men, nhuộm đơn bằng xanhmetylen, rồi quan sát với vật kính x100 (vật kính dùng dầu). Tế bào nấm men *S.cerevisiae* có hình cầu hay ôvan, có một số đang ở giai đoạn nảy chồi.



(a)



(b)



(c)

Hình 1: (a) Khuẩn lạc ; (b) Hình dạng tế bào nấm men *S.cerevisiae* dưới kính hiển vi quang học; (c) Sơ đồ cấu tạo tế bào nấm men (1.Thành tế bào; 2.Thể biên; 3.Màng sinh chất; 4.Nhân tế bào; 5.Hạch nhân; 6.Màng nhân; 7.Không bào; 8. Màng lưới nội chất; 9.Hạt dự trữ; 10.Ti thể; 11.Chất tế bào).

3. Làm một số thí nghiệm xác định nấm men rượu

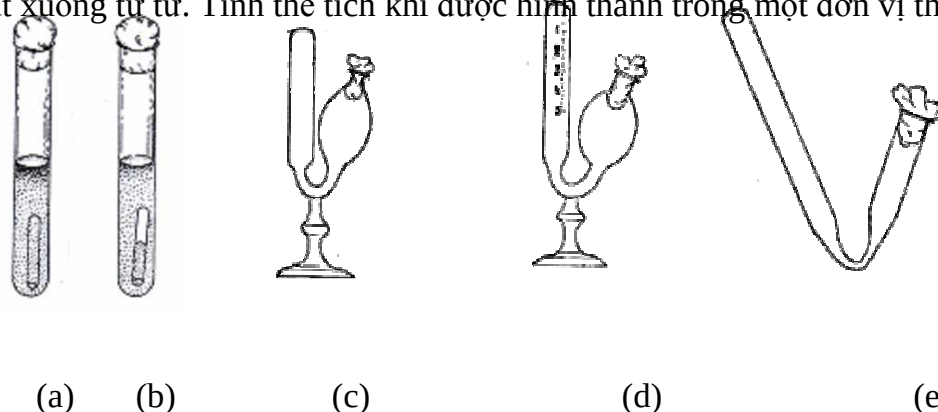
a. Chuẩn bị dịch lên men rượu

Rót 150ml dung dịch 10% glucose vào bình tam giác dung tích 250 ml vô trùng rồi cấy khoảng 1,5-5ml dịch nấm men (giống đã hoạt hóa 24 giờ). Đặt vào tủ ấm 30°C trong 1- 2 giờ.

1) Đo thể tích khí CO₂

Để đánh giá khả năng lên men rượu có thể xác định các sản phẩm hình thành như CO₂, acetaldehyde hoặc sản phẩm cuối cùng là ethanol. Trong đó cách đo thể tích CO₂ được hình thành là đơn giản hơn cả.

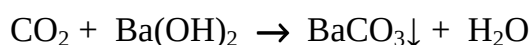
Giữ khí CO₂ trong ống phao hoặc bình Smith (xem hình dưới). Môi trường Hansen dịch thể vô trùng được phân vào ống nghiệm có ống phao 1/2 chiều cao hay bình Smith khoảng 1/2 bầu tròn bằng pipet vô trùng. Cây giống nấm men khoảng 1ml đã hoạt hóa 24 giờ, nút chặt miệng bình rồi đặt vào tủ có nhiệt độ thích hợp. Khí CO₂ sinh ra sẽ đẩy cột môi trường tụt xuống từ từ. Tính thể tích khí được hình thành trong một đơn vị thời gian.



Hình 2: (a, b) Cách giữ khí CO₂ trong ống phao và (c,d,e) trong bình lên men Smith

2) Phản ứng với Ba(OH)₂: (Xác định sự có mặt của CO₂ trong dịch lên men)

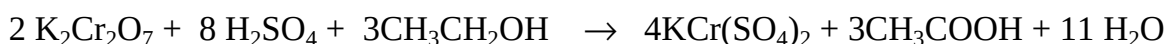
- Cho vào ống nghiệm 5ml dịch lên men, thêm 1ml dung dịch Ba(OH)₂ 10%. Dùng kẹp gỗ cặp ống nghiệm và đun nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn. Để lắng. Nếu có mặt của CO₂ sẽ tạo thành kết tủa màu trắng do sự tạo thành BaCO₃ theo phản ứng :



3) Phản ứng với kali bicromat : (Xác định sự có mặt của rượu ethylic trong dịch lên men)

- Cho vào ống nghiệm 2ml dịch lên men rượu, thêm 2 ml H₂SO₄ đậm đặc, thêm vài tinh thể K₂Cr₂O₇ lắc đều cho đến khi xuất hiện màu xanh lục.

Phương trình phản ứng diễn ra như sau:



Ống đối chứng: Làm tương tự như trên, song thay dịch lên men bằng dịch chưa lên men. So sánh sự đổi màu ở hai ống thí nghiệm và đối chứng.

4. Thu nhận nhanh nấm men rượu trong thực tế

Bên cạnh phương pháp phân lập như trên, tùy điều kiện từng trường chúng ta có thể tự thu nhận nhanh các chủng nấm men để làm đối tượng dạy thực hành sinh học như sau:

a. Hoạt hóa men nở bột mỳ: 50 ml dung dịch đường glucose 10% thêm 1g NaCl đun sôi, để nguội thêm 1g men bánh mỳ dạng bột. Chuẩn bị trước khi thí nghiệm 2-3h.

b. Pha loãng dịch chiết từ cơm ủ men rượu sau 2-3 ngày.

c. Pha loãng men ép làm nở bột mỳ (0,1g men ép hòa loãng trong 9ml nước cất vô trùng).

d. Pha loãng dịch trái cây (nho, táo, chuối, sim...) ngâm đường (10g quả chín + 10g đường + 5ml nước đun sôi để nguội) sau 5-7 ngày rồi lấy 1ml dịch quả ngâm đường trên pha loãng trong 9ml nước cất vô trùng.

*** Câu hỏi**

- 1) Trình bày phương pháp phân lập nấm men rượu thuần khiết.
- 2) Thế nào là chủng nấm men rượu thuần khiết (chủng sạch)?
- 3) Vì sao khi phân lập nấm men rượu người ta thường thêm streptomycin hay rosebengal vào trong môi trường. Hãy giải thích.

5. Những điểm cần lưu ý

Khi phân lập nấm men rượu cần lưu ý: các hộp thạch môi trường phải vô trùng có bề mặt khô nước và có độ rắn chắc, không gồ ghề, giúp các khuẩn lạc nấm men mọc rời nhau ra. Để phòng sự nhiễm tạp do không khí bản, các thao tác phải tuyệt đối vô trùng.

Các chủng sau khi làm sạch cần được kiểm tra lại bằng cách quan sát hình dạng tế bào dưới kính hiển vi cũng như xác định lại các phản ứng định tính như khả năng sinh khí CO₂, khả năng lên men sinh rượu ethylic.

Việc tạo ra một chủng nấm men thuần khiết cũng như bảo quản khỏi bị tạp nhiễm là việc làm có ý nghĩa rất lớn trong học tập, nghiên cứu cũng như sản xuất.□

Tài liệu tham khảo

- [1] Egorov N.X., (1983). Thực tập Vi sinh vật, NXB Mir, Maxcova. Nguyễn Lâm Dũng dịch, NXB ĐH&THCN Hà Nội.
- [2] John William Henry Eyre, (2009). *A Laboratory Guide for Medical, Dental, and Technical Students*, <http://www.gutenberg.org/>
