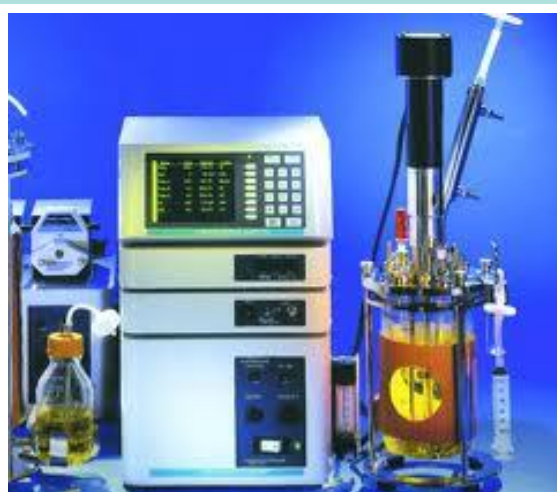


**BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC – THỰC PHẨM**

Ths. Bùi Thái Hằng (chủ biên), Ths. Phạm Thị Thanh Mai

GIÁO TRÌNH CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT



LỜI NÓI ĐẦU

Công nghệ vi sinh vật (Microbial Technology) là một bộ phận quan trọng trong Công nghệ sinh học, là một môn khoa học nghiên cứu về những hoạt động sống của vi sinh vật, nhằm khai thác chúng tốt nhất vào quy trình sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Trong giáo trình này trình bày các nguyên lý cơ bản về công nghệ vi sinh vật, các ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong sản xuất các ngành công nghiệp thực phẩm, công nghiệp, y dược, bảo vệ môi trường; các kiến thức cơ bản về hoạt động sống của vi sinh vật, tính đa dạng của chúng trong tự nhiên và mối quan hệ hữu cơ giữa vi sinh vật với cơ thể sống khác, ... nhằm cân bằng hệ sinh thái học, tạo ra nhiều của cải cho xã hội, phát triển nền nông nghiệp sinh thái sạch, bền vững và chống ô nhiễm môi trường

Giáo trình còn là tài liệu tham khảo cho giảng viên, sinh viên ngành Sinh học; Công nghệ sinh học, Công nghệ thực phẩm và những bạn có quan tâm đến Công nghệ vi sinh vật.

Với mục đích đáp ứng nhu cầu về học tập cho sinh viên và nâng cao chất lượng đào tạo, trường Cao đẳng Lương thực - Thực phẩm đã tổ chức biên soạn giáo trình này. Đây là giáo trình được biên soạn dùng làm tài liệu học tập cho sinh viên hệ Cao đẳng ngành Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm của trường.

Tuy nhiên, việc biên soạn chưa thật đầy đủ, chắc chắn còn nhiều thiếu sót, rất mong sự đóng góp ý kiến của các đồng nghiệp và bạn đọc.

Xin trân trọng cảm ơn!

Đà Nẵng, ngày 01 tháng 10 năm 2010

Các tác giả

MỤC LỤC

	TRANG
Chương 1. ĐẠI CƯƠNG VỀ CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT	6
1. CÔNG NGHIỆP VI SINH VẬT VÀ CÁC PHẠM VI ỨNG DỤNG	6
1.1. Khái niệm về công nghệ vi sinh vật	6
1.2. Lịch sử phát triển của ngành công nghiệp vi sinh vật	6
1.3. Phạm vi ứng dụng của công nghệ vi sinh vật	8
2. SƠ ĐỒ NGUYÊN TẮC CỦA CÁC QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT	13
2.1. Sơ đồ nguyên tắc của quá trình sản xuất công nghệ vi sinh vật	13
2.2. Thuyết minh quy trình sản xuất công nghệ vi sinh vật	13
3. PHÂN LOẠI SẢN PHẨM CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT	14
3.1. Sinh khối (biomass)	14
3.2. Các sản phẩm trao đổi chất	15
3.3. Các sản phẩm của sự chuyển hoá (transformation product)	16
Chương 2. TUYỂN CHỌN VÀ BẢO QUẢN GIỐNG VI SINH VẬT	18
1. CHỦNG VI SINH VẬT DÙNG TRONG SẢN XUẤT	18
1.1. Yêu cầu của chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất	18
1.2. Các nguyên lý điều hòa trao đổi chất	18
1.3. Những sai hỏng di truyền của điều hòa trao đổi chất	21
1.4. Kỹ thuật phân tử	21
2. PHÂN LẬP VÀ CHỌN GIỐNG VI SINH VẬT	24
2.1. Các loại môi trường phân lập	24
2.2. Một số môi trường thường dùng	25
2.3. Kỹ thuật phân lập giống vi sinh vật	27
2.4. Cải biến di truyền chủng giống sử dụng trong công nghệ lên men	29
3. BẢO QUẢN GIỐNG VI SINH VẬT	30
3.1. Phương pháp cấy chuyển định kỳ và bảo quản lạnh trên môi trường thạch nghiêng	31
3.2. Phương pháp bảo quản giống trong lớp dầu khoáng	31
3.3. Phương pháp bảo quản giống trong cát	31
3.4. Phương pháp bảo quản giống trong đất	32
3.5. Phương pháp bảo quản giống trên hạt	32
3.6. Phương pháp lạnh đông	32
3.7. Phương pháp đông khô	33
3.8. Bảo quản lạnh sâu trong nitơ lỏng	33
Chương 3. DINH DƯỠNG VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP	35

1. QUÁ TRÌNH DINH DƯỠNG Ở TẾ BÀO VI SINH VẬT	35
1.1. Dinh dưỡng carbon	35
1.2. Dinh dưỡng nitrogen	41
1.3. Dinh dưỡng khoáng	44
2. NHU CẦU DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY	46
2.1. Nhu cầu dinh dưỡng	46
2.2. Cách tính thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật	47
3. NGUYÊN LIỆU TRONG SẢN XUẤT	47
3.1. Các hợp chất cung cấp nguồn carbon	47
3.2. Các hợp chất cung cấp nguồn nitrogen	51
3.3. Các nguồn chất khoáng, chất sinh trưởng	52
3.4. Chất béo trong công nghệ vi sinh vật	52
3.5. Nước dùng trong công nghệ vi sinh	53
Chương 4. KỸ THUẬT VÀ ĐỘNG HỌC QUÁ TRÌNH LÊN MEN	55
1. CÁC PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN VI SINH VẬT	55
1.1. Lên men trên môi trường rắn –xốp	55
1.2. Lên men trong môi trường lỏng	55
1.3. Lên men gián đoạn, lên men bán liên tục và lên men liên tục	56
1.4. Lên men thường, lên men hai pha, lên men định hướng	56
2. CÁC BƯỚC TRIỂN KHAI LÊN MEN CÔNG NGHIỆP	57
2.1. Nhân giống	57
2.2. Lên men	58
2.3. Các yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình lên men	66
3. BẢO VỆ QUÁ TRÌNH LÊN MEN	68
3.1. Khử trùng thiết bị và hệ thống đường ống truyền dẫn (hệ thống CIP)	68
3.2. Khử trùng môi trường nuôi cấy bề mặt	69
3.3. Khử trùng môi trường nuôi cấy bề sâu	69
3.4. Khử trùng dầu mỡ phá bọt	70
3.5. Khử trùng không khí	70
3.6. Kiểm tra an toàn vệ sinh (trạng thái vô trùng)	72
4. ĐIỀU KHIỂN QUÁ TRÌNH LÊN MEN	72
4.1. Kiểm soát nhiệt độ, pH, oxy hoà tan	72
4.2. Kiểm soát sự tạo thành bọt	73
4.3. Máy phục vụ đo lường, tự động hoá trong công nghệ vi sinh	74
Chương 5. CÁC SẢN PHẨM CỦA CÔNG NGHIỆP VI SINH	75
1. SINH KHỐI VI SINH VẬT	75

1.1. Sinh khối nấm men	75
1.2. Sinh khối vi khuẩn	79
1.3. Sinh khối vi tảo	80
2. CÁC SẢN PHẨM ĐỒ UỐNG LÊN MEN	84
2.1. Lên men rượu	84
2.2. Lên men rượu vang	91
2.3. Lên men bia	97
3. CÁC SẢN PHẨM ACID HỮU CƠ	101
3.1. Lên men lactic acid	101
3.2. Lên men citric acid	106
3.3. Lên men acetic acid	110
4. CÁC SẢN PHẨM VITAMIN VÀ ACID AMIN	113
4.1. Riboflavin (Vitamin B ₂)	113
4.2. Cobalamin (vitamin B ₁₂)	115
4.3. Glutamic acid	116
4.4. Lysine	119
5. CÁC CHẤT KHÁNG SINH	121
5.1. Penicillin	121
5.2. Streptomycin	123
6. CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT – GIBBERELLIN	124
6.1. Tác nhân vi sinh vật	124
6.2. Quá trình lên men	125
7. ĐỘC TỔ NẤM (MYCOTOCIN)	125
7.1. Một số chủng vi sinh vật sinh độc tố	126
7.2. Cấu trúc, hoạt tính sinh học	126
8. DEXTRAN-POLIMER SINH HỌC	127
8.1. Tác nhân vi sinh vật	127
8.2. Sản xuất dextran	128
CHƯƠNG 6. CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG NÔNG NGHIỆP	132
1. PHÂN BÓN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH ĐẠM	132
1.1. Định nghĩa	132
1.2. Ý nghĩa của việc sử dụng phân vi sinh vật cố định đạm	132
1.3. Các nhóm vi sinh vật cố định đạm	133
1.4. Cơ chế của quá trình cố định nitrogen phân tử	136
1.5. Quy trình sản xuất	136
2. PHÂN VI SINH PHÂN GIẢI PHÂN LÂN KHÓ TAN (PHÂN LÂN VI SINH)	138

2.1. Định nghĩa	138
2.2. Ý nghĩa của việc sử dụng phân vi sinh vật cố định đạm	138
2.3. Các nhóm vi sinh vật phân giải lân	139
2.4. Sự chuyển hóa lân	140
2.5. Quy trình sản xuất	141
3. PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC (COMPOST)	141
3.1. Định nghĩa	141
3.2. Phân hữu cơ sinh học với sự trợ giúp của chế phẩm vi sinh vật	142
3.3. Phân hữu cơ sinh học có bổ sung vi sinh vật trợ lực và làm giàu dinh dưỡng (phân hữu cơ vi sinh vật)	142
4. CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CẢI TẠO ĐẤT	142
5. SẢN XUẤT THUỐC TRỪ SÂU VI SINH VẬT	143
5.1. Định nghĩa	143
5.2. Các chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh vật	143

Chương 1. ĐẠI CƯƠNG VỀ CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

1. CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT VÀ CÁC PHẠM VI ỨNG DỤNG

1.1. Khái niệm về công nghệ vi sinh vật

Công nghệ sinh học là một lĩnh vực khoa học công nghệ rất rộng, dựa vào đối tượng sinh học công nghệ sinh học được chia thành các ngành:

- Công nghệ vi sinh vật là công nghệ nhằm khai thác tốt nhất khả năng kỳ diệu của vi sinh vật, tạo điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất.

- Công nghệ tế bào là công nghệ nhằm tạo điều kiện cho các tế bào động, thực vật phát triển tốt trong các môi trường xác định và an toàn, chủ yếu là công nghệ nuôi cấy mô.

- Công nghệ gen là công nghệ nền, cải biến chủng giống nhằm nâng cao hiệu suất của chủng giống sản xuất và đa dạng hóa sản phẩm sinh học.

Trong các lĩnh vực trên thì công nghệ vi sinh vật trở thành nền tảng cho sự phát triển của công nghệ sinh học theo ba giai đoạn: Công nghệ sinh học truyền thống – là các quá trình truyền thống nhằm chế biến, bảo quản các loại thực phẩm, xử lý đất đai, phân bón để phục vụ nông nghiệp; Công nghệ sinh học cận đại là quá trình sử dụng các thiết bị lên men để sản xuất ở quy mô lớn; Công nghệ sinh học hiện đại chia thành các lĩnh vực như công nghệ di truyền, công nghệ tế bào, công nghệ protein-enzyme... gắn liền với các cơ thể mang gen tái tổ hợp.

Công nghệ vi sinh vật là ngành công nghệ nhằm khai thác các quá trình chuyển hoá tốt nhất của cơ thể vi sinh vật, trong đó vi sinh vật được coi là các nhà máy cực kì nhỏ và cực kì tinh vi. Nhiệm vụ của công nghệ vi sinh vật là tạo ra điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất theo chiều hướng mong muốn. Để có thể thu nhận các sản phẩm lên men có hiệu quả, có chất lượng cao thì con người phải tìm kiếm, lựa chọn các môi trường và điều kiện nuôi cấy cũng như chủng loại vi sinh vật có khả năng lên men tốt nhất.

Công nghệ vi sinh vật (hay công nghệ lên men vi sinh vật) là công nghệ nuôi một hay một số chủng vi sinh vật nhất định. Thông qua hoạt động sống, trao đổi chất của các vi sinh vật này con người có thể thu được các sản phẩm công nghệ cần thiết hoặc thực hiện những chuyển đổi công nghệ mong muốn.

1.2. Lịch sử phát triển của công nghệ vi sinh vật

Lịch sử phát triển của công nghệ sinh học đi từ sinh học mô tả đến sinh học thực nghiệm, những bước tiến bộ của khoa học về sự sống gắn liền với sự tiến bộ của vật lý, hóa học, cơ học, toán học và cả tin học. Sự ứng dụng các phương pháp nghiên cứu, các thiết bị, công cụ mới đã tạo điều kiện cho con người có khả năng nghiên cứu, tìm hiểu sâu hơn về thế giới vô cùng của sự sống.

Ngày nay, ngành công nghiệp vi sinh dựa trên cơ sở của các quá trình lên men đang phát triển mạnh mẽ. Sản phẩm của ngành này rất đa dạng và phong phú như: các loại rượu, bia, nước giải khát, amino acid, các loại nước chấm, bánh mì, chất kháng sinh, chế phẩm enzyme...

Lịch sử phát triển của ngành công nghiệp vi sinh có thể chia làm ba giai đoạn chính.

Giai đoạn 1: Từ thời hoang sơ đến giữa thế kỷ 19. Đặc điểm của giai đoạn này là con người đã biết làm ra các loại sản phẩm như nước uống có cồn, làm men bánh mì, làm dấm ăn... bằng những kinh nghiệm dân gian. Họ thực sự chưa biết gì về thế giới vi sinh vật, chưa có kiến thức về lĩnh vực khoa học này.

Giai đoạn 2: Từ giữa thế kỷ 19 đến đầu thế kỷ 20. Bước ngoặt lớn nhất trong giai đoạn này là việc tìm ra nguyên nhân sự lên men và một loạt các công trình khoa học về vi sinh vật học của Louis Pasteur. Ông là người đầu tiên đặt nền móng cho bộ môn khoa học vi sinh vật. Những công trình của L. Pasteur có ý nghĩa vô cùng to lớn, từ các vấn đề lý thuyết chung của vi sinh vật đến phương pháp nghiên cứu các quá trình trong công nghiệp, trong y học và thú y.

Năm 1857, L. Pasteur đã công bố công trình lên men rượu. Ông đã chỉ ra rằng, nấm men là những tế bào có sẵn ở trong thiên nhiên, nhất là ở các vỏ trái cây chín, trong điều kiện đầy đủ không khí chúng hô hấp bình thường, sinh sản và phát triển; trong điều kiện thiếu không khí chúng chuyển sang con đường lên men. Theo L. Pasteur, quá trình lên men chính là hoạt động của nấm men khi không có không khí. Sau khi nghiên cứu bệnh chua của rượu vang và bia ông thấy các vi sinh vật lạ, cho đun các sản phẩm lên men này tới $60 - 65^{\circ}\text{C}$ ngay sau khi chiết chai thì sản phẩm giữ được lâu và ổn định chất lượng. Phương pháp này chính là phương pháp thanh trùng Pasteur được áp dụng rộng rãi cho đến ngày nay.



Louis Pasteur (1822-1895)



Phòng thí nghiệm của Louis Pasteur tại
Ecole Normale de Paris

Tổng kết các phát minh của mình về quá trình lên men, L. Pasteur phát biểu một nguyên lý nổi tiếng: "Lên men là sự sống không có oxy". Quan niệm lên men của Pasteur ở đây gồm các quá trình lên men rượu, lên men glycerine, lên men acetone-butanol, ngày nay chúng ta quan niệm đây là quá trình lên men cổ điển hay lên men kỵ khí.

Năm 1886, E.C. Hansen đã sử dụng các chủng nấm men thuần khiết trong sản xuất bia, có thể xem đây là bước khởi đầu trong công nghiệp lên men hay công nghiệp vi sinh.

Năm 1898, E. Buchner đã nghiên cứu các quá trình sinh hóa và enzyme tham gia trong quá trình lên men rượu.

Giai đoạn 3: Năm 1929, Alexander Fleming đã tìm ra chất kháng sinh penicillin nhờ mốc màu xanh lục *Penicillium notatum*. Đến năm 1940 H.W. Florey và E. Chain ở

trường đại học Oxford (Anh) đã tìm được phương pháp lên men và tinh chế được chất penicillin. Đó là phương pháp lên men hiếu khí với chủng nấm mốc thuần khiết. Trong quá trình nuôi cấy cần phải sục khí mà vẫn giữ được vô trùng. Phương pháp sản xuất kháng sinh nhờ vi sinh vật được hoàn thiện và ngành công nghệ vi sinh bước vào thời kỳ mới. Phương pháp này đã mở ra cho công nghiệp lên men những bước phát triển vũ bão và trở thành công nghiệp hiện đại, cho chúng ta những sản phẩm quý nhờ vi sinh vật: từ việc chọn, tạo giống vi sinh vật, nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy tối ưu, kỹ thuật về lên men, tách và tinh chế sản phẩm.

Ngày nay, công nghệ lên men là thành phần chủ yếu của công nghệ sinh học, ngày càng góp phần tích cực giải quyết những vấn đề chiến lược toàn cầu cho xã hội loài người.

1.3. Phạm vi ứng dụng của công nghệ vi sinh vật

Phạm vi ứng dụng của vi sinh vật và các sản phẩm của nó rất rộng, bao gồm các lĩnh vực sau đây:

1.3.1. Dược phẩm và y tế

Sức khỏe của nhân loại đang trong tình trạng đáng lo ngại, hầu như lúc nào cũng có khoảng 1/3 dân số toàn cầu ở trạng thái bất ổn. Công nghệ vi sinh vật đã đóng góp trong việc tìm kiếm nhiều loại dược phẩm quan trọng, chẩn đoán và điều trị nhiều loại bệnh hiểm nghèo cho con người.

Bảng 1.1. Ứng dụng các sản phẩm từ vi sinh vật trong dược phẩm và y tế

Sản phẩm	Ứng dụng	Vi sinh vật
Chất kháng sinh: Penicillin Tetracyclin Streptomycin Erythromycin Griseofulvin	Điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn, nấm hoặc virus	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium patulum</i> <i>Streptomyces erythreus</i> <i>Streptomyces griseus</i>
Alkaloid của nấm cựa gà: Ecgotamin Ecgotoxin	Trong khoa sản (giúp vào việc co tử cung) và điều trị các bệnh mạch máu, bệnh nhức đầu	<i>Claviceps purpurea</i>
Vitamin B ₁₂	Điều trị bệnh thiếu máu ác tính	<i>Propionibacterium shermanii</i>
Steroide có cấu trúc được thay đổi một cách đặc hiệu nhờ vi sinh vật	Chế phẩm hormone để kìm hãm sự rụng trứng, để điều trị viêm và thấp khớp	Các loại vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm
L - sorbose (tiền chất để tổng hợp acid ascorbic)	Tiền chất của vitamin C	<i>Acetobacter suboxydans</i>
Dextran	Chất thay thế huyết tương	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

- Vaccine: Trong quá trình tìm kiếm các biện pháp, thuốc phòng và trị các loại bệnh truyền nhiễm công nghệ vi sinh đã tạo ra vaccine, nhất là vaccine thế hệ mới.

Vaccine thế hệ mới có những ưu điểm: rất an toàn cho người sử dụng vì không sản xuất từ các vi sinh vật gây bệnh, không nuôi cấy trên phôi thai gà hay các tổ chức động vật vốn rất phức tạp, tốn kém nên giá thành thấp. Gồm các loại:

- + Vaccine ribosome: Cấu tạo từ ribosome của loại vi khuẩn gây bệnh (thương hàn, tả, dịch hạch), ưu điểm của loại vaccine này là ít độc và có tính miễn dịch cao.

- + Vaccine các mảnh của virus: Là vaccine chế tạo từ glycoprotein của vỏ virus gây bệnh như: virus cúm...

- + Vaccine kỹ thuật gen: Là vaccine chế tạo từ vi khuẩn hay nấm men tái tổ hợp có mang gen mã hoá việc tổng hợp protein kháng nguyên của một virus hay vi khuẩn gây bệnh nào đó.

- Insulin: Việc sản xuất insulin ở quy mô công nghiệp là một thành công rực rỡ của công nghệ gen. Insulin là một protein được tiết ra từ tuyến tụy nhằm điều hòa lượng đường trong máu. Thiếu hụt insulin trong máu sẽ làm rối loạn hầu hết các quá trình trao đổi chất ở cơ thể dẫn đến nhiều đường trong nước tiểu. Để điều trị bệnh này người bệnh phải tiêm insulin. Insulin điều chế từ tuyến tụy của gia súc hay được tổng hợp bằng con đường hoá học phải qua quá trình rất phức tạp và tốn kém.

Năm 1978, H. Boger đã chế insulin thông qua kỹ thuật di truyền trên vi khuẩn *E. coli*, cụ thể người ta đã chuyển gen chi phối tính trạng tạo insulin của người sang cho *E. coli*. Với *E. coli* đã tái tổ hợp gen này, qua nuôi cấy trong nồi lên men có dung tích 1000 lít, sau một thời gian ngắn có thể thu được 200 gam insulin tương đương với lượng insulin chiết rút từ 8.000 - 10.000 con bò.

- Interferon: Interferon có bản chất protein, giúp cho cơ thể chống lại được nhiều loại bệnh. Để có được interferon người ta phải tách chiết chúng từ huyết thanh của máu nên rất tốn kém. Cũng như insulin, người ta chế interferon thông qua con đường vi sinh vật. Năm 1980, Gilbert đã thành công trong việc chế interferon từ *E. coli*, năm 1981 đã thu nhận interferon từ nấm men *Saccharomyces cerevisiae* cho chất lượng tăng gấp 10.000 lần so với ở tế bào *E. coli*.

- Kích thích tố sinh trưởng (HGH-Human Growth Hormone): HGH được tuyến yên tạo nên, thông thường muốn chế được HGH người ta phải trích từ tuyến yên tử thi, mỗi tử thi cho 4- 6mg HGH, theo tính toán muốn chữa khỏi cho một người lùn phải cần 100 – 150 tử thi. Năm 1983, sự thành công của công nghệ vi sinh đã giúp con người chế được HGH từ vi sinh vật. Cứ 1lít dịch lên men *E. coli* thu được lượng HGH tương ứng với 60 tử thi.

- Chất kháng sinh: Kháng sinh chế từ vi sinh vật được con người đầu tư sản xuất từ lâu. Đến nay người ta đã tìm thấy có tới 2500 loại thuốc kháng sinh với cấu trúc phân tử đa dạng trong số đó chủ yếu có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Ngoài ra còn phải kể đến các chế phẩm enzyme có vai trò quan trọng trong thực tế. Thứ nhất, enzyme được dùng trực tiếp như những thuốc chữa bệnh, ví dụ như L-asparaginase có tác dụng kìm hãm sự sinh trưởng của những khối u nhất định, được sử dụng như một loại thuốc điều trị khối u. Thứ hai, các enzyme được dùng để tổng hợp dược phẩm. Trong sản xuất penicillin bán tổng hợp thì enzyme penicillinase đóng vai trò phân hủy penicillin thành aminopenicilanic acid là chất khởi đầu cho sự tổng hợp về sau. Thứ ba, phân tích bằng enzyme, không thể có một sự chẩn đoán lâm sàng hiện đại trong phòng thí nghiệm mà lại thiếu sự hỗ trợ của các enzyme. Nhờ enzyme ta có thể xác định một cách rất chính xác những rối loạn về hàm lượng các chất trao đổi, qua đó chẩn đoán được bệnh.

1.3.2. Công nghiệp thực phẩm

Từ lâu, con người đã biết ứng dụng vi sinh vật và các sản phẩm của vi sinh vật vào chế biến thực phẩm hoặc làm thức ăn như làm sữa chua từ sữa bò, làm bánh mì, làm phomat, muối dưa, làm dấm, nấu rượu, nấu bia...

Bảng 1.2. Ứng dụng các sản phẩm từ vi sinh vật trong thực phẩm

Sản phẩm	Ứng dụng	Vi sinh vật
Protein đơn bào: Nấm men Vi khuẩn Tảo lam Các tảo khác	Dinh dưỡng động vật, dinh dưỡng con người dưới dạng thực phẩm nhân tạo.	<i>Candida utilis</i> <i>Methanomonas methanica</i> <i>Spirulina maxima</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>
Nấm men bánh mì	Làm nở bánh	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bia Rượu vang và sâm banh Một số đồ uống chứa rượu	Làm đồ uống	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (Các chủng khác)
Acid hữu cơ: Acid acetic Acid citric Acid lactic Acid glutamic	Chất gia vị cho thực phẩm và đồ uống	<i>Acetobacter suboxydans</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Corynebacterium glutamicus</i>
Vitamin: Riboflavin (B ₂) β - caroten	Chất gia vị có tính chất vitamin và có tác dụng tạo màu cho thực phẩm	<i>Eremothecium asbyii</i> <i>Blakeslea trispora</i>
Amylase Invertase Protease	Thủy phân tinh bột Thủy phân đường Làm mềm thịt	<i>Aspergillus niger</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Bacillus subtilis</i>

Những năm gần đây khi nền công nghiệp phát triển mạnh thì ngành công nghiệp vi sinh ứng dụng đã trở thành công nghệ khá vững mạnh, đạt được nhiều thành tựu đáng kể trong lĩnh vực công nghiệp thực phẩm. Đó là những qui trình sản xuất thực phẩm lên men truyền thống với những dây chuyền thiết bị hiện đại như công nghệ sản xuất rượu vang, rượu sâm banh, cồn thực phẩm, các loại rượu cao cấp như Uyski, Vodka,... công nghệ sản xuất bia, công nghệ sản xuất các loại acid thực phẩm như acetic acid, lactic acid, amino acid, citric acid, mì chính.

Trong công nghiệp thực phẩm, các enzyme vi sinh vật ngày càng được ứng dụng nhiều. Tại các nhà máy bia, amylase và protease gây ra những biến đổi trong bột nhào khiến cho chất lượng sản phẩm được nâng cao rõ rệt. Pectinase và cellulase cũng được

dùng vào sản xuất các dịch quả và sản phẩm rau. Đối với công nghiệp đường thì melibiase (α - galactosidase) được chú ý, nhờ enzyme này mà saccharose chứa trong raffinose có thể thu nhận được dưới dạng đường củ cải kết tinh. Việc ứng dụng enzyme sẽ có ý nghĩa to lớn hơn nữa trong công nghiệp chế biến nếu như sự phát triển của enzyme được cố định trên giá mang và làm bất động được đầy mạnh hơn.

1.3.3. Nông nghiệp

Trong lĩnh vực trồng trọt, công nghệ vi sinh đã tạo ra các chế phẩm kích thích sinh trưởng, chế phẩm vi khuẩn, vi nấm được sản xuất hàng loạt. Các chế phẩm sinh học phòng trừ dịch hại, các loại phân vi sinh vật chứa vi khuẩn *Rhizobium* (cố định đạm cộng sinh) ở các loài cây họ đậu, *Azotobacter* (cố định đạm tự do) được sử dụng làm phân bón cho rau, đậu, lúa...

- Sản xuất phân bón vi sinh vật: Phân bón vi sinh vật là sản phẩm chứa một hay nhiều loài vi sinh vật sống đã được tuyển chọn có mật độ đảm bảo các tiêu chuẩn đã ban hành có tác dụng tạo ra các chất dinh dưỡng hoặc các hoạt chất sinh học có tác dụng nâng cao năng suất, chất lượng nông sản hoặc cải tạo đất. Các loại phân bón vi sinh vật kể đến là phân vi sinh vật cố định nitrogen - đạm sinh học, phân vi sinh vật phân giải hợp chất phosphate khó tan – phân lân vi sinh, chế phẩm nấm rễ, chế phẩm tảo lam...

- Sản xuất phân hữu cơ sinh học: Một loại sản phẩm được tạo thành thông qua quá trình lên men vi sinh vật các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc khác nhau (phế thải nông, lâm nghiệp, phế thải chăn nuôi, phế thải chế biến, phế thải đô thị, phế thải sinh hoạt...), trong đó các hợp chất hữu cơ phức tạp dưới tác động của vi sinh vật hoặc các hoạt chất sinh học của chúng được chuyển hoá thành mùn.

- Sản xuất chất kích thích sinh trưởng (gibberellin, auxin...) từ vi sinh vật. Gibberellin sản xuất bằng con đường lên men được ứng dụng phong phú trong nghề làm vườn, là một loại hormone thực vật ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, ra hoa của thực vật. Gibberellin được kết hợp với các nguyên tố vi lượng ở dạng muối tạo thành các loại phân bón lá có tác dụng tốt với nhiều loại cây trồng, kích thích ra hoa, kết trái, làm tăng năng suất.

- Sản xuất các chế phẩm vi sinh vật dùng trong bảo vệ thực vật: Bt, Biopor, Enterobacterin, Bathurin.... Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* gây bệnh cho côn trùng và các chất trao đổi có tính độc của nó được dùng như những chất diệt côn trùng đặc hiệu, ứng dụng trong nghề trồng rau và lâm nghiệp. Các virus gây bệnh cho côn trùng được dùng để chống các sâu hại trong ngành cây ăn quả. Một số chất kháng sinh được dùng để chống các bệnh nấm cho cây trồng. Sự phát triển của các chất trừ sâu hại có nguồn gốc vi sinh vật mang ý nghĩa ngày càng lớn.

- Cải tạo giống cây trồng: Thông qua kỹ thuật di truyền với sự hỗ trợ của vi sinh vật, con người đã tạo ra được giống cây trồng có nhiều tính ưu việt đó là cho năng suất cao, chất lượng nông sản tốt, sức đề kháng sâu bệnh cao...

Trong chăn nuôi, việc cân đối hợp chất protein trong khẩu phần thức ăn cho vật nuôi là một vấn đề rất quan trọng. Để giải quyết vấn đề này người ta đã dựa vào công nghệ vi sinh vật để sản xuất ra protein đơn bào - sinh khối nấm men được nuôi trên phụ phẩm của ngành công nghiệp thực phẩm (rỉ đường), công nghiệp gỗ, giấy (dịch thủy phân gỗ, dịch đường sulfide), dầu khí (paraffin)... Trong sinh khối nấm men rất giàu protein (tới 50% chất khô), các vitamin nhóm B, tiền vitamin D và các chất

khoáng rất cần cho dinh dưỡng động vật. Các amino acid, trước hết là lysine đóng vai trò rất lớn trong chăn nuôi. Hầu hết, các nguồn thức ăn thực vật thiếu lysine, đây là amino acid không thay thế, chỉ cần bổ sung vào thức ăn với liều lượng 1kg lysine vào một tấn thức ăn thì tăng trọng được $10 \div 30\%$ và giảm chi phí thức ăn từ $10 \div 20\%$. Chế phẩm lysine là dịch lên men cùng sinh khối vi khuẩn và lysine tạo thành được cô đặc, sấy phun để thu dạng chế phẩm bột.

Chất kháng sinh còn dùng làm thức ăn bổ sung cho gia súc. Một lượng lớn chất kháng sinh được sản xuất cho dinh dưỡng động vật như oxytetraxilin và bacitraxin. Nhờ bổ sung chất kháng sinh và các chất sinh trưởng như riboflavin, vitamin B₁₂ vào thức ăn gia súc mà có thể làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn và kích thích sinh trưởng của động vật non.

1.3.4. Tuyển khoáng và khai thác nguyên liệu

Trong tự nhiên có nhiều loại quặng nghèo, đặc biệt là những quặng kim loại quý như Ag, Au, Cu, U. Nếu khai thác các quặng này theo các phương pháp truyền thống thì sẽ không kinh tế. Người ta đã dựa vào vi sinh vật và phương pháp làm giàu quặng, tuyển khoáng bằng phương pháp chất lọc (leaching). Tác nhân gây chất lọc là các chủng thuộc giống vi khuẩn *Thiobacillus*. Chủng này oxy hóa các hợp chất lưu huỳnh thành acid sulfuric. Acid này hòa tan kim loại từ quặng ít có giá trị thành muối sulfate có thể hòa tan vào dung dịch. Phương pháp này đã được triển khai ở qui mô lớn trong việc khai thác đồng từ quặng sulfite. Khả năng này của vi khuẩn có thể áp dụng cho việc phân giải các hợp chất phosphate khó tan như quặng apatide, biến thành các hợp chất dễ tan thực vật có thể tiêu hóa được. Vấn đề này có thể đóng góp cho việc dùng phân lân từ quặng không cần chế biến thành superphosphate hoặc nung chảy.

Vi sinh vật có khả năng hòa tan kim loại nhờ các chất tạo phức hữu cơ do chúng sinh ra và có thể tích lũy kim loại ở các gian bào của chúng. Nhờ đó mà ta có thể thu nhận được kim loại một cách dễ dàng hơn, trong đó kể có vàng, bạc và cả bạch kim.

Vi sinh vật còn có khả năng lên men từ các dịch đường được thủy phân từ cellulose, nguồn nguyên liệu phong phú có thể tái sinh thành các sản phẩm ethanol, 2,3-butadiol, acetone và butanol hoặc methane... Trong tương lai các sản phẩm này sẽ đóng vai trò quan trọng trong giải quyết vấn đề năng lượng, tổng hợp hữu cơ. Đây cũng là một hướng khai thác nguyên liệu trong tương lai có nhiều triển vọng tốt.

1.3.5. Bảo vệ môi trường

Vi sinh vật đóng vai trò quyết định trong việc bảo vệ môi trường, vì chúng có nhiều chức năng then chốt của vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên. Đối với rác thải, nước thải từ các nguồn động vật và thực vật, vi sinh vật dễ dàng làm sạch trong quá trình hoạt động sống của chúng. Quá trình làm sạch này theo đúng nguyên lý của công nghệ lên men đó là lên men kỵ khí và lên men hiếu khí. Điều khác ở đây là các tác nhân gây lên men không phải là một chủng thuần khiết mà là một quần thể. Chúng có thể sống ở môi trường nước bã thải, có hệ enzyme thủy phân phong phú để phân giải các cơ chất chủ yếu có trong phế thải. Điều quan trọng ở đây là chúng ta cần phải đưa ra các biện pháp kỹ thuật sao cho các tập đoàn vi sinh vật phát triển và hoạt động tối ưu để rút ngắn thời gian phân hủy phế thải, sau đó mới đưa ra môi trường tự nhiên bên ngoài.

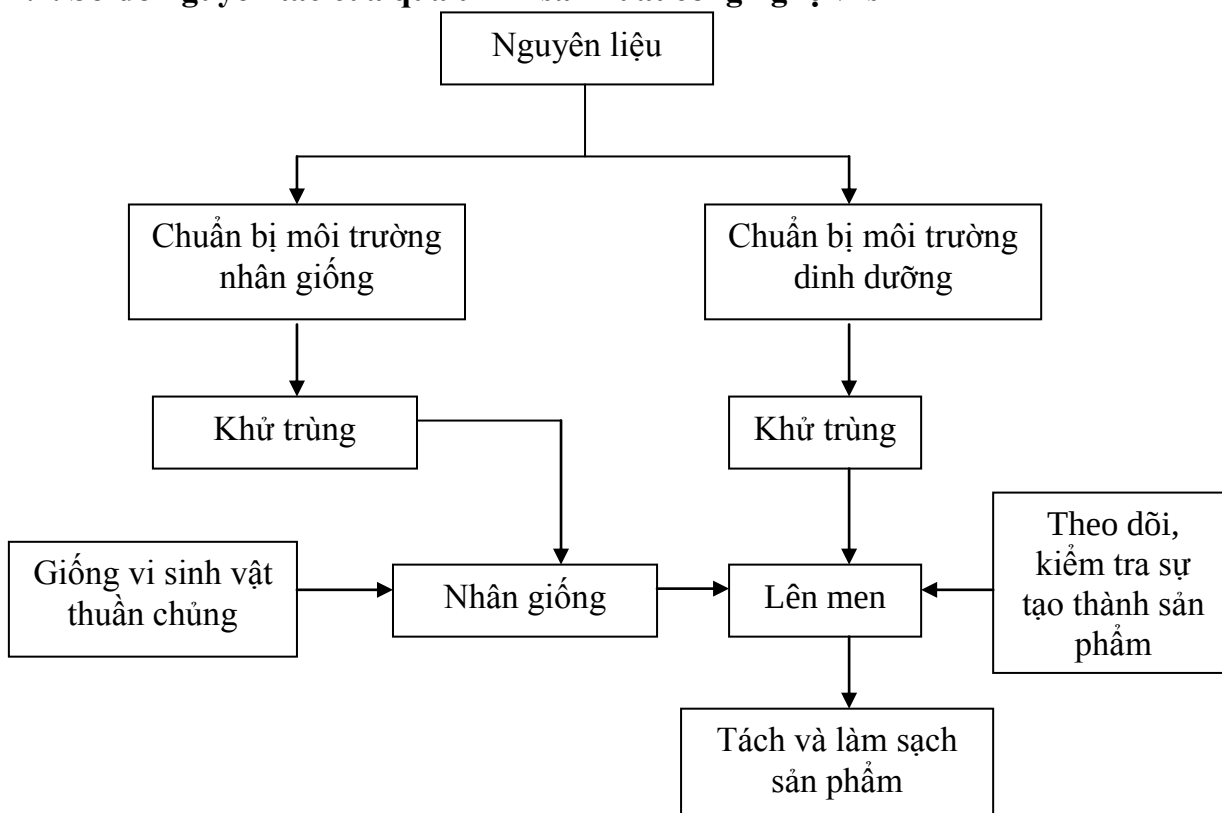
Vấn đề môi trường đáng quan tâm đặc biệt là các chất đường như không bị hoặc khó bị phân hủy của nước thải công nghiệp, trước hết là công nghiệp hóa học. Để loại trừ những chất lạ này cần phải lựa chọn các chủng có năng lực phân hủy mới và mạnh,

vấn đề này đòi hỏi phải có một thời gian dài, vì đó là kết quả của nhiều đột biến. Nhờ các phương pháp di truyền học vi sinh vật người ta có khả năng chọn được những chủng hoặc những quần thể hỗn hợp để đưa vào vào việc giải độc môi trường. Trong các thiết bị làm sạch nước thải công nghiệp cũng cần phải có các chủng này.

Để làm sạch nước thải một cách triệt để, có thể sử dụng tảo và vi khuẩn lam trong việc đồng hóa các chất vô cơ sinh ra trong quá trình phân hủy chất hữu cơ. Việc phối hợp vi sinh vật trong quá trình làm sạch nước thải góp phần làm tăng hiệu quả xử lý và hiệu quả kinh tế của quá trình xử lý nước thải. Trong thực tế người ta đã sử dụng khả năng khử nitrate thành nitrogen phân tử của một số vi khuẩn để loại bỏ nitrogen vô cơ khỏi nước thải.

2. SƠ ĐỒ NGUYÊN TẮC CỦA CÁC QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT CÔNG NGHỆ VI SINH

2.1. Sơ đồ nguyên tắc của quá trình sản xuất công nghệ vi sinh



Hình 1.1. Sơ đồ nguyên tắc của quá trình sản xuất nhờ vi sinh vật

2.2. Thuyết minh quá trình sản xuất công nghệ vi sinh

* Nguyên liệu: Gồm các hợp chất có chứa nguồn carbon hữu cơ để đảm bảo nguồn năng lượng trong quá trình hoạt động của giống vi sinh vật dị dưỡng và làm bộ khung carbon trong các sản phẩm lên men. Ngoài ra, còn cần có nguồn nitrogen, các nguồn chất khoáng đa lượng hoặc vi lượng (P, K, Mg, Fe, Zn...) và các chất sinh trưởng (các vitamin, purine, pirimidine,...).

* Môi trường: Thành phần môi trường lên men và môi trường nhân giống vi sinh vật có thể được chuẩn bị có thể giống hoặc khác nhau (môi trường nhân giống có thể tích ít hơn môi trường lên men). Môi trường phải có đầy đủ các chất dinh dưỡng, chất khoáng nhằm thúc đẩy quá trình lên men theo định hướng và được vô trùng trước khi nuôi cấy vi sinh vật.

* Chủng vi sinh vật sản xuất thường là các giống thuần chủng đã được chọn lọc kỹ, được bảo quản bằng phương pháp thích hợp. Từ môi trường bảo quản, giống được cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng, nuôi ở điều kiện thích hợp để giống phát triển trở lại bình thường, quá trình này gọi là quá trình hoạt hóa giống. Quá trình hoạt hóa giống được xem là kết thúc khi chủng vi sinh vật sinh trưởng, phát triển bình thường và vẫn duy trì được hoạt tính. Giống sau khi hoạt hóa phải được kiểm tra hoạt tính và cấy chuyển sang ống nghiệm môi trường lỏng để bắt đầu cho các bước nhân giống từ phòng thí nghiệm đến sản xuất.

* Lên men: Quá trình lên men tùy thuộc tính chất của chủng sản xuất, sản phẩm cuối cùng ta có thể thực hiện theo phương pháp nuôi cấy hiếu khí hoặc kỵ khí. Nếu trường hợp lên men hiếu khí thì phải có hệ thống cung cấp khí vô trùng, các thiết bị lên men phải chế tạo sao cho việc cấp oxygen, như khuấy trộn, phân tán bọt khí ... đáp ứng được nhu cầu của giống nuôi cấy. Các bình hoặc thùng lên men thực chất là các bình phản ứng sinh học (bioreactor), trong đó các phản ứng hóa sinh được thực hiện nhờ các phức hệ enzyme trong tế bào vi sinh vật. Nghiên cứu những điều kiện lên men tối ưu, trong đó có lưu ý đến các nguồn cơ chất rẻ tiền trong thành phần môi trường dinh dưỡng là quá trình tối ưu hóa phenotype.

* Thu nhận và làm sạch sản phẩm: Việc thu nhận sản phẩm của quá trình lên men là phức tạp, mỗi loại hình có những đặc thù riêng và quá trình tách, làm sạch sản phẩm có những yêu cầu công nghệ riêng biệt, được trang bị các thiết bị phù hợp với từng loại của sản phẩm. Đối với sản phẩm là các dung môi hữu cơ hòa tan trong nước như ethanol, butanol thì cần phải có tháp chưng cất phân đoạn. Đối với sản phẩm là các chất hòa tan trong dịch nuôi cấy thì cần phải ly tâm tách lấy phần dịch, rồi cho kết tủa, làm sạch, có thể cho kết tinh trở lại. Hoặc sản phẩm nằm trong tế bào thì phải phá vỡ vỏ tế bào (nghiên, làm lạnh đông chậm, sóng siêu âm...) rồi mới tiến hành tách và làm sạch tiếp theo.

Thu nhận sản phẩm thường bắt đầu bằng cách tách tế bào vi sinh vật ra khỏi dịch nuôi cấy. Nếu sinh khối vi sinh vật có hệ sợi thường qua lọc, còn đối với vi khuẩn và nấm men thì ly tâm. Việc xử lý tiếp theo tùy thuộc sản phẩm lên men nằm ở dịch hay trong tế bào. Cũng có khi cả hai phần này đều được xử lý.

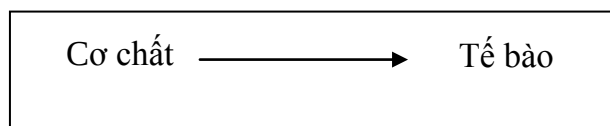
Bản chất hoá học của sản phẩm quy định các biện pháp xử lý tiếp theo: chiết rút, hấp phụ, sàng phân tử hoặc kết tủa... Việc hoàn thành sản phẩm tương đối phức tạp và thường phải làm qua nhiều bước với các thiết bị thích hợp. Sản phẩm được thu nhận với chất lượng và hiệu suất cao có ý nghĩa quyết định về mặt kinh tế của một phương pháp. Vì vậy, việc hoàn thành sản phẩm phải chú ý từ khi chọn giống, chọn môi trường dinh dưỡng. Việc tối ưu hoá một phương pháp còn liên quan đến việc làm sạch nước thải, sử dụng phế liệu và phế phẩm.

3. PHÂN LOẠI SẢN PHẨM CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

Phân loại sản phẩm của công nghệ vi sinh vật theo sinh lý trao đổi chất là dựa vào sản phẩm chính của quá trình lên men. Theo kiểu này thì có 3 nhóm sản phẩm:

3.1. Sinh khối (biomass)

Quá trình nuôi cấy chủ yếu là sinh sản, phát triển các tế bào của giống vi sinh vật, các chất dinh dưỡng được chuyển hoá thành vật chất tế bào. Tóm tắt quá trình như sau:



Việc tổng hợp sinh khối hay vật chất tế bào đồng nhất với sự sinh trưởng và phát triển (sinh sản) các tế bào của chủng nuôi cấy. Sinh sản là sự tăng số lượng của tế bào. Sinh trưởng là sự tăng về khối lượng tế bào, đòi hỏi sự tổng hợp tất cả các chất cấu trúc và thành phần của tế bào, như acid nucleic, protein, lipid, polysaccharide của thành tế bào. Sinh trưởng phục vụ cho sự duy trì và sinh sản của vi sinh vật. Theo chức năng này, trong quá trình tiến hóa của tế bào vi sinh vật đã hình thành cơ chế điều hoà trao đổi chất, sao cho phần lớn các chất dinh dưỡng tiêu hao phục vụ cho việc tổng hợp tế bào chất. Trong điều kiện nuôi cấy tối ưu với các nguồn carbonhydrate thích hợp thì có khoảng 50% cơ chất được dùng cho sinh trưởng tăng sinh khối, 50% dùng để trao đổi năng lượng phục vụ cho quá trình hô hấp của vi sinh vật, sản phẩm cuối cùng của hô hấp là CO_2 và nước.

Các dạng sản phẩm loại này thường gặp:

- Protein đơn bào ở dạng nấm men chấy nuôi, men bánh mì. Nấm men chấy nuôi là những tế bào nấm men sau khi sấy khô đã chết giàu protein và thường gọi là protein đơn bào. Men bánh mì là sinh khối của giống nấm men *Saccharomyces cerevisiae* còn sống được làm khô, khi trộn với bột nhào nấm men sẽ hoạt động và lên men rượu nhẹ để giải phóng CO_2 làm nở bánh.

- Các chế phẩm vi sinh vật thường là các vi khuẩn cố định nitrogen từ không khí (thường là vi khuẩn cố định đạm). Chúng sống cộng sinh ở cây đậu tạo nốt sần ở rễ thường gọi là vi khuẩn nốt rễ hoặc các loài sống tự do trong đất. Trong các chế phẩm hoặc phân bón, các vi khuẩn này còn sống và có hoạt tính cố định đạm.

- Các chế phẩm hoặc thuốc trừ sâu vi sinh thường gặp nhất là Bt, là sinh khối của một vài loài thuộc giống *Bacillus*. Chúng còn sống và có khả năng sinh tinh thể độc trong ống tiêu hoá của côn trùng làm côn trùng bị chết. Hoặc một số nấm mốc (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*) và virus diệt côn trùng khác.

- Các vaccine cũng là dạng sinh khối vi sinh vật gồm có vaccine tế bào chết và vaccine tế bào vi sinh vật nhược độc (yếu về hoạt động sống và sinh độc tính yếu) dùng tiêm hoặc uống để cơ thể sinh kháng thể.

Các sản phẩm lên men không có chức năng nào đối với tế bào. Vì vậy, trong quá trình nuôi cấy cần chọn các điều kiện sao cho càng nhiều cơ chất được chuyển thành tế bào càng tốt.

3.2. Các sản phẩm trao đổi chất

Sản phẩm của trao đổi chất là điển hình của công nghệ lên men. Quá trình lên men được tóm tắt như sau:

Cơ chất $\longrightarrow$ Sản phẩm + Tế bào

Sản phẩm gồm 4 loại chính:

- * Các sản phẩm cuối cùng của sự trao đổi chất và năng lượng, chính là các sản phẩm lên men cổ điển như: ethanol, methanol, propanol, acid lactic, acetol-butanol, methane...

Lên men là quá trình kị khí của sự thu nhận năng lượng, trong đó hydrogen tách ra được chuyển đến các chất nhận hữu cơ. Các hợp chất hữu cơ nhận hydrogen là

những hợp chất được hình thành trong quá trình trao đổi chất dị hóa. Sau khi nhận hydrogen, các hợp chất này thải ra ngoài tế bào giống như các sản phẩm cuối cùng của sự hô hấp. Do vậy, mà trong sản xuất cần chọn các điều kiện nuôi sao cho càng nhiều cơ chất được chuyển thành các sản phẩm lên men càng tốt.

Ví dụ: trong sản xuất rượu để tăng hàm lượng rượu thì cần tăng hàm lượng đường và giảm các yếu tố quan trọng cho sinh trưởng.

* Các chất trao đổi bậc 1

- Là các amino acid, nucleotide, vitamin, citric acid, lipid, carbohydrate...

- Các chất trao đổi bậc một là những viên gạch cấu trúc có trọng lượng phân tử thấp của các cao phân tử sinh học tế bào chất: amino acid, nucleotide, nucleoside, đường, acid béo, vitamin... Ngoài ra, các sản phẩm trung gian của quá trình trao đổi chất (các acid hữu cơ trong chu trình Krebs) cũng là các chất trao đổi bậc 1. Các cơ chế điều hòa phát triển trong quá trình tiến hóa bảo đảm sao cho các chất trao đổi bậc 1 chỉ được tổng hợp đến mức độ cần thiết. Trong quá trình nuôi cấy các chủng vi sinh vật hay các quá trình lên men ở quy mô công nghiệp, người ta cần điều khiển các điều kiện sao cho các chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp thừa hoặc "siêu tổng hợp" các sản phẩm đối với yêu cầu sinh trưởng của chúng. Sinh tổng hợp thừa các chất trao đổi bậc 1 là do rối loạn trao đổi chất của tế bào vi sinh vật hoặc có sự thay đổi trong quá trình điều hòa các quá trình này.

* Các chất trao đổi bậc 2:

- Là các chất kháng sinh, các alkaloid, các chất kích thích hoặc kìm hãm sinh trưởng (gibberellin, abscisic acid...), các độc tố từ vi sinh vật...

Các chất trao đổi bậc 2 là những hợp chất có trọng lượng phân tử thấp, không gặp ở mọi cơ thể. Chúng chỉ có ở một số nhóm vi sinh vật nhất định. Chúng không có chức năng chung trong trao đổi chất của tế bào, nhưng có ý nghĩa với sự sinh trưởng của các cơ thể sản sinh ra chúng. Rất có thể chúng có một chức năng nào đó đối với việc duy trì loài trong điều kiện sinh thái nhất định. Các chất kháng sinh là tiêu biểu cho những hợp chất này. Một số nấm gây bệnh sinh ra các chất kích thích sinh trưởng hoặc kìm hãm hay gây độc đối với cây chủ. Đó cũng là những chất trao đổi bậc 2. Các chủng tồn tại trong tự nhiên thường chỉ tổng hợp ra ít chất trao đổi bậc 2 tích tụ trong tế bào hoặc tiết ra ngoài. Trong sản xuất lên men công nghiệp, người ta chỉ có thể làm cho chủng vi sinh vật có đặc tính "siêu tổng hợp" nhờ những điều kiện nuôi cấy đặc biệt và những thể đột biến.

* Các enzyme gồm:

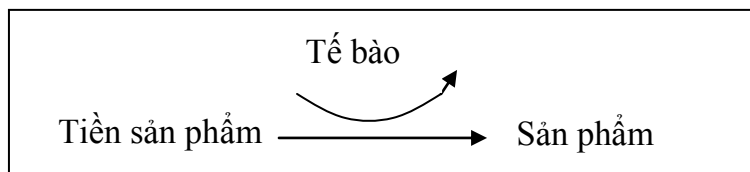
+ Enzyme ngoại bào: protease, amylase, cellulase, pectinase...

+ Enzyme nội bào: asparaginase, penicillinase, lipase...

Tế bào vi sinh vật có khoảng trên 1000 enzyme khác nhau. Phần lớn các enzyme ở trong tế bào (enzyme nội bào) và khi cần thiết mới tiết enzyme ra ngoài tế bào (enzyme ngoại bào) để phân hủy những cơ chất tương ứng. Ví dụ amylase thủy phân tinh bột, pectinase phân hủy pectin... vi sinh vật có khả năng sử dụng cơ chất khác nhau cho sinh trưởng và thích ứng với các điều kiện rất khác nhau. Sở dĩ như vậy là do tế bào chỉ tổng hợp một số enzyme trong những điều kiện cần thiết. Trong sản xuất enzyme cần điều khiển quá trình lên men, thực chất là điều khiển sự trao đổi chất của tế bào vi sinh vật sao cho enzyme tổng hợp được càng nhiều càng tốt.

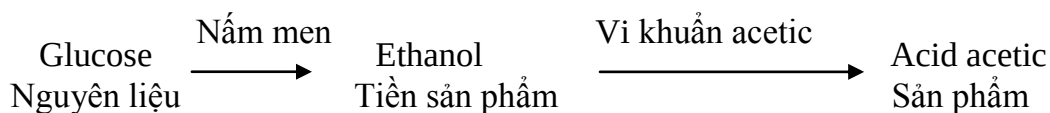
3.3. Các sản phẩm của sự chuyển hoá (transformation product)

Trong sự chuyển hóa chất, các tế bào vi sinh vật hoạt động như những hệ thống xúc tác cho một hoặc nhiều bước chuyển hoá chất. Về mặt lý thuyết những phản ứng này có thể xảy ra nhờ xúc tác của những enzyme riêng biệt đặc hiệu, song khó thực hiện tách được những enzyme đó là điều khó khăn hoặc không kinh tế. Trong quá trình chuyển hóa chất, tiền sản phẩm được trộn với sinh khối vi sinh vật thu được sau khi nuôi cấy có hoạt tính với những enzyme có mặt trong tế bào sẽ cho những sản phẩm mong muốn. Những thành tựu của quá trình này được ứng dụng trong sản xuất các chất cortisol, ascorbic acid, gluconic acid...và các dẫn xuất dùng điều trị các chứng viêm khớp.



Ví dụ: sự chuyển hóa steroid của sự tạo thành cortisol, sự oxy hóa không hoàn toàn thành acetic acid, sự chuyển hóa trong sorbose trong sản xuất ascorbic acid (vitamin C).

Sự chuyển hóa ethanol:



Các vi khuẩn acetic tham gia chuyển hóa như *Acetobacter*, *Acetomonas*...

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Nêu đối tượng nghiên cứu của công nghệ vi sinh vật.
2. Các giai đoạn phát triển của công nghệ vi sinh vật.
3. Phân loại các sản phẩm của công nghệ vi sinh vật.
4. Tại sao có người nói vi sinh vật vừa là người bạn thân thiết, vừa là kẻ thù nguy hiểm của con người?

Chương 2. TUYỂN CHỌN VÀ BẢO QUẢN GIỐNG VI SINH VẬT

1. CHŨNG VI SINH VẬT DÙNG TRONG SẢN XUẤT

1.1. Yêu cầu của chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất

Để triển khai quá trình lên men sản xuất mỗi sản phẩm nhất định, bước đầu tiên là phải lựa chọn chủng vi sinh vật có hoạt lực tích tụ sản phẩm cao và đáp ứng được các yêu cầu công nghệ làm tác nhân cho quá trình. Việc tuyển chọn và tạo chủng công nghiệp thường được tiến hành dựa vào quá trình tuyển chọn giống thông thường hoặc dựa vào con đường tạo chủng tái tổ hợp. Tùy thuộc vào mỗi công nghệ cụ thể có thể có các đặc thù riêng cho việc lựa chọn, song yêu cầu của các chủng vi sinh vật dùng trong công nghiệp phải đảm bảo các tiêu chuẩn sau đây:

- Tạo ra sản phẩm mong muốn với năng suất cao, chất lượng tốt.
- Tồn tại ở dạng thuần khiết, ổn định về di truyền và có thể bảo quản giống lâu dài để đảm bảo cung cấp giống thường xuyên, ổn định cho sản xuất.
- Thích hợp với điều kiện lên men sản xuất lớn, dễ dàng cấy chuyển và nhân giống nhanh và đủ giống cho sản xuất.
- Có tốc độ phát triển nhanh và tích tụ sản phẩm mong muốn trong khoảng thời gian ngắn.
- Không gây độc với con người, động vật và thực vật (trong trường hợp nếu có tích tụ độc tố thì độc tính phải thấp và độc tố này dễ dàng loại bỏ khỏi sản phẩm, đồng thời nó phải bị mất hoạt tính nhanh trong điều kiện môi trường ngoài, đảm bảo an toàn cho con người, động vật, thực vật và môi trường sinh thái).
- Dễ dàng tách sinh khối của chúng ra khỏi dịch lên men trong giai đoạn tinh chế sản phẩm.
- Có khả năng áp dụng các kỹ thuật tạo giống hiện đại để nâng cao hoạt tính của chủng hoặc tạo ra các chủng tái tổ hợp có đặc tính ưu việt hơn.

1.2. Các nguyên lý điều hòa trao đổi chất

Các đặc thù chung của vi sinh vật công nghiệp cũng như các vi sinh vật khác là có nguồn enzyme rất phong phú (có tới hàng ngàn enzyme). Ví dụ, trong tế bào *E.coli*, người ta đã xác định được khoảng 2000 enzyme và có thể nhiều hơn nữa nếu nuôi nó trong môi trường thích hợp. Các enzyme đóng vai trò quan trọng trong đời sống vi sinh vật, chúng là chất xúc tác cho các phản ứng sinh hóa xảy ra trong và ngoài tế bào để phân hủy cơ chất và tổng hợp các vật liệu tế bào nhằm bảo vệ cũng như phát triển. Chúng còn tham gia vào trong quá trình chuyển hóa vật chất trong sinh giới.

Các vi sinh vật tồn tại trong tự nhiên hình thành cơ chế điều hòa phát triển sao cho các sản phẩm trao đổi chất sinh ra và các thành phần của tế bào chỉ ở mức độ cần thiết cho sự sinh sản và duy trì loài. Ở tự nhiên, trong quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật không có sự tạo dư thừa các chất trao đổi chất bậc một, bậc hai và các enzyme.

Sự trao đổi chất của tế bào có tính kinh tế này được bảo đảm là nhờ ở vi sinh vật tồn tại các cơ chế điều hòa trao đổi chất ở mức độ cao. Các nhà khoa học đã tìm ra ba cơ chế điều hòa quá trình trao đổi chất ở vi sinh vật:

- Điều hòa các hoạt tính enzyme nhờ sự ức chế ngược bằng sản phẩm cuối cùng hay còn gọi là sự kim hãm theo liên kết ngược.

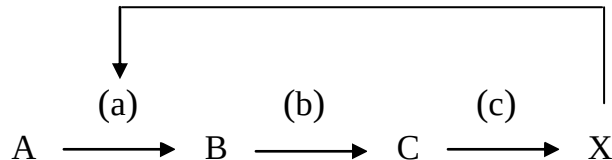
- Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiểm chế.

- Điều hòa sinh tổng hợp enzyme bằng sự kiểm chế dị hóa.

1.2.1. Điều hòa hoạt tính enzyme nhờ sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng hay còn gọi là kìm hãm do liên kết ngược

Sản phẩm cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp một chất có khả năng gây ra sự ức chế quá trình tổng hợp của chính nó. Sản phẩm cuối cùng dù được tế bào tổng hợp nên hay thu nhận từ môi trường bên ngoài, khi ở nồng độ dư thừa so với nhu cầu của cơ thể vi sinh vật sẽ ảnh hưởng đến enzyme đầu tiên trong chuỗi sinh tổng hợp

Ta có sơ đồ chuỗi các phản ứng sinh hóa xảy ra để tổng hợp chất X như sau:



Enzyme đầu tiên (a) là một enzyme dị lập thể, nó thay đổi cấu hình không gian khi có mặt sản phẩm cuối X nhằm giảm bớt hoạt tính xúc tác của chính mình. Enzyme này ngoài vị trí gắn với cơ chất A (trung tâm xúc tác), nó còn một hay nhiều vị trí gắn với sản phẩm cuối cùng X gọi là trung tâm dị lập thể. Trung tâm xúc tác và trung tâm dị lập thể tách biệt nhau về không gian và khác nhau về cấu trúc. Nếu sự hiện diện của X ở mức dư thừa so với nhu cầu của cơ thể thì sẽ xảy ra sự bao vây của trung tâm dị lập thể, làm cho trung tâm xúc tác bị biến đổi cấu hình không gian đến mức khiến cho enzyme a không thể gắn được cơ chất A mà chỉ gắn với X. Như vậy, không có sự chuyển hoá A thành B, chuỗi sinh tổng hợp X sẽ bị gián đoạn. Sự điều hòa này ở mức độ enzyme. Quá trình tổng hợp enzyme cũng được điều hòa bởi sự cảm ứng và ức chế quá trình sinh tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiểm chế.

1.2.2. Điều hòa tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiểm chế

Trong cơ chế này chúng ta gặp lại chất X là những chất có phân tử lượng thấp, là sản phẩm cuối cùng của một chuỗi sinh tổng hợp. Ví dụ X ở đây là amino acid. Sơ đồ được biểu diễn ở hình 2.1.

Gen điều khiển: Là đoạn DNA nằm kề bên nhóm gen cấu trúc, gọi là operator (kí hiệu O). Nhờ tác dụng gắn với chất ức chế, O làm việc như một “công tắc” phụ trách việc “đóng mở” hoạt động của nhóm gen cấu trúc.

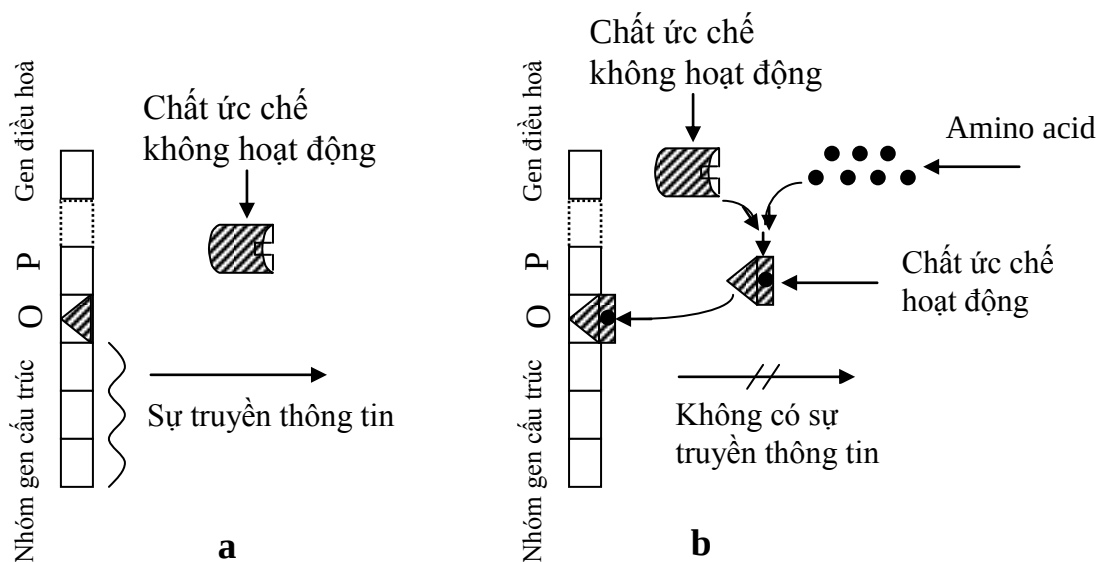
Gen khởi động: Là đoạn DNA nằm kề phía trước O gọi là promoter (kí hiệu P), là nơi gắn enzyme RNA polymerase, enzyme này xúc tác cho quá trình tổng hợp RNA thông tin của nhóm gen cấu trúc. Khi chất ức chế gắn vào O thì phân tử RNA polymerase bị cản trở, không di chuyển dọc theo mạch khuôn DNA, dẫn đến các gen cấu trúc bị kiểm chế và không tạo được protein cũng như enzyme tương ứng. Do vị trí và chức năng như vậy nên được gọi là gen promoter.

Gen điều hòa: gen này chịu trách nhiệm mã hoá việc tổng hợp nên một protein đặc biệt đóng vai trò chất ức chế. Thường nó chỉ tổng hợp với một lượng không đáng kể trong tế bào (khoảng 10-20 phân tử/ tế bào). Đặc điểm của chất ức chế là một protein có dạng oligomer có hai tâm đặc thù, hai tâm này làm cho chất ức chế có khả

năng hoặc gắn với chất cảm ứng hoặc gắn với O. Nếu chất ức chế có ái lực lớn với O thì thường gắn vào O.

Trong sơ đồ trên, X có tác dụng đặc hiệu với chất ức chế (chất do gen điều hoà tổng hợp nên). Khi trong môi trường có dư thừa chất X so với nhu cầu của tế bào, X sẽ gắn với chất ức chế, làm thay đổi cấu hình không gian của chất ức chế, khiến cho chất ức chế có khả năng gắn với operator, hay gọi là hoạt hoá chất ức chế. Do vậy còn gọi chất X là chất đồng kìm hãm. Khi chất ức chế gắn với O sẽ làm ngưng trệ quá trình phiên mã, ức chế operon (nhóm gen cấu trúc, gen operator và gen promoter được tổ hợp lại thành một đơn vị gọi là operon. Mỗi một operon tương ứng một gen điều hoà, chịu sự kiểm soát nghiêm ngặt của gen này), đưa đến các enzyme không tổng hợp được. Liên đới việc sản xuất chất X bị gián đoạn.

Trong khi đó tế bào vẫn tiếp tục sử dụng chất X, khiến cho số lượng chất này bị giảm đến mức không đủ để đáp ứng nhu cầu của tế bào. Lúc này sẽ xảy ra quá trình giải phóng sự kiểm chế operon nói trên. Tức do thiếu chất X, chất ức chế lúc này sẽ thiếu mất yếu tố hoạt hoá, do đó không có khả năng gắn với operator, điều này đưa tới giải phóng operon, dẫn tới các enzyme được tổng hợp và việc sản xuất X sẽ được tiến hành trở lại. Đó là hiện tượng giải kiểm chế.



Hình 2.1. Điều hoà tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiểm chế

a. Không có amino acid, enzyme được tổng hợp.

b. Có amino acid, enzyme không được tổng hợp.

O: (Operator) gen điều khiển, P: (Promoter) gen khởi động

1.2.3. Điều hoà tổng hợp enzyme nhờ sự kiểm chế dị hoá

Trường hợp các enzyme tham gia quá trình dị hoá được điều hoà bằng cơ chế kiểm chế dị hoá, các enzyme tham gia vào quá trình dị hoá được gọi là enzyme cảm ứng. Chất mà enzyme tham gia phân hủy gọi là cơ chất cảm ứng. Các cơ chất này có khả năng kích thích sự tổng hợp ra các enzyme cảm ứng tương ứng. Do đó, các

enzyme tương ứng chỉ được tạo ra khi trong môi trường nuôi cấy có mặt các cơ chất tương ứng.

Thực tế, trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật không chỉ tồn tại một loại cơ chất mà có rất nhiều cơ chất. Các cơ chất này đều có khả năng kích thích sự tạo ra enzyme cảm ứng, còn quá trình tổng hợp enzyme phụ thuộc hoàn toàn vào tính chất của cơ chất. Cơ chất nào dễ dàng bị phân hủy thì sẽ dễ kích thích sự tạo ra enzyme cảm ứng tương ứng trước. Sự tổng hợp các enzyme xúc tác phân hủy các cơ chất khác bị ức chế bởi sự kiểm chế dị hoá. Ví dụ: Trong môi trường nuôi cấy có hai nguồn carbohydrate: glucose và lactose, trước tiên vi sinh vật sẽ hình thành các enzyme phân giải glucose. Sự cảm ứng để tổng hợp enzyme phân giải lactose (β -galactosidase) bị ức chế bởi sự kiểm chế dị hoá, sự ức chế này cho đến khi không còn glucose trong môi trường. Sự ức chế quá trình tổng hợp các loại enzyme khác bởi glucose trong trường hợp này gọi là hiệu ứng glucose.

Toàn bộ quá trình kiểm chế dị hoá có liên quan chặt chẽ đến quá trình dịch mã trong cơ chế sinh tổng hợp protein. Trong tự nhiên có rất nhiều vi sinh vật điều khiển quá trình sinh tổng hợp theo cơ chế này.

1.3. Những sai hỏng di truyền của điều hòa trao đổi chất

Với những cơ chế điều hoà nói trên, quá trình trao đổi chất ở vi sinh vật thường tuân theo nguyên tắc kinh tế và hài hoà. Các vi sinh vật không khi nào tổng hợp ra những chất quá thừa so với nhu cầu phát triển của chúng. Nhưng trong thực tế có sự tổng hợp thừa, không những thừa mà còn thừa rất nhiều so với nhu cầu phát triển của chúng. Sản phẩm thừa này của vi sinh vật rất cần thiết cho các quá trình sản xuất các sản phẩm lên men từ vi sinh vật.

Với những thành tựu của khoa học, hiện nay con người đã cố gắng tạo ra được rất nhiều chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp thừa và siêu tổng hợp các chất. Đây là kết quả của quá trình chọn lọc nhân tạo với các phương pháp gây đột biến. Những chủng đột biến này có những sai hỏng di truyền rất đáng được quan tâm. Như vậy, muốn cho vi sinh vật tổng hợp thừa một sản phẩm nào đó, có thể dùng các cơ chế gây tổng hợp thừa như sau:

- Tác động vào trung tâm dị lập thể để chúng không còn khả năng hoạt động hoặc tác động vào chất kiểm hãm làm chúng không có khả năng tương tác với trung tâm dị lập thể. Ví dụ: lợi dụng cơ chế điều hoà hoạt tính enzyme nhờ sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng, con người đã tìm cách gây đột biến, làm hỏng trung tâm dị lập thể của enzyme (a), làm cho nó mất khả năng gắn với chất X nhưng bản thân enzyme (a) vẫn còn hoạt tính xúc tác đối với cơ chất A. Do vậy khi có mặt chất X, sản phẩm cuối cùng với số lượng dư thừa so với nhu cầu của vi sinh vật, enzyme (a) vẫn xúc tác chuyển A thành B ... đưa đến chất X vẫn được tiếp tục tổng hợp. Đây là điều con người mong muốn.

- Tác động lên gen điều hoà (Regulator), gen chỉ phối tạo nên chất ức chế, dẫn đến sự sai hỏng của chất ức chế hoặc phá huỷ quá trình tổng hợp chất ức chế. Hay có khi đột biến “sai lệch” gen điều khiển (Operator) làm cho gen này mất khả năng gắn với chất ức chế. Kết quả là ngay cả khi một chất ức chế nào đó có nồng độ dư thừa so với nhu cầu của vi sinh vật, các enzyme cần thiết cho sự tổng hợp của chúng vẫn được hình thành và các chất này vẫn được tiếp tục tổng hợp trong tế bào.

- Đưa vào bộ gen của vi sinh vật những gen mới làm tăng sự tổng hợp thừa các sản phẩm mà con người mong muốn.

1.4. Kỹ thuật phân tử

Để tìm được các chủng vi sinh vật theo sự mong muốn, con người đã tìm cách tác động vào bộ gene của vi sinh vật. Việc tạo nên các chủng đột biến này dựa trên cơ sở hiểu biết về các quy luật di truyền và biến dị, dựa trên kinh nghiệm của công tác lai tạo giống.

Cùng với sự phát triển của sinh học phân tử, công nghệ gene cho phép con người có thể chủ động tạo các chủng giống vi sinh vật theo mong muốn của con người trong điều kiện *in vitro*.

Kỹ thuật phân tử cho phép chuyển các đoạn gene từ sinh vật này sang sinh vật khác, tạo nên các chủng sinh vật mang các đặc tính theo mong muốn của con người.

1.4.1. Vector chuyển gene

- Vector chuyển gen là các phân tử DNA có kích thước nhỏ, cho phép gắn các gen cần thiết, có khả năng tự tái bản không phụ thuộc vào sự phân chia của tế bào, tồn tại độc lập trong tế bào.

- Đặc điểm của vector chuyển gene

- + Kích thước vector càng nhỏ càng tốt để có thể gắn DNA có kích thước tối đa, dễ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn và được sao chép nhanh.

- + Có các đặc điểm cho phép dễ dàng phát hiện, nhận biết chúng trong tế bào vật chủ, thường là các gen kháng chất kháng sinh hoặc gen sinh tổng hợp chất màu, dễ phát hiện trên môi trường thạch.

- + Có vị trí nhận biết duy nhất của một số lượng tối đa các enzyme giới hạn.

- Các loại vector chuyển gene

Gồm nhiều loại như plasmid, phage, cosmid, phagemid, nhiễm sắc thể nhân tạo ở nấm men... Nhưng phổ biến nhất là plasmid và bacteriophage.

- Plasmid: Ở tế bào Prokaryote, dưới kính hiển vi điện tử có thể quan sát chất nhân là phân tử DNA nguyên vẹn dạng vòng. Đó là nhiễm sắc thể - nơi chứa nguyên liệu di truyền của tế bào. Cùng với nhiễm sắc thể còn có cấu trúc dạng vòng nhỏ hơn người ta gọi là plasmid. Là những phân tử DNA có kích thước nhỏ (2 – 5kb), dạng vòng, nằm trong tế bào chất của tế bào vi khuẩn. Có khả năng tái bản độc lập, không phụ thuộc vào sự tái bản của bộ gene tế bào.

Ở nhóm Eukaryote, người ta mới phát hiện plasmid ở nấm men.

Plasmid có các đặc điểm đáp ứng được yêu cầu của vector chuyển gene:

- + Tham gia vào cơ chế tái tổ hợp nội bào

- + Có khả năng di chuyển từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác.

- + Có khả năng vận chuyển gene

- + Có khả năng sinh sản cực nhanh và có hoạt tính mạnh

- Bacteriophage (phage hay thực khuẩn thể)

Là virus của vi khuẩn, thể hiện tính độc đối với vi khuẩn qua chu trình sinh sản gây độc của phage. Có khả năng xâm nhập vào tế bào vi khuẩn, đình chỉ quá trình trao

đổi chất của vi khuẩn và lấy nguyên liệu từ vi khuẩn để xây dựng nên các thành phần của nó kể cả nguyên liệu di truyền.

Ưu điểm của phage khi sử dụng làm vector chuyển gene:

- + Kích thước vô cùng nhỏ.
- + Có khả năng xâm nhập vào tế bào vi khuẩn hiệu quả hơn plasmid
- + Có khả năng mang các đoạn DNA có kích thước lớn.

1.4.2. Quá trình thuần hóa gene và chuyển gene nhờ vi sinh vật

Thuần hóa gene là quá trình bắt gene phải làm việc theo ý muốn của con người. Quá trình này rất phức tạp, đòi hỏi có những hiểu biết sâu sắc về đặc tính của gen và kỹ thuật phân tử.

Trong kỹ thuật phân tử, thì vai trò của các enzyme là rất quan trọng, gồm các loại enzyme: nuclease, ligase, polymerase (DNA polymerase và RNA polymerase).

* Enzyme nuclease: Là các enzyme phân cắt DNA (RNA), chia thành 2 nhóm exonuclease và endonuclease.

Endonuclease là những enzyme cắt DNA ở giữa phân tử, còn exonuclease cắt từ hai đầu mút của phân tử DNA. Trong nhóm endonuclease có các enzyme giới hạn (RE – restriction enzyme), những enzyme này được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm vì nó có tính đặc hiệu cao, chỉ cắt DNA mạch kép ở những vị trí nhất định

Các RE nhận biết DNA mạch kép ở những trình tự điểm nhận và cắt DNA ở ngay điểm này hoặc điểm kế cận. Các điểm này thường có trình tự 4 – 6 cặp nucleotide đối xứng đảo ngược nhau, gọi là palindrom. Mỗi RE có trình tự nhận biết đặc trưng.

Do đặc tính cơ bản của các RE là có khả năng nhận biết và cắt ở một trình tự xác định trên phân tử DNA, mà người ta chia RE thành các loại sau:

+ Loại I: Khi enzyme nhận biết được trình tự, nó sẽ tự di chuyển trên phân tử DNA đến cách đó khoảng 1000 – 5000 nucleotide và cắt.

+ Loại II: Enzyme nhận biết được trình tự và cắt ngay đó.

+ Loại III: Enzyme nhận biết một trình tự và cắt DNA ở vị trí cách đó khoảng 20 nucleotide.

Trong 3 loại RE trên, thì loại II được quan tâm và sử dụng nhiều nhất trong lĩnh vực phân tử.

* Enzyme ligase: Là enzyme xúc tác hình thành các liên kết phosphodiester nối các nucleotide với nhau. DNA ligase xúc tác nối hai đoạn DNA, RNA ligase nối hai đoạn RNA.

Các loại enzyme ligase phổ biến:

+ *E.coli* DNA ligase: Được trích ly từ trực khuẩn *E.coli* và xúc tác phản ứng nối hai trình tự DNA có đầu so le.

+ T₄ DNA ligase: Có nguồn gốc từ phage T₄ xâm nhiễm *E.coli*, enzyme này có cùng chức năng như *E.coli* DNA ligase, nhưng đặc biệt là có khả năng nối hai trình tự DNA đầu bằng, nên được sử dụng nhiều.

+ T₄ RNA ligase: Cũng có nguồn gốc từ phage T₄ xâm nhiễm *E.coli*, xúc tác quá trình nối hai trình tự RNA.

* Enzyme polymerase: Là nhóm các enzyme xúc tác quá trình tái bản DNA, tổng hợp RNA trong quá trình phiên mã.

- DNA polymerase I (pol I): xúc tác sự tổng hợp một mạch đơn DNA mới, xúc tác cho sự gắn các nucleotide vào khoảng trống trên mạch polynucleotide của sợi DNA. Ngoài ra, enzyme này còn có chức năng như một exonuclease có khả năng phân giải các liên kết giữa các nucleotide ở đầu mạch theo cả chiều 5' đến 3' và 3' đến 5'.

- *Taq* polymerase: được tách chiết từ vi khuẩn *Thermus aquaticus*, là polymerase chịu nhiệt được sử dụng trong nhân bản DNA bằng kỹ thuật PCR.

- RNA polymerase: các enzyme này xúc tác sự phiên mã tổng hợp RNA từ mạch khuôn của phân tử DNA theo chiều từ 5' đến 3'.

* Các bước chuyển gene:

- Thu nhận gene cần chuyển: Có thể thu nhận gene trực tiếp từ bộ gene bằng cách ly tâm hoặc cắt bằng RE, hoặc tổng hợp hóa học theo trình tự nucleotide đã biết của gene.

- Tạo vector tái tổ hợp: Sau khi có các đoạn DNA thuần khiết, gắn nó vào các vector chuyển gen. Trước tiên cách cắt vector chuyển gene và gene cần chuyển cùng một loại RE tại những trình tự nhận biết của nó. Sau đó trộn lẫn chúng lại với nhau, các đầu dính sẽ bắt cặp với nhau. Kết hợp với enzyme ligase để hàn dính, thu nhận được vector tái tổ hợp.

- Chuyển vector vào tế bào nhận, nhân bản gene vừa tạo nên trong tế bào nhận, chọn ra dòng tế bào có chứa gene mong muốn. Bước tiếp theo của quá trình chuyển tải gene là chuyển các vector tái tổ hợp đã tạo thành trong điều kiện in vitro vào tế bào nhận thích hợp. Đối với vector là plasmid thì đây là quá trình biến nạp, được hỗ trợ bằng nhiều cách khác nhau. Đối với vector là phage, nó có khả năng tự động thực hiện tải nạp với hiệu suất cao hơn nhiều. Tùy đối tượng nhận gene và yêu cầu cụ thể mà lựa chọn các phương pháp khác nhau.

2. PHÂN LẬP VÀ CHỌN GIỐNG VI SINH VẬT

2.1. Các loại môi trường phân lập

- Môi trường tự nhiên: gồm các hợp chất tự nhiên chưa xác định rõ thành phần, ví dụ môi trường đơn giản thường dùng môi trường canh thang để nuôi cấy vi khuẩn có thành phần như sau: cao thịt 5g, pepton 10g, NaCl 5g và nước 1000ml.

- Môi trường tổng hợp: là môi trường đã biết thành phần hóa học. Ví dụ môi trường dùng để nuôi cấy *Disulfo desulfuricans* như sau: K₂HPO₄ 1g, NH₄Cl 1g, MgSO₄ 2g và nước cất 1000ml. Một ví dụ khác về môi trường xác định các loại Enterobacteria, môi trường này cho phép nghiên cứu enzyme urease và các tính chất indol từ tryptophan: urea 20g, L-tryptophan 3g, K₂HPO₄ 1g, KH₂PO₄ 1g, NaCl 5g, cồn 95% 10ml, phenol đỏ 25g, nước cất 1000ml.

Môi trường tổng hợp chỉ được sử dụng để nghiên cứu nhu cầu dinh dưỡng của một số vi sinh vật, dùng trong phân loại hoặc nghiên cứu môi trường tối thiểu trong nghiên cứu chọn lọc các thể dị dưỡng hoặc ảnh hưởng của các tác nhân sinh trưởng.

- Môi trường bán tổng hợp: trong môi trường này có một số hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên và một số chất hóa học đã biết thành phần hóa học. Đây là loại môi trường được sử dụng thường xuyên trong nghiên cứu vi sinh vật.

- Môi trường “tuyển chọn” là môi trường cho phép phát triển một loại vi sinh vật mà ta nghiên cứu, bằng cách ức chế sinh trưởng của các vi sinh vật khác. Loại môi trường này thường có các nhân tố ức chế như các loại muối, các chất kháng sinh,... hay các chất ở nồng độ cao sẽ ức chế các vi sinh vật khác,...

- Môi trường làm “giàu” vi sinh vật: là những môi trường (thường là môi trường lỏng) chứa các nhân tố làm giàu vi sinh vật cần nghiên cứu. Ví dụ môi trường Muller – Kaufman, môi trường này cho phép làm giàu vi khuẩn *Salmonella* và ức chế các vi khuẩn Gram dương, Gram âm khác.

2.2. Một số môi trường thường dùng

2.2.1. Môi trường phân lập vi khuẩn

Môi trường cao thịt peptone (g/l):		Môi trường cho <i>Lactobacillus</i> (g/l):	
Cao thịt	10	Nước ép cà chua	10
Peptone	10	Tryptone	10
NaCl	5	Cao nấm men	5
Agar	20	Nước cất	1000 ml
Nước	1000 ml		pH = 7,2

2.2.2. Môi trường phân lập nấm men và nấm mốc

Môi trường Hansen (g/l): (chủ yếu dùng cho nấm men)		Môi trường Sabouraud(g/l):	
Peptone	10	Peptone	10
Maltose	50	K ₂ HPO ₄	3
MgSO ₄ .7H ₂ O	2	Glucose hoặc maltose	40
K ₂ HPO ₄	3	Agar	20
Agar	20	Nước	1000 ml
Nước	1000 ml		

Môi trường Czapeck (g/l): (dùng cho nấm mốc)

NaNO ₃	3	KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	FeSO ₄	0,01
K ₂ HPO ₄	1	Saccharose	30
Agar	20	Nước	1000 ml
pH	5-6		

Môi trường Martin (g/l):

Peptone	5
Agar	20
Glucose	10
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Nước cất	1000 ml

Môi trường Martin cải tiến (g/l):

Peptone	15
Agar	20
KH ₂ PO ₄	4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Dung dịch Rose bengal	100 ml
Nước cất	1000 ml

Để ức chế sự phát triển của vi khuẩn chúng ta có thể cho vào môi trường các yếu tố chọn lọc như:

Rose bengal	10 ml
Streptomycine	30 mg/l
Penicillin	50 mg/l
Tetracycline	2 – 5 mg/l
Oxytetracycline	2 – 5 mg/l
Neomycin	50 mg/l
Polymyxin	50 mg/l

Khi phân lập nấm men muốn ức chế sự phát triển của nấm mốc người ta thêm vào môi trường sodium propionate 2,5 g/l.

2.2.3. Môi trường phân lập xạ khuẩn

Môi trường Gause - 1 (g/l):

Tinh bột	20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
NaCl	0,5
Agar	20
Nước cất	1000 ml
K ₂ HPO ₄	0,5
KNO ₃	1
FeSO ₄	0,1
pH	7,2 – 7,4

Môi trường tinh bột - đậm sulfate (g/l):

Tinh bột	10
MgSO ₄	1
NaCl	1
Agar	20
Nước cất	1000 ml
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
pH	7,2

2.2.4. Môi trường nuôi cấy tảo

* Môi trường nuôi cấy tảo *Chlorella* (môi trường KUN)

Thành phần cơ bản (g/200ml):

KNO ₃	20,22
NaH ₂ PO ₄	12,42
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,294
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,78
MgSO ₄	4,93
FeEDTA	0,139

Thành phần vi lượng (g/l):

H ₃ BO ₃	0,061
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,278
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,01235
MgCl ₂ .4H ₂ O	0,169
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,024

Cách pha chế như sau: Cân 0,005 g sodium acetate hòa tan trong 500ml nước cất. Hút 10 ml từ dung dịch có thành phần cơ bản, 1 ml dung dịch vi lượng. Đổ toàn bộ vào 500 ml dung dịch sodium acetate. Thêm nước cất cho đủ 1000 ml. Điều chỉnh pH 5,5 – 7,5.

*Môi trường nuôi cấy tảo *Spirulina*

Môi trường cơ bản (môi trường Zarrouk) (g/200ml):

K ₂ HPO ₄	0,1
NaNO ₃	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,04
FeSO ₄	0,0002
K ₂ SO ₄	0,2
NaCl	0,2

- Môi trường bổ sung 1 (g/l):

H ₃ BO ₃	2,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,04
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
MoC ₃	0,01

- Môi trường bổ sung 2 (g/l):

K ₂ Cr ₂ (SO ₄).24H ₂ O	960
--	-----

Cách pha chế môi trường như sau: Cân chính xác 16,8 gam NaHCO_3 hòa tan trong 500 ml nước cất. Hút 10 ml dung dịch cơ bản, cho 500 ml dung dịch NaHCO_3 vào. Hút 1 ml dung dịch bổ sung 1 và 1 ml dung dịch bổ sung 2, thêm nước cất cho đủ 1 lít.

2.3. Kỹ thuật phân lập giống vi sinh vật

2.3.1. Phân lập giống trong tự nhiên

Thiên nhiên là nguồn cung cấp giống vô tận cho công nghệ vi sinh vật. Các vi sinh vật sử dụng trong công nghiệp thực phẩm có thể dễ dàng phân lập chúng từ các loại thức ăn, nước uống sản xuất theo phương pháp cổ truyền: từ bánh men thuốc bắc, mứt tương, sữa chua ... Vi sinh vật sử dụng trong công nghệ sản xuất kháng sinh thường được phân lập trong đất, nước ở những vùng khác nhau.

Điểm đặc trưng của nguồn giống phân lập từ tự nhiên:

- Phân lập giống trong tự nhiên chúng ta có thể nhận được các chủng vi sinh vật giống như mong muốn.
- Giống vi sinh vật trong tự nhiên ít khi cho năng suất sinh học cao.
- Các vi sinh vật trong tự nhiên thường chưa thích nghi với sản xuất theo qui mô công nghiệp, do vậy phải qua một giai đoạn huấn luyện thích nghi, đáp ứng được yêu cầu đề ra.

Mục tiêu lớn nhất mà các nhà nghiên cứu phân lập giống trong tự nhiên là tìm ra những chủng đột biến tự nhiên có những tính trạng di truyền trội phù hợp với mục tiêu đề ra. Tuy nhiên đây mới là công việc đầu tiên là tạo giống ban đầu, sau đó thực hiện nghiên cứu các bước tiếp theo để nâng cao chất lượng giống.

Các bước tiến hành phân lập giống từ điều kiện tự nhiên như sau:

- Tìm vị trí để phân lập giống. Vị trí để phân lập giống phải là nơi hay mẫu có sự tập trung khá cao về mật độ giống vi sinh vật mà ta quan tâm.
- Chuẩn bị các ống nghiệm chứa các môi trường tập trung. Môi trường tập trung là môi trường chứa nhiều chất dinh dưỡng có khả năng thích hợp cho nhiều vi sinh vật cùng loài. Ở đó các vi sinh vật trong cùng một loài sẽ phát triển rất mạnh, các vi sinh vật của các loài khác sẽ không phát triển hoặc phát triển rất kém. Mục đích của việc sử dụng môi trường tập trung là loại dần những vi sinh vật mà ta không quan tâm.
- Sau đó lấy một gam mẫu hay một ml mẫu (nếu mẫu ở dạng lỏng) đem pha loãng.
- Pha loãng tới mức độ pha loãng nhất định mẫu cần phân lập và ta cấy chúng trong những ống nghiệm hoặc vào hộp petri có môi trường tập trung.

- Song song đó ta chuẩn bị môi trường đặc hiệu và sau khi các vi sinh vật đã phát triển mạnh trên các môi trường tập trung, ta chuyển chúng sang môi trường đặc hiệu. Môi trường đặc hiệu là môi trường chỉ cho phép các vi sinh vật mà ta quan tâm phát triển còn các vi sinh vật khác sẽ bị ức chế không phát triển được.

- Bước cuối cùng là kiểm tra những đặc điểm của vi sinh vật mà ta quan tâm. Mục đích là tuyển chọn từ những vi sinh vật cùng loài, những cá thể có đặc điểm đặc trưng mà ta mong muốn.

2.3.2. Phân lập giống trong điều kiện sản xuất

Khác với giống được phân lập trong điều kiện tự nhiên, các giống vi sinh vật phân lập trong điều kiện sản xuất có những ưu điểm riêng:

- Giống được phân lập trong điều kiện sản xuất có những giống đã qua quá trình sản xuất, đã có khả năng thích nghi với điều kiện sản xuất.

- Giống được phân lập trong quá trình sản xuất thường là những giống đã được qua biến đổi gen và có những đặc điểm sinh hoá cao hơn hẳn những chủng nguyên gốc. Do đó, việc phân lập chúng và tạo lập được giống từ đây sẽ có năng suất và chất lượng sản phẩm sinh học cao.

- Trong điều kiện sản xuất thường tồn tại khá tập trung những giống vi sinh vật mà ta quan tâm. Những giống này đang trong quá trình sản xuất và theo chất thải, nước thải ra ngoài. Do đó khả năng thu nhận kết quả khả quan hơn các mẫu vật phân lập từ nguồn khác.

Quá trình được tiến hành như sau:

* Chọn vị trí và mẫu vật phân lập: Trong quá trình sản xuất, giống vi sinh vật có thể bị thoái hóa, nhưng không phải tất cả, mà trong đó có những cá thể vẫn giữ được những đặc tính mong muốn.

Do đó nhiệm vụ là từ tập hợp vi sinh vật có trong quá trình sản xuất đó ta phân lập ra những giống còn giữ được những đặc điểm ban đầu. Địa điểm và mẫu vật đem phân lập ở điều kiện sản xuất bao gồm:

- + Dịch đang tiến hành lên men
- + Nước thải của nhà máy
- + Chất thải của nhà máy.

Trong đó dịch đang lên men cho xác suất thu nhận được kết quả cao hơn.

* Sau khi xác định được vị trí và vật phẩm dùng để phân lập, ta còn thực hiện các bước sau giống như các bước trong phân lập giống từ điều kiện tự nhiên.

2.3.3 Phân lập giống trong những ống giống đã thoái hóa

Các ống giống là tập hợp các tế bào vi sinh vật có cùng một nguồn gốc di truyền. Tuy nhiên, do điều kiện bảo quản bất thường mà ống giống thay đổi một số đặc điểm sinh hóa, do vậy mà khó ứng dụng trong sản xuất.

Việc ứng dụng các ống giống này vào trong sản xuất sẽ làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm. Tuy nhiên không phải tất cả các tế bào có trong ống giống đó bị thoái hóa mà vẫn còn rất nhiều cá thể vẫn bảo tồn được đặc tính ban đầu. Do vậy, chúng ta có thể phân lập giống từ các ống giống này. Thực chất của việc phân lập giống trong những ống giống đã thoái hóa là quá trình tuyển chọn lại giống từ các ống giống.

Công việc này hoàn toàn không phức tạp vì vị trí và vật phẩm phân lập rõ ràng. Công việc này là công việc thường xuyên ở nhiều phòng thí nghiệm và phòng kỹ thuật để duy trì được giống tốt cho sản xuất.

2.3.4. Thu nhận giống từ các trung tâm giữ giống

Ngày nay có nhiều trung tâm giữ giống vi sinh vật trên thế giới có thể cung cấp cho chúng ta các giống phục vụ cho công tác nghiên cứu, giảng dạy, sản xuất. Một số trung tâm giữ giống như:

- Mỹ: ABBOTT, ATCC, NRRL
- Canada: CANAD- 212
- Nhật: FERM, HIR
- Úc: CC
- Trung Quốc: IMASP
- Việt Nam: VTCC

2.4. Cải biến di truyền chủng giống sử dụng trong công nghệ lên men

Quá trình trao đổi chất của cơ thể vi sinh vật được kiểm soát bởi chính hệ gen của cơ thể đó. Thực tế đã chứng minh, dù thiết kế và chế tạo nòi lên men có cải tiến và điều kiện nuôi cấy tối ưu có thể nâng cao số lượng sản phẩm của vi sinh vật, nhưng cũng bị giới hạn; chỉ có cải biến di truyền, tạo các chủng vi sinh vật mới là nền tảng thành công của công nghệ lên men. Đột biến và tái tổ hợp di truyền là hai cách đạt đến mục tiêu cuối cùng này.

2.4.1. Tạo khả năng thích nghi của giống vi sinh vật với điều kiện sản xuất công nghiệp

Giống tạo ra trong quá trình phân lập ở trên có những đặc tính tốt theo mong muốn. Tuy nhiên chất lượng giống vi sinh vật là một trong những tiêu chí luôn luôn phải được hoàn thiện. Mặt khác, các chủng giống được phân lập từ tự nhiên thường không thích nghi ngay với điều kiện sản xuất công nghiệp, do đó việc tạo khả năng thích nghi và nâng cao chất lượng giống là điều bắt buộc trong sản xuất công nghệ vi sinh vật.

*** Nguyên tắc:**

- Do cơ thể vi sinh vật là cơ thể đơn bào do vậy mà khả năng thích nghi của vi sinh vật với điều kiện môi trường xung quanh rất cao. Mặt khác, cơ thể vi sinh vật thực hiện những quá trình trao đổi chất, sinh sản, phát triển rất nhanh trong một chu kỳ sống rất ngắn. Do đó, giai đoạn thích nghi phải được xảy ra nhanh và mạnh trong một giai đoạn rất ngắn so với chu kỳ phát triển và sống của chúng.

- Khi đã tạo được khả năng thích nghi của giống vi sinh vật đối với một tác động môi trường nào đó phải luôn luôn duy trì tác động đó ở mức độ đã tạo ra tính thích nghi. Sự thích nghi này thực chất là thường biến, không di truyền. Do vậy, nếu phá bỏ tác động này hoặc làm thay đổi mức độ tác động này sẽ phá bỏ tính thích nghi.

*** Các bước tiến hành tạo giống thích nghi được thực hiện như sau:**

- Đầu tiên lập bảng mức độ tăng dần (ví dụ như nồng độ chất khô), hay giảm dần (như pH) của yếu tố tác động.

- Nuôi giống trong những điều kiện tăng dần hoặc giảm dần theo thang bậc tăng dần hay giảm dần. Qua mỗi bậc tăng dần hay giảm dần của yếu tố thích nghi, những cá thể nào không thích nghi được mức độ tăng dần hay giảm dần đó sẽ chết. Những cá thể nào thích ứng được với thang bậc tăng dần hay giảm dần sẽ tồn tại. Ta cứ làm như

vậy và cuối cùng thế nào ta cũng thu được những cá thể mong muốn. Nhiều cơ sở sản xuất và cơ quan nghiên cứu bằng cách này đã tạo được nhiều giống có chất lượng tốt.

- Sau cùng, duy trì giữ giống trong điều kiện đã tạo được tính thích nghi đó. Nếu thay đổi điều kiện và mức độ của yếu tố thích nghi, tính thích nghi sẽ hoàn toàn biến mất và giống lại trở lại đặc tính ban đầu.

Một trong những yêu cầu quan trọng của người làm công việc nâng cao chất lượng giống bằng phương pháp huấn luyện thích nghi là phải có tính kiên trì. Kiên trì trong huấn luyện thích nghi và kiên trì cả trong quá trình bảo quản để duy trì đặc tính thích nghi đó.

2.4.2. Đột biến

Sự thay đổi hệ gen bằng đột biến tự nhiên là rất thấp. Việc gây đột biến chủng vi sinh vật bằng tia UV, bức xạ ion hay hợp chất hóa học nào đó sẽ làm tăng đột biến. Đây cũng là nhiệm vụ to lớn của các nhà di truyền công nghiệp để sàng lọc số lượng lớn các thể đột biến ngẫu nhiên và lựa chọn được các thể đột biến có giá trị mong muốn.

Quá trình tổng hợp hàng loạt các sản phẩm của quá trình trao đổi chất tế bào được kiểm soát bằng “ức chế ngược”. Khi một hợp chất đạt đến mức độ tích tụ cụ thể nào đó, quá trình tổng hợp chúng sẽ dừng lại. Quá trình tổng hợp lại bắt đầu trở lại khi mức độ của chất đó giảm xuống dưới mức đặc hiệu. Nếu một thể đột biến không tạo được tín hiệu ức chế bổ sung ngược thì sản phẩm tiếp tục được tổng hợp thừa hay siêu tổng hợp. Bằng kỹ thuật như vậy, người ta đã tạo được chủng *Corynebacterium glutamicum* sản xuất lysine với hiệu suất rất cao. Như vậy, các chủng không sản sinh và kiểm soát được sản phẩm cuối cùng đó được gọi là chủng dị dưỡng.

2.4.3. Tái tổ hợp di truyền

Tái tổ hợp di truyền được định nghĩa là các quá trình kết hợp gen từ các nguồn khác nhau. Một chủng *Brevibacterium flavum* là chủng sản xuất lysine cao nhưng lại bị giới hạn là khả năng hấp thụ glucose kém. Một chủng vi khuẩn khác có khả năng đồng hóa glucose tốt nhưng không sản sinh được lysine. Sự kết hợp hai chủng này với nhau bằng phương pháp dung hợp tế bào trần tạo thành chủng tái tổ hợp vừa có khả năng sử dụng glucose vừa có hiệu suất sinh tổng hợp lysine cao.

Chủng vi sinh vật tái tổ hợp là các chủng vi sinh vật đã được biến đổi gen theo mục đích của con người. Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, có thể gắn thêm một hoặc một số gen từ các loài sinh vật khác (vi sinh vật, thực vật, động vật) tạo nên các chủng vi sinh vật tái tổ hợp. Các chủng này thường được loại bỏ một số gen độc, gen có hại, được tạo dòng thuần có độ ổn định cao và lâu dài.

Tùy theo mục đích của con người có thể tạo nên các chủng vi sinh vật tái tổ hợp là vi khuẩn, vi nấm hoặc virus. Các chủng vi sinh vật tái tổ hợp được ứng dụng rộng rãi trong thực tiễn ở nhiều lĩnh vực khác nhau:

- Ứng dụng trong công nghiệp: sản xuất enzyme (protease, amylase...); sản xuất acid hữu cơ (acetic acid, lactic acid...): sản xuất cồn và nhiên liệu sinh học,...

- Ứng dụng trong y học bảo vệ sức khỏe con người: nhiều chủng vi sinh vật tái tổ hợp được sử dụng để sản xuất các protein được liệu sử dụng trong điều trị bệnh cho con người như insulin, hormone kích thích sinh trưởng, interferon, interleukin.... Một số chủng virus tái tổ hợp được sử dụng trong sản xuất vaccine, hoặc làm vector liệu pháp gen trong điều trị bệnh cho con người.

- Ứng dụng trong kỹ thuật chuyển gen tạo giống cây trồng vật nuôi mới. Ví dụ chủng *Agrobacterium tumefaciens* được sử dụng để chuyển các gen khác nhau vào nhiều loại cây trồng như thuốc lá, cà chua, ngô, lúa... có hiệu quả cao.

- Ứng dụng, trong xử lý môi trường: nhiều chủng vi khuẩn tái tổ hợp có hoạt tính enzyme phân giải hữu cơ mạnh, được sử dụng tạo chế phẩm xử lý phế thải rắn, nước thải, nước ao hồ thủy sản có hiệu quả góp phần làm giảm thiểu ô nhiễm môi trường, đồng thời tăng giá trị sản xuất nông nghiệp.

3. BẢO QUẢN GIỐNG VI SINH VẬT

Bảo quản chủng giống lâu dài và giữ được hoạt tính cao có ý nghĩa quan trọng không những trong nghiên cứu vi sinh vật mà còn có ý nghĩa hết sức quan trọng trong quá trình sản xuất các chất có hoạt tính sinh học ở mức độ công nghiệp cũng như trong phòng thí nghiệm. Hoạt tính sinh học của các chủng thường không phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy mà phụ thuộc nhiều vào quá trình bảo quản. Trong quần thể, các khuẩn lạc của chủng giống khi phát triển nhiều khuẩn lạc không có hoạt tính. Sau khi phân lập, thuần khiết hay lựa chọn các chủng giống có hoạt tính mong muốn, người ta thường sử dụng các phương pháp bảo quản lâu dài các chủng này.

Có nhiều phương pháp bảo quản giống vi sinh vật, tùy theo trang thiết bị và loại vi sinh vật cần giữ chúng ta có thể sử dụng các phương pháp khác nhau. Trong công nghệ vi sinh vật thường sử dụng những phương pháp sau đây để bảo quản giống vi sinh vật:

3.1. Phương pháp cấy chuyển định kỳ và bảo quản lạnh trên môi trường thạch nghiêng

Nguyên tắc của phương pháp này là dựa trên sự trao đổi chất theo một khoảng thời gian nhất định.

Hầu hết các cơ sở sản xuất và rất nhiều cơ sở nghiên cứu áp dụng phương pháp này trong giữ giống vi sinh vật. Phương pháp này rất đơn giản và tiện lợi, tuy nhiên thời gian giữ giống chỉ nên kéo dài trong một tháng, sau đó phải cấy chuyển lại trên môi trường mới. Do phải cấy chuyển nhiều lần nên tốn nhiều công sức và giống cũng dễ bị mất các tính di truyền ban đầu.

Phương pháp tiến hành như sau: Thuần khiết lại chủng vi sinh vật trên môi trường agar ở đĩa petri, chọn các khuẩn lạc điển hình và cấy lên môi trường thạch nghiêng thích hợp, sau đó nuôi trong tủ ấm để vi sinh vật phát triển bình thường, lấy các ống giống ra và cho vào tủ lạnh giữ ở 4°C, hàng tháng cấy chuyển lại vào môi trường mới. Để khắc phục hiện tượng bị mất nước, môi trường giữ giống bị khô làm chết vi sinh vật người ta có thể cho thêm vào môi trường 1% dầu thực vật như dầu lạc, dầu dừa... khi làm môi trường.

3.2. Phương pháp bảo quản giống dưới lớp dầu khoáng

Nguyên tắc của phương pháp này là cách ly vi sinh vật khỏi lớp không khí để hạn chế tối đa quá trình hô hấp của vi sinh vật.

Cách tiến hành như sau: Cho môi trường agar thích hợp của từng loại vi sinh vật vào 1/3 ống nghiệm, thanh trùng ở 121°C trong 20 – 30 phút, lấy ra để nghiêng thạch một góc 45°, chờ thạch đông, cấy giống vi sinh vật và nuôi trong tủ ấm để vi sinh vật phát triển tốt. Chuẩn bị paraffin lỏng chuẩn bị bằng cách cho vào ống nghiệm sạch, thanh trùng ở 121°C trong 30 phút, lấy ra để nguội. Khi vi sinh vật trong các ống nghiệm phát triển tốt (2 ngày – 1 tuần) bằng các thao tác vô trùng ta đổ paraffin lỏng một lớp dày 2cm vào từng ống giống, dùng paraffin đặc đun chảy đổ lên nút bông.

Giống được chuẩn bị như vậy đem bảo quản trong phòng ở nhiệt độ thường hoặc trong tủ lạnh.

Ưu điểm của phương pháp này là đơn giản không cần có trang thiết bị gì đặc biệt nên phòng thí nghiệm nào cũng có thể làm được, thời gian bảo quản có thể kéo dài đến 12 tháng, đỡ tốn nhân công cấy chuyển và ít có nguy cơ giống bị thoái hoá hoặc nhiễm tạp.

3.3. Phương pháp bảo quản giống trong cát

Nguyên tắc của phương pháp này là làm giảm độ ẩm của đất hoặc cát sau khi vô trùng. Độ ẩm thấp làm giảm khả năng hô hấp của vi sinh vật và như vậy sẽ bảo tồn được tính trạng mong muốn.

Phương pháp này thường dùng để giữ giống các vi sinh vật có bào tử. Cách làm như sau:

- Chuẩn bị cát: Cát sông đem rửa sạch bằng nước nhiều lần, sấy khô, sàng qua rây để bỏ các hạt lớn, ngâm trong HCl đậm đặc sau đó đem đun sôi 1 – 2 giờ, rửa nhiều lần cho đến khi cát trung tính (dùng phenolphthalein làm chỉ thị màu), có thể trung hòa bằng NaOH hoặc NaHCO_3 nếu thấy còn acid, sấy khô ở 120°C trong 3 – 4 giờ, chia cát khô vào các ống nghiệm và thanh trùng trong tủ sấy ở $160 - 170^\circ\text{C}$ trong 2 – 3 giờ, hoặc thanh trùng trong autoclave ở 130°C trong 90 phút. Trước khi sử dụng phải kiểm tra độ vô trùng bằng cách cho môi trường nước thịt - peptone vào cát đã vô trùng và để vào tủ ẩm $28 - 30^\circ\text{C}$ trong khoảng 48 giờ đến 1 tuần. Quan sát hàng ngày, nếu môi trường vẫn trong nghĩa là cát đã vô trùng, còn nếu môi trường bị đục thì phải đem cát thanh trùng lại.

- Chuẩn bị bào tử: Các chủng vi sinh vật đem nuôi trên môi trường agar thích hợp để chúng tạo nhiều bào tử, thời gian thường đối với một số loài như sau: vi khuẩn 5 – 7 ngày trong $26 - 28^\circ\text{C}$, nấm mốc 8 – 10 ngày trong $24 - 26^\circ\text{C}$, xạ khuẩn 14 ngày trong $26 - 28^\circ\text{C}$.

- Trộn bào tử vào cát: Bằng thao tác vô trùng cho 1 – 2 gram cát đã vô trùng vào các ống giống vi sinh vật đã hình thành bào tử, dùng que cấy vô trùng trộn đều bào tử với cát, tránh làm cát bị ướt quá vón cục, cho cát đã có bào tử vào ống nghiệm vô trùng, đậy nút bông và cho vào tủ sấy thường giữ dưới 40°C hoặc tủ sấy chân không có các chất hút ẩm như CaCl_2 hoặc silicagen trong khoảng 2 – 3 ngày cho đến khi thấy cát thật khô, dùng paraffin đặc đun nóng chảy phết lên nút bông để tránh trường hợp hút ẩm trở lại, bảo quản trong phòng mát, hoặc trong tủ lạnh 4°C , thời gian bảo quản từ 1 đến nhiều năm, giống trước khi dùng cấy ria lên môi trường agar và chọn khuẩn lạc điển hình.

3.4. Phương pháp bảo quản giống trong đất

Phương pháp bảo quản này thích hợp đối với nấm mốc và xạ khuẩn.

Cách làm: Đất vườn đem nghiền nhỏ, rây lấy những hạt nhỏ bằng nhau cỡ 1 mm, thêm 1 – 2% CaCO_3 để trung hoà các loại đất chua, hoặc thêm 2% cát, hoặc 2% than hoạt tính để làm cho đất được tơi xốp. Cho vào các ống nghiệm vô trùng 1 – 2 gram đất, đậy nút bông và thanh trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 1 giờ, thanh trùng 2 lần liên tiếp mỗi lần cách nhau 24 giờ. Đất đã thanh trùng đem kiểm tra để biết chắc không còn vi sinh vật lạ, sau đó trộn với bào tử vi sinh vật và sấy khô, bảo quản như phương pháp bảo quản trong cát. Thời gian bảo quản có thể 10 năm, một số chủng vi khuẩn kỵ khí sinh butanol có thể bảo quản sau 21 năm.

3.5. Phương pháp bảo quản giống trên hạt

Phương pháp bảo quản này thích hợp đối với nấm mốc và xạ khuẩn.

Cách làm: Chọn hạt tốt (lúa, ngô, kê...), loại bỏ các tạp chất, rửa sạch cho vào nước sôi theo tỷ lệ 30ml nước sôi cho 100 gram hạt, khuấy đều, ngâm tiếp 30 phút, lọc bỏ nước, rải hạt lên khay sạch để ráo nước, cho vào bình tam giác khoảng 15 – 16 gram/bình dung tích 250ml, đậy nút bông, thanh trùng ở 121⁰C trong 40 phút, thanh trùng 3 lần như vậy mỗi lần cách nhau 24 giờ, bào tử hoặc thể dinh dưỡng của vi sinh vật đem hoà vào nước vô trùng, dùng pipette vô trùng cấy vào mỗi bình 3ml, lắc đều, nuôi ở nhiệt độ thích hợp cho từng chủng trong thời gian 8 – 10 ngày, hàng ngày lắc nhẹ để phá vỡ các khối hạt kết lại, làm khô trong tủ hút chân không cho đến khi độ ẩm còn 8%. Kiểm tra độ thuần khiết và khả năng sống của giống trước khi tráng paraffin lên nút bông và bảo quản trong phòng mát. Giống trên hạt kê có thể dùng dần làm nhiều lần.

3.6. Phương pháp lạnh đông

Phương pháp này dựa trên cơ sở sự phát triển của vi sinh vật bị ức chế ở nhiệt độ lạnh sâu, đây là phương pháp đang được sử dụng khá rộng rãi để giữ giống vi sinh vật. Ưu điểm của phương pháp này là đơn giản, thời gian giữ được lâu.

Cách làm: Để bảo vệ vi sinh vật không bị chết ở nhiệt độ lạnh sâu do các tinh thể nước gây ra người ta phải trộn vi sinh vật vào một trong các chất bảo vệ sau:

- Glycerine 15%.
- Huyết thanh ngựa (loại không cho chất bảo quản).
- Dung dịch saccharose 10% + gelatin 1%, pH = 6,8 – 7.
- Dung dịch glucose hoặc lactose 10%.

Sau khi đã trộn đều vi sinh vật với chất bảo vệ, ta cho vào các ống nghiệm, đậy nút lại và cho vào làm lạnh từ từ, khi nhiệt độ đạt -20⁰C – -25⁰C thì phải giữ tốc độ làm lạnh chậm 1 – 2⁰C/phút.

Thời gian cấy chuyển như sau:

- + Nếu giữ ở nhiệt độ -15⁰C – -20⁰C thì 6 tháng cấy chuyển và làm lại một lần.
- + Nếu giữ ở nhiệt độ -30⁰C thì 9 tháng cấy chuyển và làm lại một lần.
- + Nếu giữ ở nhiệt độ -40⁰C thì 1 năm cấy chuyển và làm lại một lần.
- + Nếu giữ ở nhiệt độ -50⁰C – -60⁰C thì 3 năm cấy chuyển và làm lại một lần.
- + Nếu giữ ở nhiệt độ -70⁰C thì 10 năm cấy chuyển và làm lại một lần.

3.7. Phương pháp đông khô

Có hai phương pháp đông khô chủng giống: đông khô vi sinh vật và phương pháp đông khô dịch thể trực tiếp.

- Phương pháp đông khô vi sinh vật: đông khô là quá trình mà nước được lấy ra khỏi mẫu khi các mẫu đang ở trạng thái lạnh sâu. Ở đây, vi sinh vật được huyền phù trong môi trường thích hợp và được làm lạnh trong môi trường chân không. Thiết bị đông khô sẽ hút nước và cuối cùng mẫu được làm khô đến mức nhất định. Mẫu được hàn kín để cho môi trường chứa mẫu là chân không. Đây là phương pháp phổ biến và hiệu quả cao cho bảo quản các đối tượng vi sinh vật khác nhau như nấm sợi, nấm men, vi khuẩn và một số virus. Tuy nhiên phương pháp này ít được ứng dụng đối với tảo, động vật nguyên sinh và tế bào động vật.

- Phương pháp đông khô dịch thể trực tiếp (L-drying): khác với phương pháp trên là dịch huyền phù vi sinh vật được làm khô nhanh ở chế độ chân không thích hợp mà mẫu không cần làm lạnh trước. Phương pháp này đặc biệt có ý nghĩa đối với nhóm vi khuẩn không có khả năng sống sót trong nhiệt độ thấp của giai đoạn tiền đông. Các thông số cần quan tâm khi thực hiện phương pháp này là tuổi của vi sinh vật bảo quản, tốc độ đông khô, nhiệt độ đông khô thấp nhất, khoảng thời gian làm khô mẫu và độ ẩm cuối cùng của mẫu.

Cả hai phương pháp có nhiều ưu điểm so với các phương pháp khác là thời gian bảo quản lâu từ 10 đến 20 năm; không thay đổi đặc tính sinh lý, sinh hóa cũng như khả năng sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học tốt nhất; tiết kiệm được công sức, giảm sai sót nhân mắc và tạp nhiễm. Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của phương pháp này là giá thành thiết bị cao.

3.8. Bảo quản lạnh sâu trong nitrogen lỏng

Phương pháp này giống như phương pháp bảo quản lạnh sâu. Đối với phương pháp bảo quản lạnh sâu thì vi sinh vật được bảo quản trong môi trường dịch thể và nước cần cho hoạt động sống của vi sinh vật bị bất hoạt ở nhiệt độ lạnh sâu (từ -196 đến -80°C)

Với phương pháp này, tế bào có thể bị phá vỡ trong quá trình làm lạnh và làm tan mẫu. Một nguyên nhân dẫn đến làm vỡ tế bào là việc tích lũy các chất điện giải trong mẫu bảo quản và hình thành các tinh thể nước trong tế bào. Để khắc phục nhược điểm này, người ta bổ sung các chất làm hạn chế tốc độ lạnh sâu và làm tan nhanh như glycerine, DMSO (dimethyl sulfoxid). Việc bảo quản theo phương pháp lạnh sâu này được thực hiện ở các thang nhiệt độ khác nhau.

Phương pháp này thích hợp cho việc bảo quản nhiều đối tượng khác nhau như vi khuẩn, vi nấm, virus, tảo, nguyên sinh động vật và cả dòng tế bào động vật. Tuy nhiên phương pháp bảo quản lạnh sâu trong nitrogen cũng đòi hỏi yêu cầu cao về thiết bị, điện, nitrogen lỏng và dễ cháy nổ. Phương pháp này không phù hợp với các chủng vi sinh vật bình thường, thường dùng với các chủng vi sinh vật có những đặc tính quý mà không thích hợp với phương pháp đông khô.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Trình bày yêu cầu của chủng giống vi sinh vật dùng trong sản xuất.
2. Trình bày các nguyên lý điều hòa trao đổi chất của vi sinh vật.
3. Hãy phân tích các kỹ thuật phân lập các chủng giống vi sinh vật.
4. Trình bày các phương pháp cải biến di truyền chủng giống sử dụng trong công nghệ lên men.
5. Hãy phân tích các yếu tố quan trọng trong kỹ thuật phân tử.
6. Trình bày các phương pháp bảo quản chủng giống vi sinh vật.
7. Hãy giải thích tại sao trong thiên nhiên vi sinh vật tăng lên không tương ứng với tốc độ sinh sản vô cùng nhanh chóng của nó.

Chương 3. DINH DƯỠNG VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP

1. QUÁ TRÌNH DINH DƯỠNG Ở TẾ BÀO VI SINH VẬT

Trong quá trình sống, tế bào vi sinh vật tiến hành trao đổi chất không ngừng với môi trường xung quanh. Tế bào vi sinh vật tuy nhỏ, nhưng vì hấp thụ các chất dinh dưỡng và thải các sản phẩm trao đổi chất qua toàn bộ bề mặt tế bào cho nên cường độ trao đổi chất của chúng là rất lớn. Các chất dinh dưỡng vào tế bào qua màng và được chuyển hóa để tạo thành những chất riêng biệt cần thiết cho quá trình xây dựng tế bào. Nhờ quá trình đồng hóa các tế bào mới có thể sinh trưởng, phát triển và không ngừng tăng sinh khối, đồng thời tạo ra các sản phẩm trao đổi chất.

Sự biến đổi các chất dinh dưỡng bao gồm nhiều phản ứng hóa sinh khác nhau nhờ hệ enzyme theo những con đường trao đổi chất đặc biệt để tạo ra những thành phần của tế bào; năng lượng sinh học cần thiết cho các hoạt động.

Qua quá trình trao đổi chất vi sinh vật tích lũy trong tế bào hoặc thải vào môi trường xung quanh những sản phẩm của quá trình lên men, hô hấp, sinh tổng hợp. Sự tích lũy này có nhiều ý nghĩa thực tế và đã được ứng dụng vào sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Lên men cổ điển với các sản phẩm như rượu, bia, butanol, propanol, acetone, glycerine, acid lactic... Lên men hiện đại với các sản phẩm sinh tổng hợp là các chất hoạt động sinh học, có cấu tạo hóa học phức tạp như các amino acid, vitamin, chất kháng sinh... Các sản phẩm này đã được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, y học, nông nghiệp...

Các chất dinh dưỡng của vi sinh vật chủ yếu lấy từ môi trường xung quanh. Các môi trường dinh dưỡng nhân tạo cần cung cấp đầy đủ năng lượng, các vật liệu xây dựng tế bào và đảm bảo cho hiệu suất sinh tổng hợp cao. Thành phần môi trường gồm có các nguồn thức ăn carbon, nitrogen, chất khoáng, các nguyên tố vi lượng và các chất kích thích sinh trưởng. Việc lựa chọn các nguồn dinh dưỡng và nồng độ của chúng trong môi trường phụ thuộc vào đặc tính sinh lý của từng chủng, từng loài vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy.

1.1. Dinh dưỡng carbon

Carbon có trong tế bào chất, thành tế bào, trong tất cả các phân tử enzyme, acid nucleic và các sản phẩm trao đổi chất. Do chiếm khoảng 50% trọng lượng chất khô của tế bào, vì vậy carbon có ý nghĩa trong sự sống của sinh vật.

Nguồn carbon được vi sinh vật sử dụng là rất lớn. Ngoài những dạng carbon vô cơ thuần khiết (kim cương, than chì) ra hầu như không có hợp chất carbon nào mà không được một nhóm vi sinh vật nhất định sử dụng.

Nguồn thức ăn carbon chủ yếu của vi sinh vật là carbonhydrate, đáp ứng được các yêu cầu của tế bào: sản sinh năng lượng; tạo thành những tiền chất; tạo ra các quá trình oxy hóa – khử để biến đổi tiền chất này thành những sản phẩm trung gian hoặc sản phẩm cuối cùng để xây dựng tế bào, đồng thời tích tụ trong môi trường một hoặc vài sản phẩm sinh tổng hợp.

Giá trị dinh dưỡng và khả năng hấp thụ của các nguồn carbon phụ thuộc vào:

- + Thành phần và cấu tạo hóa học của chúng, đặc biệt là mức độ oxy hóa của các nguyên tử carbon.

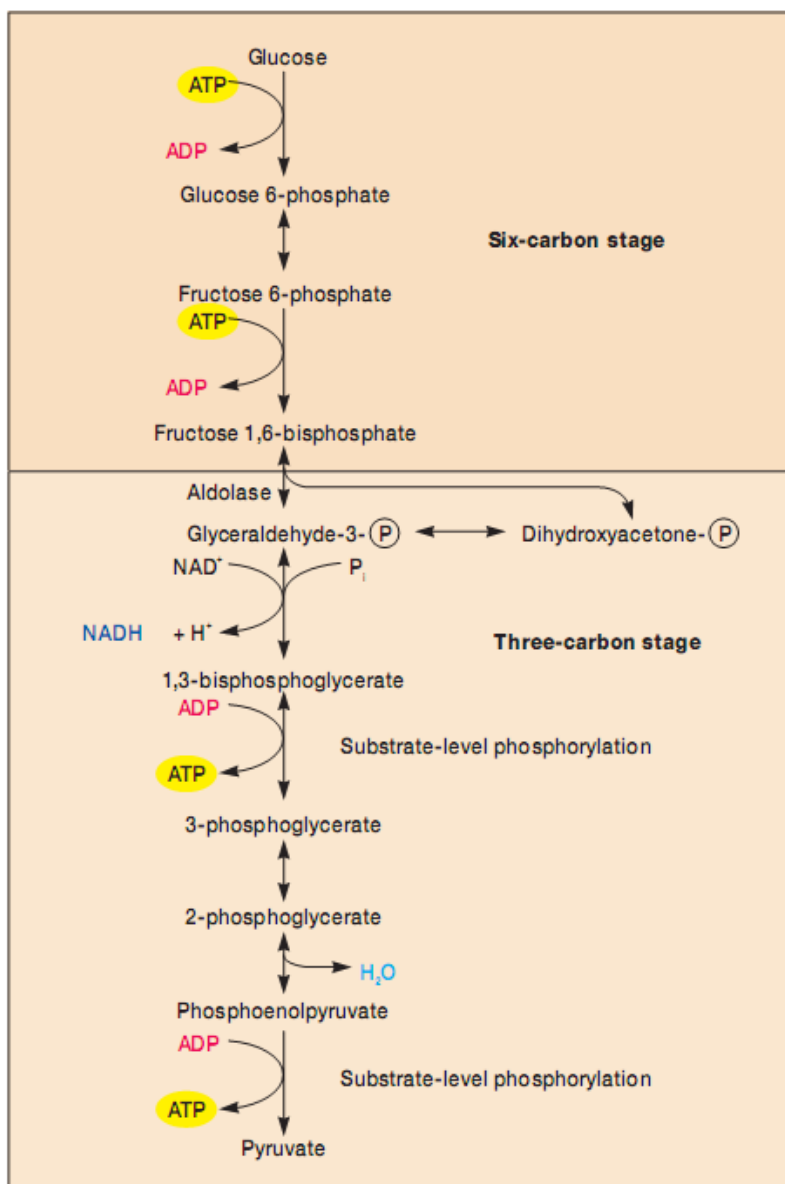
- + Đặc điểm sinh lý của các vi sinh vật

Các hợp chất cao phân tử (tinh bột, protein,...) sẽ được thủy phân nhờ các enzyme thành các hợp chất phân tử thấp mà vi sinh vật có thể đồng hóa được. Đối với các hợp chất không tan trong nước (cellulose, lipid, paraffin) vi sinh vật hấp phụ quanh bề mặt của chúng và phân giải chúng dần dần.

Trong số carbohydrate trước hết phải kể đến glucose là một nguồn carbon vạn năng đối với vi sinh vật. Quá trình biến đổi glucose trong tế bào vi sinh vật xảy ra theo 3 con đường: chu trình Embden – Meyerhof – Parnas (EMP); chu trình Pentose phosphate (PP) và chu trình Entner – Doudoroff (ED).

*** Con đường EMP**

Năm 1930, ba nhà khoa học người Đức là G. Embden, O. Meyerhof và Parnas đã tiến hành những phản ứng hóa học riêng rẽ trong hàng loạt các quá trình lên men và xây dựng được con đường phân glucose. Sau này người ta gọi là chu trình Embden – Meyerhof - Parnas (EMP) hay chu trình đường phân (glucolysis). Có thể chia con đường thành hai giai đoạn:



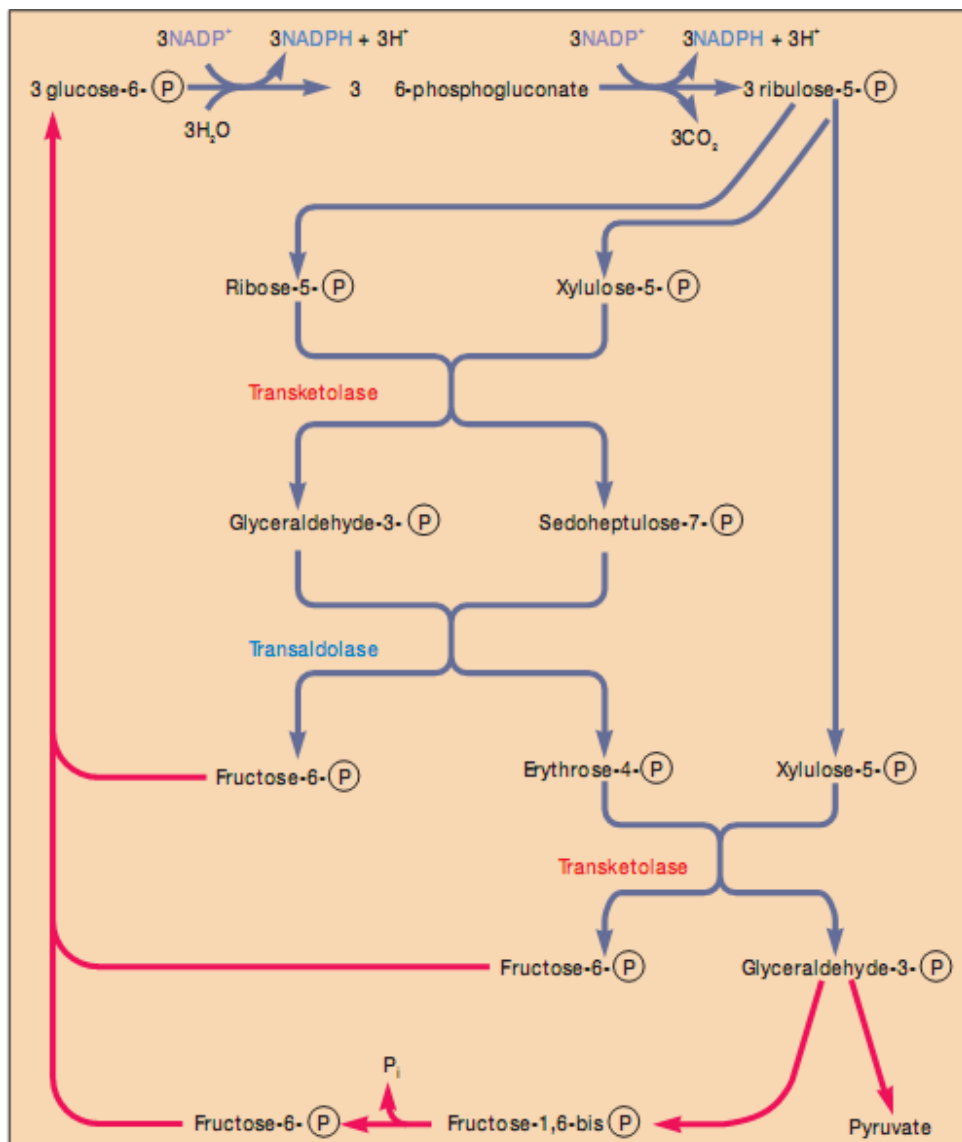
Hình 3.1. Sơ đồ chu trình EMP

+ Giai đoạn đầu: giai đoạn “đầu tư năng lượng” bao gồm 5 phản ứng đầu tiên. Ở giai đoạn này đường được hoạt hóa bởi ATP từ phản ứng phosphoryl hóa, để tạo fructose -1,6 diphosphate. Đường này sau đó được cắt thành hai phân tử triose phosphate.

+ Giai đoạn sau: là giai đoạn “phát sinh năng lượng” bao gồm 5 phản ứng tiếp theo. Ở giai đoạn này các triose – phosphate sẽ được hoạt hóa tiếp để tạo thành hai hợp chất chứa các liên kết phosphate cao năng là 1,3 - diphosphoglycerate và phosphoenolpyruvate. Hai chất này sẽ chuyển phosphate cao năng ADP để tạo thành ATP.

Từ glucose qua con đường EMP tạo thành 2 ATP, hiệu suất của con đường này khoảng 51%.

*Con đường Hexomonophosphate (HMP)



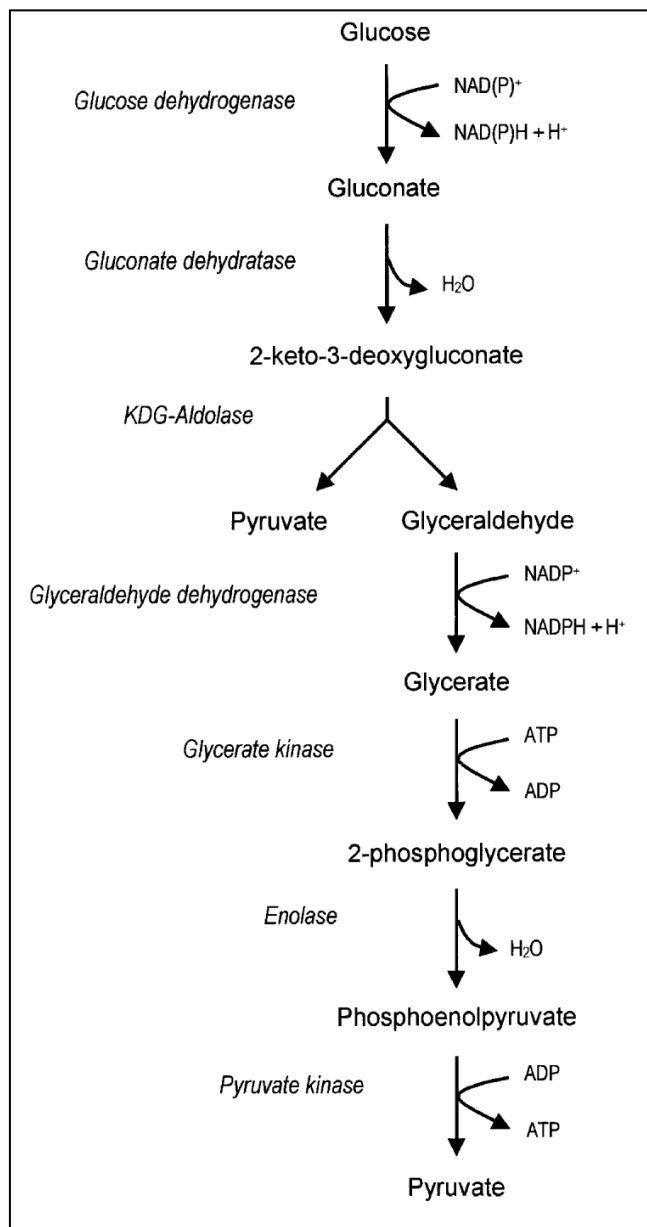
Hình 3.2. Sơ đồ chu trình Pentose phosphate

Được O. Warburg, F. Dickens, B.S. Horecker và E. Racker khám phá vào những năm 1940-1950, còn được gọi là con đường Pentose phosphate (PP). Đặc trưng của con đường này là tạo ra NADP-H (nicotineamide adenine dinucleotide phosphate), kết quả từ một phân tử glucose tạo thành 1 ATP, gồm hai giai đoạn chuyển hóa:

+ Giai đoạn oxy hóa: gồm 3 phản ứng, các phản ứng này đều là quá trình khử NADP^+ thành NADH. Phản ứng đầu tiên có sự tham gia của enzyme glucose – 6 – phosphate dehydrogenase. Khi đó glucose – 6 – phosphate (G6P) sẽ bị oxy hóa thành lacton, tiếp tục bị thủy phân nhờ enzyme lactonase đặc hiệu để tạo thành 6 phosphogluconate (6 –PG), 6-PG tiếp tục bị ôxy hóa tạo thành NADPH và pentose.

+ Giai đoạn không oxy hóa: ribulose-5-phosphate tiếp tục được chuyển hóa để tạo thành ribose 5 phosphate (Ri -5- P) nhờ enzyme phospho-pentose-isomerase.

*Con đường Entner – Doudoroff (ED):

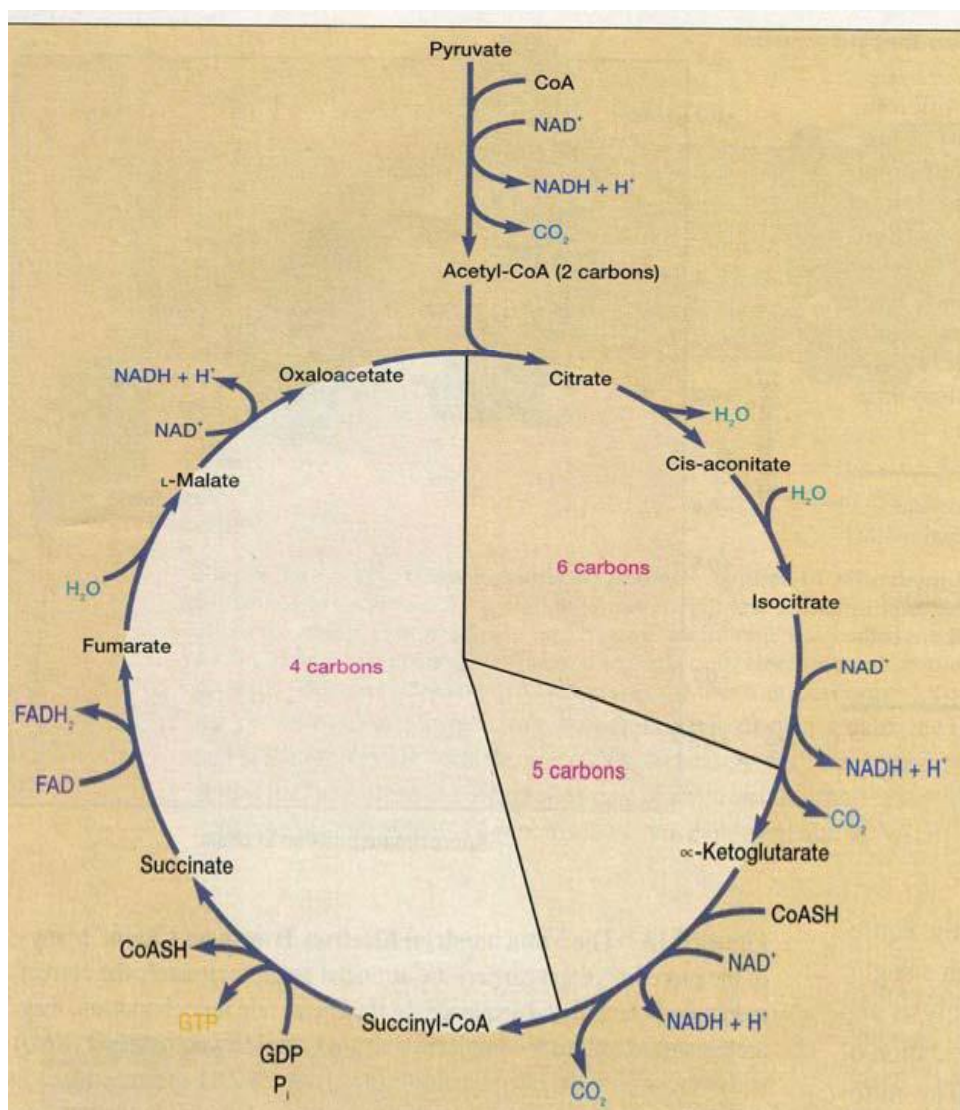


Hình 3.3. Sơ đồ chu trình ED

Là con đường phân giải hexose này được khám phá lần đầu tiên ở vi khuẩn *Pseudomonas saccharophila*. Sản phẩm đặc trưng cho quá trình này là 2 keto-3 deoxy-6 phosphogluconat, nên còn được gọi là con đường KDPG.

Con đường ED được một số ít vi sinh vật sử dụng, chủ yếu là chi *Pseudomonas*. Mỗi phân tử glucose qua con đường ED chỉ tạo ra được 1 ATP, vì vậy hiệu suất năng lượng của con đường này cũng vào khoảng 25%.

Như vậy, từ glucose qua các con đường EMP hoặc PP hoặc ED các vi sinh vật chỉ thu được rất ít năng lượng 1-2ATP, phần năng lượng chủ yếu vẫn còn tích lũy trong các NADH, NADPH, và nhất là trong pyruvate. Đặc biệt từ glucose đến pyruvate, mới chỉ có một mối liên kết carbon (C-C) được cắt ra.



Hình 3.4. Sơ đồ chu trình TCA

Trong quá trình oxy hóa hoàn toàn, pyruvic acid tạo được từ các con đường trên được các vi sinh vật hô hấp hiếu khí sử dụng triệt để thông qua chu trình tricarboxylic acid (TCA) hay còn gọi là chu trình Krebs.

Tùy thuộc vào hệ enzyme của vi sinh vật, nếu ở vi sinh vật hiếu khí bắt buộc thực hiện quá trình oxy hóa hoàn toàn thì hợp chất 3 carbon này sẽ được oxy hóa đến cùng để tạo ra CO_2 và H_2O thông qua chu trình TCA. Trong trường hợp oxy hóa không hoàn toàn, các vi sinh vật cũng tiến hành hô hấp hiếu khí nhưng sản phẩm tiết ra môi trường là những chất hữu cơ chỉ được oxy hóa một phần như các cetoacid, acetic acid, gluconic acid, fumaric acid, citric acid, lactic acid và hàng loạt các hợp chất hữu cơ khác. Các sản phẩm này giống với sản phẩm của một số quá trình lên men như lên men propionic, butyric, lactic... nên còn được gọi là “lên men oxy hóa”.

Một phần năng lượng có thể thu được từ sự phân giải glucose thành pyruvate qua các con đường nói trên nhưng phần lớn năng lượng lại được giải phóng khi pyruvate bị phân giải hiếu khí thành CO_2 trong chu trình TCA. Dựa vào số lượng C của các chất trung gian có thể chia chu trình TCA làm 3 giai đoạn:

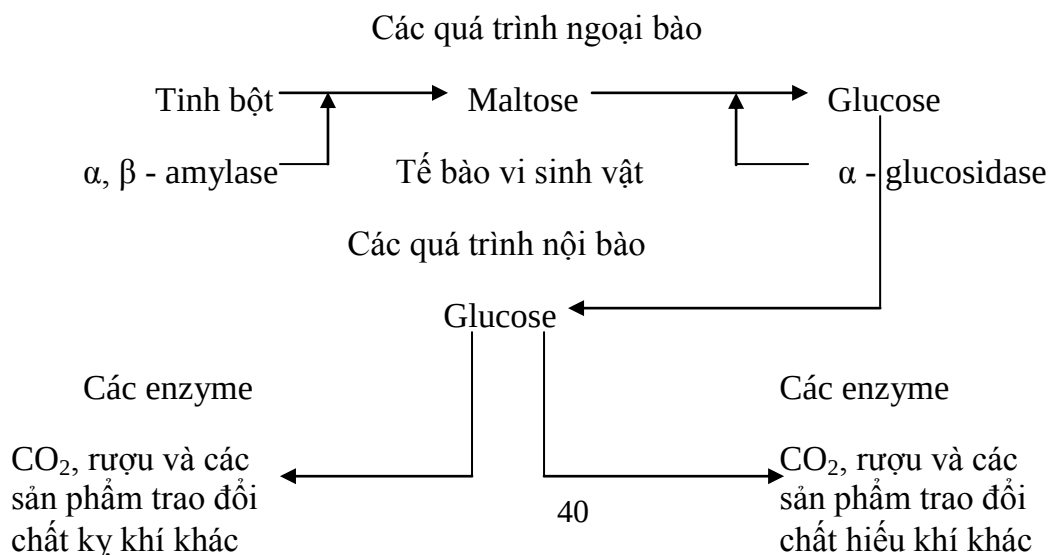
- Phức hợp đa enzyme pyruvate dehydrogenase thực hiện quá trình oxy hoá pyruvate thành CO_2 và acetyl – CoA, là một phân tử cao năng bao gồm coenzyme A và acetic acid nối với nhau qua liên kết cao năng thioester.

Acetyl – CoA xuất hiện từ sự phân giải của các chất khác nhau như carbohydrate, lipid và các amino acid có thể bị phân giải tiếp trong chu trình này. Cơ chất đối với chu trình TCA là acetyl-CoA.

- Sự kết hợp acetyl-CoA với oxaloacetate (chất trung gian 4C) thành citrat và mở đầu chặng 6C. Citrat (chứa 3 gốc COOH) được sắp xếp lại tạo thành isocitrat. Sau đó isocitrat bị oxy hóa và loại carboxyl hai lần tạo ra - ketoglutarat rồi succinyl-CoA. Ở giai đoạn này 2NADH được tạo thành và 2C bị tách khỏi chu trình như CO_2 .

- Giai đoạn 4C trong đó qua hai bước oxy hóa xuất hiện một FADH_2 và một NADH. Ngoài ra, GTP (một phân tử cao năng tương đương ATP) được tạo thành từ succinyl – CoA nhờ phosphoryl hóa ở mức độ cơ chất. Cuối cùng oxaloacetat được tái tạo và sẵn sàng kết hợp với một phân tử acetyl – CoA khác. Từ hình 3.4. nhận thấy chu trình TCA tạo ra 2 CO_2 , 3 NADH, 1 FADH_2 và 1GTP đối với mỗi phân tử acetyl-CoA bị oxy hoá.

Trong công nghiệp lên men nói chung, trừ trường hợp thu nhận sinh khối đơn thuần, người ta cố tạo điều kiện cho vi sinh vật có thể sử dụng nguồn dinh dưỡng cacbon để tổng hợp các sản phẩm cần thiết nhiều hơn so với việc tăng sinh khối và tạo thành CO_2 .



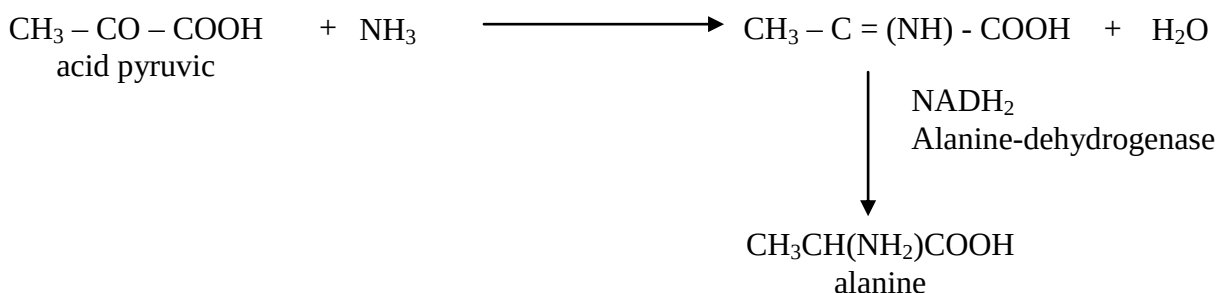
Hình 3.5. Sơ đồ đồng hóa tinh bột ở vi sinh

Cơ chất dinh dưỡng làm nguồn carbon trong quá trình trao đổi chất và trong lên men là các loại đường saccharose, maltose, lactose, glucose, các đường hexose khác và các loại ngũ cốc. Không phải tất cả các vi sinh vật đều có thể sử dụng được các nguồn carbon này, chỉ có các tế bào vi sinh vật hệ enzyme chuyển hóa chúng thành glucose mới có thể đồng hóa. Có một số loài có hệ enzyme chuyển hóa các paraffin của dầu mỏ, các dạng khí đốt như methane làm nguồn dinh dưỡng carbon.

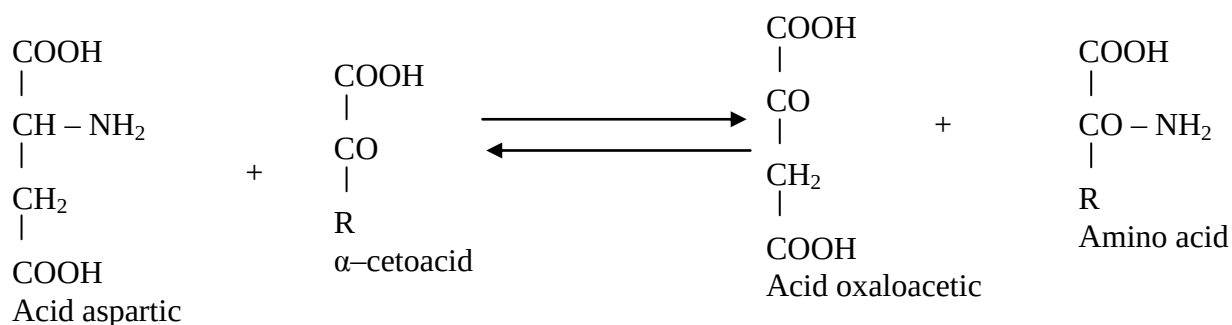
1.2. Dinh dưỡng nitrogen

Vi sinh vật cũng như tất cả các cơ thể sống khác cần nitrogen trong các quá trình sống để xây dựng tế bào. Tất cả các thành phần quan trọng của tế bào đều có chứa nitrogen (protein, acid nucleic, enzyme...). Tất cả các loại protein đều được cấu tạo từ các amino acid. Các amino acid có trong tế bào vi sinh vật ở dạng tự do là nguyên liệu để tổng hợp các phân tử protein. Các amino acid được tạo thành do quá trình trao đổi carbon và nitrogen. Việc tổng hợp các amino acid trải qua hàng loạt các phản ứng phức tạp với sự xúc tác của nhiều enzyme khác nhau, gồm hai loại phản ứng cơ bản có trong tế bào vi sinh vật là phản ứng amine hóa và phản ứng chuyển amine.

Phản ứng amine hóa gồm hai giai đoạn: giai đoạn thứ nhất là việc tạo thành iminoacid nhờ liên kết với NH_3 không có sự tham gia của enzyme, giai đoạn thứ hai là giai đoạn khử nhóm imine thành amine dưới tác dụng của dehydrogenase:



Một số amino acid được tạo thành nhờ phản ứng chuyển nhóm amine cho α - ketoacid:



Các amino acid tạo thành được hoạt hóa sẽ liên kết với RNA hòa tan rồi chuyển vào ribosome, ở đây xảy ra sự tổng hợp các mạch peptide và protein. Một số amino

acid được tổng hợp với lượng quá nhiều so với nhu cầu sinh lý của vi sinh vật sẽ được tiết vào môi trường nuôi cấy. Hiện tượng này gọi là hiện tượng “siêu tổng hợp” và được áp dụng vào công nghiệp lên men các amino acid.

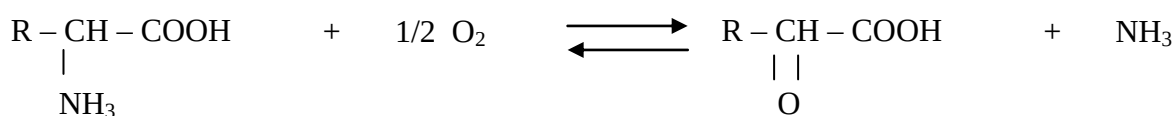
Nitrogen trong không khí rất phong phú, song nó cũng rất bền vững về mặt hóa học, khó bị khử hoặc bị oxy hóa, chỉ có một số vi sinh vật gọi là vi khuẩn cố định đạm mới có khả năng đồng hóa nitơ trong không khí.

Trong tất cả các môi trường nuôi cấy cần thiết phải có các loại hợp chất nitrogen mà vi sinh vật có thể đồng hóa được. Việc chọn nguồn nitrogen là rất cần thiết để đảm bảo được hiệu suất cao và có lợi về mặt kinh tế trong sản xuất vi sinh vật. Các nguồn nitrogen dùng trong công nghiệp lên men thường là các hợp chất nitrogen hữu cơ và vô cơ.

Các amino acid có thể được bổ sung vào môi trường dạng tinh khiết hoặc ở dạng hợp chất protein. Các amino acid ở đây không những là nguồn nitrogen mà còn là nguồn carbon.

Các amino acid có mặt trong môi trường thường không được vi sinh vật sử dụng trực tiếp ngay làm nguyên liệu xây dựng tế bào. Muốn sử dụng được các amino acid này vi sinh vật thường phải tiến hành hai loại phản ứng trao đổi chất: phản ứng khử amine và phản ứng khử carboxyl.

Phản ứng khử amine xảy ra trong điều kiện hiếu khí, NH_3 được tách ra khỏi phân tử amino acid và tạo thành cetoacid.

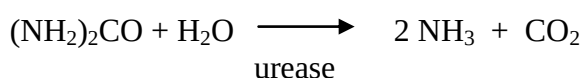


Ở đây có sự tham gia của enzyme deaminase. Vùng hoạt động của enzyme này ở khoảng pH 6,5 – 7,5. Hoạt lực khử amine tùy thuộc vào chủng vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy chúng. Như vậy chỉ có những loại vi sinh vật nào có khả năng khử amine mới có khả năng sử dụng amino acid. Trong quá trình nuôi cấy các vi sinh vật này đều xảy ra các phản ứng khử amine. Ở giai đoạn đầu NH_3 được tạo thành từ các amino acid có trong môi trường dinh dưỡng, ở giai đoạn cuối việc khử amine thực hiện ở những amino acid được tạo thành do hiện tượng tự phân của tế bào.

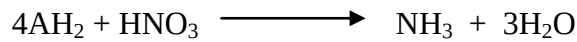
Khi pH môi trường chuyển về vùng acid sẽ xảy ra các phản ứng khử carboxyl các acid amin và tạo thành các amin: sản phẩm decarboxyl của một số acid amin có độc tố cao như lysine – cadaverin, octinin – putrexin. Ở tế bào xạ khuẩn và vi khuẩn thường thấy các phản ứng khử carboxyl của acid glutamic.

Các acid amin trong dạng hợp chất thường là các protein của đậu tương, khô lạc và pepton. Muốn đồng hóa được các hợp chất này vi sinh vật phải tiết vào môi trường hệ enzyme protease để thủy phân protein thành các amino acid. Rất nhiều loài nấm mốc, vi khuẩn, xạ khuẩn có hoạt tính protease cao: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *Bacillus*... Những amino acid, purine và pyrimidine là những nguồn nitrogen thích hợp hay được vi sinh vật sử dụng.

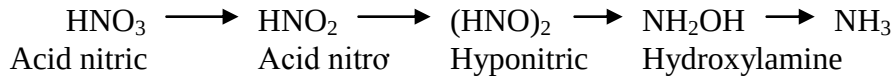
Urea được dùng trong công nghiệp sinh tổng hợp có hai tác dụng: làm nguồn N và làm chất điều chỉnh pH, dưới tác dụng của enzyme urease, urea phân hủy thành CO_2 và NH_3 .



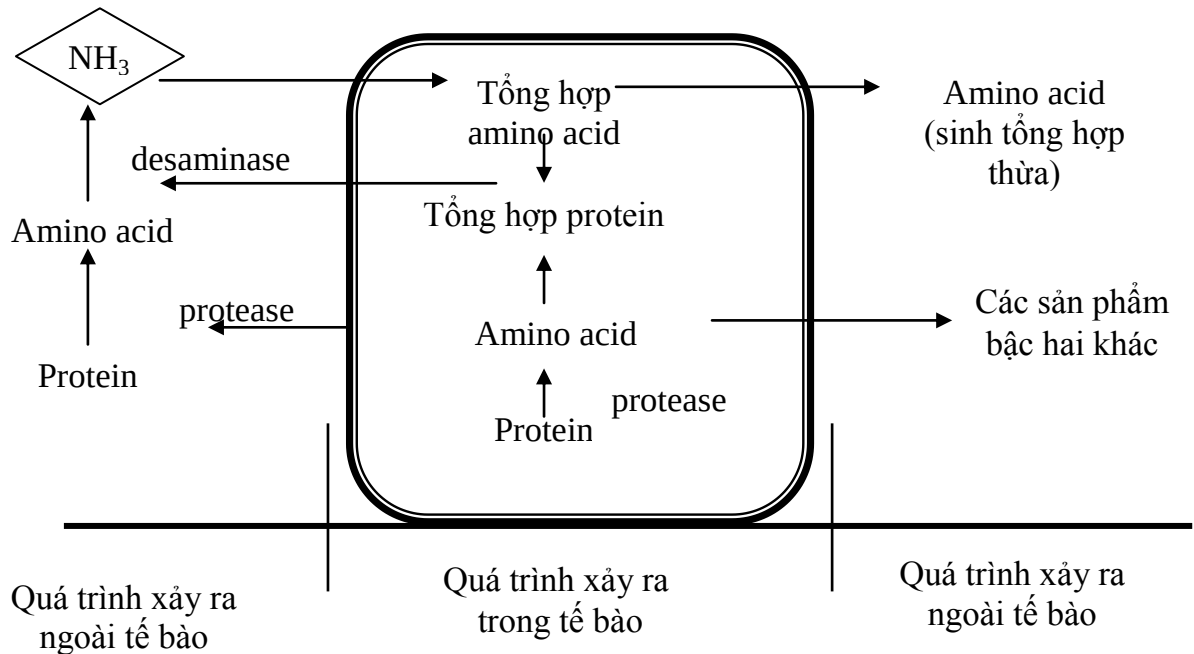
Vì sinh vật thường không trực tiếp đồng hóa được nitrate mà phải trải qua các quá trình biến đổi:



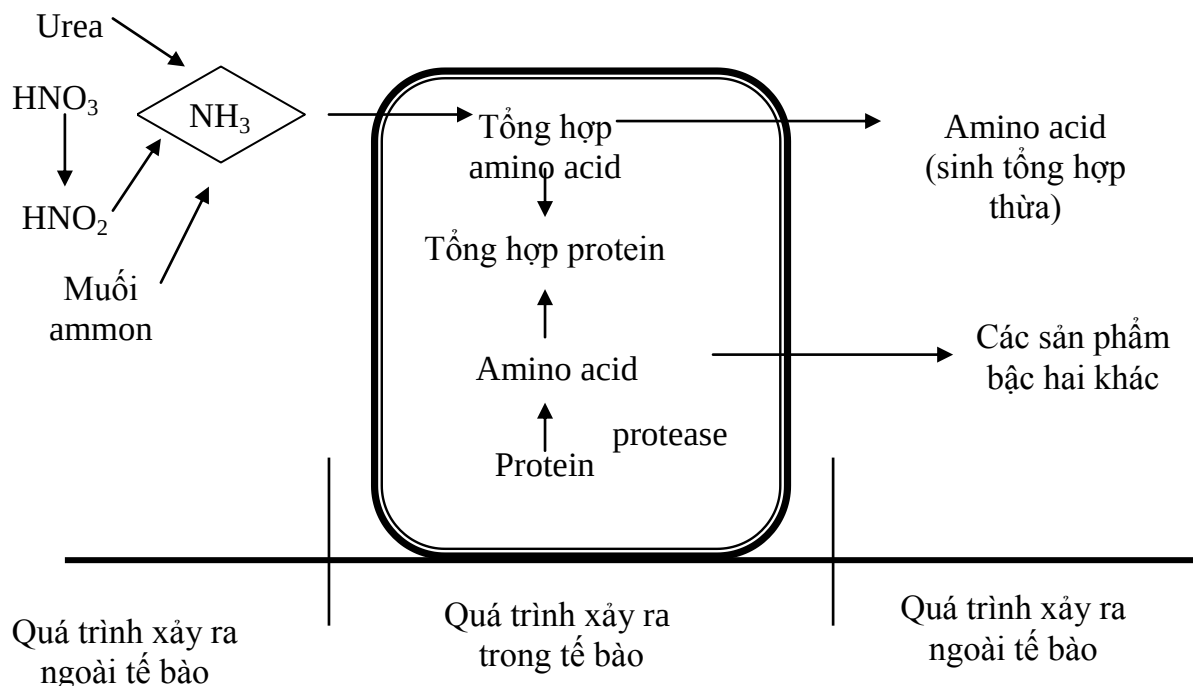
AH_2 là chất khử có trong môi trường.



Quá trình này được thực hiện nhờ hệ enzyme nitratreductase



Hình 3.5. Quá trình chuyển hóa nguồn nitrogen hữu cơ ở vi sinh vật



Hình 3.6. Quá trình chuyển hóa nguồn nitrogen vô cơ ở vi sinh vật

Tất cả các loài vi sinh vật đều đồng hóa được muối ammon. Việc sử dụng nguồn nitơ hữu cơ, ure và các muối ammon đều gắn liền với việc tách NH_3 ra rồi hấp thụ vào tế bào. Như vậy, NH_3 là trung tâm của các con đường dinh dưỡng nitrogen của vi sinh vật. Trong trường hợp dùng các muối ammon làm nguồn nitrogen thì vi sinh vật sử dụng các gốc acid ít hơn gốc ammon, vì vậy môi trường sẽ chuyển về phía acid. Để ổn định pH người ta thường bổ sung vào môi trường CaCO_3 để trung hòa các acid vô cơ và hữu cơ tạo thành trong quá trình lên men.

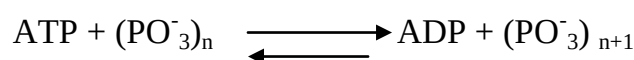
Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến khả năng sinh tổng hợp của vi sinh vật không những phụ thuộc vào chính bản thân nguồn nitrogen mà còn phụ thuộc vào cả tỷ số C:N trong môi trường. Tỷ số này có nhiều ý nghĩa, tạo cho vi sinh vật khả năng trao đổi chất thích hợp, khả năng tích tụ cao các sản phẩm sinh tổng hợp và tạo thành các hệ enzyme để tiến hành các phản ứng sinh hóa theo hướng có lợi.

1.3. Dinh dưỡng khoáng

1.3.1. Các hợp chất phosphorus (P)

Sự có mặt của các hợp chất P và nồng độ của chúng trong môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình trao đổi chất trong tế bào vi sinh vật. Thay đổi nồng độ các hợp chất P trong môi trường sẽ dẫn đến thay đổi các quá trình tổng hợp hàng loạt các hợp phần của tế bào có chứa P, tế bào chất và chất nhân. Ngoài ra, P có trong môi trường còn có tác dụng điều chỉnh hoạt tính hệ enzyme đồng hóa các nguồn thức ăn carbon.

Trong tế bào vi sinh vật thường gặp các hợp chất polyphosphate, là các hợp chất có mối liên kết giàu năng lượng – P – O – P chứa khoảng 10kcal/mol. Các polyphosphate chia làm hai nhóm: nhóm hòa tan trong acid và nhóm không hòa tan trong acid. Nhóm thứ nhất có trong tế bào vi sinh vật ở trạng thái tự do, không liên kết với bất kỳ một hợp chất hữu cơ nào khác. Trong phân tử nhóm này chứa từ 3 – 25 gốc phosphate. Nhóm thứ hai là các phức chất polyphosphate – nucleic hoặc là các phức chất với thành phần khác của tế bào như protein. Các polyphosphate chứa nhiều năng lượng và có thể so với ATP. Ở nhóm P của ATP được chuyển cho polyphosphate hoặc ngược lại:



Để tổng hợp được polyphosphate trong môi trường cần phải có nguồn P và nguồn năng lượng.

Chức năng của polyphosphate là tham gia vào sự vận chuyển glucose qua màng tế bào. Vai trò của polyphosphate trong trường hợp này là chuyển cho glucose gốc phosphate, sau đó glucose được biến đổi theo con đường phosphoryl. Trong giai đoạn nảy mầm của bào tử nấm mốc và khi bước vào pha tiềm phát của sự phát triển của vi khuẩn người ta nhận thấy có sự tổng hợp mạnh mẽ các polyphosphate cao phân tử và các polyphosphate phân tử thấp. Ở giai đoạn này rõ ràng hàm lượng các polyphosphate hòa tan trong acid giảm đi rất nhiều ở các tế bào vi sinh vật. Các enzyme phân giải các polyphosphate không hòa tan trong acid ở trạng thái không hoạt động. P trong môi trường không đi vào thành phần của bào tử nấm mốc. Vì vậy, trong sự tổng hợp acid nucleic các polyphosphate là nguồn P. Khi tế bào vi sinh vật bắt đầu sinh trưởng mạnh, phân cắt mạnh mẽ và khi tạo thành khuẩn ty ở nấm mốc các hợp chất

polyphosphate không tan trong acid được sử dụng cho quá trình sinh tổng hợp protein và acid nucleic. Khi chuyển vào pha sinh trưởng ổn định thì việc sử dụng các polyphosphate vào các mục đích này sẽ dừng lại. Tỷ số giữa polyphosphate hòa tan và không hòa tan trong acid có trong tế bào phụ thuộc và điều kiện nuôi cấy và mỗi điều kiện nuôi cấy sẽ làm cho các enzyme depolymerase polyphosphate hoạt động ở các mức độ khác nhau.

Nguồn phosphate có mặt trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật thường là các hợp chất P hữu cơ có trong bột đậu, cao ngô, bã rượu, khô dầu... và các hợp chất P vô cơ như các muối monophosphate, amon và superphosphate. Yêu cầu về P của vi sinh vật phụ thuộc vào chủng loài, vào tỷ lệ môi trường (tỷ lệ C:N) và điều kiện nuôi cấy. Nồng độ các nguồn P quá cao cũng làm cho vi sinh vật phát triển kém và giảm hiệu suất sinh tổng hợp.

Nếu trong môi trường có calcium carbonate khi thanh trùng các hợp chất P vô cơ sẽ kết hợp với ion Ca^{++} và tạo thành kết tủa. Vi sinh vật thường sử dụng nhanh các hợp chất P vô cơ hòa tan, các hợp chất P vô cơ không hòa tan trong môi trường thường được sử dụng ít và chậm. Ảnh hưởng các hợp chất P hữu cơ đến quá trình trao đổi carbohydrat và các quá trình sinh tổng hợp có thể khác với muối phosphate. Khi dùng cao ngô, bột đậu tương... cần phải chú ý đến hợp chất hữu cơ chứa P là phytine. Chất này là muối Ca – Mg của acid inozitphosphoric. Inozit là rượu mạch vòng 6 nguyên tử carbon có cấu tạo giống với glucose.

1.3.2. Các chất khoáng khác

Trong tế bào vi sinh vật có hàng loạt các chất khoáng khác: Mg, Na, Fe, Al, Zn, Mn, Pb,... Vi sinh vật lấy các chất khoáng từ môi trường dinh dưỡng. Có trường hợp phải bổ sung vào môi trường một số các dạng muối khoáng hoặc có khi chúng có sẵn trong các nguyên liệu pha môi trường (đường, bột, cao ngô, rỉ đường, calcium carbonate) và trong nước.

Những hợp chất khoáng của môi trường có nhiều ý nghĩa sinh lý khác nhau. Một trong những tính chất của chúng là làm thay đổi trạng thái keo của tế bào chất. Dưới tác động của muối vô cơ lớp bề mặt tế bào không ngừng thay đổi và dẫn đến làm thay đổi tốc độ các phản ứng enzyme trong quá trình trao đổi chất.

Muối ăn (NaCl) trong môi trường lên men các chất kháng sinh, ngoài tác dụng là nguồn cung cấp ion Cl^- còn có tác dụng làm thay đổi sức thẩm thấu của màng tế bào, tạo điều kiện cho việc tiết chất kháng sinh từ các sợi mốc, xạ khuẩn vào môi trường dễ dàng. Một số kim loại (Zn, Fe, Mn, Mg...) là các chất hoạt hóa enzyme. Chúng tham gia vào cấu trúc phân tử enzyme và các enzyme này được gọi là metaloenzyme.

Cơ chế tác dụng của các cation kim loại trong các phản ứng enzyme có thể là:

- + Kim loại là thành phần của trung tâm hoạt động
- + Kim loại làm định hình và ổn định phân tử protein để có tác dụng xúc tác enzyme
- + Kim loại tác dụng lên cơ chất, làm thay đổi cấu trúc điện tử và dễ dàng tham gia các phản ứng enzyme.
- + Kim loại giúp cho coenzyme kết hợp với apoenzyme
- + Kim loại thực hiện chức năng là cầu nối giữa enzyme với cơ chất để tạo thành hợp chất trung gian.

Trong công nghiệp lên men nói chung cần nhiều nước để pha môi trường. Trong nước đã có sẵn nhiều nguyên tố khoáng. Việc chọn nguồn nước thích hợp cho đối tượng lên men là cần thiết. Trong nước nếu có quá cao các ion kim loại, đặc biệt là Fe, sẽ làm giảm hiệu suất lên men. Ngoài Fe ra còn một số kim loại như Zn, Cu, Mn, Mo, B, K, Mg, Ca... cũng có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính sinh tổng hợp của vi sinh vật. Một số kim loại được sử dụng với một lượng rất ít nên chúng được gọi là các nguyên tố vi lượng, và chúng thường có sẵn trong các nguyên liệu pha môi trường. Một vài môi trường khi pha cần thêm các nguyên tố vi lượng ở các dạng muối, hay dùng là muối sulphate, với nồng độ phần triệu (viết tắt là ppm).

Trong sản xuất công nghiệp người ta dùng cao ngô, rỉ đường, nước chấm, các loại bột... Trong các nguyên liệu này có thấy các nguyên tố Al, As, Bo, K, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, P, Zn,... Hàm lượng một số kim loại (% trọng lượng khô) có trong cao ngô như sau: Mn 0,004; K 0,5-1,5; Cu 0,001; Mg 0,5 -1,0; Zn 0,05.

Tác dụng hỗn hợp các nguyên tố kim loại có trong môi trường khác với tác dụng của từng nguyên tố riêng biệt. Có thể sự có mặt nguyên tố này sẽ làm giảm tác dụng kìm hãm hoặc làm tăng tác dụng kích thích của nguyên tố kia. Song, tỷ lệ giữa các nguyên tố khoáng trong môi trường cũng cần phải xác định bằng con đường thực nghiệm. Ví dụ tỷ lệ các chất khoáng thích hợp trong nuôi cấy các chủng sinh penicillin: K_2HPO_4 : $MgSO_4$: $NaNO_3$ = 0,475: 0,05: 0,475.

Trong một vài trường hợp kim loại tham gia vào thành phần phân tử của hoạt chất sinh học. Ví dụ Co có trong thành phần vitamin B_{12} , Fe có trong các chất kháng sinh, grisein. Trong các trường hợp này môi trường cần bổ sung muối Co hoặc muối Fe trong quá trình lên men.

2. NHU CẦU DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

2.1. Nhu cầu dinh dưỡng

Các chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng có ý nghĩa rất lớn trong quá trình nuôi cấy, lên men các chủng vi sinh vật. Hiểu được các nguyên tố, hàm lượng cấu thành tế bào, nguồn gốc các chất dinh dưỡng cũng như vai trò của chúng đối với tế bào vi sinh vật là rất cần thiết trong nghiên cứu tối ưu hóa môi trường nuôi cấy và lên men sản xuất các sản phẩm trong công nghiệp.

Một số loài có thể sử dụng các hợp chất đơn giản làm nguồn dinh dưỡng cho tất cả các chất dinh dưỡng đa lượng, vi lượng, nguyên tố vết và từ đó chúng tổng hợp tất cả các phân tử hợp chất cần thiết cho sinh trưởng. Những sinh vật khác không có khả năng trao đổi chất rộng và sự sinh trưởng của chúng phụ thuộc vào các phân tử hữu cơ có sẵn mà chúng không có khả năng tổng hợp được. Do vậy, chúng phải thu nhận các hợp chất này từ môi trường.

Tùy thuộc vào nhu cầu các chất là nhân tố sinh trưởng (gồm các vitamin, các amino acid, các nucleic acid) vi sinh vật thường chia làm hai nhóm:

+ Nguyên dưỡng: là những vi sinh vật không nhất thiết cần các nhân tố sinh trưởng, những yếu tố của môi nuôi cấy là đầy đủ đối với chúng. Ví dụ, loại môi trường tối thiểu có các thành phần sau (g/l): glucose - 10,5; K_2HPO_4 - 1; KH_2PO_4 - 3,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,05; $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,005; $NaCl \cdot 2H_2O$ - 0,05, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 0,02 và nước cất - 1000ml.

+ Khuyết dưỡng là những vi sinh vật đòi hỏi các nhân tố sinh trưởng (các chất hữu cơ nhất định) cho sự sinh trưởng của chúng.

Trong quá trình lên men, một môi trường nuôi cấy tốt nhất phải là môi trường đảm bảo cho quá trình sản xuất tốt nhất với hiệu suất cao nhất trong thời gian ngắn nhất và giá thành thấp đối với các chủng vi sinh vật cho trước.

2.2. Cách tính thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Ngày nay, người ta kiểm tra tỷ lệ carbon: nitrogen : phosphorus : kalicum có trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật tương đương với tỷ lệ này trong sinh khối vi sinh vật để cân đối các thành phần dinh dưỡng hợp lý. Tỷ lệ các chất này trong sinh khối vi sinh vật như sau: C : N : P : K = 50 : 10 : 4 : 1. Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí, một nửa nguồn C đồng hóa vào sinh khối còn một nửa qua hô hấp thành CO₂. Do vậy, trong môi trường lên men hiếu khí, tỷ lệ các chất là C : N : P : K = 100 : 10 : 4 : 1. Tuy nhiên, trong điều kiện lên men kỵ khí thì khoảng 90% nguồn C phân hủy được dùng vào trao đổi năng lượng. Do đó, tỷ lệ các nguồn tốt nhất trong lên men kỵ là C : N : P : K = 500 : 10 : 4 : 1.

Tuy nhiên để tính chính xác nguồn C bổ sung vào môi trường lên men phù hợp, Aiba (1965) tính theo cách sau: Nếu ta muốn sản xuất được 40g/l tế bào khô của vi khuẩn hiếu khí chứa nguyên tố C bằng 50% khối lượng của nó và có thể biến đổi được 50% C có trong cơ chất thì cơ chất đó phải chứa: $[(40 \times 50)/100] \times (100/50) = 40\text{g C}$. Còn nếu lượng C đó được cung cấp dưới dạng glucose thì công thức của môi trường cần $[40 \times (180/72)] = 100\text{g glucose}$

Phép tính tương tự cho phép ta xác định được khối lượng hợp chất nitrogen cần phải đưa vào môi trường. Tuy nhiên sử dụng dạng nào của nguồn C và N là tối ưu hoàn toàn phụ thuộc vào bản thân vi sinh vật và chỉ có thể xác định chính xác bằng thực nghiệm.

Trong môi trường nuôi cấy nguồn C và năng lượng được đưa vào ở phạm vi 10 – 100g/l. Ở nhiều chủng vi sinh vật, nồng độ cần thiết để duy trì tốc độ cực đại là rất nhỏ, đối với đường thì chỉ khoảng 1 – 10mg/l; amino acid và vitamin thì tế bào chỉ cần nồng độ 1 – 100 µg/l.

Một thành phần cần thiết cho sinh trưởng của vi sinh vật hiếu khí là oxygen. Johnson (1959) đã đưa ra công thức cho phép tính lượng oxygen cần thiết cho sinh trưởng của một vi sinh vật hiếu khí, phát triển trong cơ chất gồm các carbonhydrat như sau: milimol O₂/phút = (3333 : γ) – (40,8x G) trong đó γ – khối lượng tế bào vi khuẩn khô tạo thành từ 100g glucose; G –tốc độ phát triển tính bằng g/phút.

Nhu cầu O₂ thay đổi ở các vi sinh vật khác nhau, như tảo, nấm hay một số vi khuẩn hiếu khí hoàn toàn, nhất thiết đòi hỏi lượng O₂ hòa tan cao; ngược lại nấm men hay vi khuẩn kỵ khí tùy tiện có thể phát triển trong điều kiện có O₂ hoặc không có O₂.

3. NGUYÊN LIỆU TRONG SẢN XUẤT

3.1. Các hợp chất cung cấp nguồn carbon

3.1.1. Các nguyên liệu nguồn tinh bột

Các loại ngũ cốc và bột sắn: trong các loại bột ngũ cốc thường được dùng là bột gạo, bột ngô đã tách phôi, khoai mì, bột đại mạch....Ngoài thành phần chủ yếu là tinh bột, các loại bột này còn chứa các hợp chất protein, các chất xơ (chủ yếu là cellulose) và các chất khoáng.

Khoai mì được coi là nguyên liệu chứa tinh bột có nhiều thành phần dinh dưỡng thuận lợi cho nhiều quá trình lên men. Trong khoai mì còn có nhiều chất khoáng như

K, Na, P, Mg và Fe. Vi sinh vật rất cần các chất khoáng này để tạo ra các sản phẩm thứ cấp. Mặt khác khi làm nguồn thực phẩm cho con người lại là loại thực phẩm thiếu dinh dưỡng nên giá thành khoai mì thường rất rẻ và là loại dễ trồng nên được sử dụng làm nguyên liệu cho nhiều quá trình lên men. Thành phần hóa học của khoai mì bảng 3.1.

Bảng 3.1. Thành phần hóa học trung bình của khoai mì

STT	Thành phần	Đơn vị	Số lượng	STT	Thành phần	Đơn vị	Số lượng
1	Protein	%	1,1	8	P	mg/100g	30,0
2	Lipid	%	0,2	9	Fe	mg/100g	1,2
3	Glucide tổng số	%	36,4	10	Vitamin B ₁	mg/100g	0,03
4	Cellulose	%	1,5	11	Vitamin B ₂	mg/100g	0,03
5	Tro	%	0,8	12	Vitamin PP	mg/100g	0,6
6	K	mg/100g	394	13	Vitamin C	mg/100g	34
7	Ca	mg/100g	25,0	14	Acid folic	mg/100g	520

Ngô mảnh là một loại nguyên liệu rất thông dụng trong các quá trình lên men. Ngô mảnh chứa nhiều glucide, protid và cả lipid. Ưu điểm của ngô mảnh là vật liệu rời, tinh bột có trong ngô mảnh thường không tạo khối kết dính nên thuận lợi để làm môi trường bán rắn trong nuôi cấy bề mặt. Ngoài ra chúng lại dễ bảo quản, dễ mua và rẻ tiền. Thành phần hóa học của ngô mảnh bảng 3.2.

Bảng 3.2. Thành phần hóa học trung bình của ngô mảnh

STT	Thành phần	Đơn vị	Số lượng	STT	Thành phần	Đơn vị	Số lượng
1	Protein	%	8,5	9	P	mg/100g	190,0
2	Lipid	%	3,2	10	Fe	mg/100g	2,3
3	Glucide	%	71,8	11	Mg	mg/100g	85
4	Cellulose	%	1,7	12	Zn	mg/100g	1,4
5	Tro	%	0,8	13	Cu	mg/100g	0,16
6	Ka	Mg/100g	310,6	14	Mn	mg/100g	0,5
7	Ca	Mg/100g	30,0	15	Co	mg/100g	22,4
8	Na	Mg/100g	10,4	16	Mo	mg/100g	35

Cám gạo được sử dụng nhiều nhất trong nuôi cấy vi sinh vật. Trong cám gạo chứa đầy đủ các chất phù hợp cho sự phát triển của vi sinh vật, trong đó nấm sợi phát triển rất mạnh trong môi trường cám. Trong thành phần hóa học của cám, hàm lượng tinh bột chiếm khối lượng lớn.

Tuy nhiên tinh bột của cám là tinh bột của gạo nên rất dễ tạo ra sự kết dính khi ta tiến hành gia nhiệt trong quá trình thanh trùng. Sự kết dính này tạo thành một khối chặt chẽ, ngăn chặn sự vận chuyển O₂ trong khối môi trường. Chính vì vậy trong quá

trình sản xuất sử dụng cám gạo người ta thường cho vào môi trường khoảng 25% trấu làm chất độn tạo khả năng xâm nhập của không khí vào môi trường. Thành phần hóa học của cám gạo bảng 3.3.

Bảng 3.3. Thành phần hóa học trung bình của cám gạo

STT	Thành phần	Đơn vị	Số lượng
1	Protein	%	12,2
2	Lipid	%	22,7
3	Glucide	%	40,3
4	Cellulose	%	6,3
5	Tro	%	6,5
6	Ca	mg/100g	30,0
7	P	mg/100g	4,6
8	Fe	mg/100g	14,0
9	Vitamin B ₁	mg/100g	0,96

Các nguyên liệu tinh bột có thể sử dụng cho lên men trực tiếp với các chủng vi sinh vật có khả năng sinh ra enzyme amylase ngoại bào, đặc biệt là trong phương pháp nuôi cấy bề mặt. Ngoài ra, nguồn nguyên liệu này phải qua giai đoạn thủy phân thành đường rồi mới dùng chuẩn bị môi trường dinh dưỡng.

Để cung cấp nguồn C chủ yếu là đường glucose thì bột sắn, bột ngô, khoai tây là những nguồn nguyên liệu tốt nhất. Trong bột sắn chủ yếu chứa tinh bột, các hàm lượng nitrogen hữu cơ, khoáng, vitamin có với lượng rất ít.

Thủy phân các loại tinh bột, hai cách:

+ Thủy phân bằng acid (HCl hoặc H₂SO₄) ở nhiệt độ cao. Dịch thủy phân được trung hòa bằng Na₂CO₃ hoặc NaOH, nếu dùng H₂SO₄ làm tác nhân thủy phân thì có thể dùng CaCO₃ hoặc dùng nước vôi để trung hòa, sau đó đem qua lọc khung bản với than hoạt tính để khử màu. Dịch thủy phân này chứa chủ yếu là glucose, một lượng nhỏ amino acid, các chất khoáng. Sử dụng làm môi trường nuôi cấy hoặc cô đặc 60-70% chất khô để dùng dần.

+ Thủy phân bằng enzyme: sử dụng chế phẩm enzyme từ nấm mốc nuôi cấy bề mặt hoặc nuôi cấy chìm, gồm phức hệ enzyme α , β - amylase và glucoamylase. Sản phẩm thu được là hỗn hợp maltose và glucose. Hoặc phối hợp chế phẩm enzyme từ nấm mốc và chế phẩm enzyme từ vi khuẩn (α - amylase chịu nhiệt), hiệu quả của quá trình thủy phân cao hơn.

3.1.2. Các loại mật rỉ

- Mật rỉ hydrol: dịch thu được sau khi kết tinh glucose ở các cơ sở sản xuất glucose từ tinh bột thủy phân bằng acid. Trong hydrol có tới 40-50% glucose và một hàm lượng đáng kể là NaCl.

- Rỉ đường là một hỗn hợp khá phức tạp. Bên cạnh hàm lượng đường lên men được khá cao, trong rỉ đường còn chứa các hợp chất chứa nitrogen, các vitamin, các hợp chất vô cơ, một số chất keo và vi sinh vật tạp nhiễm làm bất lợi cho quá trình lên men sau này. Vì vậy, tùy theo mục đích sử dụng khác nhau cần phải xử lý rỉ đường trước khi dùng làm môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Thành phần hóa học của rỉ đường bảng 3.4.

Rỉ đường mía là phế phẩm thu được của công nghiệp sản xuất đường. Rỉ đường củ cải là nước cốt sinh ra trong sản xuất đường từ củ cải đường.

Bảng 3.4. Thành phần hóa học trung bình của rỉ đường củ cải và mía

STT	Thành phần	Đơn vị	Hàm lượng rỉ đường	
			Củ cải	Đường mía
1	Đường tổng số	%	48-52	48-56
2	Chất hữu cơ khác	%	12-17	9,0-12
3	Protein	%	6,0-10	2-4
4	K	%	2,0-7,0	1,5-5,0
5	Ca	%	0,1-0,5	0,4-0,8
6	Mg	%	0,09	0,06
7	P	%	0,02 -0,07	0,6-2,0
8	Biotin	mg/kg	0,02 – 0,15	1,0-3,0
9	Pantotenic acid	mg/kg	50-110	15-55
10	Inozitol	mg/kg	5000 -8000	2500-6000
11	Thiamin	mg/kg	1,3	1,8

Ngoài các nguồn nguyên liệu trên trong công nghiệp lên men còn sử dụng các nguồn nguyên liệu sau đây để làm nguồn C nuôi cấy vi sinh vật thu nhận cồn hoặc protein đơn bào:

+ Dịch kiềm sulfite: Là một loại phế phẩm của công nghiệp sản xuất cellulose. Dịch kiềm sulfite có thành phần: 80% chất khô là đường hexose (glucose, mannose, galactose), phần còn lại là đường pentose. Ngoài ra trong dịch kiềm sulfite có chứa acid ligninsulfuric. Acid này chưa được vi sinh vật sử dụng, hiện nay đang có hướng nghiên cứu để vi sinh vật có thể sử dụng acid này trong công nghệ lên men. Lưu ý kiềm sulfite có đặc tính hấp phụ nhiều O₂, cho nên khi nuôi cấy các vi sinh vật hiếu khí có thể giảm mức cung cấp O₂ tới 60% so với mức bình thường.

+ Cellulose được sử dụng dưới dạng rơm, rạ, giấy, mặt cưa...Các loại nguyên liệu tùy theo đối tượng vi sinh vật sẽ có cách xử lý thích hợp khác nhau. Hiện nay sử dụng trực tiếp cellulose còn rất hạn chế.

+ Hydrocarbon: Cũng có thể là nguồn nguyên liệu dùng trong công nghiệp lên men. Trong quá trình tìm kiếm nguồn carbon cho môi trường nuôi cấy vi sinh vật ở quy mô công nghiệp, con người đã phân lập được một số vi sinh vật có khả năng sử dụng được nguồn hydrocarbon là dầu mỏ và khí đốt. Các nguồn nguyên liệu này rất dồi dào và rẻ tiền, vì vậy việc sử dụng vi sinh vật nuôi cấy trên môi trường dầu mỏ và

khí thiên nhiên đã và đang là vấn đề hấp dẫn các nhà nghiên cứu cũng như nhà sản xuất.

+ Các loại dầu thực vật (dầu dừa, dầu lạc, dầu đậu tương, dầu hạt bông, dầu hướng dương...) được dùng trong nuôi cấy vi sinh vật với vai trò là nguồn dinh dưỡng carbon, ngoài ra còn là chất phá bọt trong quá trình lên men. Trong quá trình lên men vi sinh vật có khả năng tiết ra enzyme lipase sẽ phân hủy các chất dầu này thành glycerine và các acid béo.

Bảng 3.5. Thành phần hóa học của các loại dầu thực vật

Các loại dầu	Acid béo (%)				
	Oleic	Linoleic	Palmitic	Stearic	Arachidic
Dầu lạc	50 – 70	13 – 26	6 – 11	2 – 6	5 – 7
Dầu bắp	< 45	< 48	< 7,7	3,6	< 0,4
Dầu đậu tương	25 – 36	52 – 65	6 – 8	3 – 5	0,4 – 10
Dầu bông	30 – 35	40 – 45	20 – 22	2,0	0,1 – 0,6
Dầu lanh	13 – 29	15 – 30	9 – 11	6 – 7	-

3.2. Các hợp chất cung cấp nguồn nitrogen

Nitrogen tham gia trong các thành phần cấu trúc nên tế bào vi sinh vật, giúp tế bào hoàn thiện được mọi chức năng của hoạt động sống, đây là nguồn dinh dưỡng quan trọng không kém gì nguồn carbon. Nitrogen được cung cấp cho tế bào dưới nhiều dạng khác nhau:

* Dưới dạng các hợp chất vô cơ và hữu cơ khá thuần khiết như: NH_4^+ , NO_3^- , peptone, các amino acid (sử dụng ở quy mô phòng thí nghiệm).

* Trong lên men công nghiệp, người ta thường sử dụng nguồn nitrogen dưới dạng sản phẩm thô gọi là nguồn nitrogen kỹ thuật, bao gồm các loại sau:

+ Dịch thủy phân nấm men: Là một dung dịch rất giàu chất bổ dưỡng, gồm các amino acid, các peptide, vitamin (đặc biệt là các vitamin nhóm B). Người ta sử dụng dịch nấm men thủy phân với mục đích bổ sung nguồn nitơ và các chất kích thích sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

Có thể thu nhận dịch thủy phân nấm men bằng nhiều phương pháp khác nhau: bằng tác động của enzyme; phương pháp tự phân ở 45 – 50°C, pH 6,2... Thành phần hoá học của các dịch thủy phân nấm men phụ thuộc vào nguyên liệu và quy trình sản xuất.

+ Bột đậu nành: là phế thải sau khi tách lấy dầu, đây là nguyên liệu lí tưởng dùng trong công nghệ vi sinh. Loại bột này chứa tới 40 – 50% protein, 30% carbohydrate, hàm lượng dầu còn lại khoảng 1%.

+ Cao ngô: Có dạng lỏng sền sệt màu nâu thẫm được tạo nên từ nước chiết ngâm ngô thông qua quá trình cô đặc, lượng chất khô chiếm 40 – 50%. Trong thành phần chất khô chứa 3 – 5% đạm tổng số, 1 – 3% đạm amine. Trong cao ngô còn chứa một ít protein, một số các amino acid tự do và các peptide có phân tử lượng thấp.

+ Khô lạc hay bánh dầu phộng: Là xác bã thu được sau khi ép đậu phộng lấy dầu. Thành phần giàu protein và một số acid béo. Hàm lượng đạm tổng số và đạm amine gần giống với cao ngô.

+ Dịch thủy phân các loại khô dầu (đậu tương, lạc, hạt bông, hướng dương) và thịt, cá...giàu N hữu cơ, amino acid. Nếu thủy phân bằng acid thì nhiều vitamin và một số amino acid bị phá hủy (tryptophan, cysteine), còn thủy phân bằng enzyme thì lượng các thành phần này đầy đủ hơn. Các dịch thủy phân này chính là nước chấm (magi, xì dầu) và nước mắm.

3.3. Các nguồn chất khoáng, chất sinh trưởng

Trong công nghệ lên men, vai trò của dinh dưỡng khoáng rất lớn, ảnh hưởng nhiều đến chất lượng của quá trình lên men.

Trong các nguyên tố khoáng, người ta đặc biệt lưu ý đến vai trò rất quan trọng của phosphorus (P). Trong lên men công nghiệp, người ta bổ sung P dưới dạng bột đậu, bột bắp, bã rượu, hay ở dạng muối phosphate vô cơ.

Các chất khoáng khác như: Mg, Na, Fe... vi sinh vật sẽ nhận từ môi trường dinh dưỡng ở dạng muối vô cơ hoặc ngay trong nước pha môi trường dinh dưỡng. Vì vậy, thông thường khi pha chế môi trường người ta thường dùng nước máy, không dùng nước cất để pha chế môi trường.

Các nguyên tố vi lượng như: Mn, Mo, Co...thường có mặt trong những nguyên liệu tự nhiên ban đầu khi đưa vào môi trường lên men như dịch nước trái cây, nước chiết thóc malt...

Ngoài ra, người ta còn sử dụng nước chiết cám, dịch ép khoai tây, các dịch ép giá đậu, dịch ép cà chua, bắp cải hoặc một số rau quả khác có chứa nhiều vitamin và dùng làm nguồn kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy vi sinh vật.

Bảng 3.6. Nhu cầu của vi sinh vật đối với một số loại muối khoáng

Loại muối khoáng	Nồng độ cần thiết (g/l)	
	Đối với vi khuẩn	Đối với nấm, xạ khuẩn
K_2HPO_4	0,2 – 0,5	1 – 2
KH_2PO_4	0,2 – 0,5	1 – 2
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 – 0,2	0,2 – 0,5
$MgSO_4.4H_2O$	0,005 – 0,050	0,02 – 0,10
$NaMoO_4$	0,001 – 0,005	0,001 – 0,002
$ZnSO_4.7H_2O$		0,02 – 0,10
$CoCl_2$	0,03	0,05
$CaCl_2$	0,01 – 0,03	0,02 – 0,10
$CaSO_4$	0,001 – 0,003	0,001 – 0,050

3.4. Chất béo trong công nghệ vi sinh vật

Trong lên men các chủng vi sinh vật hiếu khí vì cần phải thổi khí và khuấy liên tục, cho nên môi trường tạo thành nhiều bọt. Khối bọt hình thành ngày càng nhiều và

có thể trào ra ngoài thùng lên men qua các khe hở của các chi tiết gây tạp nhiễm và làm giảm sự hiếu khí của môi trường.

Có nhiều biện pháp để chống bọt. Một trong các biện pháp là dùng các chất có hoạt tính bề mặt như dầu thực vật, mỡ cá voi và một số chất phá bọt tổng hợp.

Các loại dầu thực vật thường dùng là dầu lạc, dầu ngô, dầu đậu tương, dầu lanh, dầu hướng dương, dầu bông.

Chất béo được bổ sung vào môi trường lên men làm nhiều lần. Số lượng chất béo bổ sung tùy thuộc vào mức độ tạo bọt của môi trường. Nếu lượng chất béo dùng quá nhiều sẽ làm chậm quá trình đồng hóa hydratcarbon. Dưới tác dụng lipase của các vi sinh vật chất béo sẽ bị phân hủy thành glycerine và các acid béo. Vi sinh vật có thể sử dụng glycerine và các acid béo như là những nguồn C.

Ngoài ra lượng chất béo phá bọt cao sẽ làm cho môi trường có độ nhớt lớn, tạo thành các hạt nhũ tương của các loại xà phòng, đặc biệt là trong môi trường có carbonat canxi, làm cho môi trường giảm mức độ hiếu khí và vi sinh vật sinh trưởng kém, giảm hiệu suất sinh tổng hợp.

Chất béo có mặt trong môi trường với tư cách là nguồn dinh dưỡng carbon khi vi sinh vật có khả năng tiết ra enzyme lipase sẽ phân hủy chất béo thành glycerine và các acid béo, sau đó được đồng hóa tiếp vào con đường EMP và kết hợp chuyển hóa với hợp chất có CoA rồi vào chu trình Krebs.

3.5. Nước dùng trong công nghệ vi sinh

Nước là thành phần cơ bản nhất và thường được sử dụng với số lượng rất nhiều trong lên men công nghiệp. Do đó chất lượng nước phải được đảm bảo để không xảy ra những phản ứng hoá học khi tiến hành lên men hoặc không để xảy ra những tác động của vi sinh vật lạ xâm nhập từ nước vào quá trình lên men. Nước trước khi sử dụng phải xử lý để đảm bảo theo tiêu chuẩn qui định. Chất lượng nước phải được xem xét ở các chỉ số:

- Độ cứng: được thể hiện bằng sự có mặt của ion Ca^{2+} và Mg^{2+} có trong nước. Muối carbonate của hai ion này biểu hiện độ cứng tạm thời. Còn các ion khác như ion Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- là biểu hiện độ cứng vĩnh cửu. Nước dùng trong lên men phải có độ cứng chung không quá 7mg đương lượng.

- Độ oxy hoá của nước: cho biết mức độ nhiễm bẩn của nước bởi các chất hữu cơ. Chỉ số này được biểu hiện bằng mg O_2 /lít.

- Chỉ số vi sinh vật, đặc biệt là những vi sinh vật gây bệnh: là một chỉ số quan trọng, nó biểu hiện sự nhiễm bẩn sinh học. Nước chứa nhiều vi sinh vật sẽ không được sử dụng trong các quá trình lên men. Chỉ tiêu vi sinh vật trong nước dùng trong quá trình lên men được xác định như sau:

- + Tổng số vi sinh vật hiếu khí < 1000 tế bào/lít
- + Chuẩn độ Coli không quá 300 ml
- + Chỉ số Coli không quá 1 tế bào/lít

Ngoài ra, còn một số chỉ tiêu quan trọng khác cần xác định là:

- + Cặn khô: không quá 1000 mg/lít
- + Cặn sulfate: không quá 500 mg/lít
- + Cặn clorua: không quá 350 mg/lít.

Nước dùng trong các nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu kỹ thuật ở các phòng thí nghiệm thường đã qua chưng cất. Nước chưng cất đảm bảo tuyệt đối về chất lượng hóa học cũng như chất lượng vi sinh vật.

Nước dùng trong các quá trình lên men theo quy mô công nghiệp phải đảm bảo đúng tiêu chuẩn nước uống. Nước này phải không có màu, mùi, vị lạ, không chứa các kim loại nặng (Hg, Ba, Pb...) và phải đảm bảo đúng các tiêu chuẩn ở trên. Để đảm bảo đúng các yêu cầu như trên nước bắt buộc phải qua xử lý.

Phương pháp xử lý nước bằng cột trao đổi ion được sử dụng rộng rãi, phương pháp này sẽ làm sạch các loại muối vô cơ có trong nước.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Hãy so sánh quá trình phân giải glucose thông qua các con đường EMP, PP, ED.
2. Nêu vai trò của chu trình Krebs.
3. Hãy nêu các nguồn dinh dưỡng của vi sinh vật.
4. Hãy phân tích vai trò của các nguồn nguyên liệu dùng trong công nghệ vi sinh.
5. Hãy nêu các chỉ tiêu của nguồn nước trong quá trình sản xuất.

Chương 4. KỸ THUẬT VÀ ĐỘNG HỌC QUÁ TRÌNH LÊN MEN

1. CÁC PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN VI SINH VẬT

Dựa vào bản chất và kỹ thuật vận hành quá trình lên men, người ta có thể phân chia các phương pháp lên men vi sinh vật theo các tiêu chí khác nhau như:

- + Căn cứ vào đặc tính cơ lý của môi trường lên men, có thể phân biệt lên men trên môi trường rắn – xốp và lên men trong môi trường lỏng.

- + Căn cứ vào nhu cầu cung cấp oxygen cho quá trình lên men, có thể phân biệt lên men hiếu khí, lên men kỵ khí.

- + Căn cứ vào chế độ công nghệ lên men để phân biệt: lên men gián đoạn, lên men bán liên tục, hay lên men liên tục.

- + Căn cứ vào kỹ thuật điều khiển đường hướng trao đổi chất của vi sinh vật: lên men thường, lên men hai pha, lên men định hướng

1.1. Lên men trên môi trường rắn –xốp

Sử dụng để nuôi cấy các vi sinh vật hiếu khí như: nấm mốc, xạ khuẩn (những nhóm vi sinh vật sinh trưởng thành sợi) và một vài trường hợp nuôi cấy vi khuẩn. Môi trường nuôi cấy bề mặt là môi trường rắn và xốp. Nguyên liệu thường dùng phổ biến là các loại bột và hạt như bột hay hạt gạo, mỳ, ngô, khoai, sắn, hạt bông, khô lạc, cám mì, cám gạo... Khi cần thiết người ta có thể bổ sung thêm các cơ chất tạo độ xốp như trấu, mùn cưa.. để cải thiện năng lực cung cấp oxygen cho vi sinh vật trong toàn khối môi trường.

Quá trình lên men này có thể được lên men thành khối lớn song phổ biến nhất là thành lớp trên các khay dẹt – giá xếp trong phòng nuôi hay nuôi trong thiết bị lên men kiểu thùng quay. Với trường hợp lên men trên các khay nguyên liệu sau khi phối trộn, thanh trùng làm nguội được rải đều trên các khay sạch với chiều dày từ 3 ÷ 5cm và nuôi ở nhiệt độ thích hợp trong buồng nuôi cấy có độ ẩm 90%. Vi sinh vật phát triển sử dụng oxygen của không khí để hô hấp và làm tác nhân ôxy hoá trong các quá trình biến đổi hoá sinh, đồng thời thải CO₂ ra môi trường xung quanh và toả nhiệt. Do đó cần phải thông gió, phun mù hoặc làm ẩm trực tiếp, lật khối môi trường nuôi cấy. Buồng nuôi cấy có các giá kê khay, có bộ phận gia nhiệt và làm mát, bộ phận phun mù bằng nước để giữ độ ẩm tương đối của không khí là 90% để tránh làm khô môi trường.

Kỹ thuật lên men này có lợi thế về yêu cầu thiết bị đơn giản, ảnh hưởng nhiễm tạp mang tính cục bộ, dễ triển khai và vốn đầu tư thấp. Tuy nhiên, việc xác lập và điều chỉnh đảm bảo đồng đều các thông số vô cùng khó khăn, đặc biệt là xử lý mối quan hệ thông gió – điều nhiệt – độ ẩm. Bên cạnh đó vấn đề kiểm soát nhiễm tạp là không khả thi trong suốt quá trình lên men.

1.2. Lên men trong môi trường lỏng

Phương pháp này dùng cho cả vi sinh vật kỵ khí và hiếu khí. Đối với nuôi vi sinh vật kỵ khí trong quá trình nuôi không cần sục khí chỉ thỉnh thoảng khuấy trộn, còn với vi sinh vật hiếu khí phải sục khí liên tục. Chúng vi sinh vật được gieo cấy vào môi trường phân tán khắp mọi điểm và xung quanh bề mặt tế bào được tiếp xúc với dịch dinh dưỡng. Đặc điểm này đòi hỏi trong suốt quá trình nuôi cấy phải khuấy và cung cấp oxygen bằng cách sục khí liên tục.

Phương pháp này được dùng phổ biến trong công nghiệp vi sinh để sản xuất men bánh mì, protein đơn bào từ nấm men, các vi sinh vật làm phân bón cố định đạm, các enzyme, các amino acid, vitamin, các chất kháng sinh, các chất kích thích sinh học...

Phương pháp lên men chìm là kỹ thuật lên men có yêu cầu về công nghệ, đòi hỏi chi phí đầu tư và năng lực kiểm soát công nghệ cao nhất. Song cũng mang lại năng lực điều chỉnh – giám sát công nghệ thuận tiện và năng suất – hiệu quả kinh tế tổng thể cho toàn bộ quá trình cao nhất.

1.3. Lên men gián đoạn, lên men bán liên tục và lên men liên tục

Lên men gián đoạn là quá trình lên men từng mẻ tách biệt nhau. Theo kỹ thuật này, môi trường lên men được chuẩn bị, thanh trùng và làm nguội rồi cấy giống vi sinh vật. Giống vi sinh vật và các cấu tử cần thiết thường chỉ được cấp một lần vào trong quá trình lên men; đồng thời người ta sẽ tiến hành tháo dịch thu sản phẩm chung một lần khi kết thúc quá trình. Như vậy quá trình lên men bắt đầu từ khi cấy giống và kết thúc vào thời điểm thu dịch lên men. Việc giám sát các thông số công nghệ được điều chỉnh theo quy luật với nồng độ cơ chất giảm dần và nồng độ sản phẩm tăng dần đến thời điểm kết thúc. Kỹ thuật này không cho phép điều chỉnh khai thác dải thông số công nghệ tối ưu cho mục tiêu sinh tổng hợp – tích tụ sản phẩm và hiệu quả khai thác năng lực thiết bị cũng như hiệu quả chuyển hóa nguyên liệu thành sản phẩm thấp.

Lên men bán liên tục là kỹ thuật lên men, trong đó người ta xác lập ít nhất một hay vài thông số công nghệ đầu vào hoặc đầu ra ở chế độ liên tục, nhằm duy trì và khai thác tốt hơn dải thông số công nghệ lên men tối ưu, ví dụ: bổ sung liên tục một hoặc vài cấu tử dinh dưỡng hay tháo thu sản phẩm liên tục. Kỹ thuật này cho phép kiểm soát động học của quá trình lên men tốt hơn và đạt hiệu quả chuyển hóa cơ chất, sản phẩm cao hơn, trong điều kiện khai thác năng lực thiết bị tốt hơn. Tuy nhiên, kỹ thuật này cần trang bị thêm các thiết bị phụ trợ để có thể xác lập và duy trì thông số công nghệ lựa chọn ổn định.

Lên men liên tục là kỹ thuật vận hành quá trình lên men với việc bổ sung liên tục nguồn dinh dưỡng và thu nhận sản phẩm lên men liên tục, trong điều kiện xác lập và duy trì các thông số kỹ thuật lên men.

1.4. Lên men thường, lên men hai pha, lên men định hướng

Lên men thường là quá trình lên men không có sự can thiệp đến động học phát triển và đặc tính tổng hợp – tích tụ sản phẩm của chủng vi sinh vật. Thông thường, với quá trình này, hoạt tính sinh tổng hợp và tích tụ sản phẩm xảy ra gần như đồng thời và cùng chiều với sự sinh trưởng và phát triển của chủng. Nghĩa là trong quá trình lên men thường, chỉ cần xác lập chế độ công nghệ chủng sinh trưởng và phát triển tự nhiên, thì người ta đã có thể thu được sản phẩm mong muốn.

Lên men hai pha dùng để chỉ một số quá trình lên men mà trong quá trình này sản phẩm chỉ được tạo ra ở những điều kiện nhất định và khác biệt với điều kiện phát triển bình thường của chủng. Vì vậy, với các quá trình lên men dạng này, trong công nghệ người ta định hướng xác lập và điều chỉnh chế độ công nghệ thành hai giai đoạn nối tiếp nhau: giai đoạn đầu tích lũy đủ lượng sinh khối cần thiết; khi đã đủ lượng sinh khối và trạng thái sinh trưởng phù hợp, người ta lại điều chỉnh chế độ lên men sang giai đoạn sau, theo hướng để chủng tổng hợp và tích tụ nhiều sản phẩm.

Trong một số trường hợp vào các thời điểm nhất định trong quá trình lên men, người ta có thể bổ sung thêm vào môi trường một lượng nhỏ những tác nhân nhất định để làm thay đổi đường hướng trao đổi chất của vi sinh vật, qua đó tạo ra sự thay đổi sản phẩm tạo thành. Ví dụ: trong công nghệ sinh tổng hợp penicillin vào giai đoạn tích tụ kháng sinh, người ta bổ sung vào môi trường phenylacetate thì nấm sợi *Penicillium chrysogenum* sẽ tích tụ chủ yếu penicillin G, trong khi bổ sung phenoloxycetate thì

chất kháng sinh được tích tụ trong dịch lên men là penicillin V. Chất được bổ sung trong quá trình lên men này gọi là chất định hướng và quá trình lên men này cũng được gọi là lên men định hướng. Kỹ thuật này cho phép kiểm soát hiệu quả hơn nữa động học quá trình sinh tổng hợp sản phẩm, song cũng đòi hỏi yêu cầu giám sát công nghệ nghiêm ngặt.

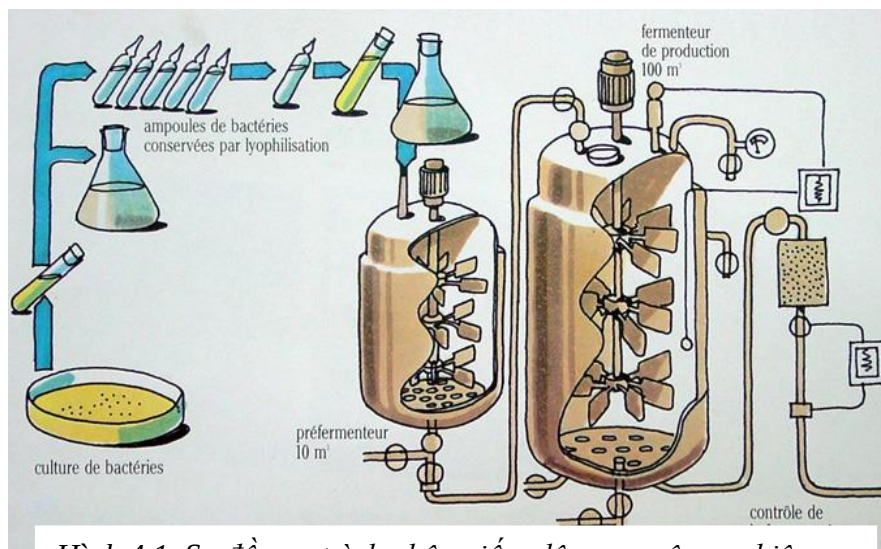
2. CÁC BƯỚC TRIỂN KHAI LÊN MEN CÔNG NGHIỆP

2.1. Nhân giống vi sinh vật

Muốn thực hiện một quá trình lên men ở quy mô công nghiệp người ta phải tiến hành nhân giống, đảm bảo số lượng tế bào với tuổi sinh lý đang ở thời kỳ hoạt động mạnh nhất để cấy vào môi trường lên men.

Các chủng vi sinh vật dùng trong sản xuất công nghiệp và các chủng vi sinh vật nói chung được bảo quản dưới nhiều dạng khác nhau. Từ môi trường bảo quản, giống được cấy chuyển sang ống môi trường dinh dưỡng lỏng hoặc đặc, rồi nuôi trong điều kiện thích hợp để giống dần phát triển trở lại, quá trình này gọi là hoạt hóa giống vi sinh vật. Tùy thuộc vào đặc tính sinh học và chế độ bảo quản áp dụng, quá trình hoạt hóa giống có thể không cần thiết hay xảy ra nhanh sau 1-2 ngày, song có trường hợp kéo dài nhiều ngày. Quá trình hoạt hóa được xem là kết thúc khi chủng sinh trưởng, phát triển bình thường và vẫn duy trì được hoạt tính.

Giống sau khi hoạt hóa được cấy chuyển tiếp sang ống nghiệm môi trường lỏng để bắt đầu cho các bước nhân giống, bao gồm từ nhân giống nhỏ trong phòng thí nghiệm, các công đoạn nhân giống trung gian, nhân giống trước sản xuất và nhân giống sản xuất. Trong quá trình nhân giống, thường khi giống phát triển đến nửa sau hoặc cuối nửa sau của giai đoạn phát triển lũy tiến thì sẽ được cấy chuyển khoảng sang môi trường nhân giống kế tiếp, với tỷ lệ 5-10%. Tùy thuộc vào quy mô sản xuất, quá trình nhân giống có thể kéo dài qua nhiều chu kỳ cấy chuyển cho đến khi đủ lượng giống cấp cho mỗi mẻ lên men.



Hình 4.1. Sơ đồ quy trình nhân giống lên men công nghiệp

Yêu cầu quan trọng nhất của khâu nhân giống là đảm bảo lượng giống cần thiết, với hoạt lực, chất lượng cao và thích ứng nhanh với môi trường lên men sản xuất. Để đạt các mục tiêu này, người ta có thể sử dụng môi trường dinh dưỡng và điều kiện nhân giống hoàn toàn đồng nhất với điều kiện áp dụng cho sản xuất thực sau này. Tuy

nhiên, trong nhiều trường hợp, khi lượng giống còn ít người ta thường sử dụng môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi tối ưu để chủng giống phát triển nhanh hơn. Sau đó mới từng bước thay đổi thành phần dinh dưỡng và các điều kiện nuôi theo hướng thích ứng với điều kiện lên men sản xuất để sao cho khi cấy giống vào thùng lên men sản xuất thì chủng vi sinh vật có thể thích ứng nhanh với điều kiện này – thường trong 2 - 3 chu kỳ nhân giống cuối cùng, việc nhân giống tiến hành ở điều kiện lên men sản xuất.

Quá trình nhân giống rất tốn kém về thời gian, nhân lực và tiềm ẩn nhiều rủi ro công nghệ, nên trong trường hợp cho phép người ta thường sử dụng các thiết bị nhân giống trung gian làm nguồn cung cấp giống thường xuyên cho sản xuất và chỉ định kỳ nhân giống cho thiết bị trung gian này.

Mục đích của việc nhân giống là để tăng số lượng tế bào vi sinh vật. Trong quy trình lên men, thì tùy vào từng chủng vi sinh vật khác nhau mà sử dụng các cơ chất và môi trường nhân giống khác nhau. Thường có hai dạng giống: tế bào sinh dưỡng và bào tử.

+ Trường hợp giống là tế bào sinh dưỡng: Để thu được lượng tế bào sinh dưỡng, người ta thường chọn môi trường nhân sinh khối là môi trường đảm bảo cho vi sinh vật tồn tại thích hợp nhất, để với thời gian ngắn nhất cho sinh khối vi sinh vật lớn nhất. Trong trường hợp này người ta thường dùng môi trường dịch thể.

+ Trường hợp giống là bào tử: Thông thường chọn môi trường bán rắn (cám gạo, bột bắp, thóc, trấu, mùn cưa...). Nuôi cấy nấm mốc và xạ khuẩn thường cần thời gian dài để tạo bào tử. Bào tử được thu hồi bằng nhiều cách: Dùng máy hút hay chổi lông mềm quét lên trên bề mặt của môi trường bán rắn để thu hồi giống.

2.2. Lên men

2.2.1. Khái niệm về lên men

Lên men theo nghĩa hẹp chỉ các quá trình lên men kỵ khí, các chất để thu năng lượng, mà trong đó hydrogen được tách ra từ một chất và chuyển đến chất nhận cuối cùng là một hợp chất hữu cơ. Lên men theo nghĩa rộng là quá trình phân giải các chất nhờ hoạt động sống của vi sinh vật.

Trong sản xuất công nghiệp, lên men là khâu trung tâm của toàn bộ quá trình công nghệ, mà trong quá trình này xảy ra đồng thời cả hai khâu sinh trưởng - phát triển của chủng vi sinh vật và khâu tổng hợp – tích tụ sản phẩm.

2.2.2. Động học sự phát triển của vi sinh vật trong quá trình lên men

*** Sự phát triển của vi sinh vật trong quá trình lên men gián đoạn**

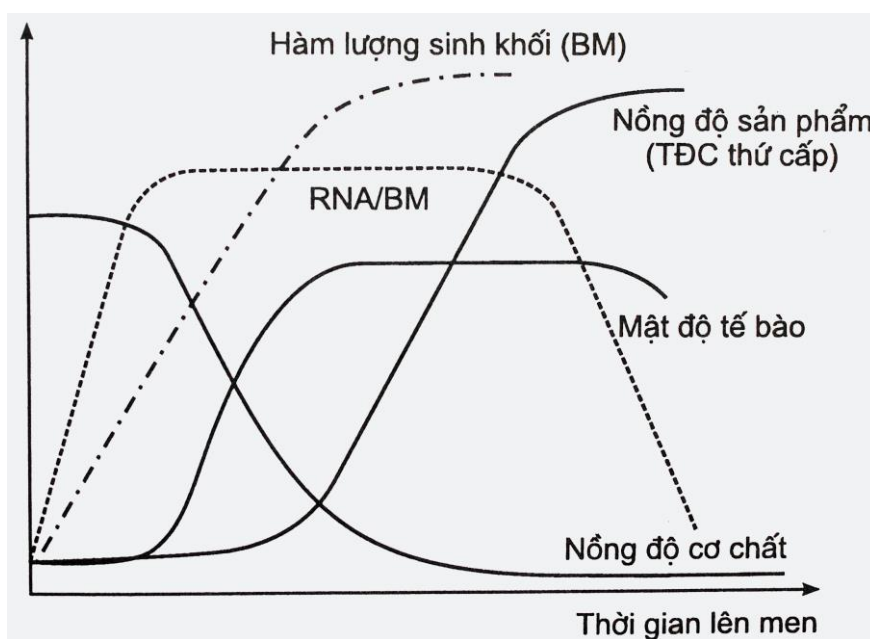
Lên men gián đoạn là các quá trình lên men được tiến hành theo từng mẻ tách biệt nhau. Quá trình này bắt đầu kể từ khi cấy giống vi sinh vật vào trong dịch lên men và có thể vận hành theo các phương án là trong môi trường chỉ chứa một nguồn thức ăn hoặc cũng có thể gồm nhiều nguồn thức ăn khác nhau. Đồng thời, trong thời gian lên men, ngoài việc cung cấp liên tục oxy cho các quá trình lên men hiếu khí, có thể tồn tại hai khả năng là không bổ sung thêm các cấu tử dinh dưỡng hoặc có thể bổ sung một hoặc một vài cấu tử nhất định nào đó vào môi trường.

Trong trường hợp môi trường chỉ chứa một nguồn thức ăn và không bổ sung thêm vào trong suốt thời gian lên men, sự phát triển của vi sinh vật trong môi trường có thể chia làm 4 giai đoạn là giai đoạn thích ứng, giai đoạn phát triển lũy tiến, giai đoạn cân bằng và giai đoạn chết dần.

Giai đoạn thích ứng là thời kỳ đầu của quá trình lên men, lúc vi sinh vật vừa được cấy vào môi trường, do điều kiện sống thay đổi nên chúng cần có một khoảng thời gian nhất định để điều chỉnh hoạt động sống cho thích nghi với môi trường mới. Trong giai đoạn này, cường độ trao đổi chất của vi sinh vật sẽ tăng dần và vi sinh vật sẽ tăng dần về kích thước, song gần như các tế bào chưa tham gia vào quá trình sinh sản. Vì vậy số lượng tế bào trong canh trường ít biến đổi, nồng độ chất dinh dưỡng giảm nhẹ và sản phẩm trao đổi chất mới được tích tụ trong môi trường rất thấp.

Giai đoạn phát triển lũy tiến được bắt đầu khi vi sinh vật đã thích nghi với môi trường mới. Do đó, trong giai đoạn này cường độ trao đổi chất của vi sinh vật xảy ra mạnh mẽ. Hoạt động trao đổi chất cao đã trở thành nguồn cung cấp năng lượng và vật liệu cấu trúc cho quá trình sinh trưởng và phát triển mạnh mẽ của chúng. Kết quả làm cho mật độ tế bào trong môi trường tăng nhanh theo quy luật hàm logarithm, nồng độ dinh dưỡng giảm nhanh, nồng độ các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp cũng tăng nhanh. Vào cuối giai đoạn này do ảnh hưởng của nồng độ thức ăn giảm, sự ức chế ngày càng tăng của các sản phẩm trao đổi chất, tốc độ sinh trưởng và phát triển sẽ giảm dần và quá trình chuyển sang giai đoạn cân bằng.

Sinh khối



Hình 4.2. Đặc điểm động học môi trường lên men gián đoạn

Giai đoạn cân bằng là khoảng thời gian lên men mà mật độ tế bào vi sinh vật trong canh trường hầu như không biến đổi, nguyên nhân của hiện tượng này do nguồn thức ăn trong môi trường đã cạn và sự ức chế của các sản phẩm trao đổi chất đủ lớn, làm cho số lượng các tế bào mới sinh ra dần cân bằng với số tế bào già chết đi. Khi trong môi trường thức ăn đã cạn kiệt, quá trình lên men sẽ chuyển sang giai đoạn chết dần. Nguyên nhân do ảnh hưởng của nguồn thức ăn bị cạn kiệt và sự ức chế mạnh mẽ của các sản phẩm trao đổi chất, dẫn đến hầu như không có tế bào mới sinh ra mà chỉ có tế bào chết đi làm cho mật độ tế bào giảm dần.

Trong trường hợp có hai nguồn thức ăn khác nhau, vi sinh vật thường có xu hướng ưu tiên hấp thụ nguồn thức ăn dễ đồng hóa trước. Khi nguồn thức ăn này cạn

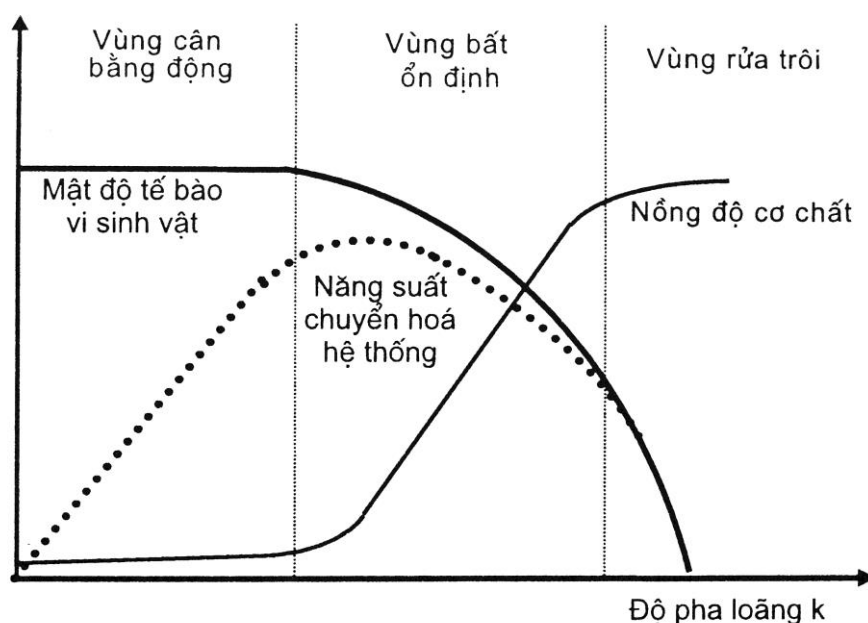
kiệt, vi sinh vật mới điều chỉnh hướng trao đổi chất để sử dụng cơ chất khó đồng hóa hơn, làm xuất hiện thêm các giai đoạn thích nghi với nguồn thức ăn sau. Hiệu ứng này có thể xuất hiện khi lên men có bổ sung định kỳ thêm thức ăn, nếu việc bổ sung gây ra sự biến đổi đáng kể về thành phần môi trường.

Trong thực tế sản xuất, giai đoạn thích ứng hầu như không tạo ra sản phẩm công nghệ song lại kéo dài thời gian lên men, làm giảm hiệu quả khai thác năng lực thiết bị và tiềm ẩn rủi ro nhiễm tạp. Vì vậy nếu không có yêu cầu công nghệ riêng, trong công nghệ lên men cần cố gắng làm giảm hiệu ứng không mong muốn này.

*** Sự phát triển của vi sinh vật trong quá trình lên men liên tục**

Lên men liên tục là quá trình lên men vận hành liên tục theo thời gian, bằng cách người ta liên tục bổ sung thêm môi trường lên men mới đồng thời lấy ra khỏi thùng lên men lượng tương đương để duy trì mức thể tích dịch lên men cân bằng ổn định trong thiết bị. Để thiết lập chế độ lên men liên tục, đầu tiên hệ thống được cấp nguồn dinh dưỡng, cấy giống và vận hành như giai đoạn đầu lên men gián đoạn. Khi chủng vi sinh vật phát triển đến giai đoạn mong muốn và các thông số công nghệ đạt giá trị tương ứng thì người ta bắt đầu bổ sung môi trường mới. Trong lúc bổ sung sẽ điều chỉnh dần tốc độ để xác lập các chế độ lên men. Đến khi các thông số này đạt giá trị cần thiết thì dừng lại và kiểm soát duy trì ổn định động các giá trị này cho đến khi kết thúc. Như vậy, tốc độ bổ sung môi trường là thông số công nghệ có ảnh hưởng lớn và quyết định chế độ làm việc trong thiết bị. Tác động của thông số này được biểu thị qua độ pha loãng k , là tỷ lệ giữa thể tích môi trường bổ sung với thể tích dịch lên men. Động học sự phát triển của vi sinh vật theo sự biến thiên của độ pha loãng có thể chia làm 3 giai đoạn: vùng cân bằng động, vùng bất ổn định và vùng rửa trôi.

Sinh khối



Hình 4.3. Đặc điểm động học môi trường lên men liên tục

+ Vùng cân bằng động: thời kỳ đầu trong quá trình vận hành, giống vi sinh vật được cấy vào sẽ phát triển đạt đến giá trị xác lập dự kiến nhất định, tương ứng với điểm đầu của độ pha loãng $k = 0$. Khi độ pha loãng tăng dần, sẽ cung cấp thêm nguồn thức ăn (từ môi trường mới bổ sung vào) và làm giảm nồng độ các sản phẩm trao đổi

chất. Hiệu ứng này tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, làm cho tốc độ sinh trưởng và phát triển của chúng cũng tăng dần theo. Lượng các tế bào mới sinh ra trong thời kỳ đầu sẽ đủ bù lại lượng sinh khối mất đi khi lấy dịch lên men ra. Như vậy, khi hệ số k càng tăng thì tốc độ sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trong môi trường lên men cũng tăng theo. Kết quả, trong một khoảng biến đổi nhất định của độ pha loãng trong thời gian đầu, mật độ tế bào vi sinh vật và nồng độ cơ chất trong dịch lên men được duy trì ở trạng thái cân bằng động, không phụ thuộc vào sự biến thiên của độ pha loãng.

+ Vùng bất ổn định: tuy nhiên, tốc độ sinh sản của vi sinh vật trong môi trường lên men chỉ có thể tăng đến một giới hạn nhất định, phụ thuộc vào chu kỳ tế bào của từng chủng. Nghĩa là, đến một khoảng giá trị nhất định của độ pha loãng, số lượng tế bào mới sinh sẽ đạt giá trị cực đại. Kể từ đó, nếu độ pha loãng tiếp tục tăng làm cho lượng sinh khối tháo ra khỏi thùng lên men cũng tăng theo, vượt quá khả năng bù đắp của số tế bào mới sinh ra, làm cho mật độ tế bào trong dịch lên men giảm theo. Lượng vi sinh vật trong môi trường giảm đi sẽ không đủ để hấp thu và chuyển hóa hết nguồn dinh dưỡng, làm cho nồng độ cơ chất tăng dần và nồng độ sản phẩm trao đổi chất cũng giảm dần. Kết quả là, trong vùng biến đổi nhất định của độ pha loãng, sự thay đổi giá trị độ pha loãng sẽ gây ra sự biến đổi kéo theo của nhiều thông số công nghệ như: mật độ tế bào, nồng độ thức ăn chưa chuyển hóa, nồng độ sản phẩm tạo thành. Miền biến đổi này của độ pha loãng được gọi là vùng bất ổn định của hệ thống và vùng này kéo dài cho đến khi mật độ tế bào vi sinh vật trong dịch lên men vẫn còn đủ để hệ thống phục hồi trở lại trạng thái cân bằng động khi giá trị độ pha loãng k giảm đi.

+ Vùng rửa trôi: nếu độ pha loãng tiếp tục tăng sẽ làm cho thời gian lưu của dịch trong thiết bị tiếp tục giảm dần, tới giá trị nhỏ hơn chu kỳ tế bào của vi sinh vật. Kết quả lượng dịch mới bổ sung gần như chảy nhanh qua thiết bị lên men và dần kéo hết lượng vi sinh vật trong môi trường, gây ra hiện tượng rửa trôi. Từ vùng động học này, dù có giảm độ pha loãng k cũng không thể xác lập sớm lại trạng thái cân bằng động cho hệ thống, do lượng vi sinh vật còn sót lại trong môi trường còn quá nhỏ. Vì vậy, trong công nghệ lên men liên tục vào giờ người ta cũng triển khai các giải pháp công nghệ phụ trợ nhằm bảo vệ hệ thống để không xảy ra hiện tượng rửa trôi.

2.2.3. Chuẩn bị môi trường lên men và thiết bị

Môi trường nhân giống lớn và môi trường lên men sản xuất nhìn chung thường không được công khai, được xem như là những bí mật thương mại của mỗi nhà sản xuất. Thực tế này cho thấy việc tối ưu hóa thành phần môi trường lên men có vai trò rất quan trọng, quyết định đến năng lực và hiệu quả của quá trình lên men. Sự đa dạng của thế giới vi sinh vật cùng với nhu cầu đa dạng tương ứng về nguồn dinh dưỡng làm cho thành phần môi trường và nồng độ cần thiết của các cấu tử trong môi trường sẽ rất đa dạng và khác nhau, tùy vào chủng vi sinh vật và mục tiêu công nghệ lựa chọn.

Môi trường lên men cần đảm bảo các nguồn thức ăn carbon, nguồn nitrogen, các nguyên tố khoáng và nguyên tố vi lượng nhưng đồng thời phải thích hợp với các mục tiêu công nghệ theo hướng tạo ra nhiều sản phẩm với hiệu suất chuyển hóa cao. Trong phần lớn quá trình lên men, việc thay đổi thành phần môi trường, nồng độ các cấu tử và sự biến thiên nồng độ của chúng trong suốt quá trình có quan hệ chặt chẽ với phổ các sản phẩm tạo thành của quá trình (ảnh hưởng này xuất hiện cả với các cấu tử đa lượng cũng như các cấu tử vi lượng, các ion khoáng, vitamin,...). Với một số công nghệ có yêu cầu sử dụng chất định hướng hay chất phụ gia kỹ thuật (chất phá bọt, chất cảm ứng, chất kìm hãm,...), thì việc sử dụng các cấu tử này đúng thời điểm sẽ có ý

nghĩa rất quan trọng đến chất lượng và hiệu quả chung của quá trình lên men. Với sản xuất lớn công nghiệp, việc lựa chọn nguyên liệu để pha chế môi trường lên men một mặt gắn chặt với yêu cầu công nghệ, nhưng đồng thời đảm bảo được yêu cầu sống còn đối với sản xuất là: khả thi trong điều kiện thực tiễn và đáp ứng được các chỉ tiêu về hiệu quả kinh tế, góp phần hạ giá thành sản phẩm.

Tùy thuộc vào yêu cầu kỹ thuật và công nghệ đặc thù của từng quy trình, môi trường lên men có thể được pha chế chung rồi mới xử lý khử trùng hoặc pha chế theo từng nhóm thành phần và khử trùng riêng, sau đó phối trộn lại với nhau. Để khử trùng môi trường lên men có thể áp dụng các phương pháp sau: thanh trùng ở nhiệt độ cao, lọc qua màng lọc vô khuẩn, sử dụng chất diệt khuẩn hay sử dụng tia năng lượng. Trong đó với các quá trình lên men khắt khe về khử khuẩn, người ta áp dụng phổ biến kỹ thuật thanh trùng môi trường bằng nhiệt độ cao (theo phương pháp gián đoạn 121°C , hay thanh trùng liên tục với thời gian ngắn hơn ở nhiệt độ $137-145^{\circ}\text{C}$), hoặc lọc qua màng siêu lọc (thường áp dụng với từng thành phần riêng rẽ hay các cấu tử có nhu cầu về lượng thấp). Việc xác định chế độ thanh trùng phụ thuộc vào nhiều yếu tố: số lượng vi sinh vật ban đầu và khả năng chịu nhiệt của hệ vi sinh vật trong môi trường cần thanh trùng, yêu cầu chất lượng thanh trùng, hiệu quả truyền nhiệt của thiết bị và của môi trường cần thanh trùng, khả năng chịu nhiệt của các cấu tử trong môi trường ... Thực tiễn cho thấy, việc xác định chế độ thanh trùng hợp lý và việc nâng cao hiệu quả quá trình thanh trùng là rất cần thiết. Tuy nhiên, yêu cầu đòi hỏi vô trùng tuyệt đối môi trường lên men trong sản xuất công nghiệp, với phần lớn các trường hợp, là không thực tế và không kinh tế. Thay vào yêu cầu vô trùng nghiêm ngặt môi trường, trong công nghệ người ta thường sử dụng khái niệm lên men an toàn. Theo đó, nếu gọi số lượng vi sinh vật sót lại sau thanh trùng là N tế bào /ml, thì khi tính toán để xác định chế độ thanh trùng môi trường lên men cho công nghiệp sản xuất không bắt buộc phải đạt $N = 0$, mà trên nguyên tắc có thể áp dụng là:

- + Chọn $N < 1$ với các quy trình công nghệ có thời gian lên men ngắn và có thể chấp nhận rủi ro do nhiễm tạp gây ra.

- + Chọn $N < 10^{-3}$ với quy trình công nghệ thời gian lên men dài và yêu cầu độ an toàn cao.

Khi lựa chọn chế độ thanh trùng, phải bám sát yêu cầu nghiêm ngặt về mức độ vô trùng của công nghệ, gắn liền với tính khả thi và hiệu quả kinh tế chung của toàn quá trình trong thực tiễn, có cân đối đến khả năng phải làm lại môi trường với chi phí bổ sung, so với phương án áp dụng chế độ thanh trùng nghiêm ngặt hơn.

Để hạn chế nhiễm tạp cho thiết bị và môi trường lên men, tùy thuộc vào yêu cầu về mức độ khử trùng, thời gian gần đây nồi thanh trùng môi trường thường được ghép cứng với thiết bị lên men thành hệ thống kín và được thanh trùng đồng thời (in situ sterilization) hay sử dụng thiết bị lên men để thanh trùng môi trường.

Với các quá trình lên men hiếu khí, cần phải có không khí sạch để sục vào dịch lên men. Ngoài ra, để khử trùng các thiết bị, tùy thuộc vào yêu cầu mức độ vô trùng, tùy thuộc vào loại thiết bị mà người ta lựa chọn các phương pháp cho phù hợp. Đồng thời với việc khử trùng thiết bị, cũng áp dụng chế độ khử trùng nghiêm ngặt tương ứng cho các thiết bị phụ trợ khác như hệ thống ống dẫn, van khớp nối, bơm vận chuyển, hệ thống cung cấp nguyên liệu, hệ thống xử lý và cung cấp không khí sạch, hệ thống thoát khí thải....

2.2.4. Xử lý dịch lên men, tách và tinh chế thu sản phẩm

Trong hầu hết quá trình lên men vi sinh, nồng độ các sản phẩm trong dịch lên men thường rất thấp, nên để thu nhận được sản phẩm với độ tinh sạch cần thiết, người ta phải áp dụng hàng loạt các công đoạn tách và tinh chế nối tiếp nhau mới thu được sản phẩm mong muốn. Việc lựa chọn giải pháp kỹ thuật và các thông số công nghệ tương ứng phụ thuộc vào đặc tính của dịch lên men và của sản phẩm cần tách, yêu cầu về độ tinh sạch, khả năng trang thiết bị và nhân lực hiện có...trong điều kiện phải bảo vệ được hoạt tính sinh học cho sản phẩm. Nhìn chung, quá trình tách và tinh chế thu sản phẩm thường chiếm tỷ trọng lớn trong phân bổ chi phí sản xuất. Vì vậy, trong thực tiễn sản xuất, tương ứng với mỗi sản phẩm người ta áp dụng quy trình tách chiết và tinh chế khác nhau. Trong đó các giải pháp xử lý được áp dụng có thể bao gồm: lắng, lọc, trích ly, kết tủa phân đoạn, hấp phụ, tách bằng các kỹ thuật sắc ký khác nhau, cô chân không, kết tinh, sấy nhiệt độ thấp, đông khô...

***Các kỹ thuật xử lý thành tế bào**

Trong công nghệ lên men vi sinh vật, vị trí phân bố sản phẩm và xác định nơi thu sản phẩm có ý nghĩa quyết định đến việc lựa chọn các giải pháp công nghệ xử lý dịch lên men đầu tiên.

Sản phẩm ngoại bào là các cấu tử tạo thành trong quá trình hô hấp vi sinh vật rồi được thải ra ngoài và tồn tại tự do trong môi trường. Để thu nhận sản phẩm này, đầu tiên người ta phải phân ly loại bỏ hay cô lập tách biệt tế bào ra khỏi môi trường sản phẩm, thường bằng phương pháp lắng, lọc, ly tâm hay thẩm tích. Các dạng sản phẩm này có lợi thế là tổng lượng sản phẩm có thể tích tụ vào môi trường lớn và sau khi thu sản phẩm tế bào vi sinh vật vẫn còn nguyên vẹn nên chúng vẫn có thể tích tụ sản phẩm hay người ta vẫn có thể tái sử dụng sinh khối này cho mục tiêu tiếp tục tạo sản phẩm. Tuy nhiên, trong công nghệ lên men, phân bổ chi phí cho quá trình tách và tinh chế thu sản phẩm thường chiếm tỷ trọng lớn. Trong khi đó, nồng độ sản phẩm ngoại bào thường ở mức thấp hơn thậm chí thấp hơn rất nhiều so với nồng độ các cấu tử khác trong môi trường nên cũng hạn chế lớn trong khâu tách và tinh chế.

Sản phẩm nội bào là các cấu tử chỉ được tạo ra và tích lũy ngay trong tế bào vi sinh vật. Để thu nhận sản phẩm dạng này khâu đầu tiên thường được là áp dụng các giải pháp công nghệ tách thu sinh khối; sau đó sử dụng các kỹ thuật thích ứng để phá vỡ thành tế bào, rồi ly tâm thu dịch bào (với sản phẩm nội bào tự do) hay thu xác tế bào (với dạng sản phẩm nội bào liên kết)...Để thu các sản phẩm nội bào, người ta có thể áp dụng các giải pháp công nghệ xử lý thành tế bào – màng tế bào chất thích ứng ngay trong quá trình lên men để các sản phẩm nội bào vẫn khuếch tán được vào môi trường, hay xử lý dịch sinh khối sau ly tâm làm biến đổi đặc tính thẩm thấu của thành tế bào để thu sản phẩm.

*** Các kỹ thuật phân ly rắn – lỏng (hay lỏng – lỏng)**

Là giải pháp công nghệ được áp dụng rất phổ biến trong công nghệ lên men, trong đó các kỹ thuật có giá trị ứng dụng cao là: lắng trọng lực, ly tâm và lọc

+ Kỹ thuật lắng trọng trường là kỹ thuật phân ly khai thác nguyên lý của lực hút trọng trường. Trong kỹ thuật lắng trọng trường, dưới tác dụng của trọng lực, các cấu tử khác pha có tỷ trọng lớn hơn sẽ dần chuyển động xuống phía dưới, còn các cấu tử có tỷ trọng nhỏ hơn sẽ dịch chuyển theo hướng ngược lại... dần dần phân tách được thành từng hợp phần tách biệt nhau. Kỹ thuật này có ưu thế về mức tiêu hao năng lượng thấp và vận hành đơn giản.

Tuy nhiên trong nhiều trường hợp, khi các cấu tử cần lắng phân ly có kích thước nhỏ và khác biệt không đáng kể về tỷ trọng, trong môi trường có đặc tính keo thì tốc độ lắng xảy ra vô cùng chậm hay có thể không thể lắng được. Do vậy, người ta có thể bổ sung vào môi trường các tác nhân có thể thay đổi trạng thái keo bền của dung dịch, làm cho các cấu tử cần tách dễ kết tụ với nhau tạo thành dạng bông lớn và cấu trúc chặt chẽ hơn, do đó chúng dễ lắng và tốc độ lắng nhanh hơn.

+ Kỹ thuật ly tâm: kỹ thuật phân ly trọng lực được xác định nhờ nguyên lý tự nhiên, song do gia tốc trọng trường nhỏ nên tốc độ chậm và không thể phân ly các cấu tử có tỷ trọng xấp xỉ nhau. Để tăng tốc độ và hiệu quả cho quá trình tách, lực ly tâm được xác định để tạo ra động lực cho quá trình phân ly. Trong các thiết bị phân ly ly tâm, người ta có thể dễ dàng xác lập được các chế độ ly tâm rất rộng với lực ly tâm có thể điều chỉnh được và đạt ngưỡng cao gấp hàng vạn lần trọng lực.

+ Kỹ thuật lọc: được áp dụng phổ biến trong công nghiệp lên men, ví dụ tách cặn môi trường, lọc tách sinh khối khỏi dịch lên men, lọc bán thành phẩm... Trong quá trình lọc, dịch lọc được cho chảy qua lớp vật liệu lọc sang phía bên kia bề mặt lọc. Động lực học của quá trình lọc là sự chênh lệch áp suất thủy tĩnh giữa hai bề mặt lọc.

Tùy thuộc vào nhu cầu ứng dụng cụ thể, người ta phát triển ra nhiều dạng thiết bị lọc khác nhau: như thùng lọc bằng đáy, máy lọc ép khung bản, thiết bị lọc đĩa, cột lọc modul... Trong quá trình lọc, các hợp phần bị giữ lại trên bề mặt lọc sẽ làm tăng trở lực lọc và cuối cùng bịt kín bề mặt lọc. Để hạn chế hiệu ứng bất lợi này, người ta có thể bổ sung trước vào dịch lọc các loại vật liệu trợ lọc. Các chất trợ lọc này sẽ tương tác, hấp phụ cặn lọc thành khối kết tụ lớn hơn, nhờ vậy cặn lọc xốp hơn.

*Kỹ thuật làm giàu sản phẩm

Kỹ thuật làm giàu sản phẩm được áp dụng sớm nhất trong lịch sử là kỹ thuật bay hơi, dưới dạng phơi khô nguyên liệu, bán thành phẩm hay thành phẩm. Ngày nay trong công nghệ lên men người ta áp dụng phổ biến các giải pháp làm bay hơi dung môi như: cô đặc hay sấy ở áp suất thường; cô đặc hay sấy chân không. Động học của quá trình này là sự chuyển dịch phân bố của nước từ pha rắn (trong sấy) hay pha lỏng (trong cô đặc) sang pha khí. Tốc độ và hiệu quả của quá trình này phụ thuộc vào hàng loạt các yếu tố khác nhau, trong đó hai yếu tố quan trọng là nhiệt độ và áp suất hơi riêng phần của cấu tử tách. Một điểm cần hết sức chú ý là việc lựa chọn xác lập điều kiện công nghệ phải đảm bảo bảo vệ được hoạt tính sinh học của các sản phẩm cuối cùng có trong vật liệu xử lý.

Giải pháp làm giàu sản phẩm khác cũng dựa trên đặc tính bay hơi của cấu tử cần tách là kỹ thuật chưng cất. Trong kỹ thuật này, nhờ khai thác đặc tính về bay hơi, người ta dễ dàng chưng tách được các cấu tử dễ bay ra khỏi các cấu tử kém bay hơi. Khi lặp lại quá trình bay hơi – ngưng tụ - bay hơi – ngưng tụ nhiều lần trên các hệ thống chưng cất, trong nhiều trường hợp người ta có thể tách phân ly riêng được các cấu tử khác nhau, với độ tinh sạch gần đạt ngưỡng tinh khiết.

*Kỹ thuật tách và tinh chế thu sản phẩm

Bao gồm các giải pháp làm tăng độ tinh sạch và nồng độ các cấu tử tách, hay đơn giản hơn là phân ly cấu tử tách ra khỏi hỗn hợp đầu vào thời gian đầu. Một số kỹ thuật phổ biến và được triển khai rộng rãi trong thực tiễn:

+Trích ly rắn – lỏng (hoặc lỏng – lỏng) là kỹ thuật sử dụng dung môi thích hợp để trích ly các cấu tử từ trong nguyên liệu rắn (trong đó có cấu tử cần tách) chuyển sang pha lỏng; hay từ dung dịch lỏng ban đầu này sang dung môi lỏng khác. Về bản

chất, quá trình trích ly là kỹ thuật khai thác đặc tính về sự phân bố của các cấu tử cần tách trong hệ dị pha và quá trình chuyển pha của cấu tử này từ pha nguyên liệu đầu vào sang dịch thu hồi. Năng lực và hiệu quả của quá trình trích ly phụ thuộc vào hàng loạt yếu tố khác nhau như: nồng độ của các cấu tử trích ly trong nguyên liệu, độ hòa tan của cấu tử trích ly trong dung môi, diện tích và bề mặt tiếp xúc giữa hai pha, điều kiện môi trường trích ly... Căn cứ vào bản chất tự nhiên của nguyên liệu, đặc tính của cấu tử cần tách, người ta có thể lựa chọn các dung môi thích ứng khác nhau, trong đó người ta thường phân hai nhóm là dung môi phân cực –trích ly các cấu tử có đặc tính phân cực; dung môi không phân cực – trích ly các cấu tử không phân cực. Trong các nhóm kỹ thuật này, dung môi rẻ tiền nhất và được khai thác phổ biến nhất là nước, các dung môi khác có thể là ethanol, butanol, eter, acetatethyl,... Cấu tử cần tách khi đã được trích ly sang pha dịch thu hồi sẽ được xử lý tiếp tục bằng kỹ thuật thích ứng đến độ tinh sạch cao hơn và xử lý hoàn nguyên dung môi (trừ trường hợp là nước) và do đó vấn đề công nghệ, kinh tế, môi trường trong hoàn nguyên dung môi cũng là các chỉ tiêu quan trọng để đánh giá lựa chọn giải pháp áp dụng các kỹ thuật này.

+ Kết tủa: là kỹ thuật bổ sung vào môi trường xử lý các tác nhân nhất định gây ra hiệu ứng làm giảm mạnh độ hòa tan của các cấu tử cần tách trong môi trường. Khi đó cấu tử chịu tương tác sẽ dần chuyển sang trạng thái kết tủa rồi lắng xuống khỏi dung dịch. Tùy thuộc vào đặc tính hóa lý của dung dịch mà các cấu tử cần tách có thể bị kết tủa trong điều kiện chọn lọc nhất định, hay kết tủa ở dải nồng độ cao hay thấp khác nhau. Nhờ vậy, khi thay đổi điều kiện kết tủa, người ta có thể phân tách nhóm các cấu tử kết tủa thành các phân đoạn tách biệt nhau.

+ Kết tinh là kỹ thuật chuyển trạng thái cấu tử từ trạng thái hòa tan sang dạng tinh thể không hòa tan trong môi trường. Kỹ thuật này thường được áp dụng trong các công đoạn xử lý dịch sau khi đã cô đặc làm giàu. Trong thực tiễn công nghiệp, người ta thường bổ sung vào môi trường khi bắt đầu kết tinh một lượng nhất định bột mịn nghiền từ các tinh thể, để tạo mầm tinh thể, nhờ đó sẽ làm tăng tốc độ và hiệu quả quá trình...

+ Sắc ký là các kỹ thuật khai thác mối tương tác vận động của các cấu tử tách, trong mối tương tác với pha tĩnh hay dung môi chạy. Trong quá trình sắc ký, các cấu tử tách sẽ chuyển động qua lớp vật liệu cấu trúc bằng các chất mang của pha tĩnh. Tùy thuộc vào bản chất tương tác chủ đạo giữa pha tĩnh với cấu tử được tách, người ta phân biệt sắc ký sàng lọc thường, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực,... Các phương pháp sắc ký có thể cho phép tách phân đoạn các cấu tử với độ tinh sạch cao và có thể thu được các cấu tử tách trong điều kiện có nồng độ thấp hơn nhiều các cấu tử khác có trong môi trường.

Tóm lại, để thu được cấu tử sản phẩm từ dịch lên men, người ta thường phải áp dụng phối hợp một số, hay nhiều giải pháp công nghệ khác nhau. Việc khai thác hợp lý các đặc tính công nghệ của giải pháp kỹ thuật triển khai cho phép nhà sản xuất thu được các sản phẩm với độ tinh sạch cao nhất. Trên thực tế độ tinh sạch của sản phẩm tăng cùng với số công đoạn công nghệ tách và tinh chế triển khai. Song quá trình triển khai bất kỳ một công đoạn nào cũng đòi hỏi trang thiết bị tương ứng và tiêu tốn nguồn lực vận hành đồng thời qua mỗi công đoạn đều phải chấp nhận một phần sản phẩm bị tổn hao.

* Hoàn thiện sản phẩm là các công đoạn cuối cùng của mọi quá trình công nghệ. Các công nghệ này thường bao gồm: làm khô và sấy thành phẩm đã tinh sạch, phối chế với các phụ gia kỹ thuật để đảm bảo ổn định và đồng đều về ngưỡng chất lượng

trong giới hạn công bố của nhà sản xuất, cuối cùng là đóng gói và hoàn thiện bao bì thành sản phẩm thương mại, kiểm định chất lượng sản phẩm cuối trước khi cung ứng vào thị trường.

*Vấn đề xử lý an toàn chất thải bảo vệ môi trường là yêu cầu bắt buộc chung cho tất cả các nhà sản xuất đặc biệt trong các quá trình sinh học ứng dụng, vì các vật liệu sinh học phát tán trong môi trường có nguy cơ tác động rất cao đến hệ sinh thái và trạng thái cân bằng động ổn định của hệ sinh thái. Yêu cầu này bắt đầu ngay từ bước cách ly nghiêm ngặt toàn bộ hệ thống thiết bị lên men đang vận hành với môi trường bên ngoài đến các bước xử lý chất thải. Các công đoạn xử lý đầu tiên với tất cả các chất thải trong công nghệ lên men đều phải xử lý phá hủy trước khi áp dụng các giải pháp xử lý vật liệu hữu cơ thông thường (xử lý khử khuẩn và xử lý phá vỡ cấu trúc các vật liệu sinh học khác như RNA, DNA...)

2.3. Các yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình lên men

2.3.1. pH

pH môi trường ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển và khả năng sinh tổng hợp của vi sinh vật, đó là do sự tác dụng trực tiếp của ion H^+ hoặc ion OH^- đến tính chất keo của tế bào, đến hoạt lực của các hệ enzyme và do tác dụng gián tiếp của pH môi trường đến tế bào. pH đầu tiên tác dụng đến sinh trưởng của vi sinh vật và tạo điều kiện thích hợp cho những giai đoạn đầu của quá trình đồng hoá, tích tụ những bán thành phẩm để tổng hợp những phân tử các hợp chất cần thiết. pH có thể làm thay đổi hướng chiều của các phản ứng, ví dụ: quá trình lên men rượu trong môi trường acid yếu (pH 4 – 5) tạo thành C_2H_5OH và CO_2 , nhưng trong môi trường kiềm lại tạo thành glycerine. Ngoài ra, trị số pH còn điều chỉnh mức độ phân ly các hợp chất của thành phần môi trường, do đó sự hấp thụ chúng vào tế bào cũng thay đổi.

Mỗi loài vi sinh vật có pH tối thích và pH cực tiểu, cực đại riêng. Nói chung vi khuẩn, xạ khuẩn, nguyên sinh động vật thích nghi ở pH 6,5 – 7,5. Nấm men và nấm mốc phát triển thích nghi ở pH 3 – 6. Nhiều vi sinh vật trong quá trình hoạt động sống lại có khả năng tiết ra những chất làm thay đổi pH môi trường, làm cho pH môi trường từ không thích hợp chuyển sang thích hợp hoặc ngược lại. Ví dụ: vi khuẩn lactic lúc đầu tiến hành lên men đường tạo thành acid làm môi trường thay đổi từ pH 6 – 7 chuyển sang pH 5 thích hợp cho hoạt động sống của chúng. Sau đó vì acid quá nhiều pH giảm quá thấp làm vi khuẩn lactic phát triển ngày càng kém. Vì vậy, trong quá trình sản xuất phải luôn luôn theo dõi, kiểm tra và điều chỉnh pH thích hợp cho hoạt động của mỗi loài vi sinh vật.

2.3.2. Nhiệt độ

Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Mỗi loài vi sinh vật chỉ có khả năng hoạt động trong một giới hạn nhiệt độ nhất định, thường chia làm ba điểm: nhiệt độ cực tiểu, cực đại và tối thích. Theo quan hệ của vi sinh vật với nhiệt độ có thể chia làm ba loại: vi sinh vật ưa lạnh có nhiệt độ tối thích từ 5 – 15°C, cực tiểu khoảng 0°C, cực đại khoảng 15 – 20°C. Vi sinh vật ưa ấm có nhiệt độ tối thích từ 20 – 37°C, cực tiểu khoảng 10°C, cực đại khoảng 40 – 50°C, rất phổ biến như nấm mốc, nấm men.... Vi sinh vật ưa nóng có nhiệt độ tối thích từ 45 – 60°C, cực tiểu khoảng 30°C, cực đại khoảng 70 – 80°C.

Nhiệt độ cao có ảnh hưởng rất mạnh và trực tiếp đến vi sinh vật, gây biến tính protein trong tế bào, do đó tế bào chết và enzyme bị đình chỉ hoạt động. Tính chịu

nhệt của các loài vi sinh vật rất khác nhau. Thường nấm men, nấm mốc chết khá nhanh ở nhiệt độ 50 – 60°C. Một số vi khuẩn chịu nhiệt thì 80 – 90°C mới bị tiêu diệt.

Nhiệt độ thấp không ảnh hưởng mạnh như nhiệt độ cao. Thường nhiệt độ thấp không thể tiêu diệt được vi sinh vật, chỉ gây ức chế mọi hoạt động sống của chúng. Điều này liên quan tới sự giảm năng lượng hoạt động của các chất trong tế bào, các phản ứng hoá sinh tiến hành khó khăn hơn.

Do đó đối với từng quá trình lên men cần phải khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng, phát triển và tốc độ tạo thành sản phẩm của vi sinh vật.

2.3.3. Oxygen

Dựa vào mối quan hệ với oxygen của không khí có thể chia vi sinh vật thành hai nhóm: hiếu khí và kỵ khí. Đối với vi sinh vật kỵ khí thì sự có mặt của oxygen không khí sẽ ảnh hưởng xấu đến sự sinh trưởng, phát triển cũng như quá trình tích lũy sản phẩm.

Đối với vi sinh vật hiếu khí thì oxygen là một trong các yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển cũng như quá trình trao đổi chất trong tế bào. Vi sinh vật chỉ sử dụng oxygen hoà tan trong môi trường lỏng. Lượng oxygen hoà tan trong nước thường rất ít. Tế bào sử dụng oxygen để hô hấp và làm giảm lượng oxygen trong môi trường. Vì vậy khi sử dụng vi sinh vật hiếu khí để lên men phải cung cấp oxygen một cách đều đặn, thiếu oxygen nhất thời tại một thời điểm nào đó trong môi trường sẽ làm phá vỡ sự trao đổi chất trong tế bào.

* Ảnh hưởng của oxygen đến sự sinh trưởng của vi sinh vật: nhu cầu oxygen trong các giai đoạn sinh trưởng khác nhau: trong thời kỳ đầu, sinh khối còn ít, tốc độ hoà tan oxygen lớn và thông khí mạnh là không cần thiết. Mức độ thông khí cần tăng dần theo sự tích lũy sinh khối trong môi trường. Như vậy nhu cầu oxygen thay đổi trong quá trình nuôi cấy liên quan với tốc độ sinh trưởng: đầu tiên nó tăng dần đến cực đại rồi lại giảm xuống, thường nhu cầu oxygen cực đại khi mức độ sinh trưởng của vi sinh vật còn chưa ngừng lại, nhưng tốc độ sinh trưởng đã bắt đầu giảm. Lúc này lượng oxygen hoà tan trong dịch nuôi cấy có thể giảm xuống tới số không. Ví dụ: trong sản xuất sinh khối nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, hiệu suất tổng hợp sinh khối tăng dần khi mức thông khí là 0,5 – 1 milimol O₂/lít/phút. Khi tăng tới 4 milimol O₂/lít/phút thì sinh khối giảm chút ít, nhưng nếu tiếp tục tăng thông khí nữa thì sinh khối sẽ giảm nhiều hơn.

* Ảnh hưởng của oxygen đến quá trình trao đổi chất và tích lũy các sản phẩm sinh tổng hợp của vi sinh vật: sự ảnh hưởng này không giống nhau, phụ thuộc vào từng quá trình lên men. Ví dụ: khi nuôi cấy nấm men trong điều kiện kỵ khí sẽ xảy ra quá trình lên men rượu, khi cung cấp oxygen thì nấm men sẽ phát triển tăng sinh khối còn lên men rượu rất ít hoặc không lên men.

Tăng cường độ thông khí sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng và số lượng sinh khối, đồng thời làm khả năng tích lũy các sản phẩm trao đổi chất trong tế bào như: các chất kháng sinh, vitamin, amino acid, enzyme, acid hữu cơ. Song không phải mọi trường hợp tăng cường độ hiếu khí đều dẫn đến việc làm tăng hiệu suất sinh tổng hợp mà nếu độ thông khí quá mức độ thích hợp thì hiệu suất sẽ giảm.

Đối với các quá trình lên men cần phải nghiên cứu ảnh hưởng của cường độ thông khí đối với hiệu suất tạo thành sản phẩm. Trong công nghiệp vi sinh vật không khí được nén qua máy nén, qua hệ thống làm nguội, tách dầu nước, qua lọc để loại hết tạp khuẩn rồi thổi vào thùng lên men.

Ngoài ra còn nhiều yếu tố khác ảnh hưởng đến quá trình lên men như: nồng độ các chất dinh dưỡng trong môi trường, bản chất của môi trường, chủng giống vi sinh vật...

2.3.4. Độ ẩm

Thành phần nước chiếm từ 70 – 90% khối lượng cơ thể vi sinh vật, tất cả các quá trình phân hủy thức ăn và chuyển hóa các chất trong tế bào đều diễn ra với sự có mặt của nước. Thiếu nước, vi sinh vật không phát triển được và lúc này chỉ tồn tại ở dạng nghỉ hoặc bào tử.

Nuôi vi sinh vật trên môi trường rắn – xốp cần quan tâm đến lượng nước, thích hợp thường là 60 – 70%. Đặc biệt trong quá trình lên men xử lý rác thải, nhiệt độ ủ đồng tăng lên, lượng nước bốc hơi nhanh dẫn đến tình trạng thiếu nước nên phải bổ sung nước sao cho vi sinh vật phát triển bình thường.

3. BẢO VỆ QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Muốn cho quá trình lên men được kết quả, ta cần phải tạo mọi điều kiện thuận lợi cho chủng vi sinh vật nuôi cấy được phát triển và hoạt động tối ưu. Muốn vậy, trước tiên phải ngăn cản sự xâm nhập và phát triển của các vi sinh vật lạ. Trong nhiều quá trình lên men thì cần phải vô trùng. Muốn có điều kiện nuôi cấy vô trùng phải tiến hành thanh trùng môi trường, thiết bị và toàn bộ hệ thống van, đường ống, các thiết bị phụ trợ trong dây chuyền sản xuất.

3.1. Khử trùng thiết bị và hệ thống đường ống truyền dẫn (hệ thống CIP)

Môi trường, thiết bị và hệ thống ống truyền dẫn phần lớn được khử trùng bằng hơi ở nhiệt độ 105 – 120°C với áp suất dư 0,05 – 0,1 MPa. Mặt bàn để cấy giống, các miệng bình nhân giống đều phải tráng rửa bằng cồn.

Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt cần phải khử trùng thiết bị, dụng cụ có liên quan đến giống vi sinh vật (thùng nuôi cấy, khay, thùng chứa nước, thùng chuẩn bị dịch huyền phù giống... Các thiết bị này có thể dùng các dịch sát khuẩn để ngâm hoặc lau rửa, xông SO₂ hoặc đem sấy ở nhiệt độ cao ở 160°C ít nhất là 1 giờ.



Hình 4.2. Hệ thống van, đường ống truyền dẫn

Trong phương pháp lên men bề sâu việc khử trùng thiết bị và hệ thống ống truyền dẫn là vô cùng quan trọng. Nếu công việc này không được tiến hành nghiêm ngặt thì quá trình lên men sẽ hoàn toàn bị phá hỏng, không thu được kết quả gì. Khử trùng nồi lên men và hệ thống ống truyền dẫn ở 120°C và làm nguội tới $60 - 80^{\circ}\text{C}$ thì cho môi trường vào. Riêng đường ống dẫn dầu phá bọt cần phải khử trùng ở $125 - 135^{\circ}\text{C}$ trong 1,5 – 2 giờ. Sau khi nồi lên men đã có môi trường, kiểm tra độ kín và thử cánh khuấy thì cho tiến hành khử trùng môi trường cùng với thiết bị.

Ngoài ra, các bộ phận, dụng cụ để tiếp giống, tiếp thêm chất dinh dưỡng, chất điều chỉnh pH...đều phải khử trùng. Các đoạn đường ống có van chặn cần phải thêm van đuôi, khi thanh trùng mở van đuôi cho hơi vào các khe và xả nước ngưng. Các đầu ống lấy mẫu, ống tiếp dịch cần phải có chụp bảo vệ không để tiếp xúc với không khí bên ngoài và trước khi sử dụng đều phải khử trùng đầu ống. Vấn đề vệ sinh và khử trùng nhà xưởng phải được kiểm soát thường xuyên.

3.2. Khử trùng môi trường nuôi cấy bề mặt

Môi trường nuôi cấy bề mặt thường là các hợp chất rắn, xốp, gồm cám, bột và các chất dinh dưỡng. Trong sản xuất công nghiệp môi trường này thường được khử trùng bằng hơi nóng trong thiết bị chuyên dùng với áp suất dư 0,05 MPa để đạt được nhiệt độ $104 - 110^{\circ}\text{C}$. Để tăng hiệu quả khử trùng người ta cho vào môi trường trước khi gia nhiệt một chất kháng sinh là furaxine với tỉ lệ 1,5g cho 100g môi trường hoặc dung dịch formaline 40% với tỉ lệ 0,2% trong nước làm ẩm môi trường. Ngoài ra, người ta còn điều chỉnh pH môi trường thích hợp bằng acid chlohydric, acid sulfuric hoặc acid lactic.

Khử trùng bằng hơi nóng có thể qua hai giai đoạn:

- + Nâng nhiệt độ tới 100°C và đảo khối môi trường liên tục trong 15 – 20 phút.
- + Sau đó nâng nhiệt tới 110°C trong khoảng 60 – 90 phút và cứ 15 phút lại đảo môi trường 3 – 5 phút.

Môi trường sau khi khử trùng chia vào các khay coi như môi trường vô trùng, được làm nguội và được tiếp giống cho vào lên men.

3.3. Khử trùng môi trường nuôi cấy bề sâu

Khử trùng môi trường nuôi cấy bề sâu (môi trường lỏng) có thể thực hiện theo phương pháp gián đoạn hoặc liên tục.

Phương pháp gián đoạn: thường dùng trong trường hợp khối dịch môi trường không lớn, như dịch dùng trong các bình lên men thí nghiệm, các nồi nhân giống và ở các nồi lên men không quá lớn. Tiến hành lên men từng mẻ ngay ở trong thiết bị theo nguyên lý thiết bị hấp áp lực qua một số giai đoạn sau:

- + Khử trùng thiết bị lên men và hệ thống đường ống tiếp xúc với môi trường bằng hơi nóng trực tiếp hoặc gián tiếp.
- + Cho dịch môi trường đã pha chế vào thiết bị (lượng dịch bằng 3/4 thể tích của thiết bị và phải tính thêm phần nước ngưng khi cho hơi trực tiếp vào môi trường).

+ Gia nhiệt tới nhiệt độ thanh trùng. Có hai bước gia nhiệt: cho hơi vào vỏ thiết bị hoặc ống xoắn trao đổi nhiệt khi dịch tới gần 100°C thì cho hơi vào thiết bị trực tiếp với dịch để nâng nhiệt độ tới nhiệt độ tới hạn.

+ Giữ ở nhiệt độ này trong khoảng thời gian thanh trùng cần thiết.

+ Làm nguội dịch ở ngay trong thiết bị bằng cách cho nước vào vỏ hoặc ống xoắn trao đổi nhiệt cùng với hệ thống khuấy làm việc.

Để tránh biến đổi trong thành phần dinh dưỡng của môi trường nên chỉ tiến hành ở áp suất dư $0,05 - 0,1\text{ MPa}$ với nhiệt độ $110 - 120^{\circ}\text{C}$ trong khoảng $1 - 1,5$ giờ từ lúc đạt được nhiệt tới hạn.

Ưu điểm của phương pháp này là tránh được tạp nhiễm do môi trường không phải vận chuyển. Nhưng nhược điểm là thời gian kéo dài. Hiện nay, để rút ngắn thời gian lên men người ta dùng một thiết bị riêng để thanh trùng.

Phương pháp liên tục: tiến hành ở nhiệt độ cao hơn ($140 - 145^{\circ}\text{C}$) và giữ ở thời gian ngắn hơn $5 - 15$ phút ở nhiệt độ này, phương pháp này cho phép đảm bảo an toàn tốt nhất và không làm thay đổi thành phần của môi trường. Thiết bị dùng vào việc này có 3 bộ phận: bộ phận khử khuẩn là cột được gia nhiệt bằng hơi khi môi trường lỏng chảy qua, bộ phận tiếp theo là bình giữ dịch ở nhiệt độ xác định trong khoảng thời gian gần bằng thời gian để diệt tối đa số vi sinh vật. Phần thiết bị này có thể là thùng hình trụ hoặc cột có các vách ngăn hoặc các tầng đĩa để phân tán nhiệt cho đồng đều cả khối môi trường hoặc ở dạng ống xoắn trao đổi nhiệt. Bộ phận giữ môi trường và giữ nhiệt này làm việc ở áp suất dư. Phần thứ ba là bộ phận làm nguội dịch môi trường có hệ trao đổi nhiệt với nước làm việc với áp suất dư $0,03 - 0,05\text{ MPa}$. Thường bộ phận này được cấu tạo theo kiểu ống lồng ống.

3.4. Khử trùng dầu mỡ phá bọt

Các chất phá bọt thường là dầu thực vật, các hợp chất hoạt động bề mặt... Vì các tế bào vi khuẩn ở trong những chất này có độ bền nhiệt cao gấp $2 - 3$ lần so với ở trong nước, nên việc thanh trùng cần phải thận trọng. Công việc này được tiến hành trong một thiết bị riêng ở gần thiết bị lên men và theo phương pháp khử trùng gián đoạn với áp suất dư của hơi là $0,2 - 0,25\text{ MPa}$. Hơi được dẫn qua vỏ kép hoặc ống xoắn ruột gà. Nhiệt độ khử trùng là $120 - 125^{\circ}\text{C}$ trong khoảng $1 - 1,5$ giờ. Dầu và bình chứa dầu sau khi khử trùng làm nguội được giữ ở điều kiện áp suất dư $0,03 - 0,04\text{ MPa}$ bằng khí nén vô trùng. Khi phá bọt dùng khí nén vô trùng đẩy qua hệ thống van đường ống nối với nồi lên men.

3.5. Khử trùng không khí

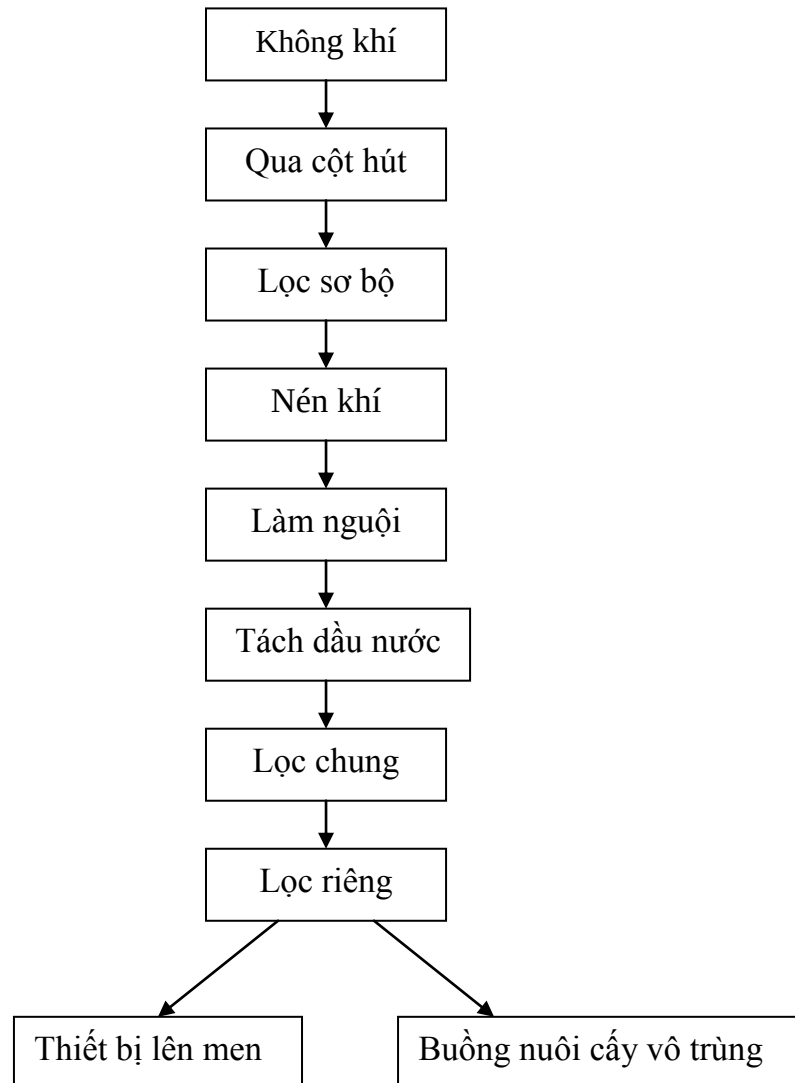
Cung cấp khí sạch cho nuôi cấy bề mặt: là một bộ phận đặt những máy điều hoà và làm sạch không khí thường ở trên hoặc bên cạnh phòng nuôi cấy. Quá trình làm sạch qua các giai đoạn:

- + Không khí qua lọc sơ bộ để loại các bụi bẩn cơ học và phần lớn các vi sinh vật
- + Vào điều hoà tổng có điều chỉnh nhiệt (nếu cần)
- + Vào quạt chung
- + Lọc vi sinh vật
- + Cung cấp cho các máy điều hoà riêng, rồi cấp cho buồng nuôi cấy.

Trong các xí nghiệp sản xuất vi sinh theo phương pháp bề mặt với quy mô lớn người ta thiết kế bộ phận này sử dụng được khí tuần hoàn, không khí được cấp qua

phòng nuôi cấy được đưa lại các máy điều hoà riêng tới 90%, chỉ bay ra khí quyển khoảng 10%.

Cung cấp khí sạch cho nuôi cấy chìm: là cả hệ thống tương đối phức tạp và qua các giai đoạn sau:



Hình 4.3. Sơ đồ lọc không khí

Lọc sơ bộ được cấu tạo bởi hai lớp lưới thép inox đặt ở mặt trước và mặt sau hộp chữ nhật hoặc hình trụ. Giữa hai tấm lưới lọc này được xếp đầy các mảnh sứ hoặc các vòng kim loại. Các mảnh sứ hoặc các vòng kim loại được tẩm dầu nhờn để các loại bụi dễ bám vào đó.

Không khí sau khi nén bị nóng cần làm nguội qua bình trao đổi nhiệt bằng nước, sau đó đưa qua bình nhỏ để tách những giọt dầu do khí nén cuốn theo và những hạt nước ngưng do làm nguội khí. Không khí nén được chứa vào bình lớn với áp suất trung bình 6 ÷ 8 atm và sau đó đưa vào phin lọc chung (tổng lọc) rồi chia làm các phin lọc riêng của từng thiết bị lên men. Phin lọc không khí được làm bằng thép thường, hình trụ có hai vỏ, bên trong được xếp vật liệu lọc bằng bông thủy tinh, bông mỡ, vải, amianthus, tấm lọc từ các loại sợi đặc biệt...

Không khí sạch vô trùng được đưa vào thiết bị lên men qua các bộ phận phun tia kết hợp với khuấy đảo hoặc ống hồi lưu để tăng thêm độ hoà tan của oxygen vào dịch, nhằm cung cấp tối đa nhu cầu oxygen của chủng nuôi cấy để đạt được năng suất lên men cũng như hiệu suất chuyển hoá cao.

3.6. Kiểm tra an toàn vệ sinh (trạng thái vô trùng)

Kiểm tra trạng thái vô trùng của môi trường cũng như cả hệ thống thiết bị trước khi bắt đầu và trong quá trình lên men, đặc biệt là pha sinh trưởng là việc rất cần thiết.

Trong lên men bề mặt: cần kiểm tra vô trùng môi trường sau khi khử trùng và nước làm ẩm bổ sung vào môi trường. Lấy mẫu và cấy vào các hộp petri có môi trường thạch - thịt - peptone hoặc thạch - malt. Sau đó gói hộp bằng giấy sạch và để vào tủ ấm $30 \div 37^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ, đọc kết quả.

Trong lên men chìm: kiểm tra môi trường sau khi khử trùng, trước lúc tiếp giống, sau khi tiếp giống và sau khoảng $4 \div 5$ giờ lại lấy mẫu kiểm tra, mẫu lấy được đựng trong các bình vô trùng. Nếu môi trường sau khi khử trùng, trước lúc tiếp giống thì chia vào các bình tam giác đặt trên máy lắc $30 \div 37^{\circ}\text{C}$ trong $24 \div 36$ giờ, sau khi tiếp giống thì được cấy trên môi trường thịt - peptone trong ống nghiệm và để trong tủ ấm $30 \div 37^{\circ}\text{C}$ trong $24 \div 36$ giờ. Đọc kết quả và đánh giá trạng thái của môi trường cũng như quá trình. Trong trường hợp đọc kết quả của môi trường đã tiếp giống và đang lên men thấy chủng nuôi cấy không phát triển hoặc bị giảm độ đục thì phải lấy mẫu cấy trên môi trường thạch - thịt - peptone. Nếu thấy trên mặt khuẩn lạc của chủng nuôi cấy có những vết trống, chứng tỏ các tế bào bị dung giải, quá trình có thể bị nhiễm thực khuẩn thể, cần kiểm tra lại hoặc đối chiếu vào hiện trạng lên men sẽ cho ta kết quả chính xác.

Từ kết quả kiểm tra vô trùng chúng ta mới yên tâm cho quá trình tiếp tục hoặc phải xử lý. Nói chung, trong quá trình lên men chìm người ta cố gắng làm sao cho cả quá trình làm việc trong trạng thái vô trùng.

4. ĐIỀU KHIỂN QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Trong khi tiến hành lên men, để điều khiển quá trình làm việc ở chế độ tối ưu với các yêu cầu công nghệ là rất quan trọng. Muốn công việc điều khiển có kết quả thì trước hết phải đo các thông số đặc trưng cho quá trình lên men, đó là nhiệt độ, pH, oxygen hoà tan, sự tạo thành bọt, thành phần khí thoát ra, sự phát triển của vi sinh vật và tạo sản phẩm trong môi trường, công suất tiêu thụ của máy khuấy, vận tốc khuấy. Cần phải đo liên tục và có hệ thống.

4.1. Khống chế nhiệt độ, pH, oxygen hoà tan

* Đo nhiệt độ và điều chỉnh nhiệt độ: Tuỳ thuộc sinh lý của chủng nuôi cấy trong khi lên men ta phải giữ nhiệt độ thích ứng trong khoảng dao động từ $0,1 \div 0,2^{\circ}\text{C}$. Để đáp ứng được yêu cầu đó người ta cho nước nóng hoặc nước đã được làm lạnh chảy trong một vỏ kép hay trong bộ phận trao đổi nhiệt thích hợp đặt ở bên trong hay bên ngoài thiết bị lên men.

Ngày nay, kỹ thuật điều chỉnh nhiệt độ đã có thể tự động hoá bằng cách lắp máy điều nhiệt vào một điểm có nước chảy từ vỏ kép hoặc ống xoắn của thiết bị lên men chảy qua, có nhiệm vụ chỉ huy thông qua một role hai tiếp điểm hoặc thiết bị để đốt nóng hay van điều chỉnh nước lạnh hoặc nước nóng tới, nghĩa là có thể đo nhiệt độ thông qua hệ thống vi tính nhờ các đầu đo tự động.

* Đo pH: Đo pH bằng điện cực cắm trực tiếp vào môi trường và cần thiết sẽ điều chỉnh bằng acid hoặc kiềm. Việc tự động cho dung dịch acid hoặc kiềm để giữ pH lên men ở giá trị tối ưu được thực hiện bằng những phương pháp đã dùng trong công nghiệp hoá học, nhưng phải dùng các điện cực đặc biệt để có thể chịu được khử trùng và đặt trực tiếp trong thiết bị lên men.

Để đảm bảo cách điện và kín cho thiết bị lên men, những điện cực đó được đệm bằng những gioăng teflon hoặc silicon và lắp trên một tấm thép không rỉ hàn vào thiết bị lên men. Trong những thiết bị lên men công nghiệp có dung tích lớn, toàn bộ các điện cực (điện cực thuỷ tinh, điện cực chuẩn và điện cực bù trừ nhiệt độ) được lắp trên một mặt bích bằng thép không rỉ, ghép bằng bulông trên thành đứng của thiết bị lên men ở chiều cao thích hợp và cách điện bằng một đệm teflon. Toàn bộ các điện cực để đo pH được nối vào máy tự ghi ở hệ thống máy kiểm soát nối với một van điện từ điều khiển việc cho acid hay kiềm vào thiết bị lên men.

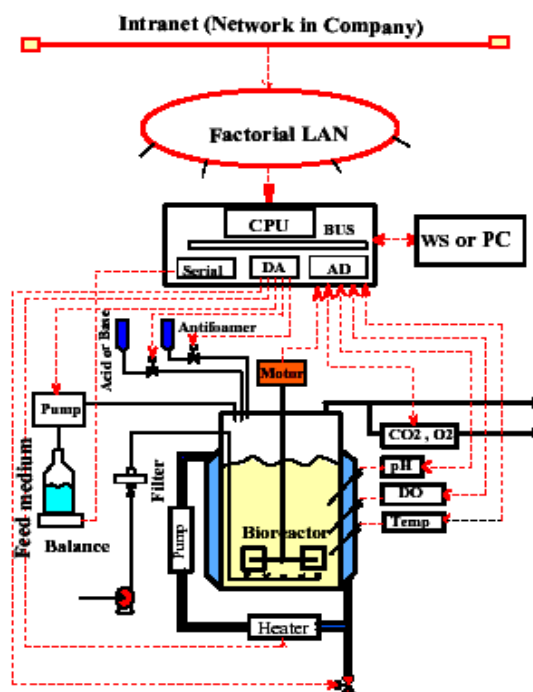
* Đo ôxy hoà tan: Trong quá trình lên men, nhu cầu ôxy của môi trường vi khuẩn thay đổi theo thời gian. Vì thế, người ta chú ý làm thử nhiều máy thí nghiệm nhằm đo ôxy hoà tan và điều chỉnh thông số này bằng cách dùng máy tự động thay đổi lưu lượng không khí và tốc độ khuấy để giữ lượng ôxy hoà tan.

4.2. Kiểm soát sự tạo thành bọt

Khi tiến hành khuấy đảo và sục khí mạnh liên tục, trong các thiết bị lên men sẽ tạo ra rất nhiều bọt. Nó có khuynh hướng trào ra khỏi thiết bị và gây nhiễm tạp môi trường lên men. Ngoài ra bọt khí cũng cản trở sự tiếp xúc giữa tế bào với môi trường dinh dưỡng.

Do vậy trong quá trình lên men, người ta kiểm soát lượng bọt tạo thành và tìm cách phá huỷ chúng. Muốn phá bọt, người ta dùng các chất phá bọt như: các loại dầu thực vật, mỡ cá heo, những alcol đồng đẳng cao, các chất hoạt động bề mặt...

Hiện nay, tất cả các thiết bị lên men đều được lắp thiết bị tự động, ngay khi bọt bắt đầu hình thành là máy tự động nạp vào thiết bị một lượng nhất định chất phá bọt. Cực thăm dò, hay điện cực phá bọt là hai dây dẫn bằng kim loại cách điện với nhau, đặt trên môi trường một khoảng cách nhất định. Khi bọt chạm tới hai đầu dây dẫn nó sẽ nối mạch và nhờ các role sẽ làm cho van điện từ hay bơm hoạt động trong một thời gian quy định bởi một đồng hồ báo phút, đảm bảo nạp chất phá bọt vô trùng vào thiết bị lên men qua một ống có đường kính nhỏ.



4.3. Máy phục vụ đo lường, tự động hoá trong công nghiệp vi sinh

Việc đo và phân tích khí thoát ra khỏi thiết bị lên men cho phép theo dõi sự tiến triển của quá trình lên men và lập bảng cân bằng. Người ta có thể sử dụng máy phân tích khí tự ghi cố định đặt trên đường ống thoát của thiết bị lên men.

Mặt khác, việc đo độ nhớt quan trọng nếu trong quá trình phát triển của vi sinh vật, nhất là các nấm, môi trường lỏng trở thành nhớt. Việc khuấy trộn và thông khí môi trường như thế rất khó. Đại lượng đó được đo đạt bằng một máy quay có tốc độ không đổi ở một nhiệt độ xác định, khi tốc độ giảm thì đó là độ nhớt tăng lên.

Cuối cùng, việc xây dựng đường cong phát triển của một vi sinh vật đôi khi được thực hiện liên tục bằng cách dùng quang kế điện đo mật độ quang học, một trong hai cốc của máy so màu được đậy kín và có dòng môi trường vô khuẩn đi qua rồi trở về môi trường nhờ bơm. Mặt khác, người ta thử dùng máy đo độ đục có bộ phận quang điện bọc kín, đặt ngay bên trong thiết bị lên men để đo mật độ quang. Cũng theo nguyên tắc đó, việc đo lường liên tục số lượng đường do vi sinh vật tiêu thụ trong quá trình phát triển được thực hiện bằng khúc xạ kế.

Tất cả những phương pháp đo và tự động hoá đó được ứng dụng trong kỹ thuật lên men liên tục, nó là tương lai của ngành công nghiệp vi sinh.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Phân loại các phương pháp lên men vi sinh vật.
2. So sánh quá trình động học phát triển của vi sinh vật trong quá trình lên men gián đoạn và lên men liên tục.
3. Hãy phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men
4. Trình bày các giai đoạn chính của quá trình lên men.
5. Hãy nêu các phương pháp thu nhận sản phẩm của quá trình lên men.
6. Trình bày các phương pháp khử trùng trong quá trình lên men.

Chương 5. CÁC SẢN PHẨM CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH

1. SINH KHỐI VI SINH VẬT

Công nghệ lên men thu nhận sinh khối vi sinh vật là quá trình nuôi cấy các chủng thuần khiết hoặc hỗn hợp một số chủng vi sinh vật. Sinh khối là những tế bào vi sinh vật dùng làm nguồn protein trong dinh dưỡng động vật được gọi là protein đơn bào (SCP – single cell protein).

Sinh khối vi sinh vật được sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau như sinh khối nấm men dùng trong sản xuất bánh mỳ, được gọi là men bánh mỳ; sinh khối vi khuẩn dùng làm phân bón; sinh khối vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* sử dụng làm thuốc trừ sâu; hay sinh khối vi sinh vật có hệ enzyme phân hủy chất hữu cơ dùng trong xử lý nước thải, chất thải bảo vệ môi trường.

* Ưu điểm của quá trình sản xuất protein đơn bào từ vi sinh vật:

- Không giống quá trình trồng trọt, chăn nuôi, sản phẩm protein từ vi sinh vật (sinh khối) có thể thu hoạch toàn bộ, dễ dàng, hiệu suất cao.
- Diện tích để nuôi cấy vi sinh vật không lớn.
- Tốc độ sinh sản của vi sinh vật cao, tương ứng với tốc độ sản sinh protein, có thể gấp 100 -1000 lần so với gia súc
- Nuôi cấy vi sinh vật không phụ thuộc vào khí hậu, thời tiết của địa phương
- Có thể phân lập và lựa chọn chủng giống thích hợp cho từng quy trình.
- Sản xuất protein từ các vi sinh vật sử dụng nguyên liệu phi protein – phế liệu hoặc phụ phẩm từ công nghiệp khác. Nguyên liệu sử dụng đa dạng, phong phú và rẻ tiền: như rỉ đường, dịch thủy phân gỗ tạp, rơm rạ, bã mía...góp phần khắc phục ô nhiễm môi trường.

Hiện nay, đa số protein sản xuất từ vi sinh vật mới được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản, chỉ một lượng nhỏ được sử dụng làm thức ăn cho người. Vì muốn làm thức ăn cho con người cần phải có một số nghiên cứu tiếp tục như: loại bỏ tạp chất, tinh chế để thu nhận chế phẩm protein tinh khiết, có thành phần phù hợp với dinh dưỡng của con người và tạo vị thơm, ngon hợp khẩu vị hơn.

1.1. Sinh khối nấm men

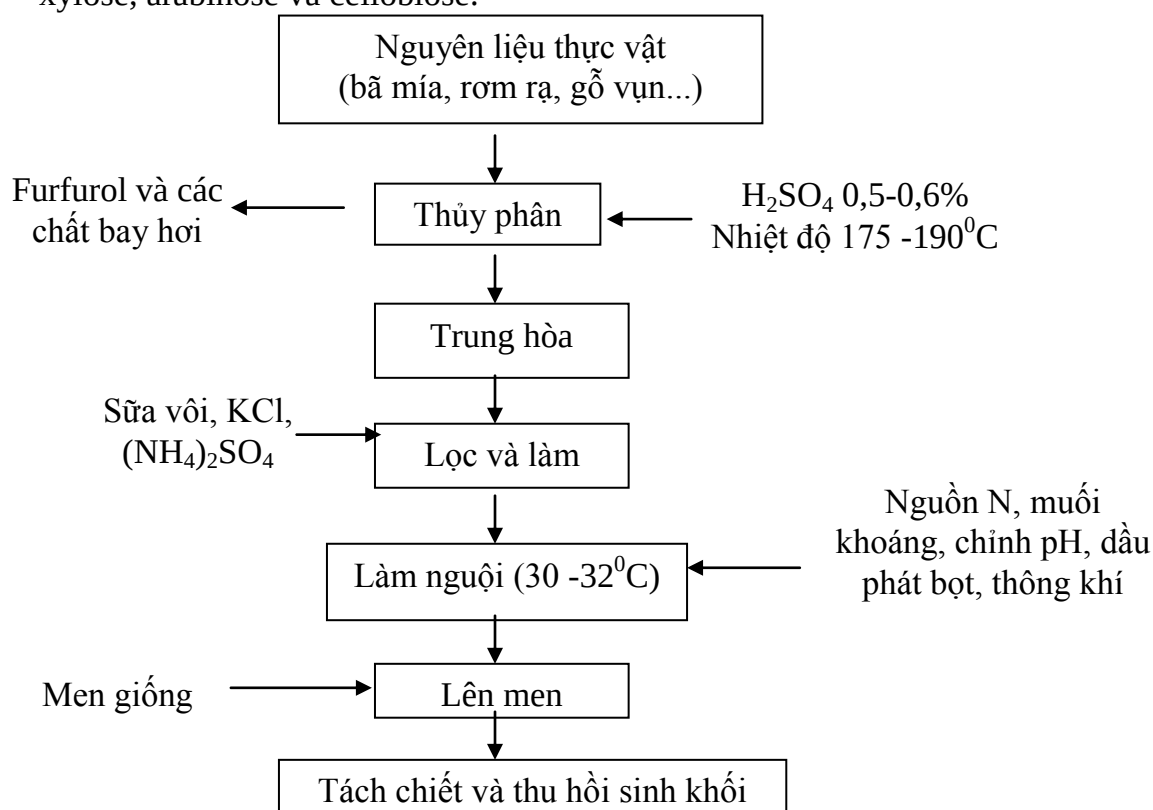
1.1.1. Sản xuất từ nguồn carbohydrate

Nấm men có thể tổng hợp amino acid từ nitrogen, muối amon và từ các nguồn carbon khác nhau: rỉ đường, tinh bột, lactoserum, bã quả, dịch kiềm sulfite, dịch thủy phân nguyên liệu thực vật và bã thải rượu.

Dịch thủy phân nguồn nguyên liệu thực vật hay dịch kiềm sulfite đều được sử dụng để sản xuất nấm men làm thức ăn chăn nuôi. Loài nấm men được sử dụng là *Candida tropicalis* và *C. utilis*. Dịch thủy phân nguyên liệu thực vật được thu nhận bằng cách thủy phân nguyên liệu như bã mía, gỗ, rơm...trong môi trường acid sulfuric nồng độ 0,5% ở nhiệt độ 170 -190⁰C. Phương pháp thủy phân bằng cellulase có nhiều ưu điểm nhưng chưa đáp ứng yêu cầu về hiệu quả kinh tế. Dịch kiềm sulfite là phế thải của công nghiệp sản xuất giấy, được tạo thành khi nấu cellulose và không thể thải ngay vào nguồn nước thải. Thành phần hóa học của dịch kiềm sulfite gồm lignin, hemicellulose, nhựa, chất béo, các muối khoáng và monosaccharide. Cần phải xử lý dịch kiềm sulfite, dịch thủy phân nguyên liệu thực vật để loại bỏ các tạp chất, tạp khuẩn, bổ sung các muối dinh dưỡng và đưa về pH thích hợp cho sự phát triển của nấm men.

Nguồn bã rượu là nguyên liệu để sản xuất nấm men gia súc. Sử dụng chủng nấm men *Candida tropicalis* và *C. utilis*, hiệu suất 12 – 18g chất khô/lít. Dùng nấm mốc *Trichoderma cutaneum* đạt hiệu suất 24 – 25g/l. Bã thải của nhà máy sản xuất rượu, còn chứa 6 – 12% chất khô. Trong bã thải từ rỉ đường chứa (tính theo % chất khô): protein 11 – 12, đường không lên men 4 – 7, glycerine 7 – 9, acid 13 – 20, betaine 8 – 10, glutamate 6 – 9, các amino acid 1 – 3, chất keo, melanoidine, glucoside, phenol, lipid 10 – 15, tất cả các chất hữu cơ chiếm 68 – 72%, hợp chất vô cơ 26 – 32%. Ngoài ra, trong bã rượu chứa nhiều vitamin ($\mu\text{g/g}$): riboflavin 8, acid pantothenic 39, acid nicotinic 21, acid pyridoxyn 30, biotin 1,5 acid folic 0,3. Để có thể sử dụng bã rượu làm môi trường nuôi cấy nấm men cần xử lý qua các công đoạn: khử trùng, tách cặn thạch cao và làm nguội. Khử trùng ở nhiệt độ thấp hơn 98°C trong vòng 1 giờ. Trong trường hợp bã rượu có chứa CaO nhiều hơn 0,8% thì cần bổ sung acid để đạt pH 4 – 4,5 và giữ ở nhiệt độ 80 – 85% trong vòng 1 giờ rồi sau đó làm nguội. Bổ sung các muối khoáng để đáp ứng nhu cầu của nấm men như acid phosphoric hoặc diammonphosphate hoặc superphosphate, ammonium sulfate.

Các carbohydrate không phải là tinh bột có thể thủy phân bằng enzyme cellulase và hemicellulase từ *Geotrichum candidum* và *Trichoderma viride*. Nhiệt độ tối thích là 50°C , pH 4,5 – 5,0. Các enzyme này thủy phân các polysaccharide thành glucose, xylose, arabinose và cellobiose.



Hình 5.1. Sơ đồ sản xuất sinh khối nấm men từ các nguyên liệu thực vật

1.1.2. Sản xuất từ nguồn carbohydrate dầu mỏ

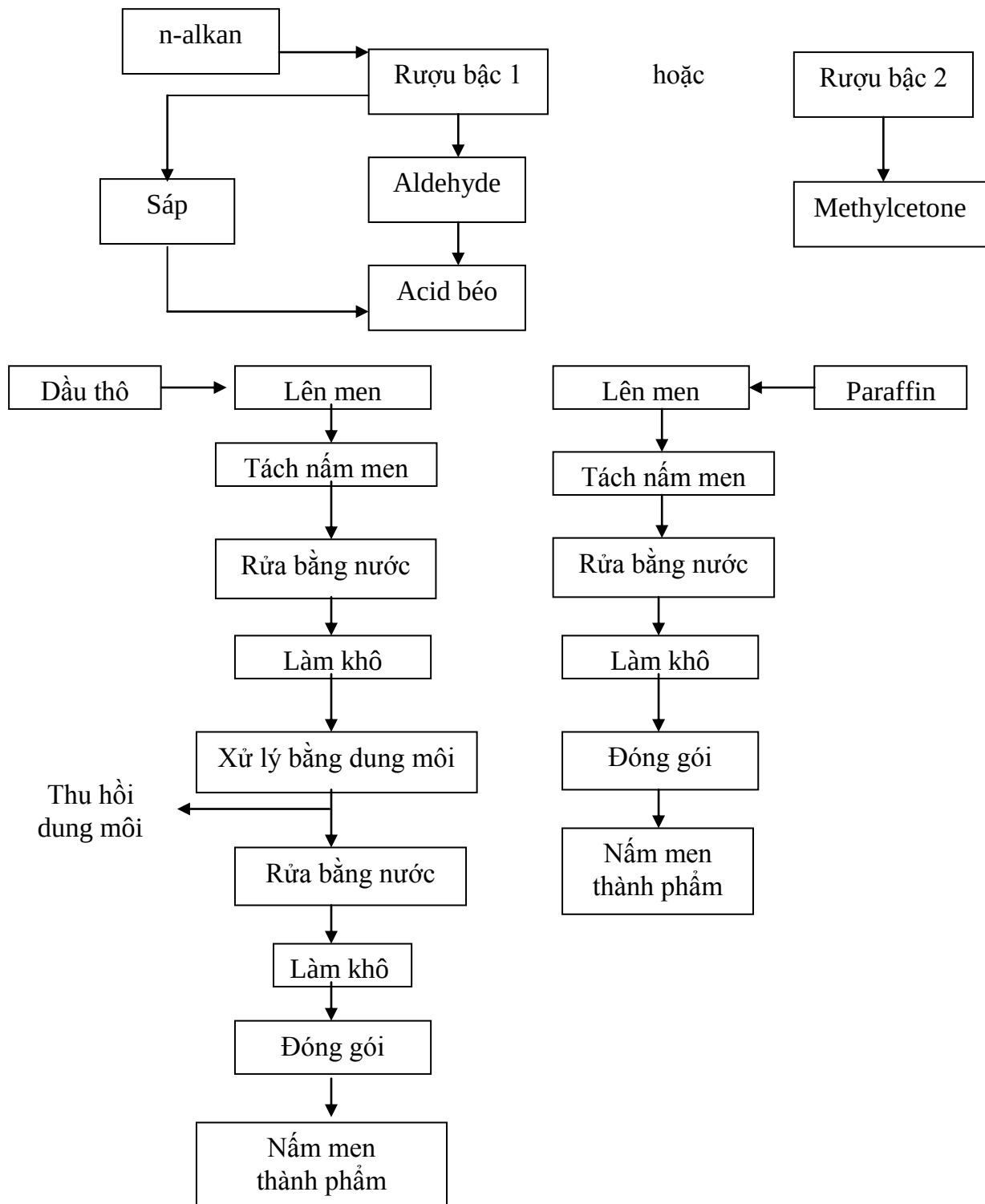
Từ những năm thập kỷ 70 của thế kỷ 20, thế giới chú ý nhiều đến việc sử dụng các sản phẩm của dầu mỏ để nuôi nấm men nhằm mục đích thu nhận sản phẩm giàu protein làm thức ăn gia súc.

Từ 1 tấn paraffin có thể thu được 0,38 tấn protein nấm men. Nhiều nước trên thế giới đã từng có các nhà máy sản xuất protein nấm men từ dầu mỏ với công suất lớn như: Liên Xô cũ 12000 tấn/năm; Nhật 12000 tấn/năm và Ý 1000 tấn/năm.

Quá trình chuyển hóa carbohydrate có thể đi theo các con đường sau:

carbohydrate $\longrightarrow$ rượu bậc 1 (hoặc rượu bậc 2) $\longrightarrow$ Aldehyde $\longrightarrow$ acid béo

* Phân hủy n-alkan



Hình 5.2. Quy trình sản xuất nấm men từ các nguồn carbohydrate

Đồng hóa carbohydrate của các vi sinh vật là một quá trình phức tạp và phụ thuộc vào các điều kiện: khả năng thâm nhập vào tế bào của carbohydrate; sự tồn tại các hệ thống enzyme cần thiết để chuyển hóa carbohydrate; khả năng bền với độc tính của carbohydrate khi ở nồng độ cao của các chủng vi sinh vật.

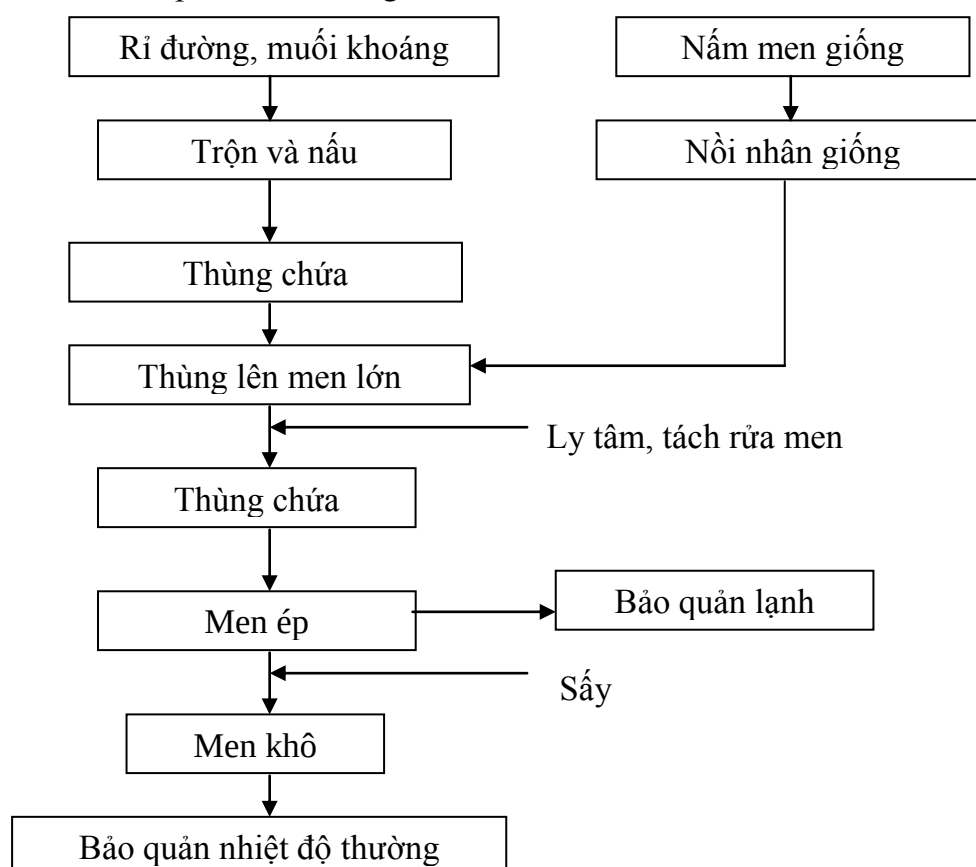
Các chủng nấm men có khả năng sử dụng carbohydrate tốt như: *Candida tropicalis*, *C. maltosa*, *C. lipolytica*, *C. parasilopsis*, *C. intermedia*, *C. robusta*, *C. pelliculose*, *C. scottii*, *C. rugosa*. Ngoài ra còn có các nấm men thuộc giống *Torulopsis* và *Rhodotorula* như *T. coliccolusa*, *T. dattila*, *T. famata*, *T. sake*, *R. glutinis*, *R. gracillis*; một số chủng thuộc giống *Trichosporon*, *Brettanomyces* và *Cryptococcus*.

1.1.3. Sản xuất men bánh mì

* Sơ đồ quy trình sản xuất men bánh mì

Trong công nghệ sản xuất bánh mì, giai đoạn lên men bột mì đóng vai trò quyết định đến chất lượng bánh mì. Quá trình lên men được thực hiện bởi nấm men. Khi đó nấm men sẽ chuyển hoá đường có trong bột mì thành cồn và CO₂.

Chính CO₂ sẽ là tác nhân làm nở bánh mì. Khi CO₂ được tạo thành sẽ bị giữ lại trong các mạng gluten có trong bột mì. Khi nướng bánh ở nhiệt độ cao, CO₂ sẽ tăng thể tích, mạng gluten sẽ căng ra và tạo thành những túi chứa CO₂. Khi nhiệt độ cao hơn, CO₂ sẽ được thoát ra khỏi túi đó và tạo ra những lỗ xốp trong bánh. Khả năng lên men càng mạnh, độ xốp của bánh càng nhiều.



Hình 5.3. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất nấm men bánh mì

Quá trình sản xuất nấm men bánh mì được thực hiện theo các bước theo sơ đồ trên. Nguyên liệu để sản xuất thường dùng là rỉ đường và một số muối khoáng. Sau khi

xử lý rỉ đường qua các bước nấu trộn và nấu thanh trùng, dịch lên men được đưa vào thùng lên men và cấy giống nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đã nhân với tỷ lệ 1%. Sau đó thực hiện quá trình lên men có sục khí. Thời gian lên men 3 – 4 ngày, khi nấm men phát triển mạnh và lượng đường sót trong dịch lên men còn lại dưới 0,1 % thì ly tâm loại nước. Sinh khối nấm men được rửa và bổ sung phụ gia cần thiết được đi sấy khô hay đông thành bánh men ép.

* Phân loại các dạng nấm men bánh mì:

- Nấm men dạng lỏng: là dạng sản phẩm thu nhận ngay sau khi quá trình lên men kết thúc. Người ta thu nhận dịch lên men có chứa sinh khối nấm men đang phát triển này để sản xuất bánh mì. Đặc điểm của dạng này dễ sử dụng và hoạt lực làm nở bánh rất cao, tuy nhiên nếu để nấm men trong dịch nuôi cấy lâu sẽ làm biến đổi chất lượng nấm men, trong đó hoạt tính enzyme zymase và maltase sẽ giảm rất mạnh do đó khó bảo quản, thời gian sử dụng ngắn.

- Nấm men dạng nhão (dạng paste): khối nấm men dạng lỏng thu được đem ly tâm ta thu được nấm men dạng nhão. Nấm men dạng nhão có độ ẩm khoảng 70-75%. Nấm men dạng nhão thường có hoạt lực nở bánh kém hơn dạng lỏng, nhưng thời gian sử dụng lâu hơn và dễ dàng vận chuyển hơn.

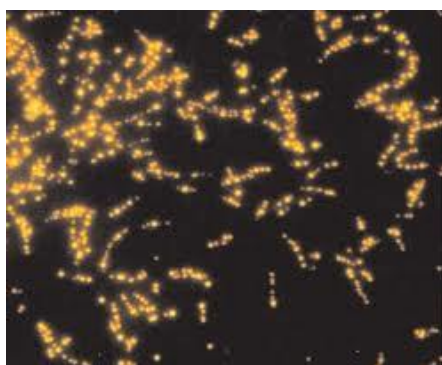
- Nấm men dạng khô: từ nấm men dạng nhão, người ta đem đi sấy ở nhiệt độ < 40°C, độ ẩm < 10%. Đặc điểm của nấm men dạng khô có hoạt lực nở bánh cao, bảo quản được lâu và dễ dàng vận chuyển.

1.2. Sinh khối vi khuẩn

1.2.1. Vi khuẩn sử dụng hydrogen (*Hydrogenomonas*)

Một số vi khuẩn hiếu khí có khả năng sản sinh ra năng lượng bằng cách ôxy hóa hydrogen và carbon từ khí CO₂. Các loại vi khuẩn khác lại hô hấp kỵ khí, cũng có thể sử dụng các loại cơ chất trên nhưng bắt buộc tự dưỡng quang năng. Khả năng sinh sản của chúng khá thấp, không có tính cạnh tranh để sản xuất protein từ các loại vi sinh vật này.

Tác nhân vi sinh vật là các chủng *Hydrogenomonas eutropha*, *H. facilis*, *H. ruhlandii*. Ngoài ra còn có các loài thuộc giống *Actinomycetes*.



Hình 5.4. Vi khuẩn *Hydrogenomonas*

Thành phần môi trường dinh dưỡng đối với chúng rất đơn giản, chúng sử dụng được muối amoniac, muối nitrate, urea làm nguồn nitrogen. Ngoài ra, cần bổ sung vào môi trường nuôi cấy như các ion K, Mg, Ca, Fe, Ni và các anion phosphate và pH tối ưu là 6,5 – 7,5, nhiệt độ 50°C.

1.2.2. Vi khuẩn sử dụng methane (*Methalobacteria*)

Methane là nguồn nguyên liệu sẵn, rẻ tiền và không gây độc trực tiếp. Khả năng ít hòa tan trong nước cho phép dễ dàng thu hồi khí vi sinh vật không sử dụng hết nguồn carbon này.

Vi khuẩn sử dụng methane có rất nhiều trong đất, nước, bùn và ở ngoài biển. Chúng là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí bắt buộc, có chứa catalase và oxydase, thuộc nhóm tự dưỡng vô cơ.

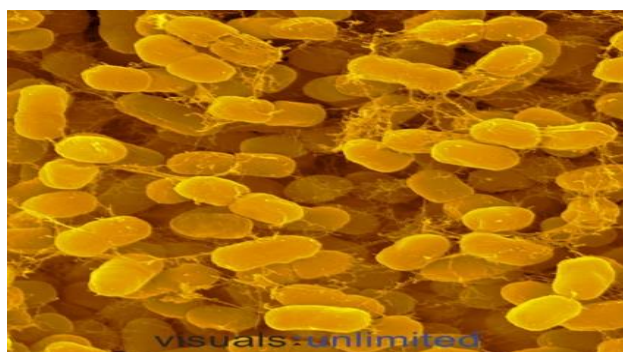
Bảng 5.1. Phân loại vi khuẩn sử dụng methane

Giống	Hình dạng	Tính chuyển động	Bao nhầy
<i>Methalosinus</i>	Hình que hay quả lê	+	+
<i>Methalocycis</i>	Hình que, hình phẩy	-	-
<i>Methalomonas</i>	Hình que	- (+)	+
<i>Methalobacter</i>	Hình que, hình cầu	-	-
<i>Methalococcus</i>	Hình cầu	-	-

Loài hay gặp nhất khi phân lập trong tự nhiên là *Methylobacterium methanicum*, có khuẩn lạc màu hồng. Ngoài các chủng thuộc loài *Methylobacterium*, có nhiều chủng vi khuẩn như *Pseudomonas* và cả nấm men có khả năng sử dụng methane và methanol.

Quá trình thu nhận sinh khối sẽ đạt hiệu quả cao nhất khi sử dụng hỗn hợp khí thích hợp: methane (10-98%), ôxy (20-45%) và CO₂ (0-20%). Tuy nhiên có thể có một số loại vi khuẩn gây nhiễm cũng có thể phát triển trên môi trường carbohydrate. Đối với một số chủng thì methanol có thể gây độc ở nồng độ thấp (0,1%). Muối amoni và nitrate là nguồn nitrogen thích hợp cho các nhóm vi khuẩn sử dụng methane, pH tối thích 6,8, nhiệt độ tối thích chủ yếu đối với các chủng là 15-35°C, tuy nhiên cũng có các chủng ưa nhiệt 45-55°C sẽ cho hiệu suất cao hơn cả.

Sự oxy hóa methane diễn ra như sau:



Hình 5.5. Vi khuẩn *Methylobacterium methanicum*

1.3. Sinh khối vi tảo

Sinh khối của vi khuẩn lam và vi tảo gọi chung là vi tảo, có chứa một lượng lớn các chất có hoạt tính sinh học. Hàm lượng protein cao, ở vi tảo có thể đạt tới 40 – 60% khối lượng khô, còn ở vi khuẩn lam hàm lượng cao hơn 60 – 70%. Hàm lượng amino acid của protein ở vi tảo khá cân đối, trong đó hàm lượng amino acid không thay thế trong protein rất cao, 42%. Giá trị dinh dưỡng của sinh khối vi tảo còn có giá trị do trong chúng còn chứa các vitamin khác nhau như vitamin A, vitamin nhóm B, vitamin K, một số loài còn có vitamin C, vitamin B₁₂. Ngoài ra, chúng còn chứa các sắc tố tự nhiên, có thể khai thác để thay thế các chất màu tổng hợp đang được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm.

1.3.1. Tác nhân vi sinh vật

Các chủng giống vi tảo được chọn để sử dụng sản xuất ở quy mô lớn cần đáp ứng được các đặc điểm sau đây:

- * Tốc độ sinh trưởng nhanh, năng suất quang hợp cao, có khả năng chống chịu với sự thay đổi của điều kiện ngoại cảnh như nhiệt độ, độ chiếu sáng của ánh sáng mặt trời, nồng độ muối cao, chống chịu được một số bệnh.

- * Sinh khối có hàm lượng và chất lượng protein cao, không chứa độc tố

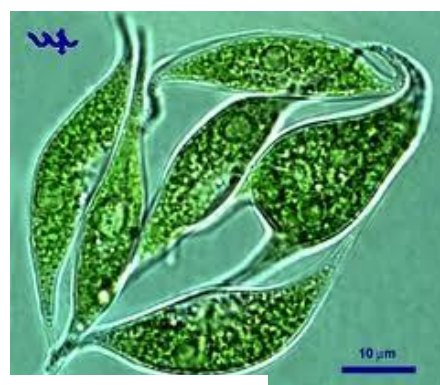
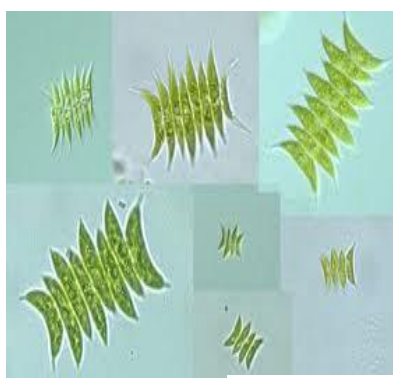
- * Tế bào luôn ở trạng thái huyền phù, dễ thu hồi bằng cách vớt, lọc hay ly tâm.

Trong nuôi trồng hiện nay, người ta sử dụng phổ biến một số loại vi tảo như *Chlorella*, *Scenedesmus* và vi khuẩn lam như *Spirulina*.

Chi *Chlorella* đã được Beijerinck phát hiện từ năm 1890, hiện đã được nghiên cứu nuôi và trồng đại trà từ những năm 1950 tại Mỹ và châu Âu. Là loại tảo đơn bào, kích thước nhỏ (khoảng 1µm), tự dưỡng; một số loài có thể sống không cần ánh sáng và sử dụng nguồn hữu cơ như glucose, acetate. Các loài thường sử dụng trong nuôi trồng để thu sinh khối là *Chlorella elipsoidea*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*.



Hình 5.6. *Chlorella vulgaris*



Hình 5.7. *Scenedesmus acuminatus*

Chi *Scenedesmus* có số lượng loài ít, là sinh vật tự dưỡng nhưng cũng có khả năng phát triển không cần ánh sáng, trong bóng tối chúng sử dụng các hợp chất hữu cơ như đường đơn, acetat và giải phóng CO₂ và H₂O. *Scenedesmus* có khả năng sản sinh các enzyme protease, amylase ngoại bào. Sinh khối *Scenedesmus* có hàm lượng protein cao, khoảng 50 – 55% khối lượng khô và được coi là nguồn SCP đáng chú ý để sử dụng làm thức ăn chăn nuôi. Một số loài thường được sử dụng trong nuôi trồng để thu sinh khối là *Scenedesmus acuminatus*, *Scenedesmus acutiformis* và *Scenedesmus costulatus*.

Giống *Spirulina* có các loài sau đây được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thu sinh khối là *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*.



Hình 5.8. *Spirulina maxima*

Hiện nay *Spirulina* được sử dụng nhiều nhất trong các loại vi tảo do có các ưu điểm sau:

- + Hàm lượng protein trong tảo *Spirulina* đạt 60 – 70% (*Chlorella* chỉ đạt 40 – 50%).
- + Tốc độ sinh trưởng cao, vòng đời ngắn 3 – 5 ngày
- + Có hình dạng sợi lò so xoắn, kích thước lớn (0,2 – 0,5 mm), nổi trên bề mặt nước nên dễ thu hoạch.
- + Tảo *Spirulina* có thành tế bào mỏng, dễ hấp thu
- + Hiệu suất sử dụng năng lượng mặt trời cao 3 – 4,5% (trong khi lúa 0,25%)
- + Hệ số sử dụng carbon cao (50 – 85%), tảo *Chlorella* 30%.

1.3.2. Quy trình công nghệ sản xuất

* Các phương pháp nuôi trồng

Vi khuẩn lam và vi tảo là cơ thể tự dưỡng sử dụng năng lượng ánh sáng mặt trời làm nguồn năng lượng và CO₂ làm nguồn carbon. Tuy các cơ thể này có khả năng phát triển trong điều kiện môi trường khắc nghiệt, nhưng phải đảm bảo các yếu tố dinh dưỡng cần thiết.

Về quy mô sản xuất thường có ba loại:

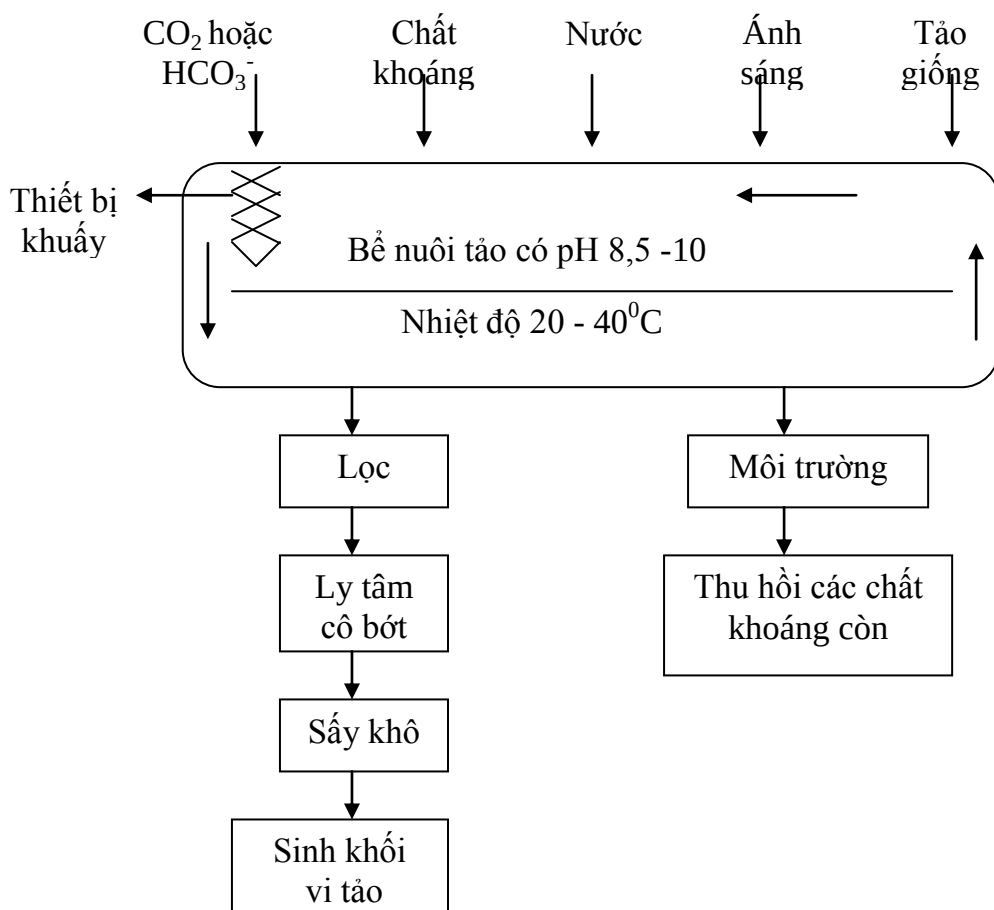
- Nuôi trồng ở quy mô thủ công đơn giản: vi tảo được nuôi ở các ao tự nhiên hay các bể xây bằng xi măng hay trong các thùng gỗ, thùng nhựa. Trong trường hợp này, thông thường người ta không thực hiện sục khí CO₂, không khuấy đảo.

- Nuôi trồng ở quy mô bán công nghiệp: vi tảo được nuôi trong các bể xây hình đường ống, phía trên tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, cấp CO_2 vào môi trường nuôi và môi trường được vận chuyển tuần hoàn trong bể nhờ máy bơm, nhiệt độ môi trường nuôi khoảng $25 - 26^\circ\text{C}$.

- Nuôi trồng ở quy mô công nghiệp: có thể sử dụng hệ thống nuôi cấy kín hoặc hệ thống nuôi cấy mở. Trong cả hai hệ thống đều có quá trình khuấy trộn, sục khí tạo điều kiện cho tế bào tiếp xúc với ánh sáng và khí CO_2 để chủng giống thực hiện quá trình quang hợp.

Hệ thống kín: vi tảo được nuôi trong các bể lên men chủ yếu sử dụng ánh sáng nhân tạo (ánh sáng đèn) có cường độ cao và hệ thống sục khí CO_2 với nồng độ tùy theo từng quy trình cụ thể. Phương pháp này có ưu điểm không phụ thuộc vào ánh sáng mặt trời, không phụ thuộc vào thời tiết khí hậu, kiểm soát được điều kiện nuôi cấy, cho năng suất tạo sinh khối cao. Tuy nhiên giá thành sản phẩm cao nên ít được áp dụng rộng rãi.

Hệ thống mở: sử dụng năng lượng từ ánh sáng mặt trời, sử dụng các bể nuôi có môi trường nước cao khoảng $15 - 20\text{cm}$, khuấy đảo thường xuyên để vi tảo có điều kiện tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, đảm bảo vi tảo không bị lắng xuống đáy bể và môi trường dinh dưỡng phân phối đều cho toàn bộ tế bào trong hệ thống nuôi.



Hình 5.9. Sơ đồ công nghệ sản xuất đại trà sinh khối vi tảo

* Môi trường nuôi trồng và cung cấp CO_2

Tương tự như môi trường nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp khác, thường sử dụng các nguyên liệu thô, rẻ tiền, dễ kiếm mà vẫn đảm bảo được khả năng thu được lượng sinh khối cao, chất lượng tốt. Các nguồn nguyên liệu thường được sử dụng để tạo môi trường nuôi cấy đại trà:

- Nước máy: bổ sung thêm các chất khoáng ở dạng phân bón khô
- Nước biển: bổ sung thêm muối khoáng
- Nước thải từ các khu vực chăn nuôi hoặc từ nhà máy xử lý nước thải.

Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy người ta cung cấp CO₂ bằng nhiều hình thức khác nhau:

- Sục khí CO₂ lấy trực tiếp từ các nhà máy sản xuất bia, rượu để giảm lượng NaHCO₃.

- Sục không khí (có chứa CO₂) kết hợp với việc sục khí CO₂ ngắt quãng.

Để đảm bảo cung cấp khí CO₂ đủ trong quá trình nuôi trồng vi tảo, việc lựa chọn địa điểm nuôi trồng là hết sức quan trọng. Cơ sở nuôi trồng nên gần các nhà máy có nguồn CO₂ như nhà máy bia, rượu hoặc nơi có nguồn nước khoáng nóng giàu HCO₃⁻ hay CO₂ tự do.

* Thu nhận sản phẩm

Có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau để thu hồi sinh khối như ly tâm, vớt, lắng kết hóa học, lắng kết điện trường, tự lắng kết. Các vi tảo có kích thước nhỏ thì thu nhận sinh khối chủ yếu bằng phương pháp ly tâm.

Đối với *Spirulina* có kích thước lớn hơn, phương pháp thu hồi sử dụng chủ yếu bằng phương pháp lọc. Sử dụng màng lọc nghiêng kết hợp với hút chân không để thu nhận *Spirulina* cho hiệu quả thu hồi sản phẩm cao.

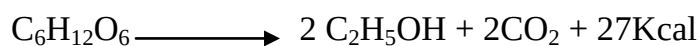
Sau khi tách vi tảo ra khỏi môi trường, sinh khối được cô đặc sơ bộ và được sấy khô bằng sấy đông khô, sấy chân không hoặc sấy quay. Sản phẩm có thể sử dụng trực tiếp hoặc mang đi chế biến.

2. CÁC SẢN PHẨM ĐỒ UỐNG LÊN MEN

2.1. Lên men rượu

2.1.1. Cơ chế của quá trình

Sự lên men rượu (ethylic) là một quá trình sinh hoá phức tạp, có sự tham gia của nấm men *Saccharomyces*, trải qua hàng loạt các phản ứng phức tạp với sự tham gia nhiều enzyme xúc tác khác nhau. Phương trình tổng quát của lên men rượu là:

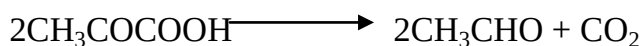


* Theo lý thuyết, sự tạo thành rượu từ glucose trải qua các giai đoạn sau:

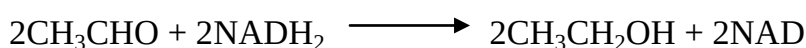
+ Glucose qua chu trình EMP tạo thành pyruvate



+ Pyruvate bị decarboxyl để tạo thành acetaldehyde



+ Sau cùng acetaldehyd bị khử bởi NADH₂

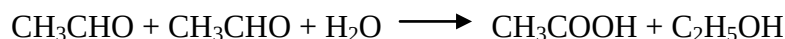


* Sản phẩm phụ của lên men rượu:

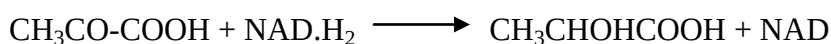
Trong quá trình lên men, ngoài sản phẩm chính là rượu ethylic và CO₂, còn có nhiều chất khác được tạo thành. Bằng phân tích sắc ký khí người ta phát hiện trên 50 chất khác nhau xếp thành 4 nhóm chính: acid, ester, aldehyde và alcol cao phân tử.

- Sự tạo thành acid: Trong quá trình lên men rượu luôn tạo các acid hữu cơ như acetic, lactic, citric, pyruvic và succinic nhưng nhiều nhất là acetic và lactic.

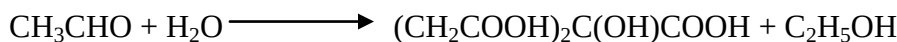
Acetic acid có thể được tạo thành từ phản ứng oxy hóa khử giữa hai phân tử aldehyde acetic, một phân tử bị oxy hóa, phân tử còn lại sẽ bị khử:



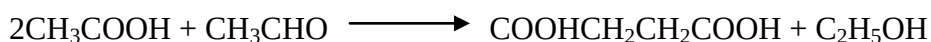
Lactic acid được tạo thành bởi pyruvate dehydronase theo phản ứng:



Citric acid được tạo ra từ aldehyde acetic theo phản ứng:



Succinic acid được tạo thành từ con đường dehydro và trùng hợp hai phân tử acetic acid với một phân tử aldehyde acetic:

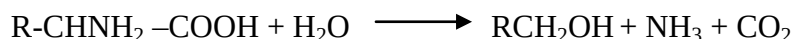


Hoặc được tạo thành do deamine glutamic acid. Trong trường hợp này, aldehyde glyceric tiếp nhận hydrogen và tạo ra cả glycerine. Phương trình tổng quát tạo succinic acid cùng với glycerine từ glutamic acid được biểu diễn như sau:



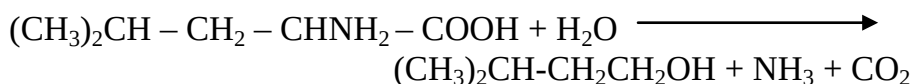
- Sự tạo thành alcol cao phân tử: Một trong những sản phẩm phụ quan trọng được tạo thành trong quá trình lên men rượu là các rượu có số nguyên tử carbon lớn hơn 2. Đó là các rượu propylic, isobutylic, isoamylic, amylic.... Các alcol này có tên chung là dầu fusel, chiếm khoảng 0,4 - 0,5% so với rượu ethylic sẽ tạo ra mùi hôi khó chịu, gây ảnh hưởng xấu đến chất lượng sản phẩm. Vì có mùi hôi nên còn được gọi là dầu khét.

Nguyên nhân hình thành dầu fusel là do nấm men sử dụng nitrogen của các amino acid. Phương trình tổng quát:



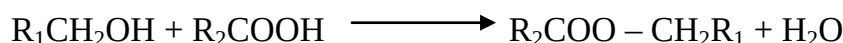
Dầu fusel là hỗn hợp của nhiều alcol khác nhau nhưng chủ yếu là trong đó chủ yếu là isoamylic và isobutylic.

Isoamylic được tạo thành từ isoleucine:

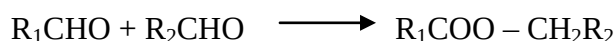


Isobutylic được tạo thành từ isovaline:

$$(CH_3)_2CH - CHNH_2 - COOH + H_2O \xrightarrow{\text{enzyme}} (CH_3)_2CH - CH_2OH + NH_3 + CO_2$$
 ác dụng của enzyme ra các ester tương ứng. Phương trình tổng quát như sau:

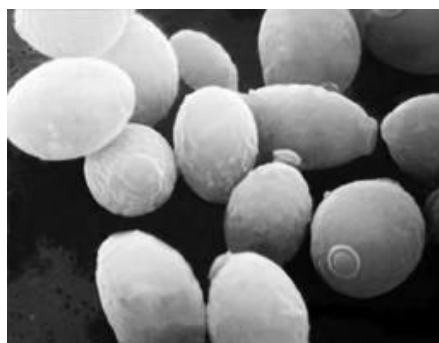
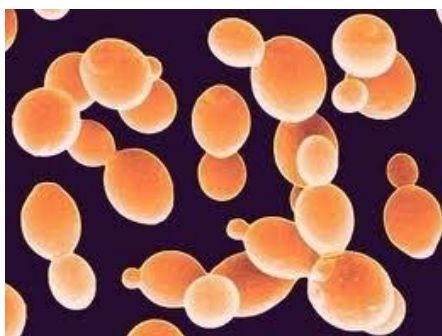


Hoặc do tác dụng của hai phân tử aldehyde:



2.1.2. Tác nhân vi sinh vật

Saccharomyces cerevisiae: tế bào hình ovan, còn gọi là men bánh mỳ hay nấm men bia rượu. Có khả năng lên men 95% glucose theo con đường lên men kỵ khí; 70% glucose theo con đường hiếu khí thông qua chu trình đường phân, pH thích hợp 4,5 – 5. Chúng có thể sử dụng được các loại đường glucose, galactose, maltose, saccharose, không đồng hóa trực tiếp được lactose và nitrate (M. Bugnicouk, 1995). Có thể tích lũy 6 – 12% rượu trong môi trường lên men.



Hình 5. 10. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.3. Công nghệ lên men rượu etylic

Thông thường nguyên liệu dùng cho sản xuất rượu là các loại ngũ cốc, sắn, khoai tây, ri đường, các loại hoa quả,... Ngoài sản phẩm chủ yếu là etylic trong quá trình lên men còn tạo thành khí CO₂, glycerine, một số cồn bậc cao, aldehyd, acid hữu cơ và sinh khối nấm men. Sản xuất rượu bằng phương pháp lên men gồm 3 giai đoạn:

- Chế biến các loại nguyên liệu thành dịch đường
- Lên men đường thành rượu
- Chưng cất và tinh chế cồn
- * Chế biến các loại nguyên liệu thành dịch đường

Các nguyên liệu lên men, trừ các loại đường như các loại chứa tinh bột, cellulose,... cần phải qua quá trình đường hóa. Các chất chứa cellulose như gỗ, rơm rạ, mùn cưa – thường sử dụng các loại acid hoặc enzyme cellulase để đường hóa. Các chất có tinh bột thường được đường hóa bằng enzyme amylase của thóc mầm hoặc của nấm mốc. Nấm mốc dùng trong đường hóa thường là các loài thuộc chi *Aspergillus* và

gần đây còn sử dụng các loài thuộc chi giả nấm men *Endomycopsis*. Chúng sản sinh glucoamylase có tác dụng chuyển tinh bột thành đường.

Hiện nay sản xuất rượu chủ yếu dùng hai nguồn nguyên liệu là tinh bột (gạo, ngô, khoai, sắn...) và rỉ đường. Đã có các công bố tạo được chủng nấm men có khả năng chuyển hóa tinh bột thành đường bằng công nghệ di truyền, có nghĩa là loại nấm men này có khả năng lên men rượu trực tiếp từ tinh bột, nhưng hiệu suất chưa cao vì vậy vẫn chưa được ứng dụng trong sản xuất rượu ở mức độ công nghiệp.

Nguyên liệu chứa tinh bột cần phải nấu chín để chuyển tinh bột sang dạng dễ hòa tan giúp cho quá trình phân giải tinh bột nhờ enzyme amylase được dễ dàng hơn. Nguyên liệu thường được nấu chín ở 130 – 140⁰C dưới áp lực, sau đó mới đường hóa.

Có nhiều phương pháp đường hóa, có thể tóm tắt các phương pháp như sau:

+ Phương pháp đường hóa bằng acid: giai đoạn nấu và giai đoạn đường hóa xảy ra đồng thời. Acid thường dùng là HCl với tỷ lệ 8 – 10% hoặc H₂SO₄ 2 – 5%. Kết quả thu được dịch đường glucose.

+ Phương pháp đường hoá bằng bánh men: là phương pháp sản xuất rượu thủ công. Nấm mốc (có hệ enzyme amylase phân giải tinh bột) được nuôi cấy và phát triển trên môi trường có tinh bột. Tinh bột sau khi được chuyển sang dạng dễ tan dịch hồ hóa không nhất thiết thành dạng dung dịch thì amylase của nấm mốc sẽ dễ dàng phân hủy tinh bột. Nhược điểm của phương pháp này là tinh bột không ở dạng dung dịch nên hạn chế tác dụng của amylase và việc sử dụng bánh men dễ gây nhiễm khuẩn, nên phương pháp này tạo ra nhiều sản phẩm trung gian và hiệu suất tổng thu hồi thấp.

+ Phương pháp maltase: sử dụng chủ yếu là các enzyme α và β -amylase của malt (thóc đại mạch nảy mầm) để thủy phân tinh bột thành các dextrin và maltose. Sản phẩm thu được chủ yếu là maltose. Ưu điểm của phương pháp này là: thời gian hồ hóa tinh bột ngắn, chất lượng rượu không bị ảnh hưởng mà thường tạo ra những hương vị đặc trưng dễ chịu, ít bị nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, phương pháp này cũng có một vài nhược điểm: hiệu suất đường hóa không cao và không triệt để vì phức hệ amylase trong mầm thóc không hoàn chỉnh, tỷ lệ malt sử dụng so với hàm lượng tinh bột có trong nguyên liệu tương đối cao (8 – 20%), giá thành sản phẩm cao.

+ Phương pháp amylo: đây là phương pháp cổ điển, lần đầu tiên được Calmette phân lập từ men thuốc Bắc ở Việt Nam 1892, loại nấm mốc vừa có khả năng đường hóa vừa cồn hóa, lúc đầu gọi là *Amylomyces rouxii* về sau gọi là *Mucor rouxii*. Ưu điểm của phương pháp này là dễ cơ khí hóa, kỹ thuật nuôi gọn; nhưng nhược điểm là đòi hỏi vô trùng tuyệt đối, thời gian lên men dài.

+ Phương pháp myco-malt: sử dụng enzyme amylase (β -amylase, glucoamylase, dextrinase) từ các chủng nấm mốc để đường hóa tinh bột và sản phẩm là hỗn hợp các dextrin, maltose và chủ yếu là glucose. Các chủng nấm mốc này thuộc chi *Aspergillus* như: *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*. Phương pháp này cho phép rút ngắn quá trình sản xuất, thời gian đường hóa chỉ 1 – 3 giờ. Chính nhờ amylase của nấm mốc này người ta có thể dùng các nguồn tinh bột khác nhau để sản xuất rượu. Đây là phương pháp nuôi cấy bề mặt nên khó tự động hóa, cần diện tích rộng và đòi hỏi nhiều công nhân.

Sản xuất rượu từ rỉ đường hay các loại đường mía thì không cần giai đoạn đường hóa. Nấm men dùng lên men rỉ đường thành rượu thường dùng loài khác với lên men từ tinh bột. Để tăng cường dinh dưỡng cho nấm men cần phải bổ sung vào môi trường rỉ đường các muối phosphate và ammonium sulfate hoặc dịch nấm men tự phân.

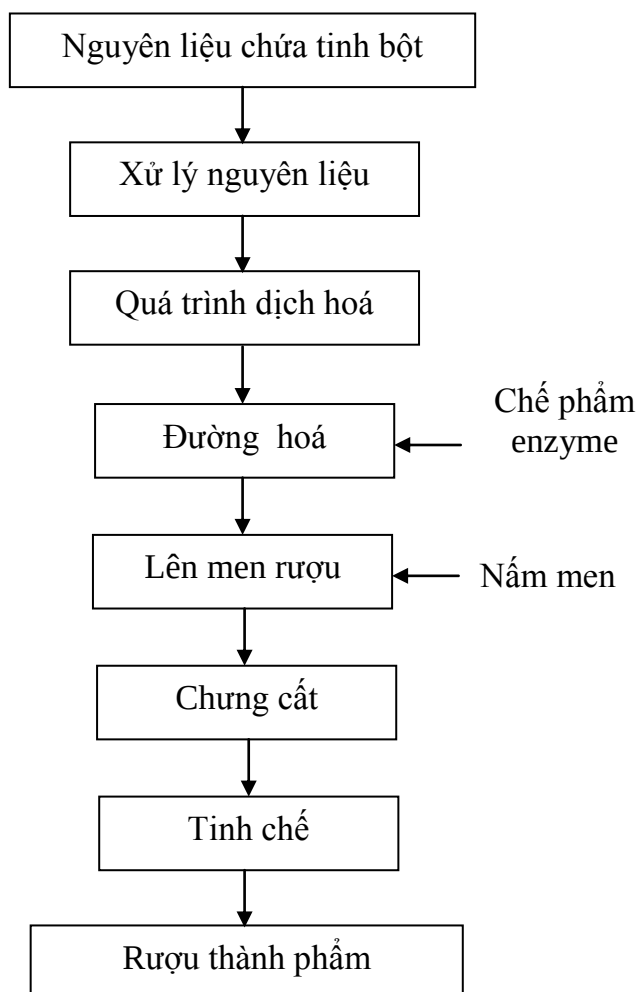
*** Lên men biến đường thành rượu**

Đường hóa xong, dịch đường được làm lạnh tới nhiệt độ lên men và bơm vào thùng cùng với 10% men giống. Ở đây, nấm men sẽ phát triển, chuyển hóa đường thành rượu và CO₂ đồng thời dưới tác dụng amylase, dextrin tiếp tục chuyển hóa thành đường lên men được: glucose và maltose.

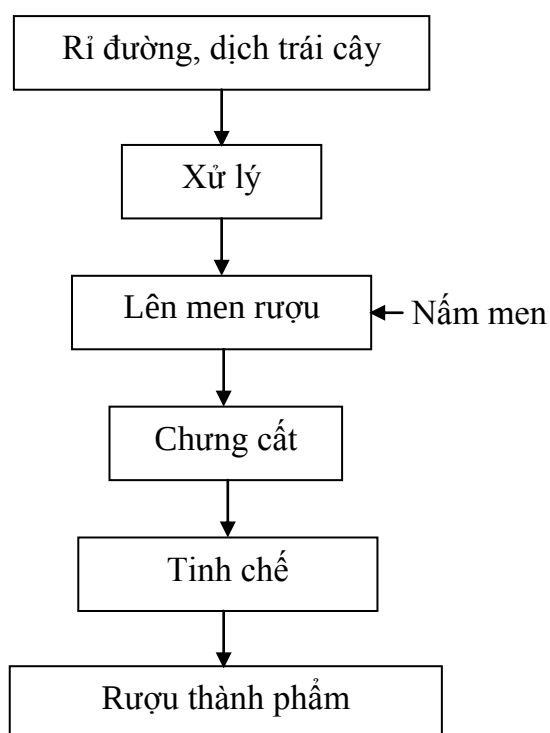
Quá trình lên men được chia thành 3 giai đoạn: lên men sơ bộ, lên men chính, lên men phụ. Trong giai đoạn đầu, thời gian kéo dài gần 60 giờ đặc trưng cho thời kỳ tiềm phát, lượng đường được lên men rất ít. Giai đoạn thứ 2 kéo dài khoảng từ giờ thứ 60 đến giờ thứ 120, sinh trưởng của nấm men và lên men nhanh, đạt tới cực đại, đặc trưng cho thời kỳ lên men chính. Giai đoạn 3 đặc trưng cho lên men phụ kéo dài, tốc độ lên men rất chậm vì lượng đường trong dịch còn rất ít, các dextrin chưa kịp chuyển thành đường.

Trong điều kiện sản xuất, lượng men giống đưa vào nhiều (8 – 10%) nên tác động lên men xảy ra rất nhanh. Trung bình mỗi giờ ở giai đoạn lên men chính nồng độ đường giảm 1%. Thời gian tiềm phát phụ thuộc vào tỷ lệ men giống đưa vào, thường chỉ 5 – 8 giờ. Tiếp đó chuyển sang lên men chính, cuối cùng là lên men phụ. Thời gian lên men phụ dài hay ngắn phụ thuộc chủ yếu lượng enzyme có khả năng phân cắt liên kết α -1,6 glucosid, do dextrin chỉ có thể lên men sau khi đã thủy phân thành glucose hoặc maltose. Điều này không xảy ra đối với lên men rỉ đường.

Sơ đồ sản xuất rượu từ tinh bột



*** Sơ đồ sản xuất rượu từ rỉ đường và dịch chiết trái cây**



Hình 5.11. Sơ đồ sản xuất rượu từ tinh bột, rỉ đường, dịch chiết trái cây

Tốc độ lên men chính phụ thuộc vào giống, còn tốc độ lên men phụ chỉ phụ thuộc vào số α -1,6 glucoside và hoạt độ enzyme thủy phân nó. Thông thường, thời kỳ tiềm phát kéo dài khoảng 2 giờ, sau đó lên men đều đều cho tới khi 92% đường được biến thành rượu và CO_2 . Tiếp đó tốc độ lên men giảm rõ rệt. Thời gian lên men chính kéo dài khoảng 9 giờ. Thời gian lên men phụ kéo dài khoảng 8 giờ. Lên men với số lượng lớn men giống thì giai đoạn tiềm phát hầu như không xảy ra, lên men chính xảy ra rất nhanh và kéo dài 4 giờ, sau đó tốc độ lên men giảm và chuyển sang lên men phụ. Thời gian cũng kéo dài 8 giờ và bằng so với trường hợp dùng ít men giống, muốn rút ngắn thời gian lên men phụ thì cần tăng lượng glucoamylase.

Lên men có thể tiến hành theo phương pháp gián đoạn hoặc liên tục.

+ Lên men gián đoạn: Tùy theo công suất yêu cầu, dung tích thùng có thể lên đến 200m^3 . Số lượng thùng lên đối với dịch đường tinh bột nên là 10 hoặc 20 để dễ bố trí sản xuất và thuận lợi cho làm việc của công nhân. Trước tiên thùng phải được vệ sinh sạch sẽ, các đường ống và van phải được sát trùng thường xuyên. Sau đó toàn bộ hệ thống được thanh trùng bằng hơi nước ở $95 - 100^\circ\text{C}$ kéo dài 50 – 60 phút. Thanh trùng xong, thùng được làm lạnh tới 30°C , tháo hết nước ngưng rồi đóng van đáy.

Men giống và dịch đường ban đầu có thể bơm song song để nấm men được hòa đều ngay từ đầu. Lượng men giống thường chiếm 10% so với thể tích thùng lên men, nhưng dịch đường không được đầy thùng ngay mà thời gian đổ đầy một thùng lên men kéo dài 6 – 8 giờ. Nhờ đó, tỷ lệ men giống lúc đầu tăng và hạn chế được sự phát triển của tạp khuẩn.

Phương pháp lên men gián đoạn thực hiện ở các thùng riêng biệt có ưu điểm là dễ làm, khi nhiễm dễ xử lý nhưng năng suất thu được thấp.

+ Lên men liên tục: đặc điểm của lên men liên tục là dịch đường và men giống được cho vào thùng đầu gọi là thùng lên men chính, số tế bào trong thùng này luôn vào khoảng 100 – 120 triệu/ml. Khi thùng đầu đầy thì dịch lên men sẽ chảy tiếp sang các thùng bên cạnh và cuối cùng là thùng chứa giấm chín.

Lên men liên tục là phương pháp tiến bộ và cho hiệu quả cao. Tuy nhiên khi áp dụng cần tính toán cẩn thận và có biện pháp công nghệ phù hợp, nếu không sẽ phản tác dụng, dễ nhiễm khuẩn hàng loạt dẫn đến giảm hiệu suất lên men.

Giống nấm men *S. cerevisiae* trước khi lên men phải tiến hành nhân giống. Trong quá trình nhân giống phải thực hiện nuôi cấy trong điều kiện vô trùng, quá trình lên men trong sản xuất không cần vô trùng tuyệt đối. Giống được chuyển trực tiếp vào dịch lên men. Nhiệt độ lên men $28 - 30^\circ\text{C}$ khoảng 4 – 5 ngày lượng cồn tích tụ trong dịch 7 – 8% có khi cao hơn thì dừng lại. Sau đó chuyển dịch vào hệ thống chưng cất.

Theo lý thuyết, từ 100kg tinh bột sẽ thu được 71,6 lít cồn. Tuy nhiên trong thực tế chỉ có khoảng 63 lít, vì 0,5 – 1% tinh bột còn lại không bị nấu chín, 2 – 4% không lên men được và 6% tạo sản phẩm phụ.

*Chưng cất: dịch lên men có cả bã sau khi lên men đưa vào chưng cất. Đối với nấu rượu thủ công thì công đoạn chưng cất tương đối đơn giản, chỉ cần nồi kín đun khối dịch sôi, hơi nước cùng với cồn được dẫn qua hệ thống làm nguội bằng nước và rượu thu được có độ cồn cao nhất khoảng 55%.

Trong công nghiệp, người ta chưng cất cồn ở hai mức: dịch và bã lên men được đưa vào tháp cất thô gia nhiệt bằng hơi nước, sau khi thu cồn thô được đưa qua tháp cất để cất thành cồn nguyên liệu hoặc cồn công nghiệp. Muốn có cồn thực phẩm phải qua cất tinh luyện để loại bỏ các tạp chất (dầu fusel, aldehyde, các loại rượu nặng, nhẹ và các tạp chất khác) và nâng cao độ cồn.

Phân loại tạp chất: Theo quan điểm tinh chế cồn, người ta chia tạp chất thành 3 loại: tạp chất đầu, tạp chất trung gian và tạp chất cuối

+ Tạp chất đầu gồm các chất dễ bay hơi hơn ethylic ở nồng độ bất kỳ, nghĩa là hệ số hơi lớn hơn hệ số bay hơi của rượu. Các chất có nhiệt độ sôi thấp hơn ethanol gồm: aldehyde acetic, ethyl acetate, methyl acetate, aldehyde butyric...

+ Tạp chất cuối gồm các chất có nhiệt độ sôi cao hơn ethanol và khó bay hơi, đó là rượu cao phân tử: isoamyllic, isobutylic, isopropyllic, propyllic.

+ Tạp chất trung gian, tùy thuộc vào nồng độ rượu và tính chất vật lý của các tạp chất mà nó sẽ bay hơi cùng với tạp chất đầu hay ở lại với tạp chất cuối. Số tạp chất này khó tách khỏi ethanol khi tinh chế, chẳng hạn: isobutyrate, ethyl isovalerianate.

2.1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và lên men

- Ảnh hưởng của nhiệt độ: Mỗi vi sinh vật đều có nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của chúng. Đối với nấm men *Saccharomyces*, nhiệt độ tối ưu là 28 – 32°C. Tuy nhiên nếu bắt đầu lên men ở nhiệt độ thấp thì khả năng lên men sẽ cao và kéo dài hơn. Khi có điều kiện làm lạnh dịch đường tới 20 – 22°C sẽ hạn chế được phát triển của tạp khuẩn. Sau 8 - 10 giờ, nhiệt độ lên men sẽ tăng đến 28 – 30°C, tiếp đó cần làm lạnh để ổn định nhiệt độ trong giới hạn tối ưu. Ở nhiệt độ cao, hoạt tính của nấm men sẽ giảm nhanh, dễ bị nhiễm lactic và nấm men dại. Ở nhiệt độ 30°C, men dại phát triển nhanh hơn nấm men thuần 2 – 3 lần, còn ở nhiệt độ 35 – 38°C nhanh gấp 6 – 8 lần. Mặt khác khi lên men ở nhiệt độ cao sẽ tạo nhiều ester, aldehyd và gây tổn thất rượu.

- Ảnh hưởng pH: Nồng độ ion H⁺ trong môi trường có khả năng làm thay đổi điện tích các chất của vỏ tế bào, làm tăng hoặc giảm mức độ thẩm thấu các chất dinh dưỡng cũng như chiều hướng của quá trình lên men. Trong điều kiện lên men rượu, pH tối ưu để tạo rượu ethylic là 4,5 – 5,0. Đối với dịch đường từ nguyên liệu tinh bột thường không chế pH 4,8 – 5,2, tạo sự kết hợp giữ cho amylase tiếp tục chuyển hóa tinh bột và dextrin thành đường lên men được. Nếu tăng pH thì dễ bị nhiễm khuẩn, glycerine sẽ tạo nhiều hơn, giảm hiệu suất lên men. Chính vì vậy, khi gây men giống trong điều kiện sản xuất người ta hiệu chỉnh pH đến 3,8 – 4,0 để cải thiện chất lượng nhân giống.

- Ảnh hưởng của nồng độ dịch lên men: Nồng độ dịch đường quá cao sẽ ảnh hưởng dẫn đến làm tăng áp suất và làm mất cân bằng trạng thái sinh lý của nấm men. Rượu được tạo nhiều sẽ ức chế không những các tạp khuẩn mà cả nấm men. Mặt khác, đường nhiều sẽ dẫn đến tổn thất hoặc phải kéo dài thời gian lên men. Ngược lại, nồng độ dịch đường thấp sẽ giảm năng suất thiết bị lên men, giảm hiệu quả kinh tế. Nồng độ chất khô của dịch đường lên men trung bình là 16 – 18%, tương đương 13 – 15% đường, sau khi lên men sẽ nhận được nồng độ rượu trong giấm chín là 8,5 – 9,5%. Ở các nhà máy rượu của nước ta chỉ không chế nồng độ chất khô của dịch đường là 13 – 14%, độ rượu trong giấm chín chỉ đạt 6,5 – 7,5%.

- Ảnh hưởng của hoạt động sục khí: Khi sục khí sẽ cung cấp oxygen hòa tan vào dịch đường giúp cho nấm men phát triển nhanh hơn. Tuy nhiên theo một số nghiên cứu, hoạt động sục khí không cần thiết đối với dịch đường từ nguyên liệu tinh

bột. Sục khí sẽ làm tăng lượng rượu bay hơi, và khi dư oxygen sẽ dẫn đến tạo nhiều sinh khối và aldehyde, làm giảm hiệu suất lên men rượu. Một lượng nhỏ oxygen sẽ được hòa tan trong thời gian khuấy và làm lạnh đủ đảm bảo cho sinh trưởng phát triển và lên men.

2.2. Lên men rượu vang

Rượu vang là loại đồ uống có cồn nhẹ, có giá trị dinh dưỡng, được lên men từ trái cây, không qua quá trình chưng cất và được tàng trữ hàng chục năm tạo nên rượu vang có hương vị đặc trưng và hấp dẫn.

Bảng 5.2. Một số tiêu chuẩn cơ bản của vang thành phẩm

Loại vang	Hàm lượng rượu (ethylic-%V)	Hàm lượng đường (saccharose-g/100ml)	Hàm lượng acid (acid malic-g/l)
Vang khô	9-14	$\leq 0,3$	5-7
Vang nửa khô	9-14	0,5-2,5	5-7
Vang nửa ngọt	9-12	3-5	5-7
Vang ngọt	13-14	14-15	5-7
Vang trắng miệng	14-17	10-16	5-7
Vang gas nhân tạo	10-12	0,5-8	5-7
Vang gas tự nhiên	11-13	0,5-8	5-7
Vang nặng	17-20	6-10	5-7

Rượu vang thường được sản xuất từ nho bằng phương pháp lên men tự nhiên nhờ hệ vi sinh vật có sẵn trong vỏ và thịt quả nho chín. Chủ yếu là nấm men *Saccharomyces vini* lên men đường có trong dịch ép quả nho thành rượu và CO₂. Độ rượu trong lên men rượu vang tự nhiên thường khoảng 9 – 10% và là rượu không qua chưng cất.

Có nhiều cách phân loại rượu vang khác nhau: theo màu sắc của sản phẩm: vang đỏ, vang trắng và vang hồng; theo hàm lượng đường: vang khô, vang dịu, vang ngọt; theo hàm lượng rượu và hàm lượng acid; vang có gas và vang không gas. Một số tiêu chuẩn cơ bản của vang thành phẩm bảng 5.2.

2.2.1. Cơ chế của quá trình

Lên men sản xuất rượu vang bao gồm hàng loạt các quá trình biến đổi sinh học, hóa học và hóa lý khác nhau, trong đó quan trọng nhất là các quá trình biến đổi sau:

- Lên men rượu:



Quá trình lên men đường đơn glucose, fructose thành ethanol và giải phóng CO₂ được thực hiện qua con đường EMP và ATC.

- Sự tạo thành sản phẩm phụ: Cũng chính là các sản phẩm phụ của quá trình lên men ethanol. Quá trình chuyển hóa các sản phẩm phụ cũng rất phức tạp: glycerine có thể chuyển hóa thành ethanol; acetic acid và hàm lượng glycerine tăng lên khi lên men ở nhiệt độ thấp; acid lactic có thể chuyển hóa thành glycerine, ethanol và acetic acid.

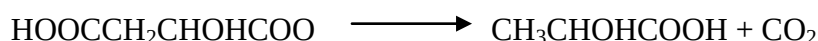
Một số rượu bậc cao khác như propylic, amylic, isobutylic... cũng được hình thành từ một số loại amino acid tương ứng có sẵn trong dịch quả bằng cách khử amine và khử carboxyl, hàm lượng rượu bậc cao có vai trò quan trọng trong việc tạo hương đặc trưng cho sản phẩm.

Acetaldehyde là sản phẩm trung gian trong quá trình lên men rượu và có vai trò quan trọng trong việc tăng giá trị cảm quan của rượu vang ở hàm lượng nhất định. Trong sản phẩm rượu mới lên men thì hàm lượng acetaldehyde thường rất thấp khoảng 75mg/l, tuy nhiên qua quá trình tàng trữ do quá trình oxy hóa của ethyl alcohol hoặc do hoạt tính của màng nấm men mà lượng acetaldehyde trong vang đã tăng đáng kể.

Các acid bay hơi như acetic, lactic, formic, butyric... được hình thành trong quá trình lên men rượu cũng ảnh hưởng nhiều đến chất lượng của sản phẩm. Hàm lượng acid bay hơi trong rượu vang là một chỉ tiêu đánh giá chất lượng sản phẩm và theo tiêu chuẩn của một số quốc gia châu Âu thì hàm lượng acid bay hơi có trong vang trắng $\leq 1,2\text{g/l}$, đối với vang đỏ $\leq 1,4\text{g/l}$.

Các sản phẩm phụ của quá trình lên men rượu đóng vai trò quan trọng đối với giá trị cảm quan của sản phẩm. Tuy nhiên quá trình hình thành và hàm lượng của các sản phẩm phụ lại phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện lên men như độ pH, hàm lượng đường, hàm lượng và chất lượng men giống, nhiệt độ...

- Sự chuyển hóa L – malic acid và citric acid: Trong môi trường có malic acid thì vi khuẩn lactic sẽ chuyển hóa malic acid thành lactic acid theo phương trình tổng quát sau:



Quá trình này được gọi là quá trình lên men malolactic được thực hiện nhờ là enzyme malolactic (MLE), đáng chú ý là sự có mặt của enzyme malatedecarboxydase chuyển hóa L – malat thành L – lactat và giải phóng CO_2 làm cho rượu vang có vị chua dịu.

Trong quá trình lên men malolactic thì citric acid có trong dịch quả cũng được chuyển hóa thành diacetyl, acetone và 2, 3 – butylen – glycol, đây là các chất tiền thân tạo hương thơm đặc trưng cho rượu vang.

2.2.2. Tác nhân vi sinh vật

- *Saccharomyces vini* (*Saccharomyces ellipsoideus*) đâm chồi liên tục hình thành hệ sợi giả, nấm men của rượu vang nho có khả năng sinh invertase ngoại bào để chuyển hóa saccharose thành fructose và glucose. Vì vậy, có thể sử dụng *S.vini* để lên men rượu từ dịch quả có bổ sung thêm saccharose ở hàm lượng cao. Có khả năng hình thành tới 17 – 18% cồn, kết lắng nhanh sau khi kết thúc quá trình lên men.

- *Saccharomyces cerevisiae* var *ellipsoideus*: có hình ellip, kích thước tương tự *Saccharomyces vini*. Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy *S. cerevisiae* có khả năng lên men dịch có hàm lượng đường cao và có thể tạo được 18 – 20% cồn, khả năng kết lắng, tạo hương, vị đặc trưng cho rượu vang. Được sử dụng trong sản xuất vang có độ cồn cao.

- *Saccharomyces oviformis* có khả năng chịu độ cồn cao, không lên men galactose. Sản phẩm tạo thành có thể đạt tới 18% cồn, có hương, vị khá tốt, thường được sử dụng để sản xuất các loại vang khô.

- Vi khuẩn lactic thuộc các giống *Pedicoccus* và *Leuconostoc*, đặc biệt là chủng *Leuconostoc oenos* có khả năng phát triển trong môi trường rượu vang có độ cồn cao,

pH thấp $\leq 3,5$ và khả năng lên men acid malic thành acid lactic có thể đạt từ 75 – 96% (Davis và cộng sự, 1986). Quá trình chuyển hóa acid malic thành acid lactic được thực hiện bởi vi khuẩn lactic giúp cho rượu vang có vị chua dịu hơn và chất lượng tốt hơn.

2.2.3. Công nghệ lên men rượu vang

*Nguyên liệu để sản xuất rượu vang

Nguyên liệu được coi là yếu tố hàng đầu, quyết định đến chất lượng của rượu vang. Từ lâu, nguồn nguyên liệu chủ yếu để sản xuất rượu vang ở các nước vẫn là dịch ép quả nho chín. Các giống nho được dùng cho sản xuất rượu vang được tuyển chọn, chỉ dùng cho sản xuất rượu vang và được trồng ở một số vùng nhất định với chế độ canh tác riêng biệt để sản xuất được một số loại vang nổi tiếng.

Một số chỉ tiêu chất lượng của nguyên liệu dùng trong sản xuất rượu vang:

+ Hàm lượng đường: là chỉ tiêu chính đánh giá chất lượng nguyên liệu, các giống nho được lựa chọn để sản xuất vang cho đến nay hầu hết đều có hàm lượng khá cao từ 18 – 25%. Trong dịch ép quả nho hàm lượng đường khử có thể chiếm 85 – 90%, còn saccharose chỉ có khoảng 10%.

+ Thành phần và hàm lượng acid: hai loại acid chủ yếu của nho là D-tartric và L-malic, trong đó tartric là acid mạnh, là chất đệm để giữ rượu ở pH rất thấp. Trong sản xuất rượu vang người ta ưa dùng loại quả có hàm lượng acid malic thấp. Ngoài ra, trong dịch nho cũng có một lượng nhỏ L – citric, acid oxalic, acid gluconic.

+ Pectin: trong một số loại quả chín pectin chiếm tỷ lệ trung bình từ 0,02 – 0,6% chủ yếu ở dạng keo và araban. Pectin có trong thành phần dịch lên men và trong rượu vang sẽ làm tăng độ nhớt và bột của sản phẩm, ảnh hưởng đến giá trị cảm quan. Trong quá trình lên men vang, khoảng 30 – 90% pectin bị kết tủa do hoạt tính pectolytic của nấm men và cặn trong vang. Để tăng chất lượng cho vang, người ta bổ sung enzyme pectinase để phân giải pectin có trong dịch quả trước khi tiến hành lên men.

+ Tanine: có chủ yếu ở cuống, vỏ và hạt quả. Sự có mặt của tanine trong rượu vang sẽ làm cho rượu có vị chát và độ trong được tốt hơn nhưng khi hàm lượng tanine trong dịch lên men càng nhiều sẽ ức chế hoạt động của nhiều loại enzyme làm giảm quá trình lên men rượu. Vì vậy đối với các loại quả có hàm lượng tanine cao trước khi đưa vào sản xuất rượu vang người ta phải sử dụng gellatine, albumine hoặc nước vôi trong để loại bỏ bớt tanine trong dịch lên men.

+ Các loại vitamin: là thành phần chủ yếu có trong dịch quả và có vai trò rất quan trọng đối với sự sinh sản, phát triển của nấm men cũng như chất lượng của rượu vang. Trong dịch quả nho có đầy đủ các loại vitamin như vitamin C, biotine, vitamin K, thiamine, riboflavin, pyridoxine, vitamin B6, vitamin PP... là nguồn dinh dưỡng rất quan trọng đối với nấm men và nhiều loại vi khuẩn khác trong quá trình lên men vang, đồng thời cũng là một trong những thành phần đặc trưng nhất của vang.

+ Các loại enzyme: trong dịch quả nho người ta đã phát hiện được các enzyme: peroxyase, polyphenoloxidase, tannase, invertase, pectinase, catalase, esterase, dehydrase,... có liên quan đến quá trình chín, hình thành màu của quả.

Quả sau khi thu hái được vận chuyển ngay về nơi sản xuất, được rửa kỹ bằng nước để làm sạch các loại bụi bẩn bám trên quả rồi được chuyển sang thiết bị tách cuống và nghiền quả thu dịch nho. Mục đích chính của việc nghiền nho là thu hồi được dịch nho nhưng không làm vỡ hạt và cuống để hạn chế lượng tanine trong dịch.

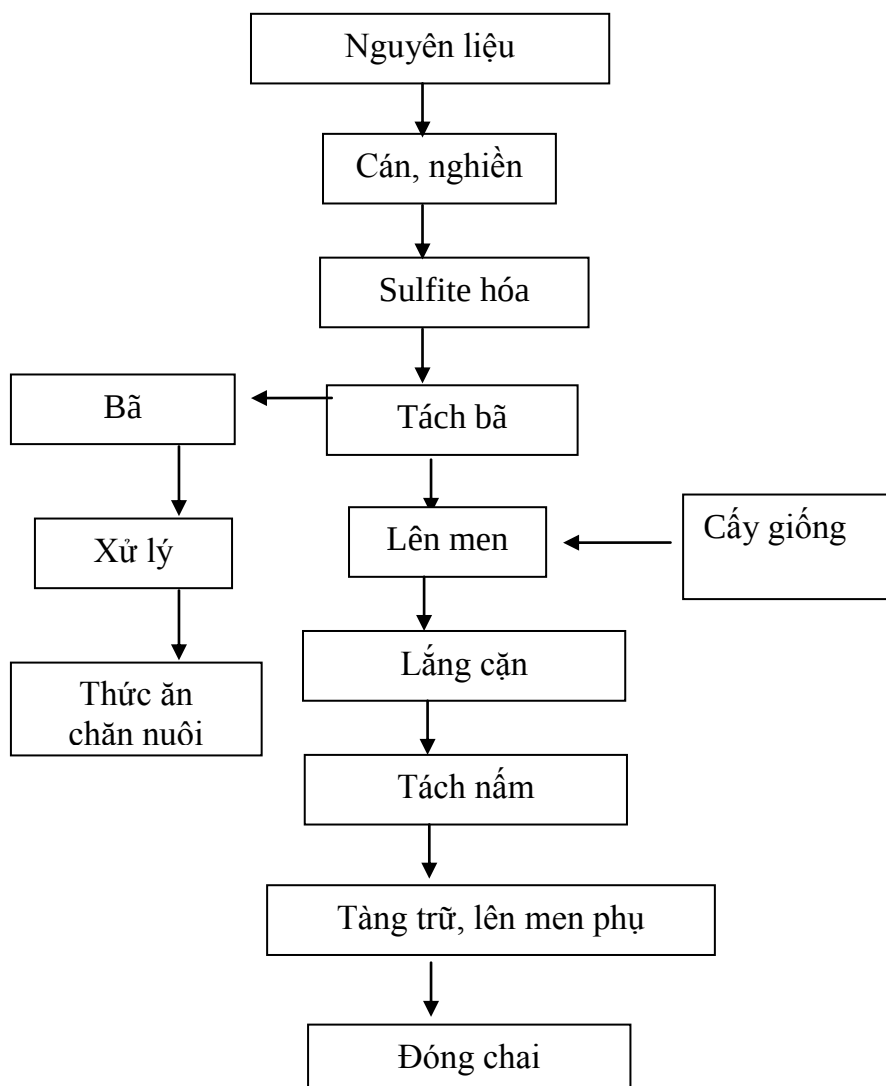
Sau khi nghiền quả, toàn bộ hèm nho gồm dịch nho, thịt quả và vỏ nho được bơm chuyển vào thiết bị lên men chính. Dịch quả tiếp tục được xử lý bằng nhiệt độ cao hoặc SO_2 với hàm lượng 120 – 150mg/l để ức chế và tiêu diệt các loại vi khuẩn và nấm men dại không có lợi cho quá trình lên men và chất lượng sản phẩm.

Quả nho ép được 85 – 95% dịch quả chứa glucose, fructose, acid malic, acid citric, acid tartaric, tanin, tinh dầu, nhựa, sắc tố...rất thích hợp để lên men. Rượu vang thành phẩm thường có độ rượu 9 – 14%, cũng có loại tiếp tục được lên men phụ tăng lượng CO_2 hoặc bổ sung CO_2 (rượu champagne), có loại bổ sung thêm rượu để tạo thành rượu có độ rượu cao 21% (rượu Vermouth, rượu Fortified).

*Lên men sản xuất vang

- Nhân giống nấm men

Quá trình nhân giống nấm men trong sản xuất rượu vang ở quy mô công nghiệp được thực hiện ở điều kiện vô khuẩn. Môi trường sử dụng cho nhân giống là dịch ép quả đã được bổ sung các thành phần cần thiết như acid, khoáng, nitrogen, oxy... và xử lý vô khuẩn bằng phương pháp thanh trùng Pasteur hoặc bằng SO_2 . Hàm lượng ôxy hòa tan trong dịch nhân giống được khuyến cáo là 6,0 – 7,0mg/l. Thông thường thời gian nhân giống diễn ra 24 – 30 giờ, tùy theo chủng nấm men và môi trường nhân giống để lên men vang. Thời gian để bổ sung nấm men thường sau 2 giờ, sau khi tiến hành bổ sung SO_2 để xử lý men dại và vi khuẩn. Tỷ lệ dịch giống nấm men để nhân giống khoảng 3 – 7%, tương đương $4 - 10^6$ tế bào/ml là phù hợp với quá trình lên men rượu vang.



Hình 5.12. Sơ đồ công nghệ sản xuất rượu vang trắng

- Lên men chính: là quá trình chuyển hóa đường thành rượu nhờ hệ enzyme của nấm men. Gồm hai giai đoạn cơ bản là:

+ Giai đoạn oxy hóa đường thành CO_2 , H_2O và năng lượng để nấm men tăng sinh khối, làm cho số lượng tế bào tăng rất nhanh trong một thời gian ngắn, do đó trong thời kỳ đầu của giai đoạn lên men, sự có mặt của oxy hòa tan trong dịch lên men là hết sức cần thiết.

+ Giai đoạn chuyển hóa đường thành rượu và giải phóng CO_2 nhờ hệ enzyme của nấm men thực chất là quá trình hô hấp kỵ khí của nấm men, do đó lượng oxy hòa tan càng ít sẽ càng có lợi cho quá trình lên men. Trong giai đoạn này chỉ có hydrogen tách ra được chuyển đến các chất nhận hữu cơ trong quá trình biến đổi đường thành rượu cũng như sự biến đổi của nhiều loại acid có trong dịch lên men.

Sự trích ly màu và tanine từ vỏ quả được xảy ra ngay trong lên men chính nhờ nhiệt độ cao và sự có mặt của cồn tạo ra trong quá trình lên men. Hoạt động của enzyme pectinase cùng với hàm lượng cồn tăng dần trong dịch lên men đã làm giảm độ nhớt, dẫn đến làm kết tủa pectin cùng một số chất vô cơ xuống đáy thùng. Nhờ vậy, sau quá trình lên men chính việc ép và lọc để loại bỏ vỏ nho dễ dàng hơn.

Lên men chính kết thúc sau 4 – 8 ngày, tùy theo chủng nấm men và điều kiện lên men. Ngoài ethylic là sản phẩm chủ yếu còn có các sản phẩm trung gian được tạo thành trong giai đoạn này như glycerine, acetaldehyde, acetic acid, CO_2 , acetone... Kết thúc quá trình lên men chính dịch vang non được rút hoặc bơm chuyển sang thùng lên men phụ.

Nhiệt độ lên men đóng vai trò quan trọng tới hiệu suất lên men và chất lượng của sản phẩm, đối với rượu vang đỏ thì nhiệt độ nên giữ là $25 - 28^\circ\text{C}$, còn vang trắng thì giữ ở nhiệt độ $15 - 18^\circ\text{C}$ sẽ giữ được hương vị tự nhiên và đặc trưng của nguyên liệu.

- Lên men phụ là giai đoạn tiếp theo của lên men chính mà đặc trưng cơ bản là quá trình lên men diễn ra chậm chạp 2 – 3 tháng ở nhiệt độ thấp $8 - 12^\circ\text{C}$, sản phẩm lúc này chưa thật “chín”, vì vậy một số quá trình biến đổi tạo acid, muối, các hợp chất tạo chất thơm ... tiếp tục diễn ra, đồng thời diễn ra sự tự phân và kết lắng của nấm men cùng với một số cặn lơ lửng xuất hiện trong khi lên men.

Cùng với các quá trình biến đổi trên thì lên men malolactic nhờ vi khuẩn lactic cũng được tiến hành trong giai đoạn này, với một số loại rượu vang được sản xuất từ các loại quả có acid malic ở hàm lượng cao. Vi khuẩn lactic sẽ tiến hành quá trình lên men malolactic để chuyển hóa acid malic có vị chua gay gắt thành acid lactic có độ chua dịu hơn, đồng thời giải phóng CO_2 .

Việc tăng cường quá trình lên men malolactic bằng cấy bổ sung vi khuẩn lactic ở giai đoạn lên men phụ là rất cần thiết đối với vang làm từ các loại có hàm lượng acid malic quá cao, như dưa và một số giống nho, sẽ có tác dụng tốt trong việc ổn định và nâng giá trị cảm quan của sản phẩm.

Quá trình lắng trong của rượu vang cũng bắt đầu trong giai đoạn lên men phụ, thời gian lắng trong và độ trong của sản phẩm phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như: nồng độ cồn, nhiệt độ tàng trữ, hàm lượng đường sót, hàm lượng acid, độ pH, hàm

lượng tanin, protein có trong vang non. Vang có độ cồn cao, pH thấp, đường sót ít, tanin càng nhiều và nhiệt độ càng thấp thì lắng trong càng nhanh, độ trong càng tốt.

+ Tàng trữ và tạo hương, vị đặc trưng cho vang: còn gọi là giai đoạn ủ “chín” vang, được đặc trưng bởi quá trình hình thành hương thơm và vị đặc trưng của vang. Rượu vang non được chuyển vào các thùng chứa bằng gỗ sồi và được tàng trữ ở nhiệt độ thấp. Trong giai đoạn này xảy ra các quá trình chuyển hóa: sự biến đổi về thành phần amino acid, các acid hữu cơ, rượu bậc cao, quá trình oxy hóa khử, thủy phân, ester, ngưng kết làm cho chất lượng của sản phẩm biến đổi rất sâu sắc cả về hương, vị và màu sắc của vang.

Bảng 5.3. Sự thay đổi hàm lượng các acid amine của vang trong quá trình tàng trữ

Amino acid	Vang non	1 tháng	2 tháng	3 tháng
Alanine	3,8	9,1	18,2	20,4
Arginine	2,3	3,5	5,7	6,7
Asparagine	4,0	10,0	23,0	26,0
Valine	4,8	8,7	19,8	21,0
Glutamic	21,0	46,0	93,0	59,0
Glycine	10,4	18,4	26,0	28,3
Histidine	2,5	5,4	9,7	8,7
Leucine	8,1	13,5	29,0	32,0
Lysine	1,7	10,0	24,0	29,3
Proline	18,0	17,9	21,6	21,4
Treonine	2,3	5,4	11,2	13,8

Thùng chứa càng lớn thì thời gian chín của vang càng kéo dài và trong giai đoạn này để thúc đẩy quá trình chín của rượu người ta phải thường xuyên tách cặn, giữ vang ở nhiệt độ thấp. Quan trọng nhất là chính quá trình oxy hóa trong giai đoạn này đã làm cho rượu vang non được biến thành rượu vang trưởng thành, nguồn oxy của quá trình oxy hóa gần như đã có sẵn trong chính các hợp chất của rượu vang non hoặc được bổ sung ngay trong quá trình tách bã, bơm chuyển từ thùng lên men vào các thùng gỗ sồi và khi lọc rượu vang.

Tại các cơ sở sản xuất công nghiệp, người ta thường tiến hành kết hợp lọc rượu vang lần cuối trước đồng thời với chiết rượu vang vào chai và được đóng kín bằng nút gỗ xốp có độ đàn hồi tốt, toàn bộ thao tác trên được thực hiện trên dây chuyền tự động và khép kín để đảm bảo vệ sinh và an toàn chất lượng sản phẩm trong quá trình lưu giữ và tiêu thụ. Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng ngay cả khi được đóng vào chai, rượu vang vẫn có thể tiếp tục có những biến đổi. Vì vậy, để rượu luôn ổn định và giữ được chất lượng tốt thì việc sử dụng chai có màu sẫm và giữ rượu vang ở nhiệt độ khoảng 15 – 20°C là phù hợp.

2.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu vang

- Nhiệt độ: Nấm men có thể sinh trưởng ở dải nhiệt độ 4 – 45°C, nhưng thích hợp nhất là 28 – 32°C. Nhiệt độ càng thấp thì nấm men sinh sản càng chậm, thời gian lên

men bị kéo dài, tuy nhiên hạn chế được sự nhiễm khuẩn. Ngược lại, nhiệt độ cao thì nấm men sinh sản nhanh hơn nên thời gian lên men ngắn hơn nhưng khả năng nhiễm khuẩn sẽ rất cao. Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng của rượu vang, khi lên men ở điều kiện nhiệt độ lạnh thì hương, vị của rượu vang sẽ có mùi vị trái cây và tươi hơn, hàm lượng acid bay hơi thấp hơn, hàm lượng glycerine sẽ tăng hơn, ngược lại khi lên men ở nhiệt độ cao thì chất lượng rượu vang sẽ bị kém đi rõ rệt.

- pH môi trường: Nấm men có thể sinh trưởng và phát triển trong môi trường có độ pH từ 2,5 – 7,5, tuy nhiên pH thích hợp nhất với sự sinh sản của nấm men được xác định là 4 – 6, nhiều chủng nấm men có thể sinh trưởng và phát triển tốt ở pH 3 – 3,5. Và để hạn chế sự nhiễm tạp và phù hợp với pH tự nhiên của nguyên liệu các nhà sản xuất luôn duy trì độ pH 3,2 – 4,0. Để điều chỉnh độ pH của dịch lên men, người ta thường sử dụng NaHCO_3 , CaCO_3 , tartaric acid, citric acid. Độ pH quá thấp hay quá cao sẽ làm thay đổi cấu trúc protein làm giảm hoạt tính của nhiều loại enzyme tham gia trực tiếp trong quá trình lên men rượu vang.

- Nồng độ rượu: Trong quá trình lên men rượu, nồng độ rượu tăng dần gây ức chế hoạt động của nấm men và kìm hãm hoạt động của các enzyme. Mỗi giống nấm men có khả năng chịu được nồng độ rượu khác nhau, một số nấm men đại chỉ có thể chịu được độ rượu 3%; giống nấm men *Saccharomyces* lại có thể chịu được độ rượu 9 – 12% và lên men đạt đến 14 – 16%. Khả năng sống sót của nấm men phụ thuộc vào nhiệt độ và nồng độ rượu có trong dịch lên men, khi nhiệt độ lên men 50°C và nồng độ rượu đạt 12 – 15% thì sau 2 phút tất cả các tế bào nấm men sẽ bị tiêu diệt. Rượu có phân tử lượng càng cao thì khả năng hoạt động sống của nấm men càng bị ức chế.

- Hàm lượng đường: Hàm lượng đường phù hợp cho quá trình lên men rượu vang là 12 – 20% và khi đạt đến 25% sẽ ức chế mạnh quá trình lên men. Tỷ lệ các loại đường có trong dịch lên men cũng ảnh hưởng đến tốc độ và hiệu suất lên men, glucose là loại đường phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của nấm men cũng như quá trình lên men rượu, tiếp đó là đường fructose và saccharose... Vì vậy, quả có chứa hàm lượng đường khử càng cao thì càng có lợi cho quá trình lên men cũng như đến chất lượng vang thành phẩm.

- Acid hữu cơ: Ảnh hưởng của acid hữu cơ đối với quá trình lên men không phải do hàm lượng tổng số của acid hữu cơ không bay hơi mà do thành phần và hàm lượng của một số acid hữu cơ bay hơi, các acid béo có trong dịch lên men sẽ tác động phối hợp đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm men.

- Ảnh hưởng của chất kìm hãm chọn lọc: SO_2 là có khả năng kìm hãm sự phát triển của các loại vi khuẩn khác nhau, trong khi đó một số chủng nấm men vẫn có khả năng phát triển và lên men trong môi trường có hàm lượng SO_2 cao. Do vậy, trong quá trình lên men rượu vang người ta sử dụng SO_2 là chất ức chế chọn lọc. Tuy nhiên, SO_2 có khả năng hạn chế quá trình lên men malolactic, làm tăng lượng acetaldehyde, glycerine. Việc sử dụng SO_2 trong quá trình lên men rượu vang cần phải tính toán phù hợp với công nghệ và thông thường sử dụng SO_2 với hàm lượng 75 – 100 ppm vừa là chất kháng khuẩn, cũng như chất chống oxy hóa là phù hợp và có hiệu quả.

2.3. Lên men bia

Bia là nước giải khát xuất hiện ở Ai Cập từ 5,6 nghìn năm trước Công nguyên. Bia có độ rượu nhẹ, chứa CO_2 , có hương vị thơm ngon và bổ dưỡng vì bia có chứa nhiều chất đạm, vitamin (đặc biệt là vitamin nhóm B), đường hòa tan, dextrin. Bia là loại nước giải khát có lẽ phổ biến nhất trên thế giới.

2.3.1. Tác nhân vi sinh vật

- *Saccharomyces carlsbergensis* (còn có tên *S. uvarum*) là loại nấm men chìm, phát triển tốt ở 6-8°C, khi tăng trở ở 0°C vẫn có khả năng lên men. Đặc điểm sinh hóa của loài này là có khả năng tổng hợp enzyme melibiase nên có khả năng hấp thụ đường raffinose. Chúng kết bông và lắng xuống đáy thùng lên men ở giai đoạn cuối.

- *S. cerevisiae* là nấm men lên men nổi, phát triển tốt ở nhiệt độ 14°C, nếu nhiệt độ thấp hơn 10°C thì hoạt lực lên men yếu. Đặc điểm sinh hóa là không có khả năng tổng hợp enzyme melibiase nên chỉ hấp thụ 1/3 đường raffinose. Khi lên men tế bào nấm men lơ lửng trong dịch lên men và chúng nổi lên bề mặt của thùng lên men ở giai đoạn cuối của quá trình lên men.

2.3.2. Công nghệ lên men bia

*Nguyên liệu sản xuất bia

+ Malt: là tên gọi loại ngũ cốc nảy mầm (mầm của lúa đại mạch, tiểu mạch, thóc gạo, lúa mì, thóc nếp...). Do hiện nay trong sản xuất bia, chủ yếu người ta dùng đại mạch nảy mầm, nên tên malt cũng được hiểu là mầm đại mạch. Hạt đại mạch là nguồn cung cấp tinh bột cho quá trình đường hóa tạo đường cho sự lên men rượu sau này. Trong quá trình nảy mầm, trong hạt sẽ tích lũy nhiều enzyme, đặc biệt là enzyme amylase. Ngoài ra còn có mặt protease, maltase, phosphatase, lipase....

+ Hoa houblon là một loại nguyên liệu đặc biệt được sử dụng trong sản xuất bia. Cây houblon là một loại cây leo, thuộc họ Gai dầu (*Cannabaceae*), chỉ phát triển ở các nước ôn đới như Đức, Pháp, Ba Lan, Tiệp Khắc... Hoa houblon tạo cho bia có vị rất đặc biệt, đến nay vẫn chưa có loại nguyên liệu nào có thể thay thế được hoa houblon trong sản xuất bia.

Trong thành phần hóa học của hoa houblon các hợp chất đắng, tinh dầu phần hoa đóng vai trò quan trọng nhất trong sản xuất bia. Ngoài ra các thành phần khác như tanine, protein, đường khử ... cũng có ý nghĩa nhất định trong các bước công nghệ.

Chất đắng là thành phần có giá trị nhất của hoa, tạo cho bia có vị đắng đặc trưng cho bia, tham gia vào sự tạo bọt và giúp cho bia bảo quản được lâu. Các hợp chất đắng gồm hai nhóm là acid đắng humulone chiếm 9 – 11% và nhựa đắng 7 – 8%. Nhựa đắng thường được tạo ra từ acid đắng. Acid đắng có công thức hóa học là $C_{21}H_{30}O_5$. Chúng có 3 đồng phân quan trọng là cohumulone, adhumulone và lupulone, là thành phần chính tạo ra vị đắng của bia. Đồng thời acid đắng có mức độ hoạt động bề mặt mạnh mẽ có khả năng tạo bọt và giữ bọt rất tốt.

Trong hoa houblon có chứa nhiều tinh dầu chiếm từ 0,17 – 0,65% trọng lượng hoa, chủ yếu là các cấu tử thuộc nhóm terpen (C_5H_8)_n và các cấu tử có mang oxygen, đại diện chính là geraniol ($C_{10}H_{18}O$). Ở điều kiện gia nhiệt nhẹ tinh dầu dễ bị oxy hóa tạo ra mùi không phù hợp cho bia.

Tanine chiếm khoảng 4% trọng lượng hoa houblon cũng có ý nghĩa nhất định trong sản xuất bia. Tanine giúp cho dịch đường trong nhanh và kết tủa protein, làm tăng độ bền vững của bia.

* Lên men sản xuất bia

- Chế biến dịch đường houblon hóa:

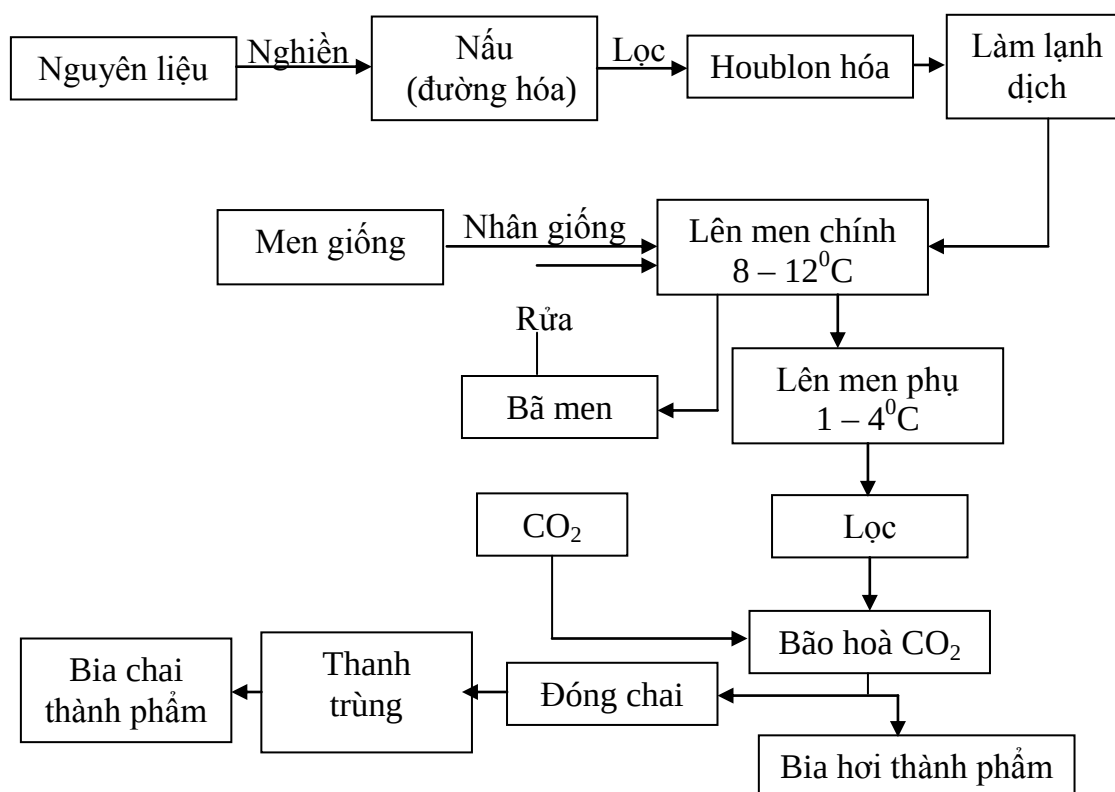
+ Nghiền malt: mục đích của quá trình này là đập nhỏ hạt malt thành nhiều mảnh để tăng diện tích tiếp xúc với nước, làm cho sự xâm nhập của nước vào các thành phần

nội nhũ nhanh hơn, thúc đẩy quá trình đường hóa và các quá trình thủy phân khác nhanh và triệt để hơn.

+ Đường hóa nguyên liệu: nguyên liệu sau khi nghiền sẽ được hòa trộn với nước trong hệ thống đường hóa. Lượng nước phối trộn với bột nghiền phụ thuộc vào chủng loại bia sẽ sản xuất và các đặc tính kỹ thuật của hệ thống thiết bị. Trong môi trường giàu nước, các hợp chất phân tử thấp phân tử có sẵn trong nguyên liệu sẽ hòa tan vào nước và trở thành chất chiết của dịch đường sau này. Các chất cao phân tử như: tinh bột, protein, các hợp chất chứa phosphorus... sẽ bị tác động bởi các nhóm enzyme tương ứng như amylase, protease, phosphatase... khi nhiệt độ của khối dịch được nâng lên đến điểm thích hợp cho các enzyme này hoạt động. Dưới tác dụng của hệ enzyme thủy phân, các hợp chất cao phân tử bị phân cắt thành các sản phẩm thấp phân tử và hòa tan vào nước trở thành chất chiết của dịch đường.

Đường hóa hoàn thành việc chuyển các dextrin, glucose, maltose và dextrin mạch ngắn. α -amylase phân cắt dextrin thành các dextrin mạch ngắn, glucose, maltose và maltotriose. β -amylase cắt từng cặp đường đơn theo mạch dextrin tạo ra chủ yếu là maltose và một ít maltotriose.

Các đường đơn, maltose, maltotriose là cơ chất cho lên men. Các dextrin mạch ngắn góp phần tạo vị đậm đà cho bia. Các dextrin dài và các phân tử tinh bột gây trở ngại cho lên men và làm giảm độ bền của bia. Để tránh hiện tượng này, trong quá trình nấu, ta dùng phép thử iodine để kiểm tra diễn biến màu của dịch thủy phân.



Hình 5.13. Sơ đồ công nghệ sản xuất bia

Dịch đường thu được sau quá trình đường hóa gọi là nước nha được đun sôi với hoa houblon ở nhiệt độ $\geq 70^{\circ}\text{C}$ trong 1,5 – 2 giờ. Quá trình này cho phép trích ly chất đắng, tinh dầu, polyphenol, các hợp chất chứa nitrogen và các thành phần khác của hoa houblon vào dịch đường ngọt. Các polyphenol của hoa houblon khi hòa tan vào dịch

đường, ở nhiệt độ cao sẽ tác dụng với các hợp chất protein cao phân tử tạo thành các phức chất dạng màng nhầy. Các phức chất này dễ kết lắng và kéo theo các phân tử cặn li ti trong dịch đường kết lắng theo. Các chất đắng, polyphenol, các hợp chất chứa nitrogen trong hoa houblon là những chất tạo sức căng bề mặt có hoạt tính rất cao, do đó chúng tham gia vào quá trình tạo bọt và giữ bọt cho bia. Ngoài ra, khi đun sôi sẽ xảy ra phản ứng melanoidine và caramel hoá tạo màu vàng đẹp cho bia sau này. Đồng thời khi đun sôi sẽ tiêu diệt các tạp trùng, khử hoạt tính của enzyme, làm đông tụ protein và cô đặc dịch nha thích hợp cho từng loại bia.

- Nấm men giống trong sản xuất:

+ Giữ giống men bia: Những nòi men bia thuần khiết được tách ra từ một tế bào, nuôi cấy và bảo quản sao cho giữ được những tính chất quý ban đầu của chúng. Trong bảo quản, quá trình sống của men giống xảy ra rất chậm và hạn chế sự phát triển của chúng. Giữ được trạng thái tiềm sinh này có thể áp dụng các phương pháp bảo quản ở nhiệt độ thấp $2 - 4^{\circ}\text{C}$, đông khô, ở dạng bào tử hoặc kỵ khí. Bảo quản giống thuần khiết ở $5 - 8^{\circ}\text{C}$ trong bão hòa CO_2 có thể giữ được những tính chất quý ban đầu, nâng cao khả năng lên men và cải thiện được mùi vị của bia.

+ Nuôi cấy men giống: Sau khi kết thúc giai đoạn nuôi cấy nấm men từ chủng thuần khiết ở phòng thí nghiệm với môi trường nhân giống thường là dịch chiết từ malt bằng phương pháp tăng dần thể tích. Quá trình nuôi cấy ở điều kiện bán sản xuất phải tuân theo nguyên tắc sau:

- Dịch đường hoa houblon được dùng làm môi trường cho nấm men sinh sản phải được tiệt trùng và làm lạnh đến nhiệt độ $6 - 10^{\circ}\text{C}$.

- Phải sục khí vô trùng vào canh trường trong các thiết bị của hệ thống nhân men để đảm bảo sự phát triển mạnh của nấm men.

- Tuyệt đối không để dịch lên men tiếp xúc với không khí chưa tiệt trùng.

Quá trình tiệt trùng môi trường nhân giống được thực hiện ở áp suất thường (100°C) hoặc ở áp suất dư (106°C) trong thời gian 30 phút. Đồng thời với quá trình làm nguội, dịch đường được bão hòa oxy bằng không khí vô trùng.

+ Tái sử dụng men sữa: Sau khi lên men chính, nấm men lắng xuống dưới đáy thiết bị chia làm ba lớp: Lớp dưới cùng là các tế bào già, có hoạt lực lên men yếu; lớp giữa là các tế bào trẻ hơn có khả năng lên men mạnh; lớp trên cùng là những tế bào có kích thước nhỏ, khả năng kết lắng kém cùng với những cặn protein và hoa houblon. Chỉ nên thu nhận lớp men giữa có màu trắng ngà sau khi đã xử lý. Số lần tái sử dụng men sữa khoảng 5 – 7 lần tùy thuộc vào chất lượng của nấm men. Phương pháp xử lý:

Rửa men: Phương pháp xử lý men đơn giản nhất là cho dịch men sữa qua rây có kích thước lỗ $0,2\mu\text{m}$ để loại bỏ các tạp chất lớn. Sau đó tiến hành rửa men bằng nước vô trùng $1 - 2^{\circ}\text{C}$ để lắng và loại bỏ cặn bẩn và xác nấm men.

Hoạt hóa men: Trước khi sử dụng để nấm men phát triển tốt cần tiến hành hoạt hóa giống bằng cách nuôi cấy nấm men trong dịch đường houblon hóa với tỷ lệ dịch đường : men sữa là 4 : 1, sục khí vô trùng đồng thời tăng dần nhiệt độ tới nhiệt độ lên men. Khi có nhiều tế bào phát triển và độ cồn đạt 0,3% thì kết thúc quá trình hoạt hóa.

- Lên men và tàng trữ bia:

Quá trình lên men được thực hiện qua hai giai đoạn: lên men chính và lên men phụ. Toàn bộ quá trình lên men được thực hiện theo công nghệ hiện đại, có hệ thống điều chỉnh nhiệt độ.

Quá trình lên men chính: được tiến hành trong thùng kín hoặc hở. Nhiệt độ thích hợp là $10 - 12^{\circ}\text{C}$. Thời gian lên men chính phụ thuộc vào chất hòa tan ban đầu của dịch đường và chế độ nhiệt trong thời gian đó, thường khoảng 6 – 8 ngày. Trong giai đoạn này, tốc độ lên men mạnh, dịch sủi bọt nhiều, nhiệt độ khối dịch tăng, cần phải tiến hành thu hồi CO_2 và làm lạnh cục bộ để dịch lên men hạ nhiệt về nhiệt độ ban đầu. Sản phẩm trong quá trình này ngoài rượu ethylic, CO_2 , còn có các sản phẩm phụ như glycerine, diacetyl, rượu bậc cao, aldehyde, acid hữu cơ, ester, ... Đặc biệt diacetyl có ảnh hưởng rất xấu đến hương và vị của bia chủ yếu được tạo thành trong giai đoạn này, khoảng $< 0,1\text{mg/l}$. Cuối giai đoạn này, sự lên men giảm xuống vì hàm lượng chất hòa tan đã tiêu hao gần hết, nấm men đã lắng xuống đáy thùng. Hạ nhiệt độ của khối dịch để chuyển sang quá trình lên men phụ.

Quá trình lên men phụ và tàng trữ: nhiệt độ lên men phụ tốt nhất là $1 - 3^{\circ}\text{C}$, áp suất $2 - 4\text{kg/cm}^2$ để tăng cường quá trình bão hòa CO_2 . Duy trì nhiệt độ và áp suất này trong suốt quá lên men. Trong giai đoạn này, nấm men trong bia non vẫn tiếp tục lên men đường còn sót lại sau quá trình lên men chính. Lượng CO_2 sinh ra được giữ lại trong thùng và hòa tan vào bia, acid hữu cơ tác dụng với rượu tạo thành các ester. Đặc biệt, lượng diacetyl tạo thành trong quá trình lên men chính được chính nấm men khử và chuyển thành acetoin. Quá trình khử diacetyl là một trong các chỉ tiêu hàng đầu để xem xét quá trình lên men phụ đạt hay chưa, tiêu chuẩn $\leq 0,2\text{mg/l}$. Ngoài ra, men bia dần kết lắng với nhau ở dạng bông hoặc bụi kéo theo các cặn bẩn lắng xuống đáy thùng lên men làm cho bia trong và màu sáng. Thời gian lên men tùy thuộc vào từng loại bia, có thể kéo dài từ 10 – 30 ngày. Quá trình này nhằm ổn định thành phần và tính chất cảm quan của sản phẩm.

* Hoàn thiện sản phẩm: để trở thành hàng hóa thương mại, bia cần được cần được xử lý qua các công đoạn sau:

- Lọc trong bia: làm tăng giá trị cảm quan, ổn định thành phần cơ học, làm tăng độ bền sinh học và độ bền keo của bia. Bia sau khi lọc trong suốt có màu vàng hoặc màu nâu. Nhiệt độ bia trước khi lọc thích hợp là $0 - 4^{\circ}\text{C}$. Điều kiện này có thể giảm bớt sự hao phí về CO_2 đồng thời tạo trước cho bia điều kiện gây đục ở nhiệt độ thấp, như vậy sau này hiện tượng này sẽ không bị lặp lại. Lọc bia được tiến hành trong các thiết bị lọc khung bản, lọc đĩa, lọc nền hoặc ly tâm.

- Bão hòa CO_2 : trong quá trình lên men, bia được carbonic hóa ở nhiều thời điểm khác nhau như trong lên men chính, lên men phụ và tàng trữ. Trong thực tế sản xuất, việc bão hòa CO_2 vào bia theo phương pháp tự nhiên có thể đạt đến nồng độ cần thiết, do vậy cần phải bổ sung CO_2 cho bia sau khi lọc và trước khi chiết vào lon, chai là tác nghiệp công nghệ không thể bỏ qua. Nhiệt độ bia thích hợp nhất cho bão hòa CO_2 là 0°C . Hàm lượng CO_2 bão hòa cần đạt $4,5 - 5,0\text{g/l}$.

- Chiết bia: Quá trình cuối cùng của công nghệ bia là giai đoạn chiết bia vào lon hoặc vào chai. Trong quá trình này, không để được để bia tiếp xúc với không khí và oxy hòa tan để tránh ảnh hưởng đến hương vị và độ bền keo của bia. Chiết bia phải chiết theo phương pháp đẳng áp, nghĩa là áp suất đối kháng ở trong lon và trong chai phải bằng áp suất bề mặt trong thùng chứa bia. Như vậy, mới đảm bảo rót được đầy thể tích lon hoặc chai, không có hiện tượng sủi bọt và hao phí bia ít nhất.

3. CÁC SẢN PHẨM ACID HỮU CƠ

3.1. Lên men lactic acid

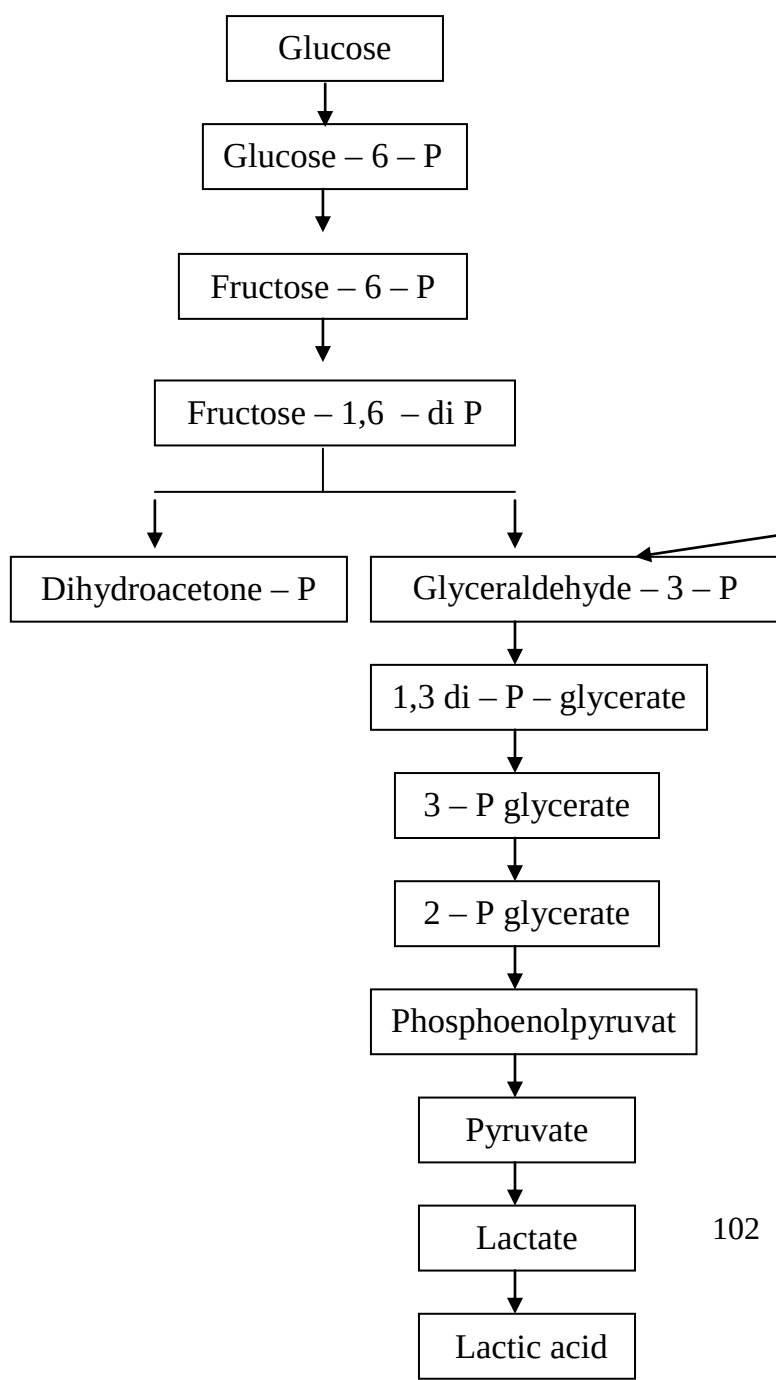
3.1.1. Cơ chế của quá trình

Lên men lactic acid là quá trình chuyển hóa sinh học kỵ khí các hợp chất đường thành lactic acid và một số sản phẩm khác nhờ vi khuẩn lactic. Dưới tác dụng của các tác nhân vi sinh vật khác nhau sản phẩm tạo thành trong quá trình lên men khác nhau. Dựa vào đặc trưng của sản phẩm tạo thành người ta chia làm hai loại: lên men lactic đồng hình và lên men lactic dị hình. Hình 5.14.

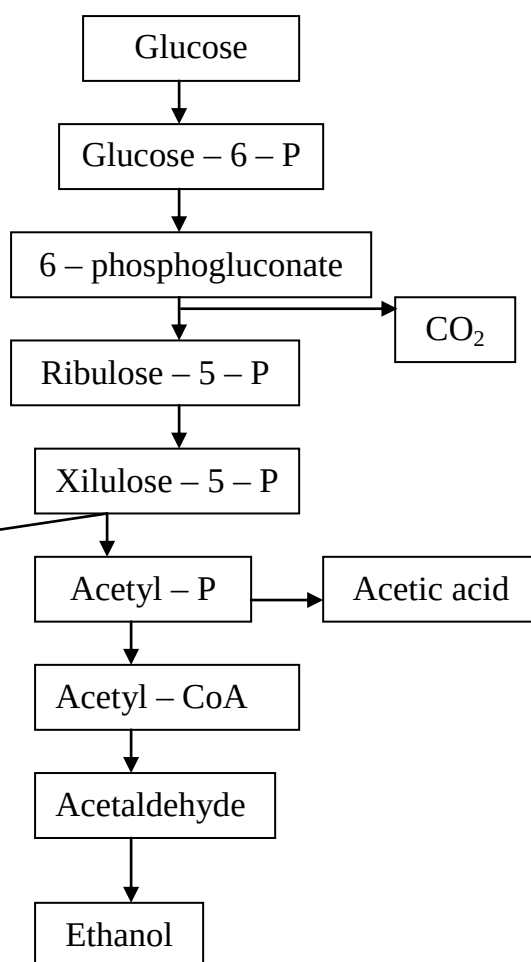
*Lên men lactic đồng hình: là quá trình lên men lactic với sản phẩm tạo thành chủ yếu là lactic acid, có thể đạt tới 90 – 98% sản phẩm của quá trình lên men. Quá trình này xảy ra khi vi khuẩn phân hủy một phân tử glucose theo con đường EMP để tạo thành hai phân tử glyceraldehyde phosphate (AIPG) và sau đó thành lactic acid.

*Lên men lactic dị hình là quá trình lên men mà sản phẩm tạo thành ngoài lactic acid (40%) còn có các sản phẩm khác như succinic acid, rượu ethylic, acetic acid, các chất khí còn lại. Quá trình này do vi khuẩn lactic thiếu hai enzyme chủ yếu của con đường EMP là aldolase và triozophosphat – isomerase nên không thể đi theo con đường EMP mà quá trình phân giải glucose xảy ra theo con đường pentose phosphate (PP).

Lên men lactic đồng hình



Lên men lactic dị hình



3.1.2. Tác nhân vi sinh vật

Vi khuẩn lên men lactic gồm nhiều giống khác nhau, được xếp vào họ *Lactobacteriaceae*. Có hai hình dạng chính là hình cầu và hình que, phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy hay điều kiện ngoại cảnh khác nhau thì hình dạng của chúng có thể bị thay đổi.

Đặc điểm sinh lý chung của vi khuẩn lactic: nhuộm màu Gram dương, không sinh bào tử, không sinh tổng hợp enzyme catalase và oxydase, không có khả năng khử nitrate và hầu hết các vi khuẩn lactic đều không chuyển động. Một số chi vi khuẩn lactic thường gặp là:

Lactobacillus: gồm 52 loài trực khuẩn phổ biến nhất, có dạng hình dạng thay đổi từ hình bầu dục đến hình que dài. Ví dụ loài *Lactobacillus plantarum* tế bào hình que, kích thước $(0,7 - 1) \times (3 - 8) \mu\text{m}$ xếp thành chuỗi hoặc đứng riêng lẻ, trong khi *Lactobacillus bulgaricus* lại có dạng hình que dài, mảnh có kích thước $(0,7 - 0,9) \times (5 - 20) \mu\text{m}$ đứng riêng lẻ, cặp đôi hay tạo thành chuỗi ngắn.

Streptococcus: là loại vi khuẩn có tế bào hình tròn hoặc hình ovan, đường kính $0,5 - 1 \mu\text{m}$, tạo thành chuỗi hoặc xếp đôi, ít khi đứng riêng lẻ, có khả năng lên men các loại đường như glucose, fructose, galactose, lactose...phân bố nhiều trong sữa và sữa chua. Có khả năng tích tụ $0,8 - 1\%$ acid lactic.



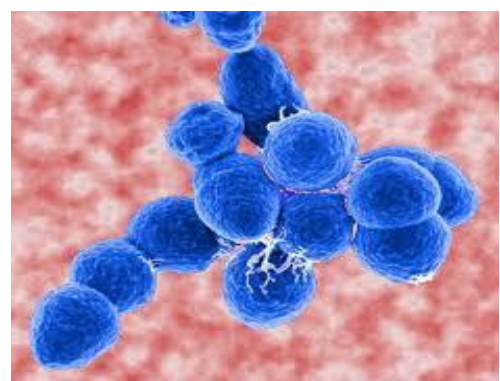
Hình 5.15. *Lactobacillus Bulgaricus*



Hình 5.16. *Lactobacillus plantarum*

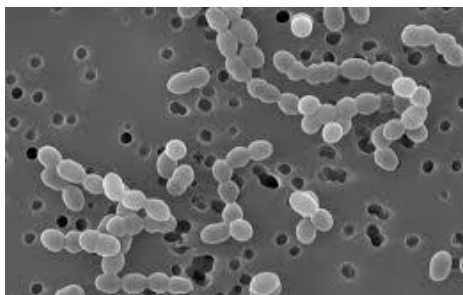


Hình 5.17. *Streptococcus thermophilus*



Hình 5.18. *Streptococcus pneumoniae*

Leuconostoc: tế bào có dạng hình hơi dài hoặc hình ovan, đường kính khoảng 0,5 – 0,8 μ m, chiều dài khoảng 1,6 μ m. Nhưng đôi khi chúng lại có dạng hình hơi tròn, sắp xếp thành chuỗi và không tạo thành đám.



Hình 5.19. *Leuconostoc*



Hình 5.20. *Leuconostoc citreum*

*Một số vi khuẩn lên men lactic đồng hình: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *S. thermophilus*, *S. diacetylactis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. delbrückii*, *L. casei*, *L. plantarum*.

*Một số vi khuẩn lên men dị hình: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. cremoris*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. viridescens*, *Bifidobacter bifidum*.

3.1.3. Công nghệ lên men sản xuất lactic acid

Nguyên liệu để sản xuất lactic acid là nguyên liệu có chứa đường hoặc ri đường được pha loãng đến nồng độ thích hợp. Nếu nguyên liệu là tinh bột như khoai, sắn, ngô, khoai tây... thì trước hết phải được thủy phân thành dung dịch đường. Trước khi lên men, dung dịch được pha loãng đến nồng độ 10 – 20 % và thanh trùng ở nhiệt độ 120⁰C. Có thể dùng nguyên liệu là huyết thanh sữa để sản xuất.

Nguyên liệu nên đáp ứng vài nhu cầu về độ tinh sạch vì các nhu cầu này là nhân tố quyết định cho các quy trình tinh sạch cần thiết của lactic acid được sản xuất. Sự lựa chọn của nguyên liệu phụ thuộc mạnh mẽ vào các ứng dụng dự định và giá trị riêng của sự tinh sạch sản phẩm.

Trong sản xuất lactic acid người ta thường dùng ri đường, vì đây là nguồn liệu rẻ tiền và dễ kiếm. Trước tiên, ri đường cần phải được xử lý để tẩy màu và tách các chất keo có trong mật ri. Để xử lý màu, người ta thường dùng than hoạt tính, đầu tiên, ri đường được làm loãng theo tỷ lệ 1: 3, sau đó cho chảy qua cột than hoạt tính. Than hoạt tính sẽ hấp phụ các chất màu, khi đó dung dịch ri đường sẽ sáng màu hơn. Sau đó, làm loãng ri đường đến nồng độ chất khô 15% và dùng H₂SO₄ 5% theo khối lượng dịch để acid hóa môi trường. H₂SO₄ như một chất điều hòa pH, phá vỡ hệ keo và chuyển hóa đường saccharose thành đường nghịch đảo giúp quá trình lên men sau này tốt hơn. Tiếp tục pha loãng dung dịch xuống còn 5 – 10% đường và điều chỉnh pH ngược lại đến 6,3 – 6,5. Sau đó, làm nguội dung dịch đường xuống 50⁰C và bơm chúng vào thùng lên men để tiến hành quá trình lên men.

* Phương pháp lên men và thu nhận sản phẩm:

+ Phương pháp truyền thống:

Vi khuẩn lactic đã được nuôi cấy riêng ở phân xường nhân giống. Khi lượng giống đảm bảo về số lượng tế bào, người ta chuyển vào thùng lên men với tỷ lệ giống là 2,5 – 3%. Trong sản xuất lactic acid, người ta thường sử dụng vi khuẩn lactic đồng hình, trong đó vi khuẩn *Lactobacillus delbruckii* được sử dụng hơn cả. Đối với vi khuẩn này, thường duy trì nhiệt độ trong suốt quá trình lên men là 50°C, pH 5 – 6, thời gian lên men 7 – 10 ngày. Tuy nhiên, điều kiện lên men có thể thay đổi tùy theo giống vi khuẩn lactic mà ta sử dụng trong sản xuất.

Trong quá trình lên men, người ta thường sử dụng vôi mịn để trung hoà lượng acid được tạo thành nhằm tránh hiện tượng acid hoá dung dịch lên men và tạo ra calcium lactat. Lượng vôi mịn sử dụng khoảng 3 – 4 lần/1 ngày. Số lượng CaCO₃ cho vào tùy thuộc vào lượng acid lactic tạo thành.

Sau khi lên men xong, dung dịch lên men được đun nóng đến 80 – 90°C. Người ta dùng CaCO₃ điều chỉnh pH của dịch lên men đến 10 – 11. Giữ yên pH này trong khoảng thời gian 3 – 5 giờ. Trong thời gian này, các chất lắng và sinh khối vi khuẩn sẽ lắng xuống đáy. Người ta loại chất lắng này. Sau đó dịch trong được lọc bằng máy lọc khung bản ở nhiệt độ 70 – 80°C. Sau khi lọc xong, toàn bộ dịch lên men được chuyển qua thiết bị tạo kết tủa calcium lactate. Quá trình tạo kết tủa này khoảng từ 10 – 16 giờ. Kết thúc quá trình kết tủa, người ta cũng đem lọc bằng máy lọc khung bản. Để riêng kết tủa và dịch lọc. Dịch lọc được đem đi cô đặc lại và tiến hành kết tủa lại một lần nữa để thu hồi toàn bộ lượng lactic acid có trong dịch lên men. Phần kết tủa này được trộn chung với phần trước và đem sang thiết bị thu nhận lactic acid. Để thu nhận lactic acid, cho H₂SO₄ vào phần kết tủa. Khi đó phản ứng xảy ra và tạo thành CaSO₄ kết tủa và dung dịch chứa lactic acid (C₃H₆O₃). Dung dịch lactic acid được đem đi khử màu bằng than hoạt tính và đem cô đặc chân không để thu nhận lactic acid tinh khiết.

+ Phương pháp hiện đại:

Nhu cầu sử dụng lactic acid ngày càng tăng, do đó nhiều công ty sinh học trên thế giới đã cố gắng tìm ra những công nghệ mới, tạo ra những chủng giống thuần chủng có hoạt lực cao nhằm nâng cao hiệu suất và năng suất sản xuất đồng thời giảm giá thành sản phẩm. Trong phương pháp này, người ta đã thay đổi giống và môi trường lên men và thay đổi phương pháp thu nhận sản phẩm.

Trong môi trường lên men sử dụng dung dịch chứa đường 40 – 100g đường trong 1000ml, ngoài ra còn bổ sung 1% dầu ngô, 1 – 4 % nước chiết ngô, nhiều loại nguyên tố khoáng vi lượng.

Điều kiện lên men ở nhiệt độ 40 – 50°C, điều chỉnh pH trong suốt quá trình lên men là 4,8 – 5,7 bằng NaOH. Giống dùng trong quá trình lên men là *Lactobacillus acidophilus*. Lượng giống cho vào để lên men là 5% so với dung dịch lên men.

Sau khi lên men xong, người ta dùng Na₂CO₃ đưa pH dung dịch lên men đến 6,5 và thực hiện các điều kiện cho việc tạo thành sodium lactate như phương pháp truyền thống. Toàn bộ dung dịch, cả phần muối lactate và sinh khối được đưa vào thiết bị thẩm tích để thu nhận sodium lactate ở dạng lỏng và sinh khối vi sinh vật. Sinh khối vi sinh vật có khả năng lên men sẽ được chuyển ngược lại để lên men kế tiếp. Sodium lactate được cô đặc chân không và được chuyển sang máy thẩm tích trích ly để thu nhận lactic acid tinh khiết. Dung dịch lactic acid sẽ được đưa qua hai cột trao đổi ion

để tách các cation Na^+ và các cation khác. Ở cột trao đổi ion thứ hai sẽ tách anion SO_4^{2-} . Lactic acid sau khi qua hai cột lọc này sẽ có độ tinh khiết rất cao khoảng 99%.

3.1.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến vi khuẩn lactic

- Ảnh hưởng của nhiệt độ: Nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến hoạt động của vi khuẩn lactic. Khoảng nhiệt độ phát triển của vi khuẩn lactic khá rộng, đa số vi khuẩn lactic có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ từ $15 - 40^\circ\text{C}$. Đặc biệt một số loài có thể phát triển ở 55°C trong khi một số loài khác có thể phát triển được ở 5°C .

- Ảnh hưởng của pH: pH môi trường tác động đến hệ enzyme của vi khuẩn lactic ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của tế bào. Các giống vi khuẩn lactic khác nhau có pH tối thích khác nhau: *Lactobacillus* là 5,5 – 6,2; *Pediococcus* 5,5 – 6,5; *Leuconostoc* 6,3 – 6,5.

- Ảnh hưởng của oxygen: Vi khuẩn lactic có thể sống ở điều kiện môi trường kỵ khí đến vi hiếu khí, do chúng không có hệ enzyme oxy hóa khử xitocrom và catalase trong tế bào. Ảnh hưởng của oxygen còn phụ thuộc vào các điều kiện khác của môi trường như nhiệt độ, ví dụ loài *Lactobacillus brevis* phát triển tốt ở nhiệt độ 30°C trong điều kiện kỵ khí và hiếu khí, tuy nhiên ở 37°C nó chỉ phát triển trong điều kiện hiếu khí.

3.1.5. Ứng dụng của vi khuẩn lactic

- Sản xuất lactic acid: Lactic acid là nguyên liệu rất cần thiết của nhiều ngành công nghiệp thuộc da, công nghiệp dệt, trong in ấn và chế tạo chất dẻo, sơn. Lactic acid có vị chua dễ chịu nên được dùng trong thực phẩm như một chất gia vị đối với các loại đồ uống nhẹ, dịch quả, mứt, syrup và trong đồ hộp rau quả. Ngoài ra, muối lactat với các nguyên tố vi lượng được dùng trong dược phẩm nhằm bổ sung cho cơ thể dưới dạng dễ hấp thụ.

- Sản xuất sữa chua: Quá trình lên men sữa chua là do vi khuẩn lactic phát triển và tích tụ một lượng lactic acid gây đông tụ casein của sữa và tạo hương vị đặc trưng cho sản phẩm. Chúng vi khuẩn thường sử dụng là *Lactobacillus Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*. Lên men trong điều kiện kỵ khí, nhiệt độ duy trì $40 - 50^\circ\text{C}$. Sản phẩm có màu trắng ngà, hơi chua, ngọt nhẹ, có mùi thơm đặc trưng.

- Sản xuất phô mai: Phô mai là sản phẩm thu được từ casein sữa đông tụ, rồi được lên men tiếp tục nhờ vi khuẩn lactic và vi khuẩn propionic hoặc nấm sợi *Penicillium camemberti*. Giống vi khuẩn lactic thường sử dụng là *Streptococcus lactic*, *Lactobacillus*...

- Tạo các chất kháng khuẩn: Vi khuẩn lactic có khả năng tạo ra các sản phẩm có thể ức chế một số vi sinh vật có hại. Các sản phẩm sau khi lên men như acid hữu cơ, diacetyl, hydrogen peroxyde và đặc biệt là bacteriocin có khả năng ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây thối, hỏng và mang mầm bệnh trong các sản phẩm thực phẩm. Đây là vấn đề đang được các nhà khoa học và các nhà công nghiệp thực phẩm quan tâm, chúng được sử dụng trong chế biến và bảo quản thực phẩm.

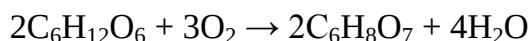
Ngoài ra, trong lĩnh vực y tế và chăm sóc sức khỏe, người ta sử dụng chế phẩm sinh học từ vi khuẩn lactic để bổ sung vào khẩu phần thức ăn của người già, em bé và người bệnh nhằm bổ sung vi khuẩn lactic trong đường ruột để kích thích quá trình tiêu hóa, tiêu diệt các vi sinh vật nhiễm trùng, chữa bệnh đầy hơi và rối loạn tiêu hóa. Những vi khuẩn có khả năng sinh chất ức chế sinh học còn được sử dụng làm dược phẩm để chữa các chứng bệnh về đường ruột như tiêu chảy, nhiễm trùng, vì chúng có khả năng tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella*, *Sarcina*, *Bacillus*.

3.2. Lên men citric acid

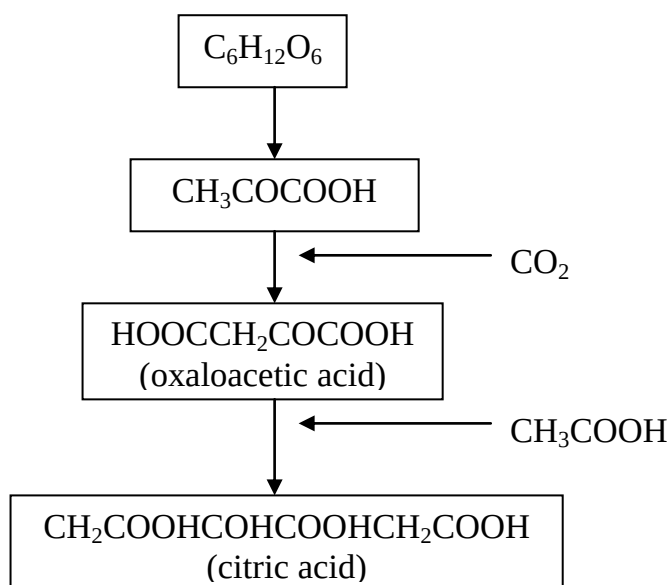
Citric acid hay limonic acid ($C_6H_8O_7$) có nhiều trong thiên nhiên, đặc biệt trong các loài cây ăn quả có múi (họ *Rutaceae*) được dùng chủ yếu trong chế biến thực phẩm và dược phẩm. Trước đây citric acid được thu từ các loại quả, từ năm 1927 thì acid này được sản xuất ở mức độ công nghiệp bằng con đường lên men nhờ nấm mốc sẽ chuyển hóa đường thành acid citric.

3.2.1. Cơ chế của quá trình

Quá trình sinh tổng hợp citric acid ở vi sinh vật có thể biểu diễn bằng phương trình tổng quát như sau:



Cơ chế của sự chuyển hóa này có thể được biểu diễn như sau: Đường glucose qua chu trình EMP tạo thành pyruvic acid, kết hợp với sự có mặt của CO_2 và acetic acid chuyển tiếp tạo thành oxaloacetic acid và citric acid.



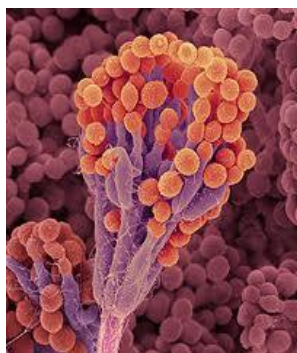
Hình 5.20. Sơ đồ cơ chế tạo thành citric acid từ glucose

Trong sản xuất các acid hữu cơ thực phẩm thì citric acid được đặc biệt chú ý vì có vị ngon và có những tính chất lý hóa đặc biệt nên acid này được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực công nghiệp thực phẩm: công nghiệp bánh kẹo, công nghiệp sản xuất rượu vang, công nghiệp chế biến nước giải khát không chứa rượu, công nghiệp dược, công nghiệp dệt, công nghiệp da, công nghiệp luyện kim và là thành phần quan trọng của nhựa hóa học.

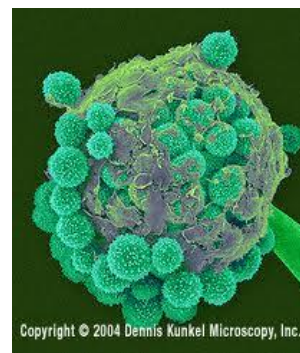
3.2.2. Tác nhân vi sinh vật



Hình 5.21. *Aspergillus*



Hình 5.22. *Penicillium*



Hình 5.23. *Mucor*

Để sản xuất citric acid người ta thường dùng những vi sinh vật như *Aspergillus niger*, *A. clavarius*, *Penicillium luteum*, *P. citrinum*, *Mucor piriformis* và nhiều loài thuộc nấm sợi thuộc chi *Mucor*. Trong số đó *A. niger* có hoạt lực cao hơn cả và được dùng rộng rãi trong công nghiệp lên men citric.

3.2.3. Công nghệ lên men acid citric

Nguyên liệu dùng trong sản xuất là rỉ đường và tinh bột. Rỉ đường là nguyên liệu thường dùng và kinh tế hơn cả. Cũng có thể sử dụng tinh bột tan, nhưng người ta hay dùng dịch đường thủy phân từ tinh bột. Gần đây, có công nghệ sản xuất acid citric bằng cách cấy mốc trên cơ chất bột sản thu được hiệu suất cao và hiệu quả các quá trình là rất kinh tế.

Nhiệt độ thích hợp cho phát triển và lên men là 30 – 32⁰C. Nguồn carbon tốt nhất đối với *A. niger* là saccharose. Nồng độ đường trong môi trường 10 – 20% là thích hợp hơn cả. Nguồn nitrogen vô cơ dùng trong lên men acid citric tốt nhất là nitrate, còn nitrogen hữu cơ là nước chiết đậu tương. Ngoài ra, trong môi trường lên men cần bổ sung các nguyên tố khoáng P, Mg, K, Fe và Zn.

Acid citric có thể sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt hoặc bằng phương pháp lên men chìm. Trong quá trình nuôi cấy bề mặt, nấm mốc tạo thành màng trên môi trường dinh dưỡng còn trong nuôi cấy chìm sợi nấm nằm toàn bộ trong dịch lên men. Phương pháp lên men chìm có nhiều ưu điểm hơn phương pháp lên men bề mặt: có thể lên men với lượng lớn hơn, hiệu suất lên men cao hơn, đảm bảo vô trùng trong quá trình nuôi, rút ngắn được thời gian lên men, dễ tự động hóa và giảm được nguồn lao động. Do vậy, hiện nay người ta sản xuất acid citric chủ yếu bằng phương pháp nuôi cấy chìm.

Quá trình lên men sản xuất acid citric gồm các công đoạn sau:

*Hoạt hóa giống và nhân giống sản xuất

Giống được hoạt hóa trong phòng thí nghiệm và thu nhận một lượng lớn bào tử nuôi cấy trên môi trường bề mặt. Sau đó chuẩn bị môi trường nhân giống bằng cách cho rỉ đường 3 – 4%, bổ sung dung dịch các chất dinh dưỡng vào nồi nhân giống, cấy giống vào môi trường với lượng 3g giống khô trong 2 – 3 lít dung dịch đường. Sau đó cung cấp khí vô trùng và đảo trộn, duy trì áp suất trong nồi 0,1 – 0,2atm, nhiệt độ 34 – 35⁰C, thời gian nuôi 28 – 36 giờ.

*Chuẩn bị môi trường lên men

Trước hết, dùng hơi nóng cao áp để tiệt trùng thiết bị và đường ống. Sau đó cho dung dịch rỉ đường với hàm lượng 3 – 4% và các chất dinh dưỡng khác vào nồi, khuấy đều. Sau khi thanh trùng, cấy giống từ nồi nhân giống vào nồi lên men. Trong quá trình chuẩn bị môi trường, cần chuẩn bị dịch rỉ đường vô trùng với nồng độ 25 – 28% để bổ sung vào nồi lên men trong quá trình nuôi.

*Lên men

Trong quá trình lên men, lượng đường giảm dần, dùng dung dịch rỉ đường có nồng độ 25 – 28% để bổ sung gián đoạn vào nồi lên men. Thời kỳ đầu duy trì nhiệt độ 33 – 34⁰C, sau khi quá trình lên men tạo acid mạnh thì giữ ở nhiệt độ 31 – 32⁰C.

***Tách nấm mốc**

Trước khi kết thúc quá trình lên men cần kiểm tra dịch lên men cách 4-6 giờ. Nếu hàm lượng acid không thay đổi thì coi như kết thúc quá trình lên men. Dịch lên men được đun nóng lên 60 – 65⁰C và chuyển vào thùng trung gian để tách sinh khối. Sinh khối nấm mốc được tách bằng thiết bị lọc chân không.

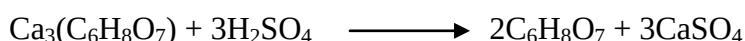
***Tạo calcium citrate**

Trong dung dịch đã lên men là các hợp chất: acid citric, acid gluconic, acid oxalic, đường không lên men và các loại muối khoáng. Acid citric được tách bằng cách cho chúng liên kết với Ca²⁺ để tạo thành muối calcium citrate ít tan.

Quá trình tạo muối được tiến hành như sau: dịch lên men đã tách sinh khối được cho vào nồi trung hòa bằng sữa vôi (có khuấy) và đun sôi. Quá trình trung hòa kết thúc khi pH=6,8 – 7,5. Sau đó dùng thiết bị lọc chân không để tách các chất kết tủa là canxi citrat và canxi oxalat, sau đó đem sấy khô.

***Tách acid citric**

Sử dụng H₂SO₄ để tách acid citric từ muối calcium citrate. Đầu tiên hòa tan acid citric trong muối calcium citrate bằng nước, khuấy trộn và cho H₂SO₄, đun sôi khoảng 10 – 15 phút.



Để tách calcium oxalate có mặt trong acid citric, sử dụng một lượng dư acid sulfuric khi đó calcium oxalate sẽ kết tủa với thạch cao được tạo thành và trong dung dịch chỉ còn acid citric. Lọc chân không để loại kết tủa có chứa thạch cao, calcium oxalate, than hoạt tính, các sulfur của các kim loại nặng.

Cô dung dịch acid citric trong thiết bị cô chân không. Giai đoạn đầu đạt tỷ trọng 1,24 – 1,26; giai đoạn hai đạt tỷ trọng 1,32 -1,36 tương ứng với nồng độ 80% acid citric.

*** Kết tinh và sấy khô acid citric**

Hạ nhiệt độ đến 35 – 37⁰C thì cho mầm kết tinh (citric acid) vào để kết tinh và tiếp tục làm lạnh đến 8 – 10⁰C và cho khuấy liên tục trong 30 phút. Sau đó cho sang thiết bị cô ly tâm để tách tinh thể đưa đi sấy khô, thu nhận sản phẩm.

3.2.4. Các yếu tố quyết định đến quá trình sản xuất citric acid

- Môi trường dinh dưỡng bao gồm đường, các hợp chất hữu cơ, vô cơ. Để nuôi cấy *Asp. niger* sử dụng môi trường có thành phần (g/l):

Saccharose – 140; NH₄N₃ – 2,23; KH₂PO₄ – 1; MgSO₄.7H₂O – 0,23.

- Môi trường lên men bao gồm:

Nước 1000 ml + đường 150g + NH₄Cl 1,9g và bổ sung ZnSO₄ làm tăng khả năng tích lũy citric acid.

- pH môi trường:

+ Để nấm mốc phát triển tốt duy trì pH 6

+ Để lên men tốt pH 3,4 – 3,5

+ Điều chỉnh pH thường dùng acid HCl

Vì điều kiện môi trường để nấm mốc phát triển và thu acid là khác nhau nên trong sản xuất phải chuẩn bị môi trường cho nấm mốc phát triển đầy đủ, sau đó điều chỉnh môi trường thích hợp để lên men citric.

- Sự thoáng khí: Tất cả hệ sợi của nấm mốc là loại hiếu khí điển hình, rất cần oxygen tự do. Trong sản xuất có thể dùng quạt gió vô trùng vào phòng lên men hoặc thổi khí vô trùng vào dịch lên men.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ: Nhiệt độ thích hợp khoảng 31 – 37°C. Sinh khối nấm mốc phát triển mạnh ở 34 – 37°C. Để tạo ra nhiều acid cần duy trì ở nhiệt độ thấp hơn 31 – 32°C.

- Thời gian nuôi cấy 7 – 10 ngày.

3.3. Lên men acetic acid

Acetic acid là hóa chất thông dụng được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp để sản xuất: chất dẻo, sợi tổng hợp, phim ảnh, sản xuất bột sơn, thực phẩm, hóa dược, các loại dung môi, điều chế các ester có mùi hoa quả, điều chế acetone....

Acetic acid có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp hóa học từ rượu methylic, rượu ethylic, từ khí thiên nhiên hay khí tổng hợp... hoặc bằng phương pháp lên men.

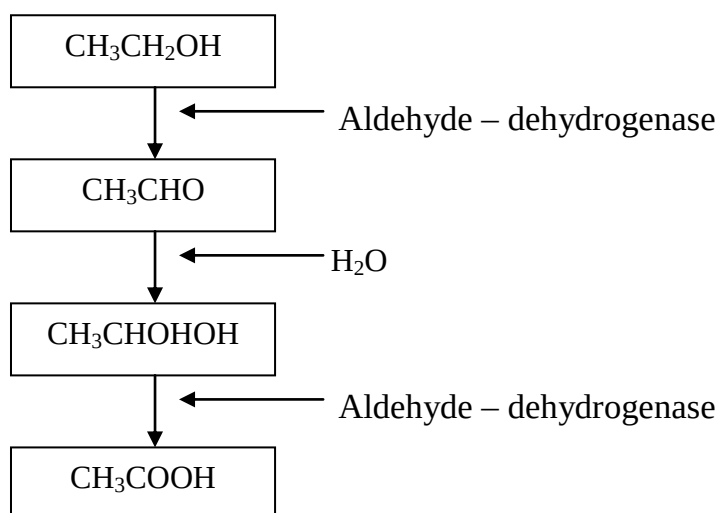
3.3.1. Cơ chế của quá trình

Bản chất sinh hóa của quá trình lên men acetic là quá trình oxy hóa rượu thành acetic acid, nhờ vi khuẩn acetic, trong điều kiện hiếu khí. Phương trình tổng quát:



Quá trình này gồm hai phản ứng dehydrogen với enzyme của vi khuẩn acetic xúc tác:

Ngoài việc oxy hóa rượu ethylic, vi khuẩn này còn có khả năng oxy hóa các rượu khác thành các acid tương ứng. Ví dụ: oxy hóa rượu propylic thành propionic acid, rượu butylic thành butyric acid, glycerine thành dioxy – acetone.

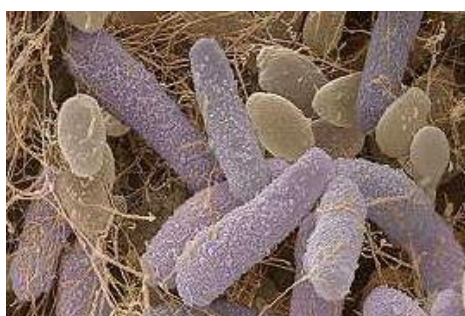


Hình 5.24. Sơ đồ cơ chế chuyển hóa rượu ethylic thành acetic acid

3.3.2. Tác nhân vi sinh vật

Vi khuẩn *Acetobacter* là tác nhân chính của quá trình lên men acetic, với hơn 20 loài. Những vi khuẩn này dễ tìm thấy trong không khí, đất và nước. Vì vậy khi các dịch nước quả, bia, rượu thấp, dịch đường... để hở tiếp xúc với không khí dễ bị vẩn đục nhẹ, trên bề mặt tạo thành một lớp màng mỏng mịn màu trắng xám hoặc vàng trắng. Đó là do các vi khuẩn acetic phát triển.

Acetobacter xylinum: Trục khuẩn hình que, kích thước khoảng 2μm, đứng riêng lẻ hoặc xếp thành từng chuỗi, Gram âm không sinh bào tử, không di động. Khi nuôi cấy trong môi trường dịch lỏng sẽ tạo trên bề mặt môi trường một lớp màng cellulose, đó là tập hợp các tế bào vi khuẩn liên kết với các phân tử cellulose. Màng này sẽ bắt màu xanh khi nhuộm với thuốc nhuộm iode và dung dịch sulfuric acid 60%.



Hình 5.25. *Acetobacter xylinum*



Hình 2.26. *Acetobacter aceti*

Acetobacter aceti: Trục khuẩn ngắn hình que, không sinh bào tử, thường kết hợp với nhau tạo thành chuỗi dài, kích thước 0,4 – 0,8 x 1,0 – 1,2 μm, không di động, bắt màu Gram âm, bắt màu vàng với thuốc nhuộm iode. Giống này có thể phát triển ở nồng độ rượu 11% và tích tụ trong môi trường 6% acetic acid. Nhiệt độ tối thích cho sinh trưởng là 34°C, môi trường bia thích hợp cho sự phát triển của loài này.

Acetobacter orleanense: Trục khuẩn dài vừa phải, không di động, khi gặp nhiệt độ cao có thể sinh ra các tế bào dị hình: tế bào kéo dài hay phình to hơn. Hai đầu tế bào hơi nhọn, phát triển thành màng mỏng nhưng chắc trên bề mặt dịch nuôi cấy.

Giống này có thể phát triển ở dung dịch 10 – 12% rượu và tạo thành được 9,5% acetic acid, nhiệt độ thích hợp 25 – 30°C.

Acetobacter schiitzenbachii: Tế bào hình que, kích thước 0,3 – 0,4 x 1,0 – 3,6 µm, có thể kết hợp thành chuỗi đứng riêng lẻ hoặc xếp thành đôi, Gram âm không sinh bào tử, không chuyển động. Các tế bào già tạo thành màng dày nhưng không chắc. Giống này có thể tích lũy trong môi trường khoảng 11,5 – 12% acetic acid, có thể dùng để sản xuất bằng phương pháp lên men chìm.

Acetobacter pasteurianum: Trục khuẩn ngắn, hình thái gần giống với *Acetobacter aceti*, bắt màu xanh với thuốc nhuộm iode, tạo váng khô và nhẵn nhéo. Tế bào xếp rời nhau thành từng chuỗi, đôi khi có dạng chùy, phồng lên. Nhiệt độ thích hợp khoảng 30°C, chịu được nồng độ rượu thấp hơn *Acetobacter aceti* và tạo được 5 – 6% acetic acid.

Acetobacter suboxydans: Có dạng hình que ngắn, không có khả năng di động, đứng riêng lẻ hay xếp thành chuỗi ngắn, tạo thành váng mỏng dễ vỡ. Có khả năng chuyển hóa glucose thành gluconic acid, sorbic thành sorbose. Vi khuẩn này được sử dụng trong công nghiệp để sản xuất ascorbic acid (vitamin C). Giống này có thể phát triển ở dung dịch 12 – 13% rượu và tạo thành được 13% acetic acid, nhiệt độ thích hợp 28 – 30°C.

3.3.3. Công nghệ sản xuất acetic acid và lên men giấm

Giấm là một dung dịch acetic acid loãng, tùy nguyên liệu khác nhau ta thu được các loại giấm khác nhau: giấm vang, giấm đại mạch, hoa quả và rượu nguyên. Sau khi lên men giấm thu được dung dịch acetic acid 5 – 10% qua chưng cất thu được acetic acid có nồng độ 40 – 90%.

* Nguyên liệu dùng để sản xuất là các loại nước quả, rượu và bia kém phẩm chất, các loại dịch đường nhưng chủ yếu vẫn là các loại rượu. Trong đó nước nho và rượu nho là nguyên liệu sản xuất giấm có chất lượng cao. Rượu ethylic là nguồn nguyên liệu được dùng phổ biến trong công nghiệp lên men acetic. Các loại quả chín được ép lấy nước và các loại dịch đường có lẫn nấm men rượu sẽ xảy ra quá trình lên men rượu, biến các loại đường thành rượu ethylic và thu được dịch rượu nhẹ. Cũng có trường hợp người ta bổ sung nấm men *Saccharomyces* vào các loại dịch trước khi lên men giấm.

Trong môi trường dinh dưỡng, ngoài rượu ethylic cần phải có đầy đủ các chất đảm bảo cho hoạt động sống của vi khuẩn acetic, gồm carbon, nitrogen, các chất khoáng: K, Mg, Ca, Fe, P, S....

* Phương pháp lên men

- Phương pháp chậm còn gọi là phương pháp Orlean hoặc phương pháp Pháp. Phương pháp này dùng nước hoa quả làm nguyên liệu với giống *Acetobacter orleanense*. Phương pháp cho hiệu suất thấp, thời gian kéo dài nhưng thích hợp cho công việc làm giấm ở gia đình hoặc sản xuất giấm ở quy mô nhỏ trong các xí nghiệp dùng “rượu lại”, dịch đường, nước hoa quả hoặc bia hỏng, rượu vang kém chất lượng... cho nên lên men thu được giấm thơm ngon. Đây là phương pháp thủ công có từ lâu, chủ yếu là sản xuất giấm từ rượu vang. Trước hết, rượu vang được pha loãng và acid hóa bằng acetic acid, tỷ lệ acetic : rượu là 2 : 4 hoặc 3 : 3. Acetic acid pha trước có tác dụng tạo điều kiện cho vi khuẩn acetic phát triển, đồng thời ngăn chặn những vi sinh vật có hại.

Dịch lên men pha xong được đổ vào các thùng gỗ và đặt trong không khí. Trên bề mặt dịch lên men sẽ nhanh chóng tạo thành những màng vi khuẩn acetic. Do màng vi khuẩn chỉ hình thành ở bề mặt nên quá trình oxy hóa tiến hành chậm và chỉ kết thúc

sau vài tuần. Khi rượu còn một lượng nhỏ (0,3 – 0,5%) thì lấy giấm ra và cho dịch lên men mới vào. Để giấm tạo thành với màng vi khuẩn lâu ngày sẽ dẫn đến việc vi khuẩn acetic sẽ tiếp tục oxy hóa giấm thành CO₂ và H₂O. Kết thúc quá trình thu được giấm có nồng độ 5 – 6%. Để giữ được lâu cần thanh trùng Pasteur. Sản xuất theo phương pháp này giấm có ưu điểm rất thơm ngon.

- Phương pháp nhanh còn gọi là phương pháp Đức hiện nay được áp dụng chủ yếu trong công nghiệp sản xuất giấm ăn trên thế giới với các thùng lên men bằng gỗ hình trụ tới 10m³ hoặc lớn hơn trong đó đặt các phoi bào gỗ giẻ. Giống được dùng ở đây là *Acetobacter schiitzenbachii* được nhiễm vào phoi bào. Cho dịch lên men chảy qua các phoi bào nhiều lần, vi khuẩn acetic tiếp xúc với môi trường lên men và oxy hóa rượu thành acid. Nhờ phoi bào dòng môi trường chảy chậm, quanh co, diện tiếp xúc với vi khuẩn rất lớn. Để tăng hiệu quả oxy hóa người ta phun môi trường thành bụi và thổi không khí vào thùng lên men qua các lớp phoi bào từ dưới lên trên. Mỗi lần môi trường qua lớp phoi bào bị nóng lên vì phản ứng oxy hóa và vi khuẩn hô hấp tỏa nhiệt. Vì vậy, trước khi cho môi trường phun thành bụi lần kế theo cần phải làm lạnh. Môi trường có thể qua lớp phoi bào nhiều lần để cho vi khuẩn tiếp xúc và oxy hóa hầu hết rượu thành trong đó thành giấm. Nhiệt độ lên men trong khoảng 24 – 37°C, thời gian khoảng 3 – 7 ngày.

Ngoài hai phương pháp nhanh và chậm người ta còn chú ý đến phương pháp lên men chìm, là phương pháp hiện đại, ngày càng có ý nghĩa lớn. Các nồi lên men được thông khí mạnh, khi thay thế từng phần dịch dinh dưỡng cũng được thông khí đầy đủ. Sau khi ethanol được chuyển thành acetic acid thì cũng rút bớt phần lớn và bổ sung dịch mới vào nồi lên men tiếp tục. Với phương pháp lên men như vậy gần như là lên men bán liên tục. Các chủng *Acetobacter suboxydans* thích hợp với phương pháp lên men này, chúng có thể chuyển hóa toàn bộ ethanol thành acetic acid với điều kiện nồng độ rượu 12% trong môi trường có thêm ít glucose và sục khí rất mạnh. Lên men ở 28 – 32°C, thời gian khoảng 2 ngày.

3.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình oxy hóa

- Nồng độ acetic acid và rượu: Acetic acid sinh ra có tác dụng ức chế hoạt động của vi khuẩn acetic. Nồng độ acid thích hợp cho vi khuẩn hoạt động là 9 – 11%. Nồng độ rượu cao nhất để oxy hóa là 6 – 15% tùy từng loại vi khuẩn, trung bình là 11 – 13%. Khi không có rượu ethylic trong môi trường, vi khuẩn sẽ oxy hóa acetic acid thành CO₂ và H₂O. Quá trình này gọi là quá trình oxy hóa có hại cho sản xuất giấm, vì vậy trong dịch lên men luôn đảm bảo còn 0,3 – 0,5% rượu.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ: Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển và lên men thay đổi tùy loài vi khuẩn, trong thực tế sản xuất nhiệt độ thường dùng là 28 – 34°C.

- Sự thoáng khí: Không khí là điều kiện tối cần thiết cho vi khuẩn và sự oxy hóa. Quá trình oxy hóa chỉ xảy ra khi vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với oxygen tự do. Trong sản xuất giấm, điều kiện hiếu khí càng tốt, quá trình oxy hóa càng nhanh.

- Môi trường dinh dưỡng: Để đảm bảo hoạt động sống bình thường của vi khuẩn acetic, trong môi trường dinh dưỡng ngoài nước, rượu còn phải có muối vô cơ, carbohydrate và hợp chất nitrogen dễ hấp thụ. Trong sản xuất người ta thường dùng môi trường có thành phần như sau: cứ 100l cồn tuyệt đối thêm 25g superphosphate, 25g ammonsunphate, 0,9g kalicarbonat, 500g glucose hoặc dịch đường thủy phân từ tinh bột tính tương đương với lượng glucose, bổ sung thêm nước thành 1000l môi trường.

3.3.5. Ứng dụng của vi khuẩn *Acetobacter*

- Chế tạo chế phẩm EM (Effective Microorganisms): EM có tác dụng với nhiều lĩnh vực công nghiệp, nông nghiệp, bảo vệ môi trường... Đặc biệt trong lĩnh vực xử lý rác, EM giúp khử mùi hôi giảm chi phí 10 lần so với đốt rác.

- Sản xuất vitamin C: Gồm nhiều quá trình hóa học và sinh học. Nguyên liệu để sản xuất vitamin C là L – sorbose được thu từ quá trình chuyển hóa hóa học glucose thành D – sorbic, dưới tác dụng của enzyme sorbic dehydrogenase của vi khuẩn *Acetobacter suboxydans* chuyển hóa D – sorbic thành L – sorbose.

- Sản xuất calcium gluconate: Ứng dụng khả năng biến đổi đường thành glucose thành gluconic acid, từ gluconic acid người ta chế tạo ra calcium gluconate, được sử dụng trong dược phẩm bổ sung calcium cho con người.

- Tạo màng sinh học trị bỏng: Màng cellulose do vi khuẩn *Acetobacter xylinum* tạo thành được tẩm dầu mù u có tác dụng sinh học trong điều trị bỏng thực nghiệm. Các vết bỏng được điều trị dần dần thu hẹp diện tích, sạch, khô và không bị nhiễm trùng. Sản phẩm màng sinh học điều trị bỏng và các tổn thương về da có hiệu quả cao và có giá trị kinh tế.

- Sản xuất thạch dừa: Là quá trình oxy hóa với sự tham gia của vi khuẩn acetic trên môi trường nước dừa già hoặc nước cốt dừa trong điều kiện hiếu khí.

Nguyên liệu trong sản xuất thạch dừa gồm: nước dừa già chứa nhiều chất dinh dưỡng như: đường, protein, lipid, vitamin, và khoáng nhưng với nồng độ thấp; chủng giống là *Acetobacter xylinum*. Tiến hành nhân giống, có thể qua một cấp hoặc hai cấp hoặc nhiều hơn tùy theo quy mô sản xuất.

4. CÁC SẢN PHẨM VITAMIN VÀ ACID AMIN

4.1. Riboflavin (Vitamin B2)

Lần đầu tiên riboflavin được Kulm chiết tách từ trứng vào năm 1933, ông đặt tên là ovoflavin. Sau đó các nhà khoa học Booher, Ellinger, Koscharka tách được riboflavin từ casein. Công thức hóa học của riboflavin: $C_{17}H_{20}N_4O_6$

Riboflavin được tổng hợp bằng cả hai con đường hóa học và vi sinh vật. Riboflavin là hợp chất mẹ của flavin, FAD và FMN tức là của các coenzyme giữ vai trò quan trọng trong các enzyme tham gia vào các phản ứng oxy hóa – khử trong hầu hết mọi sinh vật.

4.1.1. Cấu tạo hóa học và tính chất của vitamin B₂

Riboflavin có phân tử lượng là 376

Tinh thể nhỏ, hình kim, màu vàng

Điểm nóng chảy là 292⁰C

Có vị đắng, có khả năng hòa tan trong nước và các loại dung môi

Riboflavin ổn định ở nhiệt độ thường nên rất dễ bảo quản

Riboflavin tham gia vào thành phần của enzyme flavinase

4.1.2. Tác nhân vi sinh vật

Riboflavin được tổng hợp bởi nhiều vi sinh vật, gồm cả vi khuẩn, nấm men và nấm sợi như *Mycobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Mycocandida* sp., *Candida* sp., *Ashby* sp., *Eremothecium* sp., trong đó đáng chú ý là giống nấm *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii*.

**Eremothecium ashbyii*

- Khuẩn ty có phân nhánh, kích thước của khuẩn ty 2 – 4 x 60 – 80µm. Khi còn non khuẩn ty có màu trắng, về già chuyển sang màu vàng.

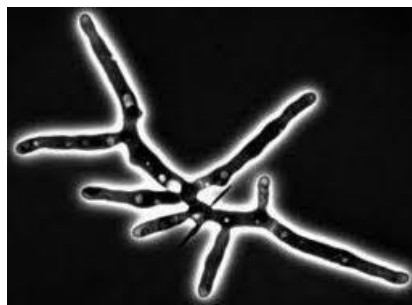
- Có khả năng đồng hóa glucose, saccharose, mannose, levulose.
- Có thể sử dụng nguồn nitrogen vô cơ và hữu cơ, đặc biệt là từ casein, globuline, glycerine có ý nghĩa rất lớn cho sự phát triển của chúng.
- Phát triển mạnh và tổng hợp nhiều vitamin B₂ nếu trong môi trường có mặt các chất kích thích sinh trưởng như thiamin, biotine, inozid.

**Ashbya gossypii*

- Có cấu tạo khuẩn ty phân nhánh.
- Có khả năng tạo bào tử, số lượng bào tử khoảng 4 – 32. Bào tử của chúng có dạng giống với vi khuẩn *Clostridium*.



Hình 5.27. *Ashbya gossypii*



Hình 5.28. *Eremothecium ashbyii*

4.1.3. Quá trình lên men

Có thể nuôi cấy nấm để sản xuất vitamin B₂ theo phương pháp nuôi cấy bề mặt hoặc nuôi cấy chìm.

Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt có thể sử dụng các nguồn nguyên liệu như khô lạc, khô đậu tương, các loại cám, mầm thóc, mầm đại mạch... Hàm lượng vitamin B₂ được tạo thành trên một số môi trường nuôi cấy bề mặt như sau (đơn vị γ/g): bã mía 130, khô hạt bông 1000, khô đậu tương 2200, khô lạc 3500, mầm đại mạch 6000, mầm thóc 5000, bã đậu 3000.

Trong công nghiệp thường sử dụng phương pháp nuôi cấy chìm để sản xuất. Thành phần môi trường như sau: saccharose 5%, dịch thủy phân protein 3%, phôi lúa mì 1%, cao thịt 0,3%, KH₂PO₄ 0,3%, NaCl 0,25%, pH ban đầu 6.

Lượng giống được cho vào thùng lên men tỷ lệ 1 – 1,5%, nhiệt độ lên men là 28 – 30°C, thổi khí liên tục, thời gian 7 ngày. Nếu bổ sung chất béo năng suất thu nhận riboflavin sẽ rất cao.

Riboflavin được tổng hợp trong tế bào nấm và được thoát ra ngoài môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên không phải tất cả riboflavin đều thoát ra môi trường bên ngoài mà trong tế bào còn một lượng lớn riboflavin. Tỷ lệ riboflavin ngoại bào và nội bào phụ thuộc nhiều vào khả năng sinh trưởng của giống sử dụng.

Trong quá trình lên men sự thay đổi pH rất phức tạp, hai ngày đầu pH giảm rõ rệt, sau đó pH tăng nhanh cùng với sự tạo thành riboflavin. Sử dụng 0,2% dầu đậu nành làm chất phá bọt trong quá trình lên men. Năng suất lên men thường đạt từ 800 – 1700 γ/ml riboflavin.

Dịch lên men được tiến hành cô chân không và sấy thành phẩm bằng thiết bị sấy hình trống, sản phẩm thu được có độ ẩm < 8% đóng gói và bảo quản. Có thể thu riboflavin tinh khiết từ những chế phẩm thô.

4.2. Cobalamine (vitamin B₁₂)

Năm 1955 đánh dấu sự hiểu biết về cấu tạo hóa học của vitamin B₁₂. Vitamin B₁₂ có ý nghĩa rất quan trọng trong quá trình trao đổi chất: nếu thiếu vitamin B₁₂ trong cơ thể con người và động vật sẽ gây ra hiện tượng rối loạn trao đổi chất carbohydrate và acid béo.

Vitamin B₁₂ tham gia vào việc sinh tổng hợp enzyme methyl malonyl-CoA-mutase và rất nhiều enzyme quan trọng khác. Các enzyme này tham gia vào các phản ứng chuyển methyl và quá trình tổng hợp methionine, colin, thimine.

Ngoài ra, vitamin B₁₂ tham gia vào việc đảm bảo hoạt động của các cơ quan tạo máu và làm tăng cường phản ứng bảo vệ cơ thể.

4.2.1. Cấu tạo hóa học và tính chất của vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂ có công thức hóa học là C₆₃H₉₀N₁₄O₁₄PCo

Thường ở dạng kết tinh, kích thước nhỏ, màu đỏ sẫm, không có mùi, vị.

Hòa tan trong nước, trong các dung dịch trung tính, trong cồn.

Vitamin B₁₂ khi tiếp xúc với kim loại nặng rất dễ mất hoạt tính, chúng không bền trong pH kiềm.

Vitamin B₁₂ có ở trong gan và các bộ phận khác của động vật, nhưng lại không tìm thấy chúng trong các tổ chức của thực vật bậc cao.

4.2.2. Tác nhân vi sinh vật

Tham gia trong quá trình sinh tổng hợp vitamin B₁₂ có nhiều loài vi sinh vật khác nhau:

* Vi khuẩn *Propionibacterium*: đại diện là *Propionibacterium shermanii* là giống có nhiều ưu điểm và có thể đưa vào sử dụng sản xuất công nghiệp. Một số đặc điểm quan trọng của loài vi khuẩn này:

- + Là trực khuẩn có kích thước nhỏ, xếp thành từng đôi hoặc tạo thành chuỗi ngắn trong tự nhiên

- + Thuộc loại hô hấp hiếu khí, có khả năng lên men acid lactic, glycerol, glucose, fructose, manit, lactose.

- + Khoảng pH hoạt động 4,5 – 7,5; pH tối ưu cho việc sinh tổng hợp vitamin B₁₂ là 5,8 – 7,5.

- + Nhiệt độ cho sự sinh trưởng và tổng hợp vitamin B₁₂ là 28 – 30°C.



Hình 5.29. *Actinomyces*



Hình 5.30. *Propionibacterium*

* Xạ khuẩn *Actinomyces*: đại diện là giống *Actinomyces olivaceus* có khả năng tổng hợp vitamin B₁₂. Các đặc điểm của chủng xạ khuẩn này:

- + Thuộc loại hiếu khí
- + Chúng phát triển và sinh nhiều vitamin B₁₂ trong môi trường chứa glucose, tinh bột, mật rỉ và bã rượu. Trong thành phần môi trường này cần bổ sung thêm các muối ammon, muối coban và CaCO₃.
- + Sinh tổng hợp vitamin B₁₂ mạnh sau 24 giờ nuôi cấy.
- + Nhiệt độ cho sự sinh trưởng và tổng hợp vitamin B₁₂ là 28 – 30°C.

4.2.3. Quá trình lên men

Quá trình lên men bằng vi khuẩn, được thực hiện ở pH ban đầu của môi trường là 6,8 – 7. Trong quá trình lên men phải điều chỉnh pH bằng NH₄OH.

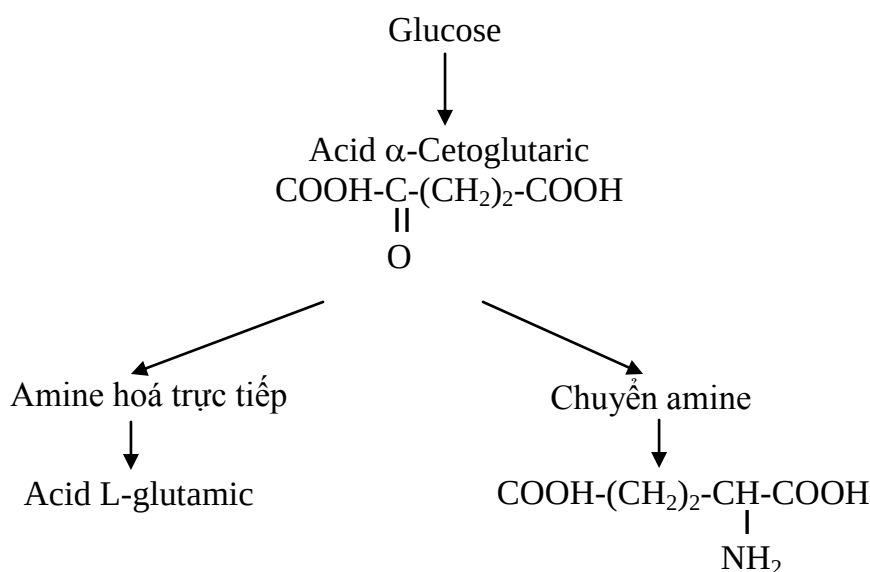
Quá trình lên men của xạ khuẩn xảy ra hai pha rõ rệt: pha tạo sinh khối, pha tạo sản phẩm vitamin B₁₂. pH ban đầu của quá trình lên men là 7. Ở pha thứ nhất pH giảm xuống còn khoảng 6,5 và bước sang pha thứ 2 pH tăng dần lên 8,2 – 8,7. Trong quá trình lên men luôn luôn sục khí, không điều chỉnh pH.

Thời gian lên men thường là 5 – 7 ngày. Đối với xạ khuẩn thời gian lên men thường ngắn hơn so với vi khuẩn. Dịch sau khi nuôi sẽ được ly tâm ở máy ly tâm cao tốc. Sinh khối sau khi thu nhận được đem sấy khô làm chế phẩm thô cho gia súc hoặc đem sinh khối chiết rút và tinh chế thu nhận vitamin B₁₂ tinh khiết.

4.3. Glutamic acid

4.3.1. Cơ chế sinh tổng hợp glutamic acid

Glutamic acid sản xuất bằng phương pháp lên men vi khuẩn. Quá trình này được xúc tác nhờ hệ enzyme có sẵn trong vi khuẩn, chuyển hoá qua nhiều giai đoạn trung gian với nhiều phản ứng khác nhau tạo ra nhiều sản phẩm phụ, và cuối cùng là sản phẩm glutamic acid. Thực chất của quá trình này là chuyển hoá đường (quá trình đường phân theo Embden-Meyerhoff), rồi sau đó thông qua chu trình Krebs của quá trình hô hấp hiếu khí của vi khuẩn, sản phẩm acid glutamic được tạo thành.



Hình 5.31. Sơ đồ chuyển hóa glucose thành glutamic acid

4.3.2. Tác nhân vi sinh vật



Hình 5.32. *Corynebacterium glutamicum*



Hình 5.33. *Brevibacterium*

Chủng vi sinh thường sử dụng là: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentus*, *Micrococcus glutamicus*. Chủ yếu dùng chủng *Corynebacterium glutamicum* (loại vi khuẩn này được nhà vi sinh vật Nhật Bản là Kinoshita phát hiện từ năm 1956 có khả năng lên men từ tinh bột, ngô, khoai, khoai mì để tạo ra glutamic acid).

Giống vi khuẩn thuần khiết này được lấy từ ống thạch nghiêng tại các cơ sở giữ giống, sau đó được cấy truyền, nhân sinh khối trong môi trường lỏng đã thanh trùng và đưa vào thiết bị lên men. Khi tuyển chọn chủng vi khuẩn phải có khả năng tạo ra nhiều glutamic acid, tốc độ sinh trưởng phát triển nhanh, có tính ổn định cao trong thời gian dài, chịu được nồng độ acid cao, môi trường nuôi cấy đơn giản, dễ áp dụng trong thực tế.

4.3.3. Quá trình lên men

Thành phần môi trường lên men phụ thuộc vào đặc điểm của chủng sản xuất. Nguồn carbon thường dùng là glucose, saccharose, dịch thủy phân tinh bột, rỉ đường, dịch thủy phân cellulose, các acid hữu cơ. Nồng độ đường trong môi trường tính theo sacchrose là 8 – 25%. Nguồn nitrogen thường bổ sung với tỷ lệ 1,5 – 2%, có thể dùng urea, muối urea. Ngoài ra còn bổ sung các muối khoáng, chất kích thích sinh trưởng như biotine, vitamin B...

Thời gian lên men phụ thuộc vào hàm lượng đường có trong môi trường, phương pháp bổ sung đường vào môi trường một lần hay nhiều lần, mức độ thông khí phụ thuộc vào đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng giống sản xuất.

Lên men sản xuất glutamic acid là nuôi cấy theo mẻ và yêu cầu vô trùng. Giống sau khi hoạt hóa thông qua bình tam giác nuôi trên máy lắc hay trong nồi lên men. Mỗi một cấp độ nuôi cấy thường kéo dài từ 18 – 24 giờ, giống cấy vào môi trường mỗi cấp khoảng 5 – 6% thể tích môi trường và thời gian lên men kéo dài 2 - 3 ngày.

Sơ đồ quá trình lên men sản xuất acid glutamic tuân thủ theo quá trình lên men chung: nhân giống, chuẩn bị môi trường, thanh trùng, làm lạnh, cấy giống, lên men, tách và tinh chế glutamic acid, chuyển sang mono – glutamate, sấy khô và đóng gói.

Các phương pháp tinh sạch, kết tinh glutamic acid từ dịch lên men như sau:

- Phương pháp sử dụng điểm đẳng điện.
- Phương pháp tạo hydrochlorite của glutamic acid.
- Phương pháp dùng dung môi hữu cơ để hoà tan glutamic acid rồi tách.
- Phương pháp trao đổi ion.
- Phương pháp chuyển glutamic acid thành các muối kim loại khó tan rồi tách.
- Phương pháp điện thẩm tích chuyển glutamic acid về phía cực dương.

Trong đó, phương pháp sử dụng điểm đẳng điện là đơn giản được ứng dụng nhiều ở các nhà máy sản xuất mì chính, phương pháp này chia làm 5 bước:

+ Cô đặc dung dịch lên men ở nhiệt độ 50 – 60°C, đến 1/3 – 1/2 dung tích ban đầu.

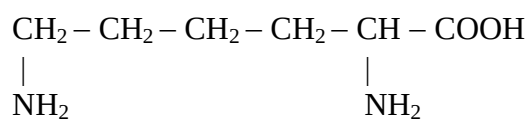
- + Tẩy màu
- + Dùng HCl đưa pH đến điểm đẳng điện là 3,2
- + Kết tinh trong điều kiện lạnh
- + Ly tâm để tách glutamic acid.

Nhược điểm của phương pháp này là hiệu suất thu hồi thấp, thường chỉ đạt 50 – 60% glutamic acid có trong dịch lên men.

Triển vọng nhất và được nhiều nơi ứng dụng là phương pháp dùng nhựa trao đổi resin. Nhựa trao đổi resin có hai loại: resin dương tính (mang tính acid) và resin âm tính (mang tính kiềm). Dịch lên men có chứa glutamic acid và tạp chất cho chảy qua cột nhựa (có chứa resin) từ dưới lên với tốc độ 150 – 180 lít/phút, thời gian chảy qua cột là 150 – 180 phút. Song song, người ta cho dòng nước chảy qua cột cùng chiều với dung dịch lên men để rửa các vi khuẩn bám vào bề mặt resin. Giữ nhiệt độ trong cột trao đổi ion là 60 – 65°C. Sau khi kết thúc quá trình trao đổi ion, dùng NaOH 4 – 5% để tách glutamic acid ra khỏi cột (tốc độ chảy NaOH là 5 – 6 m/giờ, lưu lượng 100 lít/phút).

4.4. Lysine

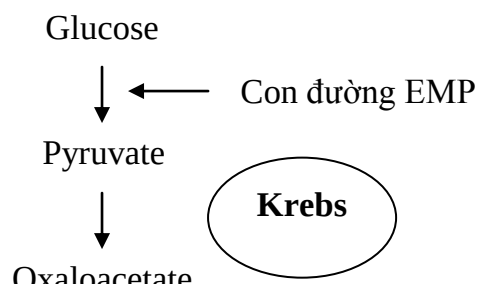
L-lysine là một amino acid không thay thế, rất cần cho hoạt động sống của người và động vật. Công thức hóa học như sau:



4.4.1. Cơ chế sinh tổng hợp lysine

Từ sơ đồ hình 5.34 cho ta một nhận xét cần quan tâm: muốn vi khuẩn tạo ra nhiều lysine thì sự chuyển hoá phải theo nhánh (3). Ở đây, các chủng đột biến mất enzyme homocerin dehydrogenase, do đó sẽ không tạo ra treonine. Mặt khác, enzyme dihydropicolinatsynthetase không mẫn cảm dị lập thể nên sự ức chế không còn. Kết quả là lysine sẽ được tổng hợp thừa.

Quá trình tổng hợp lysine xảy ra theo sơ đồ sau:



4.4.2. Tác nhân vi sinh vật

Thường sử dụng trong công nghiệp sản xuất lysine các chủng vi khuẩn đột biến không có khả năng tổng hợp enzyme homocerin – dehydrogenase, như:

Corynebacterium glutamicum: là loại vi khuẩn lên men được saccharose, fructose, glucose, maltose; không lên men được lactose, galactose và các đường pentose.

Brevibacterium lactofermentum: khuẩn lạc màu vàng nhạt hoặc vàng, có khả năng lên men các loại đường như *Corynebacterium glutamicum*.

Brevibacterium flavum: khuẩn lạc màu vàng nhạt, và có các đặc điểm tương tự *Brevibacterium lactofermentum*.

Ngoài ra có thể sử dụng các chủng *S. cerevisiae*, *Torulopsis utilis*, *Bacterium megatherum*, *Brevibacterium* sp., *Streptomyces coroniformis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium acetophilum*, *C. glutamicum*; từ paraffin *Alcaligenes marshallii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Nocardia* sp.

4.4.3. Quá trình lên men

Trong quá trình lên men, người ta thường chuẩn bị môi trường có nồng độ đường khoảng 10 – 12%. Trong thực tế sản xuất, người ta thường sử dụng dung dịch đường từ quá trình thủy phân bột ngô, bột sắn, và mật rỉ. Ngoài ra bổ sung nguồn nitrogen như urea, các loại muối ammon hoặc dung dịch amoniac; các muối khoáng: thường sử dụng ở dạng muối phosphorus nồng độ khoảng 0,008 – 0,02 mg/l. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ với hàm lượng 0,03 – 0,5%.

Nhiệt độ trong quá trình lên men là 28 – 30°C, pH 7 – 7,6

Quá trình lên men phải được thực hiện trong các thiết bị lên men có cánh khuấy và thổi khí liên tục.

Quá trình lên men xảy ra hai pha là pha tạo thành sinh khối và pha tạo thành lysine. Sự tạo thành sinh khối ở pha đầu tiên thường xảy ra rất mạnh trong thời gian 12 – 18 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy. Sau đó tốc độ tạo thành sinh khối sẽ chậm lại, trong thời gian này hàm lượng lysine được tổng hợp bắt đầu tăng dần. Pha tạo lysine kéo dài khoảng 40 – 60 giờ. Năng suất lysine sau khi lên men đạt 50 – 60 g/l.

Sau khi lên men, nồng độ chất khô trong dịch lên men khoảng 10 – 13%. Dịch sau lên men rất dễ bị hỏng do quá trình tự phân của vi khuẩn và do quá trình dễ bị nhiễm bởi các vi sinh vật khác. Do đó, người ta thường giải quyết theo hai cách sau:

+ Đem dịch sau lên men đi thu nhận và tinh chế lysine ngay.

+ Dùng HCl acid hoá dung dịch lên men đến pH 5. Đồng thời, người ta bổ sung NaHSO_3 với liều lượng 0,4% so với dịch lên men để bảo quản dung dịch lên men.

*Quá trình thu nhận lysine tiếp tục được thực hiện như sau:

- Dung dịch lên men được bơm vào nồi cô chân không, tiến hành cô cho đến khi cho đến khi nồng độ chất khô trong dung dịch đạt 35 – 40%. Ta thu được chế phẩm thô đầu tiên. Chế phẩm này có chứa khoảng 15 – 20% lysine ở dạng monochlohydrate, 15 – 17% protein, 4% amino acid, 10 – 13% betaine, 20 – 25% tro và các thành phần dinh dưỡng khác. Ta có thể sử dụng ngay chế phẩm này cho chăn nuôi gia súc. Dạng chế phẩm này có thể bảo quản trong thời gian 4 tháng. Do đó, muốn bảo quản lâu hơn, người ta phải tạo ra những sản phẩm có độ ẩm thấp bằng phương pháp sấy khô.

- Để thu nhận lysine tinh khiết thường thực hiện các bước sau:

Dịch lên men được tiến hành ly tâm để loại bỏ sinh khối và các thành phần không tan. Dịch sau ly tâm sẽ được đưa qua hệ thống trao đổi ion cationit. Sau đó cột được rửa nhiều lần cho hết màu và tiến hành quá trình nhả hấp phụ bằng 0,5 – 5% dung dịch ammoniac. Đun nóng dung dịch chứa lysine để đuổi ammoniac. Sau đó dùng HCl hạ pH của dung dịch xuống 4,9 – 5. Tiến hành cô chân không để nồng độ chất khô trong dung dịch đạt 30 – 50%. Dưới tác dụng của HCl, lysine sẽ chuyển thành dạng monochlohydrate lysine. Tiến hành làm lạnh toàn bộ đến nhiệt độ 10 – 12°C. Khi đó thấy xuất hiện những tinh thể có màu vàng nhạt. Người ta tiến hành ly tâm để thu nhận tinh thể. Dịch sau ly tâm sẽ tái kết tinh để thu nhận triệt để lysine có trong dịch lên men.

Muốn tinh thể sạch hơn, người ta hòa tan tinh thể trong cồn và tái kết tinh lại. Làm lại nhiều lần như vậy ta sẽ có lysine tinh thể sạch, độ tinh khiết khoảng 97%, độ ẩm 0,5%, tro 0,3%, sản phẩm được dùng trong thực phẩm và y học.

5. CÁC CHẤT KHÁNG SINH

Năm 1929, nhà vi sinh vật học người Anh, Alexander Fleming nhận thấy một hiện tượng kỳ lạ trên đĩa thạch mà ông đã cấy tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) tình cờ nhiễm một loại nấm mà xung quanh khuẩn lạc của nó là một vùng trong, vi khuẩn không phát triển được. Ông đã tách chiết, phân lập và nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của nó và nấm này thuộc chi *Penicillium*, do vậy ông gọi tên nó là penicillin. Đây là chất kháng sinh đầu tiên được tìm thấy.

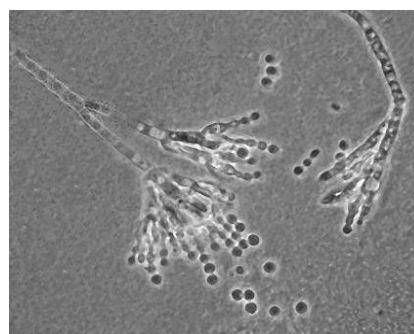
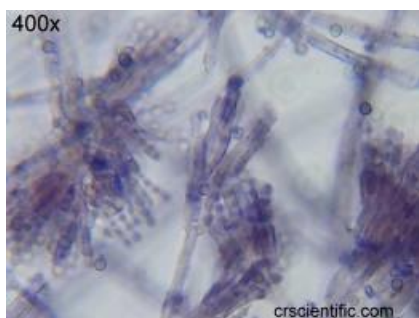
Cho đến chiến tranh Thế giới II, với sự hợp tác của các nhà vi sinh vật Anh và Mỹ, chất kháng sinh của Fleming mới được bắt đầu sản xuất ở mức độ lớn và trở thành

loại thuốc “thần kỳ” cứu sống nhiều người. Đến năm 1945, A. Fleming, E. Chain, H. Florey cùng được nhận giải Nobel về công trình penicillin.

5.1. Penicillin

5.1.1. Tác nhân vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật thuộc chi *Penicillium* và *Aspergillus* có khả năng sinh penicillin. Tuy nhiên chỉ có các loài *Penicillium notatum* và *P. chrysogenum* có hoạt tính kháng sinh cao và được dùng trong công nghiệp kháng sinh. Những chủng đầu tiên được sử dụng trong sản xuất chỉ đạt 10 – 15 đv/ml trong môi trường lên men bề mặt. Hiện nay, trong công nghiệp sản xuất penicillin bằng phương pháp lên men chìm, người ta chỉ sử dụng *P. chrysogenum* trong sản xuất công nghiệp.



Hình 5.35. Nấm mốc *Penicillium chrysogenum*

5.1.2. Quá trình lên men

Quá trình lên men penicillin thuộc vào loại lên men hai pha: pha sinh trưởng và pha tạo sản phẩm penicillin. Nguồn carbon trong lên men penicillin bởi nấm *P. chrysogenum* có thể là glucose, saccharose, lactose, tinh bột, dextrin, các acid hữu cơ (lactic, acetic, formic), các amino acid... Tuy nhiên, đường lactose có hiệu suất penicillin cao nhất và thường được dùng trong công nghiệp. Nhưng do nấm sử dụng đường lactose chậm, vì vậy trong thực tế lactose được dùng phối hợp cùng với đường khác (glucose, saccharose...) trong môi trường dinh dưỡng.

Trong pha lên men thứ nhất giống phát triển mạnh, sử dụng glucose và acid lactic của cao ngô. Sau đó, lactose mới được sử dụng (chủ yếu trong pha thứ hai tạo thành penicillin). Khi trong môi trường cạn lactose và không bổ sung các chất dinh dưỡng hệ sợi nấm sẽ bắt đầu tự phân, nếu tiếp tục lên men nồng độ penicillin sẽ giảm, trong thực tế sản xuất cần phải kết thúc lên men trước thời điểm này.

Trong công nghiệp sản xuất penicillin dựa trên nấm mốc *P. chrysogenum* có khả năng sinh penicillin cao, theo hai phương pháp:

- Lên men bề mặt: Phương pháp này được áp dụng trong thời gian đầu của công nghiệp kháng sinh. Môi trường nuôi cấy bề mặt có thể là các cơ chất rắn hoặc lỏng. Cơ chất rắn có thể là cám hoặc các loại hạt, cám được làm ướt rồi trải lên khay một lớp dày khoảng 2 cm, giống nấm mốc được trộn vào môi trường có độ ẩm 50 – 60% đã vô trùng để nguội tới 30°C. Thời gian lên men 6 – 7 ngày ở 24 – 28°C trong các buồng được điều chỉnh nhiệt độ, độ ẩm và thông gió. Nói chung, phương pháp này giống như lên men các enzyme bằng nấm mốc.

Môi trường lỏng dùng nguồn carbon là lactose, cao ngô và một số nguyên tố khoáng. Giống được cấy vào môi trường rồi lên men ở 24°C khoảng 6 – 7 ngày. Ngày nay phương pháp lên men chìm đã thay thế phương pháp lên men bề mặt.

- Lên men chìm: Thành phần môi trường gồm có cao ngô, glucose, lactose và các muối khoáng. Giống dùng trong công nghiệp thường ở dạng bào tử. Bào tử được nuôi trên các thùng nhân giống có khuấy và sục khí 36 – 50 m³/giờ để hệ sợi nấm phát triển, sau đó chuyển vào các thùng lên men. Quá trình lên men penicillin bằng nấm mốc *P. chrysogenum* ở 26 ± 1⁰C trong khoảng 120 – 125 giờ.

Trong quá trình lên men ở pha thứ nhất nấm phát triển hệ sợi mạnh, sinh khối tăng nhanh, các nguồn carbon dễ đồng hóa (glucose, saccharose) cùng các nguồn nitrogen được tiêu hao nhanh, cường độ hô hấp tăng dần đến cực đại, pH tăng và penicillin được tạo thành ít. Sang pha thứ hai hệ sợi nấm phát triển chậm, lactose được tiêu hao dần, pH tăng đến khoảng 7 – 7,5 và penicillin được tạo thành chủ yếu trong pha này. Nếu nguồn carbon trong môi trường cạn và sinh khối nấm mốc bắt đầu tự phân thì pH có thể tăng tới 8 hoặc hơn, lượng penicillin được tạo thành trong môi trường sẽ giảm. Vì vậy, quá trình lên men cần được kết thúc trước thời điểm hệ sợi nấm mốc bắt đầu tự phân. Nấm mốc sinh penicillin rất hiếu khí, cho nên quá trình nuôi cấy (nhân giống và lên men) cần phải sục khí và khuấy môi trường để đảm bảo độ hòa tan O₂ cân bằng với nhu cầu sinh lý của chúng. Nếu không đủ O₂ hiệu suất penicillin có thể giảm tới hai lần.

Các phương pháp thu nhận và tinh chế penicillin: trích ly bằng dung môi hữu cơ, hấp thụ, trao đổi ion. Trong đó, phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ được sử dụng nhiều hơn cả. Phương pháp này dựa trên những đặc điểm là: muối của penicillin rất dễ hoà tan trong nước, acid penicillic rất dễ hoà tan trong dung môi hữu cơ. Quá trình này được thực hiện qua hai giai đoạn:

+ Giai đoạn thứ nhất: Trộn nước và dung môi để tăng bề mặt tiếp xúc. Làm như vậy để các phân tử kháng sinh tiếp xúc chặt chẽ với dung môi. Tiến hành khuấy liên tục để đảm bảo quá trình tiếp xúc này đạt mức độ cao nhất.

+ Giai đoạn thứ hai: Sau khi tiếp xúc giữa kháng sinh và dung môi sẽ tạo ra kết tủa. Để tách kết tủa khỏi dung dịch người ta tiến hành ly tâm.

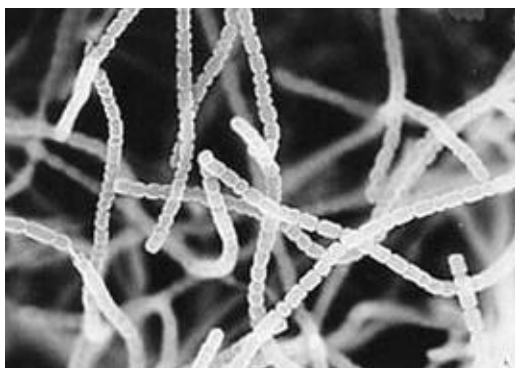
5.2. Streptomycin

5.2.1. Tác nhân vi sinh

Năm 1944, Waksman và Schatz đã phát hiện ra streptomycin từ dịch nuôi cấy một chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* (còn gọi là *Actinomyces streptomycin*).

Có khả năng đồng hóa mạnh các nguồn carbon như glucose, tinh bột, dextrin, fructose, galactose, mannose. Do đó người ta sử dụng tinh bột và glucose cho sản xuất streptomycin.

Streptomycin là một kháng sinh dùng phổ biến trong y học, thú y và bảo vệ thực vật.



5.2.2. Quá trình lên men

Sản xuất streptomycin chủ yếu bằng phương pháp nuôi cấy chìm, gồm hai pha:

- Pha thứ nhất (pha sinh trưởng mạnh). Các bào tử nảy chồi và mọc thành sợi sau 6 – 8 giờ, mỗi bào tử mọc một chồi, khuẩn ty thường thẳng và phân nhánh rất yếu, tế bào chất ưa kiềm.

- Pha thứ hai (khuẩn ty không phát triển). Cuối ngày thứ ba sợi xạ khuẩn bị chia nhỏ và bắt đầu tự phân.

Những giống sinh streptomycin rất không ổn định. Do đó, trong tương lai cần có sự can thiệp của kỹ thuật di truyền để tạo ra những giống có hoạt lực cao và ổn định để đưa vào sản xuất. Giữ bào tử ở dạng đông khô trong khoảng 5 năm có thể còn 96 – 99% hoạt lực, trong cát thạch anh tới 3 năm, trên môi trường thạch nước đậu ở 5°C tới 1 năm.

Quá trình lên men này cũng giống như lên men các loại kháng sinh khác, bao gồm các giai đoạn: nhân giống, lên men chính, thu nhận chế phẩm thô, tinh chế sản phẩm.

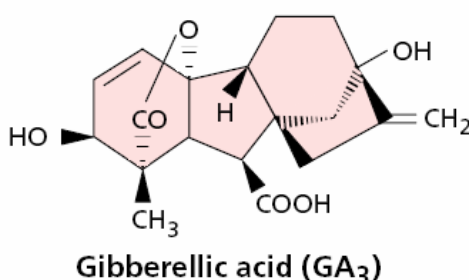
- Nhân giống. Giống xạ khuẩn được bảo quản ở dạng bào tử. Cấy bào tử vào môi trường nhân giống trong bình tam giác lắc 180 – 220 vòng/phút ở 26 – 28°C/30 – 70 giờ, sau đó cho tiếp vào các nồi nhân giống (có sục khí và khuấy), nuôi tiếp cho phát triển sinh khối 20 – 40 giờ. Nhiệm vụ chính trong giai đoạn nhân giống là tạo ra một khối lượng lớn khuẩn ty xạ khuẩn ưa kiềm có khả năng phát triển mạnh trong giai đoạn lên men chính và tạo thành một lượng lớn kháng sinh.

- Lên men streptomycin là quá trình lên men hai pha điển hình. Nhiệt độ lên men khoảng 26 – 28°C, thời gian lên men 96 giờ. Trong thời gian lên men cần phải thông khí và khuấy trộn môi trường. Lượng không khí thổi qua môi trường trung bình là 1 thể tích/1 thể tích môi trường. Khuấy môi trường liên tục trong suốt cả quá trình lên men (kể cả khi nhân giống) nếu ngừng khuấy chỉ trong một thời gian ngắn sẽ làm giảm hiệu suất streptomycin. pH trong những giờ đầu có giảm chút ít sau đó tăng dần.

6. CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT – GIBBERELLIN

Gibberellin là chất kích thích sinh trưởng được tổng hợp bởi vi sinh vật và cả ở thực vật bậc cao.

Hiện nay người ta đã phát hiện ra trên 50 loại gibberellin và ký hiệu A₁, A₂, A₃,... A₅₂. Trong đó gibberellin A₃ (GA₃) là gibberellic acid có tác dụng sinh lý mạnh nhất. Người ta đã tìm được gibberellin ở nhiều nguồn khác nhau như ở các loại nấm, ở thực vật bậc thấp và thực vật bậc cao. Tuy nhiên việc sản xuất gibberellin chủ yếu từ vi sinh vật.



Hình 5.37. Công thức hóa học của gibberellic acid

***Vai trò của gibberellin:**

+ Kích thích mạnh mẽ sự sinh trưởng kéo dài của thân, chiều dài của cành, sự vươn dài của lóng cây họ hoà thảo. Hiệu quả này có được do ảnh hưởng kích thích đặc trưng của GA lên pha giãn của tế bào theo chiều dọc.

+ Kích thích sự nảy mầm của hạt và củ, do đó nó có tác dụng đặc trưng trong việc phá bỏ trạng thái ngủ nghỉ của hạt và củ.

+ Kích thích cây ngày dài ra hoa trong điều kiện ngày ngắn và làm tăng hiệu quả của xuân hóa, có thể biến cây hai năm thành cây một năm.

+ GA ảnh hưởng đến sự phân hóa giới tính: ức chế sự phát triển của hoa cái và kích thích sự phát triển của hoa đực.

+ GA làm tăng kích thước của quả và tạo quả không hạt trong một số trường hợp. Hiệu quả này càng rõ rệt khi phối hợp tác dụng với auxin.

6.1. Tác nhân vi sinh vật

Gibberellin được hai chủng nấm sợi *Fusarium moniliforme* và *Fusarium oxysporum* tổng hợp, trong đó *Fusarium moniliforme* được sử dụng trong sản xuất.

Đặc điểm của chủng này như sau:

- + Thuộc nấm bất toàn, sinh sản bằng bào tử
- + Có khả năng tạo kháng sinh, chất ức chế thực vật
- + Có khả năng đồng hóa các loại đường glucose, saccharose, tinh bột, glycerine, dầu thực vật; các nguồn nitrogen vô cơ, hữu cơ đều thích hợp.
- + pH tối ưu cho sinh trưởng phát triển là 5,0 – 5,4; nhiệt độ 26 – 28°C.



Hình 5.38. *Fusarium oxysporum*



Hình 5.39. *Fusarium moniliforme*

6.2. Quá trình lên men

***Phương pháp lên men bề mặt**

Sử dụng môi trường cám có bổ sung 0,5 cao ngô, 0,01% hỗn hợp vi lượng, độ ẩm môi trường 55 – 60%.

Môi trường được thanh trùng ở 1atm trong 30 phút. Làm nguội môi trường và cấy giống với tỷ lệ 0,3 – 0,5%, nhiệt độ nuôi 28°C trong 3 – 4 ngày. Khi nấm

Fusarium tạo nhiều bào tử, chúng được chuyển ra nuôi trong các khay với môi trường tương tự.

Kết thúc quá trình nuôi, người ta thu nhận chế phẩm gibberelin dạng thô, đem trích ly bằng các dung môi và thu nhận dung dịch có chứa gibberellin.

*Phương pháp lên men chìm

Môi trường sử dụng là môi trường Rolen – Tom, có các thành phần trong 1 lít môi trường như sau: saccharose 40 – 60 g; tatarat ammon 7g; KH_2PO_4 2g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g; K_2SO_4 0,2g; pH 5,5. Trong khi lên men thường bổ sung 0,5 cao ngô và hỗn hợp vi lượng sẽ làm tăng khả năng sinh tổng hợp gibberellin.

Môi trường được thanh trùng và tiến hành lên men trong các thiết bị lên men có cánh khuấy và hệ thống thổi khí. Nhiệt độ lên men $26 - 28^\circ\text{C}$, pH duy trì 5,0 – 5,5, thời gian lên men 160 – 190 giờ.

Quá trình lên men gồm hai pha:

+ Pha thứ nhất là pha tạo ra hệ sợi hay pha tăng sinh, kéo dài 45 – 90 giờ đầu của quá trình lên men. Ở pha này, chất dinh dưỡng giảm rất nhanh, pH đột nhiên tăng lên sau đó trở về pH ban đầu. Cuối pha này lượng gibberellin được tạo ra rất ít.

+ Pha thứ hai: hệ sợi không tăng, pH tăng nhanh, gibberelin được tạo ra rất nhiều. Trong nhiều cơ sở sản xuất, người ta thường bổ sung nguồn carbon trong pha này.

Tùy thuộc vào đặc điểm sinh lý của chủng sản xuất mà hoạt động điều khiển quá trình lên men không giống nhau đặc biệt là thời gian lên men.

Dịch sau khi lên men được ly tâm để tách sinh khối và những thành phần có kích thước lớn, không ra khỏi dung dịch. Dung dịch sau ly tâm đem đi làm sạch để thu nhận gibberellin.

7. ĐỘC TỔ NẤM (MYCOTOCIN)

Mycotocin là một thuật ngữ chung dùng để miêu tả các độc tố được tạo thành trong quá trình sinh trưởng của nấm mốc. Độc tố nấm là một vấn đề không còn mới mẻ và việc ngộ độc bởi thực phẩm và thức ăn gia súc bị nhiễm nấm mốc đã được biết đến từ nhiều thế kỷ nay, song việc phát hiện ra aflatoxin B1 (AFB1) như là một trong những nhân tố gây ung thư có hiệu lực cao nhất gặp trong tự nhiên vào đầu những năm 60 đã thúc đẩy mạnh mẽ các nghiên cứu trên lĩnh vực này.

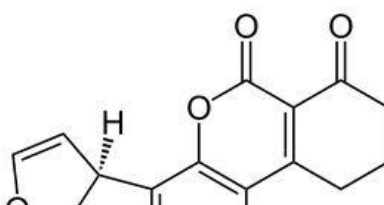
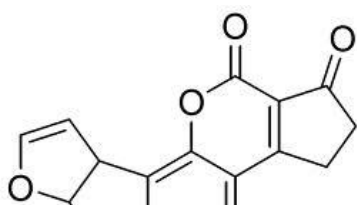
7.1. Một số chủng vi sinh vật sinh độc tố

Các nấm sinh ngoại độc tố được tìm thấy ở các nhóm nấm nang *Ascomycetes* với các nhóm thuộc giống bất toàn *Fusarium*, *Neurospora*, cũng như các loài của nhóm *Adelomycetes* như *Pythomyces*, *Stachybotrus*, *Trichotherium*...nhưng nhiều hơn cả vẫn là các loài thuộc nấm mốc *Mucor*, *Aspergillus* và *Penicillium*.

7.2. Cấu trúc, hoạt tính sinh học của độc tố

Các độc tố nấm là loại sản phẩm bậc hai điển hình gặp trong tự nhiên, có cấu tạo đa dạng của hợp chất dị vòng có các gốc phosphate, tecpen, cumarin, piron, quinon, antraquinon....

Tên của các độc tố thường bắt nguồn từ tên nấm sinh ra nó, ví dụ: aflatoxin do nấm mốc *Aspergillus flavus*; clavacin từ *A. clavarius*; islanditocin từ nấm mốc *Penicillium islandicum*...



+ Aflatoxin

Aflatoxin là độc tố vi nấm sản sinh tự nhiên bởi một số loài thuộc chi *Aspergillus*. Aflatoxin là độc tố và là tác nhân gây ung thư. Sau khi thâm nhập vào cơ thể, các aflatoxin có thể được gan chuyển hóa thành dạng trung gian epoxit hoạt hóa hoặc được thủy phân và trở thành M_1 ít độc hơn.

Các loài sinh aflatoxin thuộc chi *Aspergillus* phân bố rất rộng trong tự nhiên. Chúng có thể tạo khuẩn lạc và gây nhiễm vào hạt trước khi thu hoạch và trong quá trình bảo quản. Cây chủ dễ bị gây nhiễm bởi *Aspergillus* sau khi phơi nhiễm kéo dài trong môi trường có độ ẩm cao hoặc bị tổn thương các điều kiện xấu như hạn hán.

Các môi trường sống bản địa của *Aspergillus* là trong đất, thực vật mục nát và ngũ cốc đang bị giảm sức đề kháng vì sinh vật và nó xâm nhập tất cả các loại chất hữu cơ mỗi khi có điều kiện được thuận lợi cho sự phát triển của nó. Điều kiện thuận lợi bao gồm độ ẩm cao (ít nhất là 17%) và nhiệt độ cao.

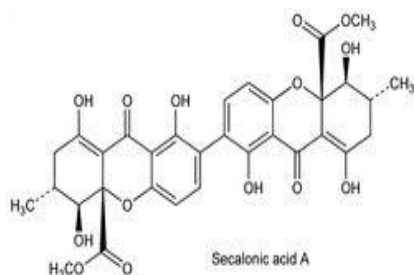
Các loại nông sản thường bị nhiễm aflatoxin là ngũ cốc (ngô, kê, lúa,...), các hạt có dầu (lạc, đậu tương, hạt hướng dương, hạt bông), gia vị (ớt, tiêu đen, rau mùi, nghệ, gừng) và các loại quả hoặc hạt khác như hạt dẻ, dừa... Aflatoxin cũng có thể xuất hiện trong sữa của động vật được cho ăn bằng thức ăn nhiễm aflatoxin.

Có ít nhất 13 dạng aflatoxin khác nhau có trong tự nhiên. Aflatoxin B_1 được coi là dạng độc nhất và được sản sinh bởi *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus*. Aflatoxin G_1 và G_2 chỉ được sinh ra từ *A. parasiticus*. Sự có mặt của *Aspergillus* trong các sản phẩm thực phẩm không phải lúc nào cũng là chỉ thị về mức aflatoxin có hại mà nó biểu thị cho rủi ro đáng kể khi sử dụng thực phẩm.

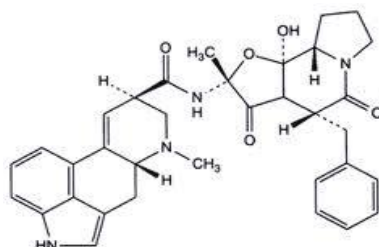
Aflatoxin M_1 , M_2 thường được phát hiện trong sữa của bò được cho ăn bởi các loại hạt bị nhiễm nấm mốc. Các độc tố này là sản phẩm của một quá trình chuyển hóa trong gan động vật. Tuy nhiên, aflatoxin M_1 cũng có mặt trong sản phẩm lên men bởi *Aspergillus parasiticus*.

+ Các alkaloid của nấm cựa gà

Alkaloid do một loài nấm sợi (*Claviceps purpurea*) sống ký sinh trong các bông lúa sản sinh, ở đó chúng tạo thành các phần xơ cứng thường được gọi là cựa gà. Bằng cách đó, chúng thâm nhập vào các ngũ cốc dùng làm bánh mì và gây nên các dịch ngộ độc gấp ở Châu Âu từ thời Trung cổ. Các nghiên cứu hóa học trong vòng trên 100 năm gần đây đã làm sáng tỏ được hai nhóm độc tố nấm - đó là các alkaloid của nấm cựa gà (ergotamin) và các ergocrom (acid secalonic)



27



8. DEXTRAN - POLYMER SINH HỌC

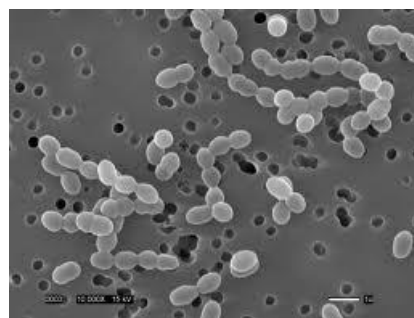
Dextran là một polysaccharide do các vi khuẩn lactic tạo thành, có phân tử lượng là 15.000 – 50.000.000, liên kết giữa các gốc glucose với nhau là 1,6 – glucoside. Nhờ các mối liên kết 1,3 và 1,4 – glucoside làm phân tử của nó có sự phân nhánh và có sự kết hợp giữa các chuỗi với nhau.

8.1. Tác nhân vi sinh vật

Các chủng *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicus*, *L. citrovorum*...có khả năng tạo thành các polysaccharide.



Hình 5.44. *Leuconostoc citrovorum*

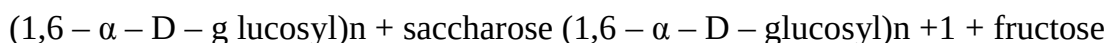


Hình 5.45. *Leuconostoc mesenteroides*

8.2. Sản xuất dextran

Nguyên liệu sản xuất dextran là đường saccharose ở dạng kết tinh hoặc syrup. Trong thực tế sản xuất sử dụng nước mía bổ sung đường saccharose, trong nước mía ngoài nguồn carbon là saccharose còn có các chất sinh trưởng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn cũng như sinh tổng hợp dextran.

Đa số các polysaccharide ngoại bào từ vi sinh vật đều là sản phẩm của sự chuyển hóa nội bào cơ chất thành các sản phẩm trung gian, và cuối cùng thành polymer. Dextran khác các polysaccharide này, cơ chất không thâm nhập vào tế bào vi sinh vật mà nó được chuyển hóa bên ngoài tế bào thành D – glucan phân nhánh, tức là dextran. Chỉ có saccharose được dùng làm cơ chất cho phản ứng này. Như vậy, polysaccharide có thể được sản xuất bởi các tế bào nguyên vẹn trong môi trường nuôi hoặc có thể được tạo ra từ các chế phẩm phi tế bào chứa phức hệ enzyme dextransaccharase (α – 1,6 – glucan : D – fructose 2 – glucosyltransferase). Enzyme này giải phóng fructose và chuyển gốc glucose lên một phân tử chất nhận cũng đã được liên kết với enzyme:



Năng lượng tự do của liên kết glucoside trong phân tử disaccaride nằm vào khoảng 23 kJ trong khi năng lượng tự do của liên kết glucoside bên trong dextran thấp

hơn một chút (12-17 kJ). Do vậy phản ứng diễn ra theo chiều từ trái sang phải đi kèm với một sự giảm năng lượng tự do.

Trong quá trình polymer hóa chuỗi dextran đang dài ra vẫn liên kết chặt chẽ với enzyme, mức độ polymer hoá tăng cho đến khi phân tử chất nhận (trong trường hợp đơn giản nhất là một phân tử cơ chất) giải phóng chuỗi polymer khỏi enzyme.

Các thành viên thấp nhất của các oligosaccharide không phải là các phân tử chất nhận có hiệu quả, ái lực đối với enzyme tăng dần theo độ dài chuỗi. Tuy nhiên, sự hạn chế về độ khuếch tán cũng tăng theo trọng lượng phân tử.

Bởi vậy, dưới các điều kiện thông thường, các dextran có trọng lượng phân tử rất cao sẽ được tạo thành, đặc biệt ở các nồng độ cơ chất thấp.

Để sản xuất các dextran có trọng lượng phân tử trung bình, cần phải tiến hành thủy phân các sản phẩm có trọng lượng phân tử cao (bằng acid hoặc bằng enzyme) và phải phân đoạn sản phẩm dưới những điều kiện kiểm soát rất cẩn thận. Trong khi đó, các polymer trọng lượng phân tử thấp và đồng nhất có thể được lấy ra dùng làm nguyên liệu ban đầu cho một phản ứng khác để sản xuất các dextran có mức độ trùng hợp mong muốn.

Các nồng độ saccharose cao và có thể cả maltose khi được dùng làm nguyên liệu ban đầu sẽ tạo nên các điều kiện thuận lợi để tổng hợp các dextran mỗi trọng lượng phân tử thấp và đồng nhất kiểu đó.

Dextran được sản xuất bởi hàng loạt loài vi khuẩn, như *Streptobacterium dextranicum*, *Streptococcus mutans* và các loài khác. *Streptococcus mutans* giữ một vai trò quan trọng trong bệnh sâu răng. Sản phẩm phụ thuộc cả vào chủng lẫn vào các điều kiện sử dụng cho sinh trưởng và tổng hợp polymer. Ở một số chủng, dextranase nằm ở dạng hòa tan trong khi ở các chủng khác, nó liên kết một phần hay hầu như hoàn toàn với tế bào. Sản xuất dextran công nghiệp dùng *Leuconostoc mesenteroides* để tạo ra một polymer chứa khoảng 95% liên kết $\alpha - 1,6$ (phần còn lại là liên kết $\alpha - 1,3$) và một trọng lượng phân tử là $4 - 5 \times 10^7$ dalton.

Các dextran được sử dụng trong ngành dược để làm chất dẫn máu (chất thay thế huyết tương). Tuy nhiên những dextran này phải có trọng lượng phân tử thấp.

Các sản phẩm với trọng lượng phân tử thấp hơn được loại khỏi hệ tuần hoàn quá nhanh nên không có giá trị điều trị đầy đủ trong khi các sản phẩm có trọng lượng phân tử quá cao lại tham gia vào sự ngưng kết máu.

Các dung dịch chứa 6% loại dextran này có giá trị về độ nhớt và tập tính keo - thẩm thấu rất giống với huyết tương của người. Vì các dextran không bị phân giải bởi các amylase trong cơ thể người nên khả năng phá hoại gan thấp hơn so với các chất thay thế huyết tương khác. Các dextran được mô cơ thể hấp thụ rất tốt, do vậy có thể được sử dụng cho nhiều loại được phẩm, chẳng hạn sắt trong khi điều trị bệnh thiếu máu.

Gần đây, người ta cho rằng dextran có thể được sử dụng để tạo nên một lớp ưa nước ở trên bề mặt các vết bỏng rộng và hấp thụ các chất tiết từ các vết thương.

Trong việc sản xuất các dextran, việc duy trì cung cấp oxygen giữ một vai trò quan trọng đặc biệt vì trong quá trình lên men dung dịch trở nên rất nhớt.

Hiện nay người ta chưa có khả năng tính toán mối tương quan giữa năng lượng khuấy trộn đưa vào và tốc độ chuyển động của oxygen trong dung dịch với tập tính phi Newton của dịch lỏng nên trong đa số trường hợp người kỹ sư sinh học chỉ còn biết dựa vào kinh nghiệm của bản thân mình.

Môi trường lên men chứa các muối vô cơ, 2% cao ngô và saccharose. Sắt và mangan là những nguyên tố vết rất quan trọng. Dung dịch được khử trùng bằng sức nóng, được chuyển sang bể lên men và cấy giống sau khi đã làm lạnh.

Lên men được tiến hành ở 25°C, trong quá trình này, chủ yếu do sự tạo thành lactic acid, giá trị pH giảm từ 6,5 – 7,0 xuống còn 4,0. Dung dịch lên men được khuấy liên tục và thông khí.

Khi dextran được tạo thành, dung dịch trở nên đậm đặc cho đến khi quá trình kết thúc sau 3 hay 4 ngày, một khối dạng keo sẽ được tạo thành. Dịch lên men chứa chủ yếu là dextran, fructose tự do, acid lactic, etanol và các vi sinh vật. Dextran sau đó sẽ được kết tủa bằng methanol. Dịch trong được chất lại và methanol được thu hồi bằng phương pháp cất.

Nếu lên men dẫn đến việc tạo thành các dextran có trọng lượng phân tử cao thì chúng sẽ được thủy phân bằng acid chlorhydric ở 100 – 105°C.

Sự hoàn tất thủy phân được xác định bởi độ nhớt. Sau một giai đoạn phản ứng nhất định, phản ứng lúc đầu được làm chậm lại bằng cách làm lạnh sau đó dừng lại hoàn toàn bằng cách bổ sung natrihydroxygenate.

Dung dịch được trộn với các yếu tố hấp phụ và lọc qua kizengua. Cuối cùng dextran được kết tủa phân đoạn với methanol, các phân đoạn mong muốn sẽ được tái hòa tan, lọc, cô đặc và sấy phun. Vì rằng việc thủy phân bằng acid khó kiểm soát và việc phân đoạn thường không thu được các phân có thành phần mong muốn, nên người ta đã tìm cách tổng hợp trực tiếp các dextran có trọng lượng phân tử thấp. Để làm điều này cần có kiến thức chắc chắn về động học của phản ứng.

Trọng lượng phân tử bị ảnh hưởng bởi:

- + Nồng độ của saccharose,
- + Chất nhận glucose,
- + Nhiệt độ phản ứng.

Chẳng hạn khi vắng mặt một chất nhận, một dung dịch saccharose 10%, sẽ thu được một sản phẩm với một trọng lượng phân tử lớn hơn 108 dalton. ở nồng độ 70% saccharose, các phân tử dextran chủ yếu có trọng lượng phân tử thấp sẽ được tạo thành. Nếu các dextran trọng lượng phân tử thấp được đưa vào làm môi thì enzyme sẽ có nhiều điểm khởi đầu và các polime tương đối đồng nhất sẽ được tạo thành. Điều quan trọng là các tế bào vi khuẩn không chứa các vết của các dextran có trọng lượng phân tử cao. Vì vậy nguyên liệu cấy phải được rửa vài lần bằng dung dịch muối để loại các dextran bám vào.

Như vậy, một hỗn hợp 2% (w/v) một chất nhận có trọng lượng phân tử thấp (1000-25000) với một nồng độ đường là 10% ở 15°C và pH 5,0 sẽ cho một sản phẩm mà 50% có trọng lượng phân tử trong phạm vi mong muốn giữa 50000 và 100000 dalton. Các dextran này được sử dụng trong bệnh viện và không bị phân giải bằng thủy phân.

Theo tính toán sản lượng dextran vào năm 1980 ở Tây Âu là 1000 tấn, và trên thế giới là 200.000 tấn. Trong khi hầu hết các polysaccharide ngoại bào được sử dụng dưới dạng không bị biến đổi về mặt hóa học thì dextran dùng cho ngành dược và nhiều mục đích khác lại được chuyển hóa thành các phân đoạn có trọng lượng phân tử tương đối thấp giữa 40000 và 70000 dalton nhờ các quy trình thủy phân thích hợp (thủy phân bằng acid loãng).

Thị trường chủ yếu của các dẫn xuất dextran dưới dạng các chế phẩm liên kết chéo chứa cấu trúc không gian ba chiều mà các nhóm chức năng được gắn vào đó nhờ các liên kết ete với các gốc glucose chính là các phòng thí nghiệm sinh hóa học.

Để sản xuất các loại gel cho mục đích sinh hóa, dextran có trọng lượng phân tử tương đối cao được dùng để tổng hợp các sản phẩm có tính thu hồi nước cao. Phản ứng với dextran trong dung dịch kiềm đã dùng epichlorohydrin để thu nhận gel, gel này sau đó được nghiền và trung hòa. Vì phản ứng giữa epichlorohydrin và polysaccharide là phản ứng tỏa nhiệt, cần chú ý để nhiệt tỏa ra được loại bỏ khỏi hệ thống.

Điều này là đặc biệt quan trọng vì gel được tạo thành trong phản ứng có tính dẫn nhiệt thấp. Vì các gốc đường khử tận cùng của các phân tử dextran có tính phản ứng capo và dễ bị phân giải trong phản ứng polime nên chúng bị khử thành sorbitol và borohydride trong dung dịch kiềm trước khi bổ sung epichlorohydrin.

Mặc dầu các gel liên kết chéo thuộc loại sephadex bản thân chúng đã cực kỳ có ích trong việc phân đoạn các nguyên liệu hoạt động về mặt sinh học, song sự chuyển hóa chúng thành các dẫn xuất ete sẽ làm tăng giá trị tiềm tàng của chúng. Các ete carboxymethyl hay dimethylaminoethyl là những sản phẩm kiểu đó. Những hợp chất này khác biệt nhiều với các dextran liên kết chéo về tập tính trương của chúng trong dịch lỏng. Các sản phẩm có độ liên kết chéo khác nhau sẽ cho ra các chất hấp phụ có lỗ khác nhau và giới hạn phân đoạn khác nhau.

Việc đưa các nhóm hóa học khác vào các phân tử sẽ cho ra các chất hấp phụ mang đặc điểm ưa lipid. Chúng có thể được dùng để phân đoạn các lipid, v.v. và có thể dùng trong dung môi lỏng cũng như trong các dung môi hữu cơ phân cực. Một số dextran khác được dùng làm các chất mang trong các quy trình nuôi cấy tế bào. Dưới dạng này (có tên thương mại do hãng dược phẩm AB của Thụy Điển đặt ra là sephadex), dextran được ứng dụng rất rộng rãi để tách và thuần khiết các phân tử sinh học khác nhau về điện tích, về kích thước phân tử v.v.. Protein không bị biến tính bởi mạng lưới polymer ưa nước và sự hấp phụ không đặc hiệu là rất thấp.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Hãy so sánh các đặc điểm của quá trình lên men thu nhận sinh khối với quá trình lên men sản xuất rượu.
2. Hãy so sánh các đặc điểm của quá trình lên men sản xuất rượu vang và sản xuất bia.
3. Hãy so sánh các đặc điểm của quá trình lên men acid lactid và acid citric.
4. Trình bày tác nhân vi sinh vật và công nghệ lên men sản xuất vitamin B₂, vitamin B₁₂.
5. Trình bày quy trình lên men sản xuất và vai trò của acid glutamic, lysine.
6. Hãy nêu ứng dụng và tác nhân vi sinh vật tham gia sản xuất các chất kháng sinh, các độc tố, gibberellin, dextran.

CHƯƠNG 6. CÔNG NGHỆ VI SINH ỨNG DỤNG TRONG NÔNG NGHIỆP

1. PHÂN BÓN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH ĐẠM

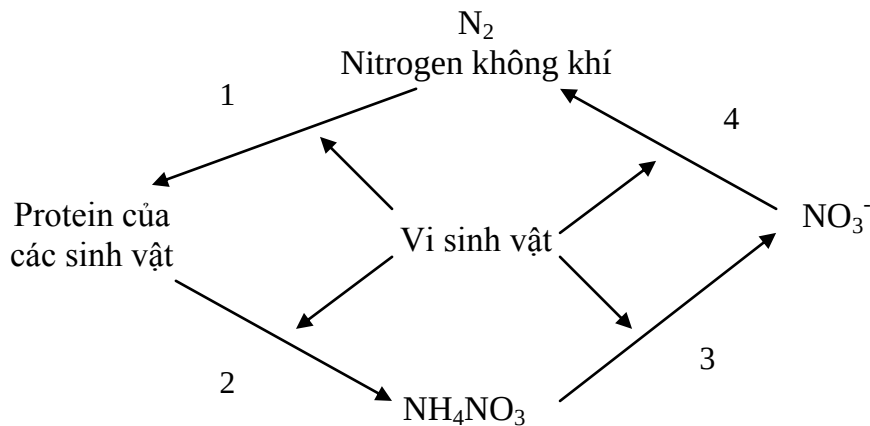
1.1. Định nghĩa

Phân bón vi sinh vật cố định nitrogen (Biological nitrogen fixing fertilizer) (tên thường gọi: phân vi sinh vật cố định đạm, phân đạm vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống (tự do, hội sinh, cộng sinh, kỵ khí hoặc hiếu khí) đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitrogen cung cấp các hợp chất chứa nitrogen cho đất và cây trồng; tạo điều kiện nâng cao năng suất cây trồng và chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Phân bón vi sinh vật cố định nitrogen không gây ảnh hưởng xấu đến người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

1.2. Ý nghĩa của việc sử dụng phân vi sinh vật cố định đạm

Trước đây việc sử dụng tràn lan phân bón và thuốc hóa học không những làm cho đất bị chai cứng mà còn làm hệ vi sinh vật có ích trong đất trồng bị thay đổi dẫn đến không có sự điều hòa trong đất trồng, gây nhiều bệnh nguy hiểm cho cây trồng.

Trong thực tế, việc thu hoạch sinh khối thực vật hằng năm đã lấy đi của đất nhiều nitrogen. Quy trình bổ sung nitrogen trong tự nhiên xảy ra quá chậm. Bằng cách bón phân hóa học làm tăng năng suất cho cây trồng tức thời, nhưng để lại hậu quả là đất bị chua dần, độ cứng cơ lý tăng dần,... làm cho đất bạc màu và điều nguy hiểm là các dư thừa của phân hóa học tích tụ trong đất, hoặc thải vào các nguồn nước trong đất làm cho đất, nước bị ô nhiễm, ảnh hưởng xấu đến hệ sinh thái và môi trường sống.



Hình 6.1. Vòng tuần hoàn nitrogen trong tự nhiên

1. Quá trình cố định nitrogen phân tử

2. Quá trình amon hóa

3. Quá trình nitrat hóa

4. Quá trình phản nitrat hóa

Nitrogen là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng không chỉ đối với cây trồng, mà ngay cả đối với vi sinh vật. Nguồn dự trữ nitrogen trong tự nhiên rất lớn, chỉ tính riêng trong không khí nitrogen chiếm khoảng 78,16% thể tích. Người ta ước tính trong bầu không khí bao trùm lên một ha đất đai chứa khoảng 8 triệu tấn nitrogen, lượng nitrogen này có thể cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng hàng chục triệu năm nếu như cây trồng đồng hóa được chúng. Thông qua hoạt động sống của các loài vi sinh vật,

nitrogen nằm trong các dạng khác nhau được chuyển hoá thành dễ hấp thu cho cây trồng.

Đồng thời, trong cơ thể các loại sinh vật trên trái đất chứa khoảng $10 - 25.10^9$ tấn nitơ. Trong các vật trầm tích chứa khoảng 4.10^{15} tỷ tấn nitơ. Tất cả nguồn nitrogen trên cây trồng đều không tự đồng hoá được mà phải nhờ vi sinh vật.

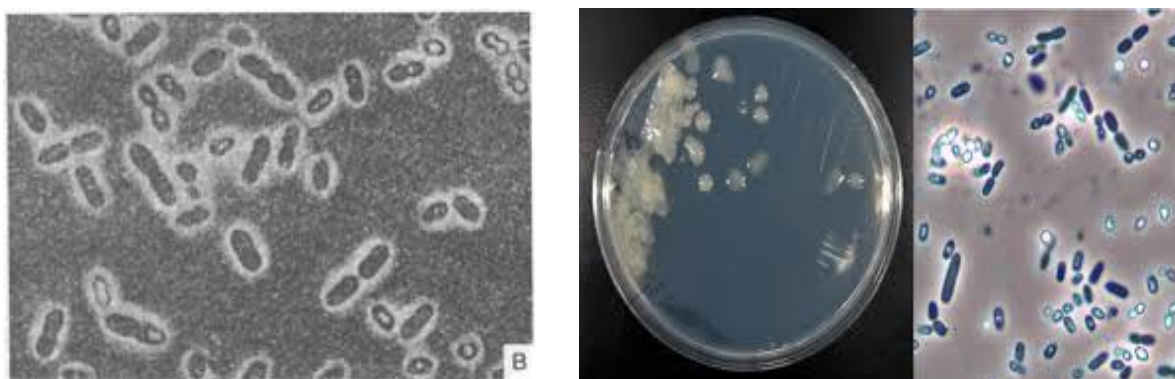
Như vậy, hàng năm cây trồng lấy đi từ đất hàng trăm triệu tấn nitrogen. Bằng cách bón phân con người trả lại cho đất được khoảng $> 40\%$, lượng thiếu hụt còn lại cơ bản được bổ sung bằng nitrogen do hoạt động sống của vi sinh vật. Vì vậy việc nghiên cứu, sử dụng nguồn đạm sinh học này được xem là một giải pháp quan trọng trong nông nghiệp, đặc biệt trong sự phát triển nền nông nghiệp bền vững của thế kỷ 21. Người ta gọi quá trình chuyển hoá nitrogen phân tử trong không khí thành đạm là quá trình cố định nitơ phân tử.

1.3. Các nhóm vi sinh vật cố định đạm

Quá trình cố định nitơ phân tử là quá trình đồng hóa nitrogen của không khí thành đạm ammon dưới tác dụng của một số nhóm vi sinh vật có hoạt tính nitrogenase. Chỉ có một số vi khuẩn mới có khả năng thực hiện phản ứng phức tạp này thuộc các nhóm sinh vật sống tự do và hội sinh; nhóm vi sinh vật cộng sinh.

1.3.1. Vi sinh vật tự do trong đất

**Vi khuẩn Azotobacter*: khi nuôi cấy ở môi trường nhân tạo thường biểu hiện tính đa hình, khi còn non có tiên mao, có khả năng di động được nhờ tiên mao (Flagellum). Là vi khuẩn hình cầu (song cầu khuẩn), Gram âm không sinh bào tử, hiếu khí, có kích thước tế bào dao động $1,5 - 5,5\mu m$, khuẩn lạc dạng S màu trắng trong, lồi, nhẵn. Khuẩn lạc có màu vàng lục hoặc màu nâu thẫm, tế bào được bao bọc lớp vỏ dày và tạo thành nang xác, gặp điều kiện thuận lợi nang xác này sẽ nứt ra vỡ tạo thành các tế bào mới.



Hình 6.2. Vi khuẩn *Azotobacter*

Vi khuẩn *Azotobacter* thích ứng ở pH 7,2-8,2, ở nhiệt độ $28-30^{\circ}C$, độ ẩm 40-60%. *Azotobacter* đồng hoá tốt các loại đường đơn và đường kép, cứ tiêu hao 1 gam đường glucose có khả năng cố định được 8 - 18 mg N. Ngoài ra, *Azotobacter* còn có khả năng tiết ra một số vitamin thuộc nhóm B như B_1 , B_6 ...; một số acid hữu cơ như: acid nicotinic, acid pantotenic, biotin, auxin. Các loại chất kháng sinh thuộc nhóm Anixomyxin.

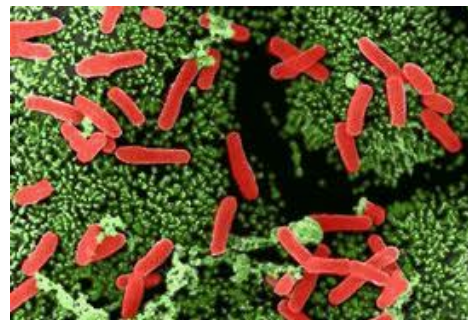
Thuộc về giống *Azotobacter* có rất nhiều loài khác nhau: *Azotobacter chroococcum*; *Azotobacter acidum*; *Azotobacter araxii*; *Azotobacter nigricans*; *Azotobacter galophilum*; *Azotobacter unicapsulare*...

*Vi khuẩn *Beijerinckii*: có hình cầu, hình bầu dục hoặc hình que, gram âm không sinh nha bào, hảo khí, một số loài có tiên mao có khả năng di động được. Kích thước tế bào dao động 0,5 - 2,0 x 1,0 - 4,5µm, khuẩn lạc thuộc nhóm S, rất nhầy, lồi không màu hoặc màu nâu tối khi già, không tạo nang xác.

Có khả năng đồng hoá tốt các loại đường đơn, đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucose nó có khả năng cố định được 5 - 10 mgN.

Khác với vi khuẩn *Azotobacter*, vi khuẩn *Beijerinckii* có tính chống chịu cao với acid, nó có thể phát triển ở môi trường pH = 3, nhưng vẫn phát triển ở pH trung tính hoặc kiềm yếu, vi khuẩn *Beijerinckii* thích hợp ở độ ẩm 70 - 80% ở nhiệt độ 25-28°C. Vi khuẩn *Beijerinckii* phân bố rộng trong tự nhiên, nhất là ở vùng nhiệt đới và á nhiệt đới.

*Vi khuẩn *Clostridium*: là loài trực khuẩn Gram dương, sinh bào tử, kích thước tế bào dao động 0,7-1,3 x 2,5-7,5 µm, khuẩn lạc thuộc nhóm S, màu trắng đục, lồi nhẵn. Vi khuẩn *Clostridium* ít mẫn cảm với môi trường, nhất là môi trường thừa P, K, Ca và có tính ổn định với pH, nó có thể phát triển ở pH 4,5- 9, độ ẩm thích hợp 60 - 80%, nhiệt độ 25 - 30°C. Vi khuẩn *Clostridium* đồng hóa tốt tất cả các nguồn thức ăn nitơ vô cơ và hữu cơ, cứ 1 gam đường glucose thì đồng hoá được 5 - 12 mgN.



Hình 6.3. Vi khuẩn *Clostridium*

Vi khuẩn *Clostridium* có rất nhiều loài khác nhau: *Clostridium butyrium*; *Clostridium beijerinckii*; *Clostridium pectinovorum*...

1.3.2. Vi sinh vật cộng sinh

Năm 1886, Hellriegel và Wynn Jones đã khám phá ra bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử. Họ đã chứng minh được khả năng của cây họ đậu lấy được nitơ khí quyển là nhờ vi khuẩn nốt sần (VKNS) sống ở vùng rễ cây họ đậu. Họ đặt tên cho loài vi sinh vật này là *Bacillus radicum*. Năm 1889, Frank đã đổi tên vi sinh vật này là *Bacterium radicum*. Cuối năm 1889 Frank đề nghị đổi tên là *Rhizobium*.

Rhizobium là loại trực khuẩn Gram âm không sinh bào tử, hiếu khí. Kích thước tế bào dao động 0,5 - 1,2 x 2,0 - 3,5µm, khuẩn lạc thuộc nhóm S, nhẵn lồi, màu trắng trong hoặc trắng đục, Vi khuẩn *Rhizobium* có tiên mao, có khả năng di động được, chúng thích hợp ở pH từ 6,5 - 7,5, nhiệt độ 25 - 28°C, độ ẩm 50 - 70%. Khi già có một số loại tạo được nang xác, khuẩn lạc sẽ chuyển sang màu nâu nhạt. Vi khuẩn *Rhizobium* gồm nhiều loại khác nhau: *Rh. leguminosarum*; *Rh. phaseoli*; *Rh. trifolii*;

Rh. lupini; Rh. japonicum; Rh. meliloti; Rh. cicer; Rh. simpanse; Rh. vigna; Rh. robinii; Rh. lotus...



Hình 6.4. Nốt sần và vi khuẩn *Rhizobium*

Hiện nay người ta tạm chia vi khuẩn nốt sần thành 4 nhóm lớn:

+ *Sinorhizobium fredy* là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra acid, hay chúng làm acid hóa môi trường.

+ *Bradyrhizobium* là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra chất kiềm, hay là chúng làm kiềm hóa môi trường.

+ *Agrobacterium* và *Phyllobacterium*, hai giống này là vi khuẩn nốt sần nhưng không cộng sinh ở cây họ đậu, mà cộng sinh ở rễ - thân - kẽ lá cây rừng và những cây thủy hải sản. Hai giống này không có ý nghĩa nhiều trong nông nghiệp.

1.3.3. Các vi sinh vật cố định nitơ phân tử khác

Ngoài những giống vi sinh vật cố định nitrogen phân tử nói trên, còn vô số những giống khác đều có khả năng cố định nitrogen phân tử, chúng có nhiều ý nghĩa trong sản xuất nông lâm, ngư nghiệp.

* **Vi khuẩn:**

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitrogen phân tử hiếu khí: *Azotomonas insolita; Azotomonas fluorescens; Pseudomonas azotogenis; Azospirillum...*

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitrogen phân tử hiếu khí không bắt buộc: *Klebsiella pneumoniae; Aerobacter aerogenes...*

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitrogen phân tử kỵ khí, tự dưỡng: *Rhodospirillum rubrum; Chromatium sp.; Chlorobium sp.; Rhodomicribium sp.,...*

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitrogen phân tử kỵ khí, dị dưỡng: *Desulfovibrio desulfuricans; Methanobacterium sp.*

* **Xạ khuẩn:** Một số loài thuộc giống: *Streptomyces; Actinomyces; Frankia; Nocardia; Actinopolyspora; Actinosynoema...*

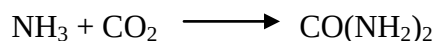
* **Nấm:** *Thodotorula...*

* **Tảo - Vi khuẩn lam:** *Glococapsa sp.; Lyngbyaps; Plectonema; Boyryanum; Anabaena azollae; Anabaena ambigua; Anabaena cycadae; Anabaena cylindrica; Anabaena fertilissima; Calothrix brevissima; Calothrix elenkii; Nostoccaloicola commune; Nostoccaloicola cycadae; Nostoccaloicola entophytum; Nostoccaloicola muscorum; Nostoccaloicola paludosum...*

1.4. Cơ chế của quá trình cố định nitrogen phân tử

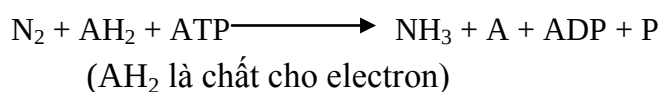
Trong một thời gian dài, cơ chế của quá trình cố định nitrogen phân tử là một bí ẩn đầy hấp dẫn đối với các

Trong khi con người phải sử dụng những điều kiện kỹ thuật cao, rất tốn kém (nhiệt độ $400 - 500^{\circ}\text{C}$, $200 - 1000\text{atm}$ với các chất xúc tác đắt tiền) để phá vỡ mối liên kết 3 của nitrogen phân tử để có được phân đạm hóa học, bằng cách tổng hợp từ:



Trong khi đó vì sinh vật với sự trợ giúp của enzyme nitrogenase lại phá vỡ mối liên kết 3 của nitrogen phân tử một cách dễ dàng ngay trong điều kiện bình thường về nhiệt độ và áp suất.

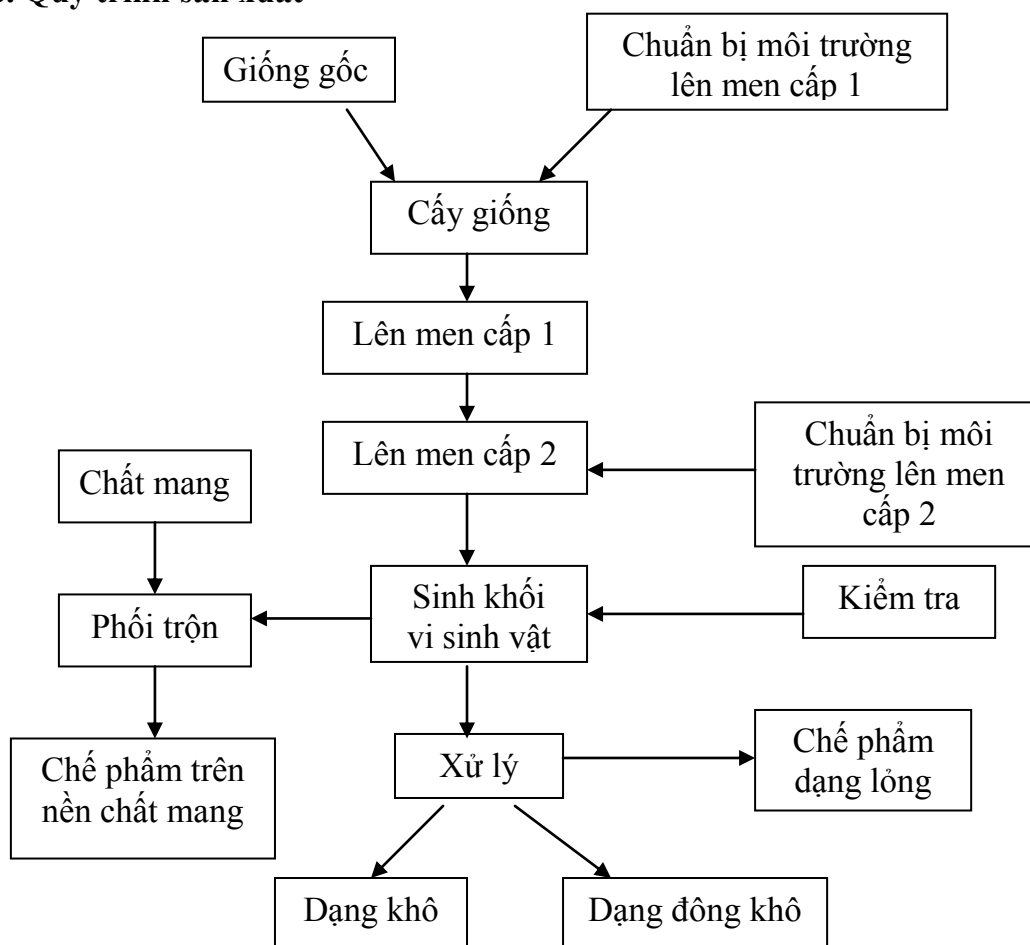
Có thể nói quá trình cố định nitrogen phân tử là quá trình khử N_2 thành NH_3 có xúc tác của enzyme nitrogenase, khi có mặt của ATP.



Các bước của quá trình cố định nitrogen phân tử như sau:



1.5. Quy trình sản xuất



Hình 6.5. Sơ đồ sản xuất phân vi sinh

1.5.1. Phân lập tuyển chọn chủng

Muốn có chế phẩm đạm sinh học tốt phải có chủng vi sinh vật có cường độ cố định nitrogen cao, sức cạnh tranh lớn, thích ứng ở pH rộng, phát huy được ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Vì vậy, công tác phân lập tuyển chọn chủng vi sinh vật cố định đạm và đánh giá đặc tính sinh học của các chủng khuẩn là việc làm không thể thiếu được trong quy trình sản xuất chế phẩm đạm sinh học.

Một số chỉ tiêu đánh giá: Thời gian mọc; kích thước khuẩn lạc và kích thước tế bào vi sinh vật; điều kiện sinh trưởng phát triển (nhu cầu dinh dưỡng, nhu cầu oxygen, pH và nhiệt độ thích hợp); khả năng cạnh tranh và cường độ cố định nitrogen phân tử. Chủng giống vi sinh vật sau khi tuyển chọn được bảo quản phù hợp với yêu cầu của từng loài và sử dụng cho sản xuất chế phẩm dưới dạng chủng giống gốc.

1.5.2. Nhân sinh khối

Từ chủng vi sinh vật tuyển chọn người ta tiến hành nhân sinh khối vi sinh vật theo phương pháp lên men chìm hoặc lên men xốp. Sinh khối vi sinh vật cố định nitrogen được nhân qua cấp 1, 2, 3 trong các điều kiện phù hợp với từng chủng loại vi sinh vật và mục đích sản xuất. Các sản phẩm phân vi sinh vật sản xuất từ vi khuẩn được tạo ra chủ yếu bằng phương pháp lên men chìm (Submerged culture). Các công đoạn chính trong sản xuất được tóm tắt theo hình 6.5. Trong sản xuất công nghiệp môi trường dinh dưỡng chuẩn không được sử dụng vì giá thành quá cao. Các nhà sản xuất đã phải tìm môi trường thay thế từ các nguồn vật liệu sẵn có đó là: Tinh bột ngô, sắn, rỉ mật, nước chiết ngô, thay cho nguồn dinh dưỡng carbon, nước chiết men, nước chiết đậu tương, ammoniac thay cho nguồn dinh dưỡng nitrogen.

Trong quá trình sản xuất việc kiểm tra và điều chỉnh các yếu tố môi trường (pH, liều lượng, tốc độ khí, áp suất, nhiệt độ...) là hết sức cần thiết. Các yếu tố này theo Walter (1996) nên được điều chỉnh tự động. Các hệ thống lên men hiện nay đã được trang bị hiện đại có công suất từ hàng chục đến hàng trăm ngàn lít.

1.5.3. Xử lý sinh khối, tạo sản phẩm

Sinh khối vi sinh vật được phối trộn với chất mang vô trùng (hoặc không vô trùng) để tạo ra chế phẩm trên nền chất mang vô trùng (hoặc không vô trùng), hay được bổ sung các chất phụ gia, chất dinh dưỡng, bảo quản để tạo ra chế phẩm dạng lỏng hoặc cô đặc, làm khô để tạo ra chế phẩm dạng đông khô hoặc khô.

1.5.4. Công tác kiểm tra chất lượng và yêu cầu chất lượng

- Để đảm bảo chất lượng trong quá trình sản xuất chế phẩm vi sinh vật cố định nitrogen cần phải kiểm tra chất lượng ở các công đoạn sản xuất sau:

- + Giống gốc và lên men cấp 1;
- + Lựa chọn chất mang và chuẩn hóa chất mang;
- + Xử lý và phối trộn sinh khối;
- + Đóng gói và bảo quản.

- Yêu cầu chất lượng đối với chế phẩm vi sinh vật cố định nitrogen nói riêng và phân bón vi sinh nói chung là phải có hiệu quả đối với đất và cây trồng, nghĩa là có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng phát triển của cây trồng, đến năng suất hoặc chất lượng nông phẩm hoặc độ phì của đất. Mật độ vi sinh chuyên tính trong sản phẩm phải đảm bảo các tiêu chuẩn ban hành. Tùy theo điều kiện của từng quốc gia, mật độ vi sinh chuyên tính trong 1g hoặc 1ml chế phẩm dao động từ 10.000.000 – 1.000.000.000 đối với chế phẩm trên nền chất mang khử trùng và 100.000 – 1.000.000 đối với chế phẩm

trên nền chất mang không khử trùng. Theo tiêu chuẩn Việt Nam mật độ vi sinh chuyên tính trong chế phẩm phải đạt 10^8 đối với chế phẩm trên nền chất mang khử trùng và 10^5 đối với chế phẩm trên nền chất mang không khử trùng.

2. PHÂN VI SINH PHÂN GIẢI PHÂN LÂN KHÓ TAN (PHÂN LÂN VI SINH)

2.1. Định nghĩa

Phân vi sinh vật phân giải phosphate khó tan là sản phẩm có chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật còn sống đạt tiêu chuẩn đã ban hành có khả năng chuyển hoá các hợp chất phosphorus khó tan thành dễ tan cho cây trồng sử dụng, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông phẩm. Phân lân vi sinh vật không gây hại đến sức khỏe của người, động thực vật và không ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái.

2.2. Ý nghĩa của việc sử dụng phân vi sinh vật cố định đạm

Lân là một trong những yếu tố quan trọng đối với cây trồng. Lân dễ tiêu trong đất thường không đáp ứng được nhu cầu của cây nhất là những cây trồng có năng suất cao. Bón phân lân và tăng cường độ hòa tan các dạng lân khó tan là biện pháp quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Bón phân hữu cơ, vùi xác động vật vào đất ở mức độ nhất định là biện pháp tăng hàm lượng lân cho đất.

Lân hữu cơ có trong cơ thể động vật, thực vật, vi sinh vật thường gặp ở các hợp chất chủ yếu như phytine, phospholipid, acid nucleic. Trong không bào người ta còn thấy lân vô cơ ở dạng octhophosphate làm nhiệm vụ đệm và chất dự trữ. Cây trồng, vi sinh vật không thể trực tiếp đồng hoá lân hữu cơ. Muốn đồng hoá chúng phải được chuyển hoá thành dạng muối H_3PO_4 .

Lân vô cơ thường ở trong các dạng khoáng như apatis, phosphoric, phosphate sắt, phosphate nhôm... Muốn cây trồng sử dụng được phải qua chế biến, để trở thành dạng dễ tan.

Cũng như các yếu tố khác, P luôn luôn tuần hoàn chuyển hoá. Nhờ vi sinh vật lân hữu cơ được vô cơ hoá biến thành muối của acid phosphoric. Các dạng lân này một phần được sử dụng, biến thành lân hữu cơ, một phần bị cố định dưới dạng lân khó tan như: $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, $AlPO_4$. Những dạng khó tan này trong những môi trường có pH thích hợp sẽ chuyển hóa thành dạng dễ tan. Vi sinh vật giữ vai trò quan trọng trong quá trình này. Hình 6.6.

Phân vi sinh vật phân giải phosphate khó tan không chỉ có tác dụng nâng cao hiệu quả của phân bón lân khoáng nhờ hoạt tính phân giải và chuyển hóa của các chủng vi sinh vật mà còn có tác dụng tận dụng nguồn photphate địa phương có hàm lượng lân thấp, không đủ điều kiện sản xuất phân lân khoáng ở quy mô công nghiệp.

2.3. Các nhóm vi sinh vật phân giải lân

* Vi khuẩn phân giải những hợp chất lân vô cơ khó tan:

- Thường gặp các giống: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*...

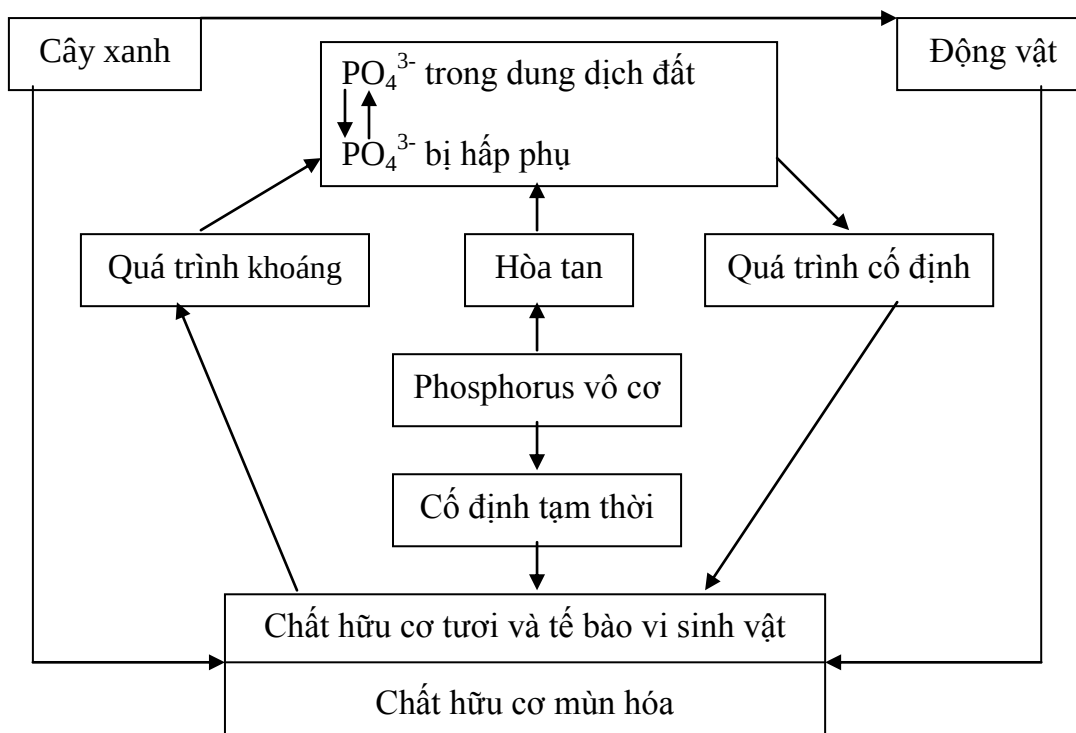
- Bên cạnh các vi khuẩn và xạ khuẩn thì nấm cũng có tác dụng trong quá trình hòa tan hợp chất lân khó tan: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Sclerotium*.

* Vi khuẩn phân giải những hợp chất lân hữu cơ khó tan:

- Giống *Bacillus*: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. malaberensis*.

B. megaterium không những có khả năng phân giải hợp chất lân vô cơ mà còn có khả năng phân giải hợp chất lân hữu cơ. Người ta, còn dùng *B. megaterium* làm phân vi sinh vật.

- Ngoài ra còn các giống *Serratia*, *Proteus*, *Arthrobacter*...
- Nấm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*...
- Xạ khuẩn: *Streptomyces*.



Hình 6.6. Vòng tuần hoàn phosphorus trong tự nhiên

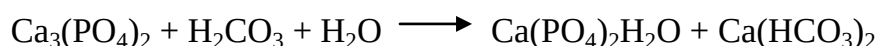
2.4. Sự chuyển hóa lân

* Sự chuyển hóa lân vô cơ - Cơ chế hòa tan phosphorus

Lân vô cơ thường tồn tại dưới dạng bicalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Nhiều nghiên cứu cho thấy sự phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ có liên quan mật thiết với sự sinh acid trong quá trình sống của vi sinh vật. Trong đó carbonic acid rất quan trọng, chính H_2CO_3 giúp cho $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ phân giải.

Quá trình phân giải theo phương trình sau:



Trong đất, vi khuẩn nitrat hóa và vi khuẩn chuyển hóa S cũng có tác dụng quan trọng trong phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

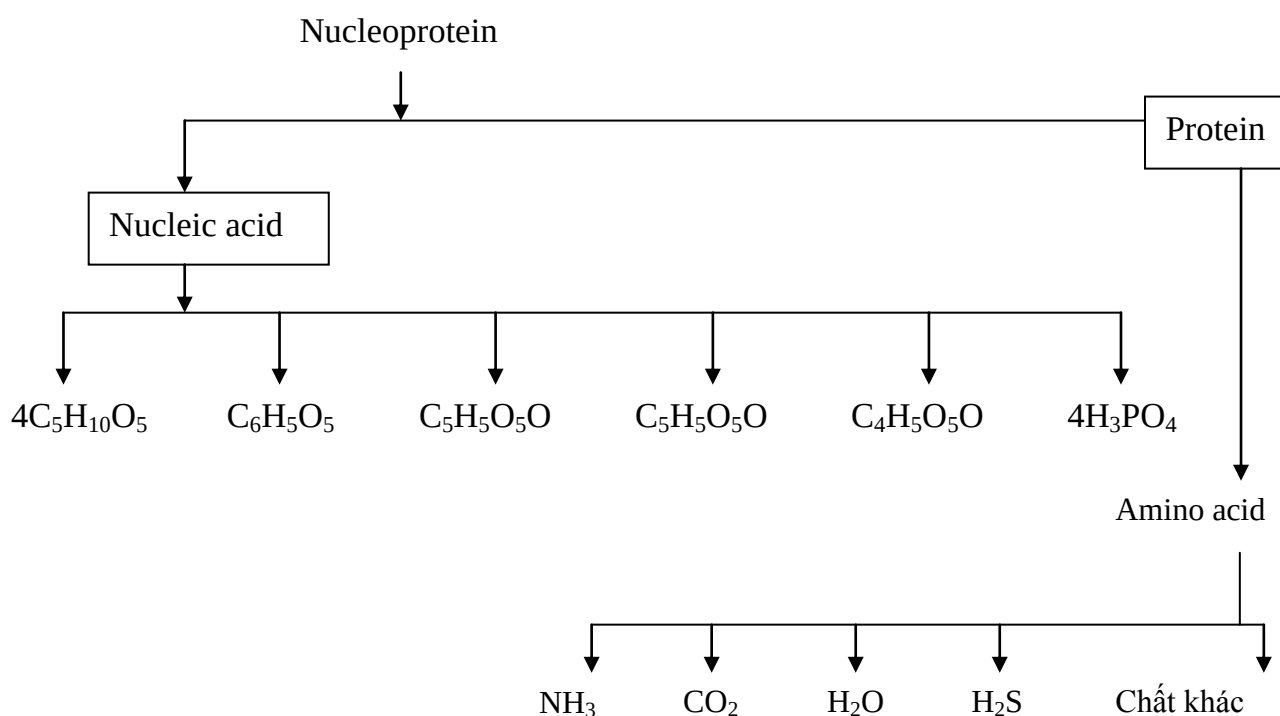
Quá trình hòa tan các hợp chất lân khó tan có thể theo cơ chế: Lân khó tan được tạm thời đồng hóa vi sinh vật, sau đó lân được giải phóng khỏi vi sinh vật dưới dạng có thể đồng hóa cho cây trồng.

* Sự chuyển hóa lân hữu cơ

Trong đất lân hữu cơ thường gặp dưới dạng: phytin, nucleic acid, nucleoprotein, phospholipid.

Nhiều vi sinh vật đất có enzyme dephosphorylase phân giải lân hữu cơ như sau:





Hình 6.7. Sơ đồ chuyển hóa lân hữu cơ

2.5. Quy trình sản xuất

2.5.1. Phân lập tuyển chọn chủng vi sinh vật phân giải lân (VSVPGGL)

Phân lập tuyển chọn chủng VSVPGGL từ đất hoặc từ vùng rễ cây trồng trên các loại đất hay cơ chất giàu hữu cơ theo phương pháp nuôi cấy pha loãng trên môi trường đặc Pikovskaya. Khi đó các chủng vi sinh vật phân giải lân sẽ tạo vòng phân giải, tức là vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc. Vòng phân giải được hình thành nhờ khả năng hòa tan hợp chất phosphorus không tan được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Căn cứ vào đường kính vòng phân giải, thời gian hình thành và độ trong của vòng phân giải người ta có thể đánh giá định tính khả năng phân giải mạnh hay yếu của các chủng vi sinh vật phân lập. Để đánh giá chính xác mức độ phân giải các hợp chất phosphorus khó tan của vi sinh vật, người ta phải xác định định lượng hoạt tính phân giải của chúng bằng cách phân tích hàm lượng lân dễ tan trong môi trường nuôi cấy có chứa loại phosphate không tan. Tỷ lệ (%) giữa hàm lượng lân tan và lân tổng số trong môi trường được gọi là hiệu quả phân giải. Thông thường để sản xuất phân lân vi sinh vật người ta cố gắng tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy nhiều loại hợp chất phosphorus và vô cơ khác nhau. Chủng vi sinh vật có khả năng phân giải hợp chất phosphorus cao chưa hẳn là có ảnh hưởng tốt đến cây trồng. Vì ngoài hoạt tính phân giải lân, nhiều chủng vi sinh vật còn có các hoạt tính sinh học khác gây ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng. Do vậy, sau khi đánh giá khả năng phân giải lân, các chủng vi sinh vật dùng để sản xuất phân lân vi sinh cần được đánh giá ảnh hưởng đến đối tượng cây trồng sử dụng. Chỉ sử dụng chủng vi sinh vật vừa có hoạt tính phân giải lân cao vừa không gây ảnh hưởng xấu đến cây trồng và môi trường sinh thái.

Ngoài những chỉ tiêu quan trọng trên, còn phải đánh giá đặc tính sinh học như khi chọn chủng vi sinh vật cố định đạm đó là: thời gian mọc; kích thước tế bào, khuẩn lạc; khả năng thích ứng ở pH; khả năng cạnh tranh...

2.5.2. Nhân sinh khối, xử lý sinh khối, tạo sản phẩm

Từ các chủng giống vi sinh được lựa chọn (chủng gốc) người ta tiến hành nhân sinh khối vi sinh vật, xử lý sinh khối vi sinh vật và tạo sản phẩm phân lân vi sinh. Các công đoạn sản xuất phân lân vi sinh được tiến hành tương tự như trong quy trình sản xuất phân bón vi sinh vật cố định nitrogen. Thông thường để sản xuất phân lân vi sinh từ vi khuẩn người ta sử dụng phương pháp lên men chìm trong các nồi lên men và sản xuất phân lân vi sinh từ nấm người ta sử dụng phương pháp lên men xốp. Sản phẩm tạo ra của phương pháp lên men xốp là chế phẩm dạng sợi hoặc chế phẩm bào tử. Chế phẩm lân vi sinh vật có thể được sử dụng như một loại phân bón vi sinh vật hoặc được bổ sung vào phân hữu cơ dưới dạng chế phẩm vi sinh vật làm giàu phân ủ, qua đó nâng cao chất lượng của phân ủ.

Tại Việt Nam, trong sản xuất phân lân vi sinh vật trên nền chất mang không khử trùng các nhà sản xuất thường sử dụng bột quặng phosphorid bổ sung vào chất mang. Việc làm này tận dụng được nguồn quặng tự nhiên sẵn có của địa phương làm phân bón qua đó giảm chi phí trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên, để phân bón có hiệu quả cần phải kiểm tra đánh giá khả năng phân giải quặng của chủng vi sinh vật sử dụng và khả năng tồn tại của chúng trong chất mang được bổ sung quặng.

2.5.3. Công tác kiểm tra chất lượng và yêu cầu chất lượng

Yêu cầu chất lượng đối với phân lân vi sinh cũng tương tự như yêu cầu chất lượng đối với phân vi sinh vật cố định nitrogen, nghĩa là phân lân vi sinh vật được xem là có chất lượng tốt khi có chứa một hay nhiều loài vi sinh vật có hoạt tính phân giải lân cao, có ảnh hưởng tốt đến cây trồng với mật độ $10^8 - 10^9$ VSV/g, ml phân bón đối với loại phân bón trên nền chất mang khử trùng và 10^6 VSV/g, ml đối với phân bón trên nền chất mang không khử trùng. Để phân bón vi sinh vật có chất lượng cao cần tiến hành kiểm tra chất lượng sản phẩm tạo ra sau mỗi công đoạn sản xuất tương tự như công tác kiểm tra chất lượng trong sản xuất phân vi sinh vật cố định nitrogen.

3. PHÂN HỮU CƠ SINH HỌC (COMPOST)

3.1. Định nghĩa

Là loại sản phẩm phân bón được tạo thành thông qua quá trình lên men vi sinh vật các hợp chất hữu cơ có nguồn gốc khác nhau (phế thải nông, lâm nghiệp, phế thải chăn nuôi, phế thải chế biến, phế thải đô thị, phế thải sinh hoạt...), trong đó các hợp chất hữu cơ phức tạp dưới tác động của vi sinh vật hoặc các hoạt chất sinh học được chuyển hóa thành mùn.

Nguyên liệu sản xuất phân hữu cơ sinh học là phế thải của người, động vật, gia súc, gia cầm bao gồm: phế thải chế biến thủy hải sản, tồn dư cây trồng nông, lâm nghiệp (thân lá, rễ, cành cây), phế thải sinh hoạt, phế thải đô thị, phế thải chế biến nông, lâm sản và than bùn. Thông thường tồn dư của các cây ngũ cốc chứa 0,5% nitơ, 0,6% P_2O_5 và 1,5% K_2O . Tồn dư các cây bộ đậu chứa hàm lượng nitrogen cao hơn nhiều so với cây ngũ cốc.

Từ các nguyên liệu hữu cơ trên người nông dân từ xa xưa đã biết ủ và chế biến thành phân chuồng, phân rác bón cho đất và cây trồng. Trước đây phân rác, phân chuồng là nguồn phân bón chính được sử dụng cho mọi loại hình canh tác ở nước ta. Phân chuồng, phân rác là một loại phân hữu cơ sinh học được chế biến bằng cách tận dụng vi sinh vật sẵn có trong nguyên liệu. Với phương pháp chế biến truyền thống để

tạo được phân hữu cơ đảm bảo độ hoai chín cần thiết, thời gian ủ kéo dài từ 4 – 6 tháng.

Ứng dụng công nghệ vi sinh vật chế biến phân hữu cơ sinh học không chỉ rút ngắn thời gian ủ mà còn nâng cao giá trị dinh dưỡng của sản phẩm tạo ra.

3.2. Phân hữu cơ sinh học với sự trợ giúp của chế phẩm vi sinh vật

Vi sinh vật trợ giúp quá trình chế biến phân ủ là các vi sinh vật lựa chọn có khả năng thúc đẩy nhanh quá trình chuyển hoá phế thải hữu cơ thành phân bón. Thông thường là các loại vi sinh vật chuyển hóa cellulose và lignocellulose, đó là các loài *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Paeceiomyces* sp., *Trichurus spiralis*, *Chetomium* sp.,... Để chế biến, các phế thải hữu cơ được cắt ngắn khoảng 5 – 8cm làm ẩm và đưa vào các hố ủ có bổ sung 5 kg urea, 5 kg lân cho 1 tấn nguyên liệu. 750ml sinh khối vi sinh vật sau 10 ngày nuôi cấy được hòa vào 30 lít nước và trộn đều với khối nguyên liệu. Độ ẩm cuối cùng của khối nguyên liệu được điều chỉnh bằng nước sạch để đạt 60%. Để đảm bảo oxygen cho vi sinh vật hoạt động và quá trình chế biến được nhanh chóng nên đảo trộn khối ủ 20 ngày 1 lần. Thời gian chế biến kéo dài khoảng 1 – 4 tháng tùy thành phần của loại nguyên liệu.

3.3. Phân hữu cơ sinh học có bổ sung vi sinh vật trợ lực và làm giàu dinh dưỡng (phân hữu cơ vi sinh vật)

Phân hữu cơ sinh học dạng này được chế biến tương tự như phân hữu cơ sinh học với sự trợ giúp của chế phẩm vi sinh vật, sau đó khi nhiệt độ khối ủ ổn định ở mức 30⁰C người ta bổ sung vi sinh vật có ích khác vào khối ủ. Đó là vi khuẩn cố định nitrogen tự do (*Azotobacter*), vi khuẩn hoặc nấm sợi phân giải phosphate khó tan (*Bacillus polymixa*, *Pseudomonas striata*, *Apergillus awamori*...). Ngoài ra, có thể bổ sung 1% quặng phosphate vào khối ủ cùng với sinh khối vi sinh vật. Sản phẩm phân hữu cơ sinh học loại này không chỉ có hàm lượng mùn tổng số mà còn có hàm lượng nitrogen tổng số cao hơn loại phân hữu cơ chế biến bằng phương pháp truyền thống 40 – 45%. Kỹ thuật chế biến phân ủ từ phế thải hữu cơ được trình bày kỹ hơn trong phần công nghệ vi sinh vật trong xử lý ô nhiễm môi trường.

4. CHẾ PHẨM VI SINH VẬT CẢI TẠO ĐẤT

Đất có tính đệm và lọc vì vậy có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn sự phân tán của các chất ô nhiễm. Tuy nhiên, với sự phát triển của công nghiệp hoá học và các ngành công nghiệp như: khai khoáng, chế tạo máy, công nghiệp sơn... sự phát tán của các chất ô nhiễm đã vượt quá khả năng tự cân bằng của đất gây nên hiện tượng tích tụ và làm ảnh hưởng xấu đến hệ sinh thái.

Trong số các chất gây ô nhiễm đất trồng người ta quan tâm nhiều đến các kim loại nặng, các thuốc hoá học bảo vệ thực vật hữu cơ. Tái sinh đất ô nhiễm bằng phương pháp sinh học không chỉ giải quyết về mặt môi trường mà còn có tác dụng nâng cao năng suất và chất lượng cây trồng. Chúng ta đều biết, các acid hữu cơ có thể hòa tan và làm linh động hơn các hợp chất kim loại nặng không tan. Trong tự nhiên một số vi sinh vật vùng rễ cây trồng có khả năng sản sinh ra các acid hữu cơ và tạo phức với kim loại nặng hoặc các kim loại độc hại với cây trồng (Al, Fe...), một số khác có khả năng phân hủy hợp chất hoá học nguồn gốc hữu cơ.

Công nghệ vi sinh vật trong cải tạo đất bị ô nhiễm là sử dụng các loại vi sinh vật có khả năng phân giải hoặc chuyển hoá các chất gây ô nhiễm trong đất qua đó tạo lại cho đất sức sống mới. Ngoài ra, các vi sinh vật sử dụng còn có khả năng phân hủy các phế thải hữu cơ cung cấp các chất dinh dưỡng cho cây trồng, đồng thời giúp cây chống

lại các tác nhân gây bệnh nguồn gốc từ đất, tạo ra các chất kích thích sinh trưởng thực vật làm ổn định cấu trúc đất ở vùng rễ cây trồng.

Các vi sinh vật thường dùng trong cải tạo đất thoái hoá, đất có vấn đề do ô nhiễm có thể kể đến là nấm rễ nội cộng sinh (VAM-*Vascular arbuscular mycorrhiza*) và vi khuẩn *Pseudomonas*.

5. SẢN XUẤT THUỐC TRỪ SÂU VI SINH VẬT

5.1. Định nghĩa

Thuốc trừ sâu vi sinh vật là những chế phẩm sinh học được sản xuất ra từ các chủng vi sinh vật được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng khác nhau theo phương pháp thủ công, bán thủ công hoặc phương pháp lên men công nghiệp để tạo ra những chế phẩm có chất lượng cao có khả năng phòng trừ được các loại sâu hại cây trồng nông, lâm nghiệp.

5.1.1. Ưu điểm của thuốc trừ sâu vi sinh vật

- Không gây độc hại cho người và gia súc, không nhiễm bẩn môi trường sống không ảnh hưởng đến đất trồng trọt và không khí môi trường
- Không ảnh hưởng đến chất lượng nông sản thực phẩm.
- Không làm mất đi tính đa dạng sinh vật nghĩa là không gây chết những nguồn tài nguyên sinh vật có ích (ký sinh, thiên địch bắt mồi ăn thịt và các vi sinh vật có lợi với con người trong tự nhiên)
- Chưa tạo nên tính kháng thuốc của sâu hại cụ thể là các thuốc trừ sâu vi sinh vật.
- Sử dụng hợp lý đúng phương pháp, đúng kỹ thuật trong điều kiện khí hậu thích hợp sẽ mang lại tính hiệu quả kỹ thuật cao.
- Hiệu quả của thuốc trừ sâu vi sinh vật thường kéo dài vì chúng không chỉ tiêu diệt được lứa sâu đang phá hại mà còn lan truyền cho thế hệ tiếp theo. Ví dụ: lớp trứng nở ra lứa sâu non mới nếu như gặp và tiếp xúc với sâu hại bị chết bởi thuốc vi sinh thì chúng cũng bị chết do lây nhiễm, như vậy hiệu quả phòng trừ của thuốc cao và hiệu quả thường kéo dài liên tục và đồng thời với thời gian phát triển của cây.

5.1.2. Nhược điểm của thuốc trừ sâu vi sinh vật

- Thuốc trừ sâu vi sinh vật khi lây nhiễm chúng phải có thời gian ủ bệnh nên hiệu lực trừ sâu chậm, hay nói cách khác là thuốc tác động chậm với sâu hại.
- Hiệu lực ban đầu của thuốc chưa cao.
- Phổ tác động của thuốc hẹp, thuốc trừ sâu virus chuyên tính, thuốc virus sâu xanh đục quả chỉ có thể phòng trừ cho sâu xanh đục quả, thuốc trừ sâu khoang chỉ có thể phòng trừ được sâu khoang...
- Một vài loại thuốc trừ sâu chịu ảnh hưởng bởi điều kiện thời tiết: dễ bị phân hủy dưới ánh sáng mặt trời và dễ bị rửa trôi khi gặp mưa, nếu phun không đúng kỹ thuật, phun trong điều kiện không thích hợp sẽ khó đạt hiệu quả cao.
- Hiện tại, thuốc trừ sâu vi sinh có công nghệ sản xuất thủ công với số lượng ít nên giá thành còn cao.
- Trình độ dân trí nông dân còn thấp, chưa nhận thức được ưu điểm của thuốc trừ sâu vi sinh vật cũng như do điều kiện kinh tế thấp nên thuốc trừ sâu vi sinh vật chưa đến tay người nông dân

5.2. Các chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh vật

5.2.1. Thuốc trừ sâu vi sinh sản xuất từ vi khuẩn

Vi khuẩn có quan hệ với côn trùng rất đa dạng và được chia thành 2 nhóm: Vi khuẩn hình thành bào tử gồm tất cả vi khuẩn gây bệnh bắt buộc và các loài gây bệnh không bắt buộc. Phần lớn các loài gây bệnh không bắt buộc có tính thể độc; Vi khuẩn không hình thành bào tử bao gồm một loài gây bệnh hoàn toàn không bắt buộc và tất cả những loài vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh cho côn trùng

Vi khuẩn gây bệnh bắt buộc là vi khuẩn luôn liên quan với một loại bệnh nhất định ở côn trùng. Trong tự nhiên, vi khuẩn gây bệnh bắt buộc thường chỉ thích nghi với một phổ ký chủ hẹp.

Vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc có thể làm tổn hại hoặc xâm nhiễm vào những mô của cơ thể côn trùng mẫn cảm với chúng, nhưng không thể xếp chúng vào nhóm vi khuẩn gây bệnh bắt buộc. Trước khi xâm nhập vào xoang máu vi khuẩn gây bệnh không bắt buộc thường sinh sản trong ruột côn trùng.

Vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh, bình thường không sinh sản ở trong ruột côn trùng, nhưng chúng có thể xâm nhập vào xoang máu. Những vi khuẩn này phát triển được trên môi trường thức ăn nhân tạo, không chuyên tính với từng nhóm côn trùng riêng biệt.

Vi khuẩn sử dụng trong biện pháp sinh học trừ dịch hại thuộc bộ *Eubacteriales*, đặc biệt là thuộc họ *Enterobacteriaceae*, *Microccaceae*, *Bacillaceae* và một số giống thuộc họ *Pseudomonadeceae* (bộ *Pseudomonadales*).

Họ *Pseudomonadeceae* gồm các loại vi khuẩn hình que, Gram âm, không hình thành bào tử. Các loài *Pseudomonas aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*,... là những vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh cho côn trùng.

Họ *Enterobacteriaceae* gồm các loài vi khuẩn sống ở ruột côn trùng. Chúng có dạng hình que, Gram âm, không hình thành bào tử. Phát triển tốt trên môi trường dinh dưỡng bình thường. Vi khuẩn thuộc họ này có loài là ký sinh bắt buộc, không bắt buộc và hoại sinh.

Họ *Bacillaceae* gồm vi khuẩn hình thành bào tử, Gram dương, hình que. Có ý nghĩa trong biện pháp sinh học là các loài thuộc giống *Bacillus*, *Clostridium*.

* Một số vi khuẩn được ứng dụng trong phòng chống côn trùng

- Vi khuẩn *Coccobacillus acridiorum*

Đây là vi khuẩn gây bệnh cho côn trùng đầu tiên được D' Herelle nghiên cứu và mô tả vào năm 1911 tại Mexico. Vi khuẩn có dạng hình que nhỏ, Gram âm và được gọi tên ban đầu là *C. acridiorum* gây bệnh nhiễm trùng máu cho châu chấu, có thể phát triển trên môi trường nhân tạo. Sản phẩm từ vi khuẩn *Coccobacillus acridiorum* được áp dụng tương đối thành công ở Mexico, Colombia, Argentina. Theo hệ thống phân loại hiện đại vi khuẩn có thể là loài *Enterobacter cloacae* var. *acridiorum*.

- Vi khuẩn gây bệnh sữa cho ấu trùng bọ hung

Bệnh sữa được phát hiện đầu tiên ở ấu trùng bọ hung ở Nhật Bản *Popillia japonica* từ năm 1921 gồm 2 dạng cơ bản là dạng A và B. Vi khuẩn gây nên 2 dạng bệnh này được mô tả với tên *Bacillus popilliae* (dạng bệnh A) và *B. lentimormus* (dạng bệnh B). Trong 2 loài vi khuẩn này thì loài *B. popilliae* phổ biến hơn chiếm 88% trường hợp và được chú ý nghiên cứu hơn. Loài *B. popilliae* là vi khuẩn ký sinh bắt buộc, Gram dương; bào tử có tính kháng cao với các điều kiện bất lợi của môi trường, lây nhiễm bệnh cho bọ hung qua đường tiêu hoá. Sau khi xâm nhập vào vật

chủ 3 – 4 ngày thì vi khuẩn bắt đầu sinh bào tử, tới ngày thứ 13 – 16 thì bào tử của vi khuẩn đạt tới mức tối đa. Trên môi trường thức ăn nhân tạo vi khuẩn không hình thành bào tử, vì vậy phải nuôi nhân vi khuẩn này trên ấu trùng bọ hung Nhật Bản. Sau 20 ngày ủ bệnh, một ấu trùng bọ hung Nhật Bản tích lũy tới 20 tỷ bào tử. Từ các sâu bị bệnh có thể gom vi khuẩn và sản xuất thành chế phẩm dạng bột chứa 100 triệu bào tử trong 1 gam chế phẩm.

- Vi khuẩn *Serratia marcescens*

Đây là một vi khuẩn hình que, Gram âm, không hình thành bào tử, ký sinh không bắt buộc trên côn trùng. Tính gây bệnh cho côn trùng của vi khuẩn này được ghi nhận trong tài liệu từ năm 1886 (Masera, 1936). Vi khuẩn *S. marcescens* đã gây dịch cho bọ hung *Melolontha melolontha*, tằm và được sử dụng thành công trừ sâu đục thân ngô. Vi khuẩn có tính gây bệnh cao cho châu chấu *Melanoplus bivittatus*, một số rệp sáp *Pseudococcus*, sâu non *Pieris brassicae*, *Lymantria dispar*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Agrotis segetum*, bọ xít *Eurygaster*...

- Vi khuẩn *Bacillus cereus*

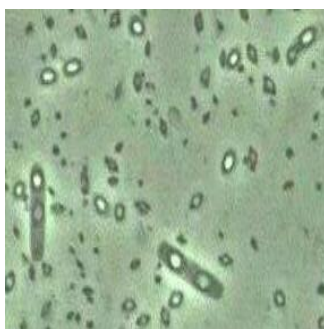
Là vi khuẩn rất phổ biến trong tự nhiên, Gram dương, hình thành bào tử nhưng không tạo thành tinh thể độc. Tính gây bệnh cho côn trùng của vi khuẩn này rất khác nhau. Người ta cho rằng tính gây bệnh của *B.cereus* chủ yếu liên quan tới sự tạo thành men phospholipase và một loại ngoại độc tố như của *Bacillus thuringiensis*.

- Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Là trực khuẩn sinh bào tử, hiếu khí hoặc hiếu khí không bắt buộc, bắt màu thuốc nhuộm Gram dương, kích thước 3 – 6µm, có phủ tiêm mao không dày, tế bào đứng riêng rẽ hay xếp thành từng chuỗi. *Bacillus thuringiensis* không lên men sinh acid đối với arabinose, cellose và maltose, khử NO_3^- thành NO_2^- , có phản ứng với lòng đỏ trứng, phát triển trên môi trường thạch kỵ khí và trên môi trường chứa 0,001% lizozym

Bacillus thuringiensis chứa tinh thể độc có bản chất protein, có khả năng diệt sâu. Nhiệt độ sinh trưởng tối đa Bt là 40 – 45°C, tối thiểu 15 – 45°C, tối ưu 29 – 30°C.

Bào tử Bt có dạng hình ovan, hình trứng dài 1,2 – 1,6 µm, có thể nảy mầm tế bào sinh dưỡng khi gặp điều kiện thuận lợi. Tinh thể protein được gọi là “thể kèm bào tử”, hình trám tám mặt, có kích thước khoảng 0,6 x 2µm.



Hình 6.8. Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

+ Các loại độc tố của Bt: có 4 loại

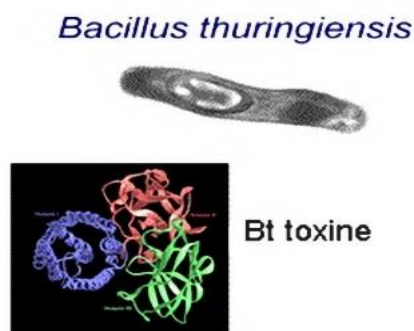
· Ngoại độc tố α (α -exotoxin) hay là phospholipase C, tác động của enzyme này có liên quan đến sự phân hủy màng tính cảnh ứng của phospholipid trong mô của côn trùng làm cho côn trùng bị chết (Krulov & Manakov, 1987).

- Ngoại độc tố β (β -exotoxin) hay là loại độc tố bền nhiệt. Ngoại độc tố này ở nhiệt độ $120 - 121^{\circ}\text{C}$ trong 10-15 phút vẫn còn hoạt tính. Một số Bt không sinh tinh thể độc nhưng có thể sinh β -exotoxin. Hoạt tính của β -exotoxin bắt đầu xuất hiện trong giai đoạn vi khuẩn phát triển mạnh, trước khi hình thành bào tử. Tác động của nó là kìm hãm nucleotid và DNA – polymerase phụ thuộc DNA, các enzyme này gắn với ATP dẫn đến việc ngưng tổng hợp RNA. Ngoại độc tố β - exotoxin còn tác dụng cộng hưởng với nội độc tố δ -endotoxin, sau khi nội độc tố δ - endotoxin có tác dụng gây dập vỡ, phá hủy hoàn toàn biểu mô ruột giữa của côn trùng mẫn cảm, ngoại độc tố β - exotoxin đã nhanh chóng xâm nhập vào huyết tương và máu đến các cơ quan gây thay đổi sinh lý và dẫn đến cái chết nhanh chóng đối với ấu trùng.

Ngoại độc tố β - exotoxin rất hiệu quả trong việc phòng trừ sâu non của các loài côn trùng mẫn cảm. Gây ra những trì trệ trong việc chuyển hóa lột xác của sâu hại và có tác động đối với cả con trưởng thành được phát triển từ các ấu trùng ăn phải độc tố dưới ngưỡng.

- Ngoại độc tố γ (γ - exotoxin) hay còn gọi là độc tố tan trong nước. Độc tố có chứa các peptid với khối lượng phân tử thấp (200 – 2000) và một số amino acid tự do. Độc tố này tan trong nước, không ổn định, mẫn cảm với không khí, ánh sáng, ôxy và nhiệt độ (bị mất hoạt lực từ 60°C trở lên trong vòng 10 – 15 phút). Độc tố này thuộc nhóm phospholipase tác động lên phospholipid và giải phóng ra acid béo, làm phá hủy các mô tế bào của sâu hại khi bị nhiễm Bt.

- Nội độc tố δ (δ - endotoxin) hay còn gọi là tinh thể độc. Là một protein kết tinh gồm 1180 amino acid. Các amino acid chủ yếu là glutamic, asparaginic, chiếm trên 20% tổng số amino acid trong phân tử và là nguyên nhân gây điểm đẳng điện thấp. Lượng amino acid cystine chiếm thấp nhất $< 2\%$ tổng số amino acid, quy định sự không hòa tan của tinh thể. Ngoài protein, tinh thể còn chứa các thành phần khác như carbohydrate (5,6%); các nguyên tố như Ca, Mg, Fe, Si... và một lượng nhỏ Ni, Ti, Zn, Al, Cu, Mn..., hầu như không có P.



Hình 6.9. Bào tử và nội độc tố δ của *Bacillus thuringiensis*

- + Đặc điểm của tinh thể độc: Tinh thể độc của Bt có dạng hình thoi hoặc hình quả trám mang chất protein và có độc tính cao với nhiều loại côn trùng. Kích thước của tinh thể $1\mu\text{m} \times 0,5\mu\text{m}$, chiếm 30% trọng lượng khô của tế bào. Tinh thể độc rất bền vững với nhiệt độ, có khối lượng phân tử là 5.000, không phải bào tử nào cũng chứa tinh thể độc.

- + Cấu tạo của tinh thể độc: gồm 3 vùng chức năng

- Vùng I là một bó gồm 7 chuỗi xoắn α . Một vài hoặc tất cả các chuỗi có thể cài vào màng tế bào ruột, tạo ra các lỗ, từ đó các ion có thể qua lại tự do.

- Vùng II chứa 3 dải β không song song tương tự như vùng gắn kháng nguyên của globulin miễn dịch. Vùng này có vai trò gắn với thụ thể trên bề mặt tế bào biểu mô ruột.

- Vùng III có nhiệm vụ bảo vệ độc tố đã được hoạt hóa không bị phân huỷ bởi protease ở ruột.

+ Tác động của tinh thể độc: Có khả năng diệt các loài sâu hại cây trồng, chủ yếu là các loại sâu non thuộc bộ cánh vảy *Lepidoptera*; một hại kho nông sản, bộ cánh cứng *Coleoptera*; và các loài cung quăng, ấu trùng của muỗi thuộc bộ hai cánh *Diptera*.

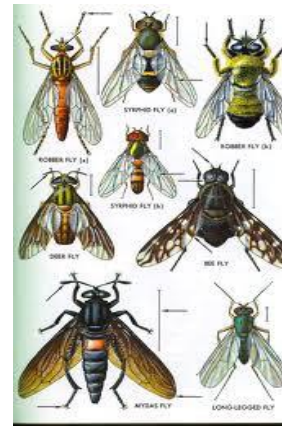
Trong 4 độc tố trên quan trọng nhất là nội độc tố δ - endotoxin vì nó quyết định hoạt tính diệt côn trùng của Bt. Hiện nay, trên thế giới còn có khả năng chế tạo và nghiên cứu sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh Bt tổng hợp, hoặc hai tổng hợp hai chủng Bt với nhau, hoặc tổng hợp Bt với thuốc trừ sâu virus để làm tăng hiệu quả trừ sâu theo cơ chế đồng tác động.



Hình 6.10. *Lepidoptera*



Hình 6.11. *Coleoptera*



Hình 6.12. *Diptera*

+ Chu trình sống và cơ chế lây nhiễm độc của Bt

Chu trình sống của vi khuẩn Bt chia ra ba giai đoạn: thể sinh dưỡng, nang bào tử, bào tử và tinh thể:

- Thể sinh dưỡng

Thể sinh dưỡng dạng que, kích thước $1,2 - 1,8\mu\text{m} \times 3 - 5\mu\text{m}$, bắt màu Gram dương. Lông mọc xung quanh hơi động hoặc không động. Chúng thường tồn tại một cá thể hoặc hai cá thể liền nhau. Thể dinh dưỡng sinh sản theo kiểu phân chia ngang. Trong thời kỳ sinh sản thường có 2, 4, 8... thể dinh dưỡng liền nhau thành chuỗi. Lúc này vi khuẩn sinh trưởng nhanh, trao đổi chất nhiều để nuôi cấy trên môi trường.

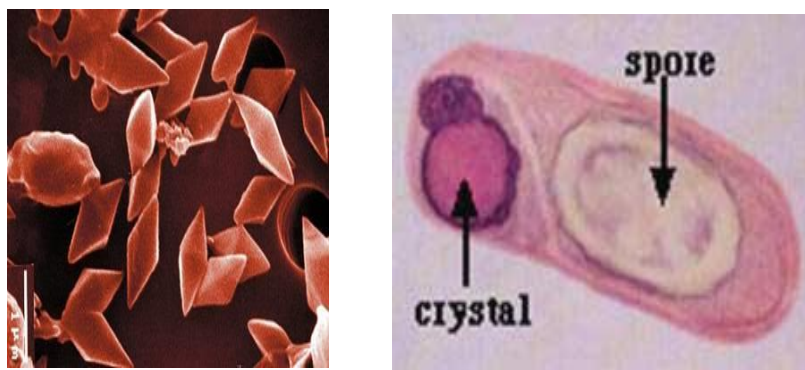
- Nang bào tử

Khi vi khuẩn già, một trong hai đầu trong cơ thể hình thành bào tử hình bầu dục, còn đầu kia hình thành thể hình thoi. Đó là giai đoạn nang bào tử, ở giai đoạn này nang bào tử hình trứng dài, to hơn thể sinh dưỡng.

- Bào tử và tinh thể

Khi nang bào tử phát triển đến một giai đoạn nào đó, chúng sẽ nứt ra, giải phóng bào tử và tinh thể. Kích thước bào tử $0,8-0,9\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$. Bào tử ở dạng ngủ có thể đề kháng với các điều kiện môi trường bất lợi. Chế phẩm vi khuẩn thường được bảo quản

ở dạng bào tử. Tinh thể thường có kích thước thay đổi khoảng $0,6 \times 2\mu\text{m}$, hình thoi, cũng có loại hình tròn, hình bầu dục tùy theo loài và loại môi trường. Tinh thể là một loại protein (chất diệt sâu) có hiệu quả chủ yếu.



Hình 6.13. Tế bào vi khuẩn Bt với tinh thể (crystal) và bào tử (spore)

Cơ chế gây độc của tinh thể độc cùng với bào tử xâm nhập vào cơ thể sâu bằng con đường tiêu hóa khi sâu ăn phải lá có vi khuẩn. Trong điều kiện bình thường, tinh thể độc không hòa tan. Khi đi vào ruột giữa của sâu, nơi có pH kiềm cao ($>9,5$) làm cho tinh thể độc tan ra. Tuy nhiên dạng hòa tan này chưa phải dạng hoạt động. Dạng tiền độc tố (có kích thước từ 135 – 140 kDa) này được protease trong ruột giữa của sâu hoạt hóa thành dạng hoạt tính (60 – 66 kDa) độc tố δ. Độc tố này liên kết với tế bào mô thành ruột, đâm qua màng tạo thành lỗ xuyên màng, làm mất cân bằng ion nội bào của tế bào biểu mô và làm chúng bị phân giải, sâu ngừng ăn và bị chết đói, pH trong ruột bị giảm xuống bằng với pH nội môi trong huyết tương. Độ pH thấp cho phép bào tử nảy mầm, xâm nhập vật chủ và cuối cùng gây chết.

* Quy trình sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu Bt

- Nguyên liệu

+ Nguồn carbon là tinh bột, maltose, glucose. Nếu là tinh bột thường dùng là gạo, ngô, sắn, Tinh bột qua giai đoạn thủy phân tạo đường đơn và đường đôi sử dụng amylase hoặc H_2SO_4 trong điều kiện nhiệt độ cao để thủy phân.

+ Nguồn N: thường sử dụng là bột cá, bột ngô, bột bánh lạc, bột bánh đậu, cao thịt bò, peptone, bột men,

+ Muối vô cơ thường bổ sung vào là các muối sau: K_2HPO_4 , MgSO_4 , CaCO_3

Môi trường sau khi trộn lẫn các thành phần trên trải qua giai đoạn dịch hóa

Sau khi chuẩn bị môi trường xong nên đi khử trùng với các chế độ khử trùng sau: Khử trùng bằng phương pháp gián đoạn: tiến hành ở áp suất dư 0,05 – 0,1Mpa với nhiệt độ từ $110 - 120^\circ\text{C}$ trong vòng 1 – 1,5 giờ; hoặc khử trùng liên tục: tiến hành ở nhiệt độ cao hơn $140 - 145^\circ\text{C}$ và thời gian ngắn hơn 5 – 15 phút.

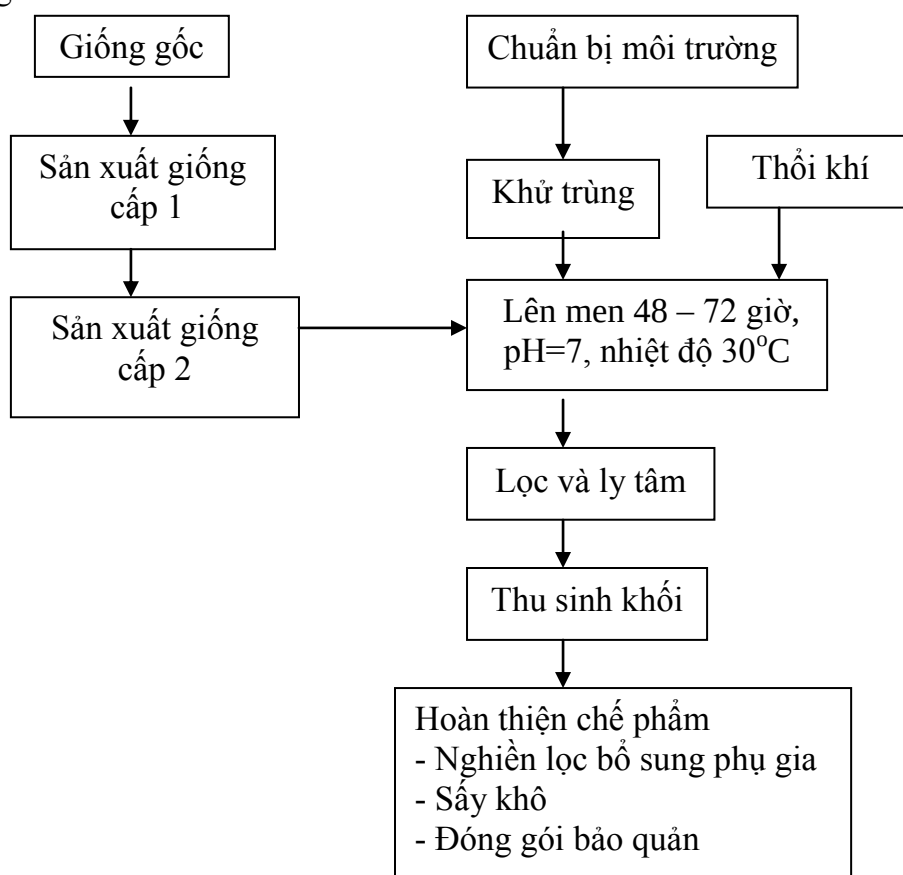
- Lên men: Tiến hành trong nồi lên men có dung tích 500l, 1000l, 2000l, ở điều kiện nhiệt độ từ $27 - 32^\circ\text{C}$ điều chỉnh pH 7,5 trong khoảng thời gian từ 48 – 72 giờ. Trong quá trình lên men tiến hành thổi khí.

- Chế độ thổi khí: Đây là chỉ tiêu cho quá trình hình thành bào tử và tinh thể độc. Ngưỡng thổi khí tốt nhất trong quá trình lên men là $0,5 - 0,6\text{m}^3$ môi trường/ m^3 không

khí. Nếu chế độ thổi khí ở mức thấp thì bào tử phát triển yếu, mật độ thưa, nếu chế độ thổi khí ở mức cao bào tử phát triển nhanh thời gian lên men ngắn, tinh thể độc tố nhỏ, hiệu quả diệt sâu không cao, nên chế độ thổi khí như trên là hợp lý nhất.

- Thu nhận sản phẩm: Sau khi lên men được 48 – 72 giờ ta tiến hành tách sản phẩm bằng cách lọc và ly tâm lạnh 4000 vòng/phút, thu kết tủa. Sau đó bổ sung thêm một số chất định hình và bảo quản rồi đem đi sấy khô trong điều kiện thường hoặc chân không ở nhiệt độ 50 – 65°C trong 1h, 70 – 80°C trong vòng 20 phút, độ ẩm giảm xuống từ 3 – 5% thì đạt.

- Hoàn thiện sản phẩm, sản phẩm sẽ được đóng gói, chế thành các dạng chế phẩm khác nhau. Hiệu quả phòng trừ bằng chế phẩm Bt không hoàn toàn quyết định bởi thành phần hoạt tính của chế phẩm mà dạng chế phẩm cũng là một nhân tố quan trọng.



Hình 6.14. Quy trình sản xuất chế phẩm Bt

- Các dạng chế phẩm Bt

+ Thuốc Bt dạng lỏng: Sau khi kết thúc quá trình lên men thu hồi sinh khối, phối trộn với các chất phụ gia, chất bám dính, chất chống thối để tạo ra chế phẩm Bt. Kiểm tra chất lượng, cuối cùng đóng chai để bảo quản.

+ Thuốc Bt dạng sữa: Thu sinh khối, sử dụng phương pháp ly tâm thu nhận bào tử và tinh thể độc, sau đó tiến hành nhũ tương hóa. Chế phẩm thu được ở dạng nhão nhớt.

+ Thuốc Bt dạng bột: phổ biến và tiện lợi, dễ sử dụng, dễ bảo quản. Thu nhận bào tử và tinh thể độc bằng ly tâm, sau đó được làm khô bằng phương pháp đông lạnh

hoặc sấy khô trong máy sấy phun. Để tăng độ bám dính của thuốc trộn với các chất phụ gia như bột mỳ, dextrin,... cuối cùng kiểm tra chất lượng, đóng gói và bảo quản để sử dụng.

- Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành tinh thể độc của Bt: Tinh thể độc có liên quan mật thiết đến độc tính của Bt, vì vậy các yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Bt đều ảnh hưởng đến quá trình hình thành tinh thể độc.

- + Vi khuẩn Bt sinh trưởng thích hợp trong khoảng nhiệt độ từ 25 – 35⁰C, nhiệt độ tối ưu là 30⁰C.

- + Độ pH thích hợp cho Bt phát triển là 7, nếu pH quá cao hoặc quá thấp đều làm biến tính tinh thể.

- + Nồng độ oxygen có ảnh hưởng lớn đến sự hình thành bào tử và tinh thể độc của Bt theo từng giai đoạn. Nếu giai đoạn đầu sinh trưởng mà thiếu oxygen thì sự tích lũy sinh khối sẽ bị giảm mạnh. Ngược lại trong giai đoạn hình thành bào tử và tinh thể độc, thừa oxygen thì sự hình thành bào tử và tinh thể độc sẽ bị giảm đi, số lượng ngoại độc tố sẽ tăng.

5.2.2. Thuốc trừ sâu vi sinh sản xuất từ nấm

Cũng như vi khuẩn, nhiều loại nấm có quan hệ cộng sinh hoặc hoại sinh với côn trùng, trong đó có nhiều loài nấm thực sự là ký sinh, gây hiện tượng bệnh lý và dẫn đến hủy diệt côn trùng. Nấm gây bệnh cho côn trùng có ý nghĩa rất lớn vì có thể gây chết thường xuyên với tỷ lệ chết cao cho nhiều loài côn trùng hại và là những tác nhân điều hòa tự nhiên rất hiệu quả. Côn trùng chết do nấm rất dễ nhận biết bằng mắt thường, vì các sợi nấm mọc qua vỏ cơ thể và bao phủ toàn bộ bề mặt ngoài của cơ thể côn trùng. Cơ thể côn trùng bị chết do nấm không bị tan rã, mà thường giữ nguyên hình dạng ban đầu, toàn bộ bên trong cơ thể chứa đầy sợi nấm.

Nấm gây bệnh cho côn trùng thuộc nhiều nhóm nấm khác nhau: từ nhóm nấm nguyên thủy sống dưới nước đến nhóm nấm bậc cao sống trên cạn. Nấm gây bệnh cho côn trùng có mặt ở trong cả 4 lớp nấm:

Nấm bậc thấp *Phycomycetes*, nấm túi *Ascomycetes*, nấm đảm *Basidiomycetes* và nấm bất toàn *Deuteromycetes*.

- Lớp nấm bậc thấp *Phycomycetes*: Trong lớp nấm này, các loài ký sinh trên côn trùng tập trung ở ba bộ: *Chytridiales*, *Blastocladales* và *Entomophthorales*. Đặc biệt có những họ nấm gồm tất cả các loài đều là ký sinh trên côn trùng như *Entomophthoraceae* và *Coelomomycetaceae*. Những giống nấm ký sinh côn trùng quan trọng của lớp nấm bậc thấp là: *Coelosporidium*, *Chytridiopsis* (bộ *Chytridiales*), *Coelomonys* (bộ *Blastocladales*) và *Entomophthora* (bộ *Entomophthorales*).

- Lớp nấm túi *Ascomycetes*: Trong lớp nấm túi có bộ *Laboulbiniales* là những nấm ngoại ký sinh côn trùng có chuyên tính cao, còn các loài nấm túi khác đều là nội ký sinh của côn trùng. Những giống nấm quan trọng gây bệnh cho côn trùng là: *Cordyceps*, *Aschersonia* (bộ *Hypocreales*).

- Lớp nấm đảm *Basidiomycetes*: Trong lớp nấm đảm chỉ ở 2 giống có các loài gây bệnh trên côn trùng. Đó là giống *Septobasidium* và *Uredinella*.

- Lớp nấm bất toàn *Deuteromycetes*: Phần lớn các loài nấm bất toàn ký sinh côn trùng đều thuộc bộ *Moniliales*. Những giống *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Spicaria*, *Metarhizium*, *Cephalosporium* và *Sorosporella* chứa các loài khi xâm nhiễm vào côn trùng đã tạo thành độc tố và gây chết vật chủ trong khoảng thời gian nhất định.

*** Cơ chế xâm nhập và lây nhiễm của nấm**

Hầu hết các loại nấm gây bệnh cho côn trùng đều xâm nhập vào cơ thể vật chủ không qua đường miệng, mà qua lớp vỏ cơ thể, nghĩa là phải có sự tiếp xúc của nguồn nấm với bề mặt cơ thể vật chủ. Bào tử nấm bám vào bề mặt cơ thể vật chủ, trong điều kiện đủ độ ẩm bào tử mọc mầm và xâm nhiễm vào bên trong cơ thể côn trùng qua lớp chitin nhờ áp lực cơ giới hoặc hoạt động men của nấm. Nấm tiết ra loại men làm mềm lớp vỏ chitin và tạo thành một lỗ thủng tại nơi bào tử mọc mầm, qua lỗ thủng đó mầm bào tử xâm nhập vào bên trong cơ thể côn trùng. Do khả năng xâm nhập vào bên trong cơ thể côn trùng qua lớp vỏ cơ thể nên nấm có thể ký sinh được côn trùng chích hút và cả những pha phát triển của côn trùng như trứng, nhộng mà các vi sinh vật khác không ký sinh được.

Nấm cũng có thể xâm nhập vào bên trong cơ thể côn trùng qua đường miệng. Từ miệng, bào tử đi tới ruột và qua thành ruột xâm nhiễm vào các tế bào nội quan để gây bệnh. Xâm nhập kiểu này chủ yếu là bào tử của các loài nấm ở nước. Dưới tác động của độc tố do bào tử nấm tiết ra có thể dẫn tới hiện tượng ngừng nhu động ruột của vật chủ. Thí dụ, trường hợp bào tử nấm *Aspergillus* trong ruột ong mật. Bào tử nấm còn có thể xâm nhập qua lỗ thở hoặc cơ quan sinh dục để vào bên trong cơ thể côn trùng, nhưng rất ít.

Sự xâm nhiễm và phát triển của nấm trong cơ thể côn trùng là một quá trình phức tạp, gồm ba giai đoạn chính sau đây:

- + Giai đoạn xâm nhập: từ khi bào tử nấm mọc mầm đến lúc hoàn thành việc xâm nhập vào trong xoang cơ thể côn trùng.

- + Giai đoạn phát triển của nấm trong cơ thể côn trùng đến khi côn trùng chết: đây là giai đoạn sống ký sinh của nấm. Trong giai đoạn này nấm thường tạo ra rất nhiều những sợi nấm ngắn. Những sợi nấm ngắn này được phân tán khắp cơ thể theo dịch máu. Về phía vật chủ có phản ứng tự vệ như sự thực bào, xuất hiện tế bào bạch huyết... Phản ứng tự vệ này chỉ trong một thời gian ngắn kìm hãm sự xâm nhập của nấm vào các nội quan. Khi các sợi nấm xâm nhập vào tất cả các bộ phận thì chúng đồng thời gây chết vật chủ.

- + Giai đoạn sinh trưởng phát triển của nấm sau khi vật chủ chết: đây là giai đoạn hoại sinh của nấm ký sinh côn trùng. Trong giai đoạn này nấm hình thành các bào tử, hoặc nấm mọc thành sợi ra bên ngoài bề mặt cơ thể vật chủ. Sau đó các bào tử được tạo thành trên lớp sợi nấm ở bề mặt cơ thể vật chủ.

Các nấm gây bệnh cho côn trùng chỉ sinh trưởng phát triển để hoàn thành một chu kỳ sống của chúng: từ mọc mầm bào tử đến hình thành bào tử mới. Nấm gây bệnh côn trùng có tính chuyên tính hẹp, chỉ ký sinh một vật chủ hoặc một giai đoạn nhất định của vật chủ, nhiều trường hợp chúng là ký sinh có tính chuyên hoá thức ăn rộng, có thể ký sinh nhiều loài côn trùng thuộc các giống, họ, bộ khác nhau.

*** Một số nấm chính gây bệnh côn trùng**

- Nấm xanh *Metarhizium anisopliae*

Nấm này được Metschnikov phát hiện đầu tiên vào năm 1878 trên bọ hung hại lúa mì bị bệnh. Nấm xanh thường gây bệnh cho côn trùng sống trong đất, thuộc hệ vi sinh vật đất trong tự nhiên. Bào tử của nấm xanh sau 24 giờ tiếp xúc với bề mặt cơ thể côn trùng thì bắt đầu mọc mầm và xâm nhập vào bên trong. Trong cơ thể côn trùng sợi nấm phát triển xâm nhập vào các bộ phận nội quan. Sau khi vật chủ chết, sợi nấm mọc

ra ngoài cơ thể côn trùng tạo thành lớp nấm màu trắng hơi hồng nhạt. Trên đó tạo thành các bào tử màu xanh xám. Quá trình phát triển của bệnh trong cơ thể côn trùng là 4 – 6 ngày tùy thuộc loài và tuổi vật chủ cũng như nguồn bệnh ban đầu. Vào giai đoạn cuối cùng của quá trình phát triển bệnh lý thì côn trùng chết.

Nấm *M. anisopliae* có 2 dạng: *M. anisopliae* var. *major* có bào tử dài và *M. anisopliae* var. *anisopliae* có bào tử ngắn. Nấm xanh sinh ra các độc tố destruxin A và B.

Nấm xanh ký sinh trên 200 loài côn trùng, thuộc các bộ: *Orthoptera* (11 loài), *Dermaptera* (1 loài), *Hemiptera* (21 loài), *Lepidoptera* (27 loài), *Diptera* (4 loài), *Hymenoptera* (6 loài) và *Coloptera* (134 loài). Nấm xanh có thể nuôi cấy trên môi trường thức ăn nhân tạo.

Nhiều loài trong chi *Metarhizium* có khả năng diệt côn trùng thuộc *Elateridae* và *Curculionidae* (*Coleoptera*), ấu trùng muỗi *Aedes aegypti*. *Anopheles stephensi* và *Clex pipiens* thuộc *Diptera*, côn trùng hại lúa *Scotinophara coarctata* thuộc họ *Hemiptera*, châu chấu *Schistocera gregaria* thuộc họ *Testigolidae*, loài mối *Nasutitermes exitiosus* (Hill) thuộc họ *Termitidae*.

M. anisopliae với bào tử dạng trụ và khuẩn lạc xanh đen hoặc đôi khi màu tối hoặc hồng vô quế. Khuẩn lạc mọc chậm, trên môi trường OA sau 10 ngày nuôi cấy ở 20°C có đường kính 2cm. *M. anisopliae* là chủng gây bệnh mạnh nhất cho côn trùng thuộc bộ *Coleoptera*. Hơn 204 loài côn trùng thuộc họ *Elaridae* và *Curculionidae* bị nhiễm bệnh bởi *M. anisopliae*. Nấm này phân bố rộng trong tự nhiên.

Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của *M. anisopliae*:

- + Không thể sinh trưởng tốt trên nền cơ chất không có chitin.
- + Sống được ở nhiệt độ thấp (8°C), biên độ của độ ẩm rộng, ở nơi tích lũy nhiều CO₂ và thiếu O₂ chúng có thể sống sót tới 445 ngày. Khi hoại sinh trong đất, bào tử bị ức chế nảy mầm bởi khu hệ nấm đất, trong đó có chủng *Aeromonas*.
- + Ở nhiệt độ dưới 10°C và trên 35°C thì sự hình thành bào tử không thể xảy ra.
- + Nhiệt độ tốt nhất cho sự nảy mầm bào tử là 25 – 30°C và chết ở 49°C trong 10 phút.
- + Nhiệt độ tốt nhất cho sự sinh trưởng là 25°C và pH 3,3 - 8,5.
- + *M. anisopliae* có khả năng phân giải tinh bột, cellulosa và chitin (lông và da côn trùng).

- Nấm châu chấu *Entomophaga grylli*

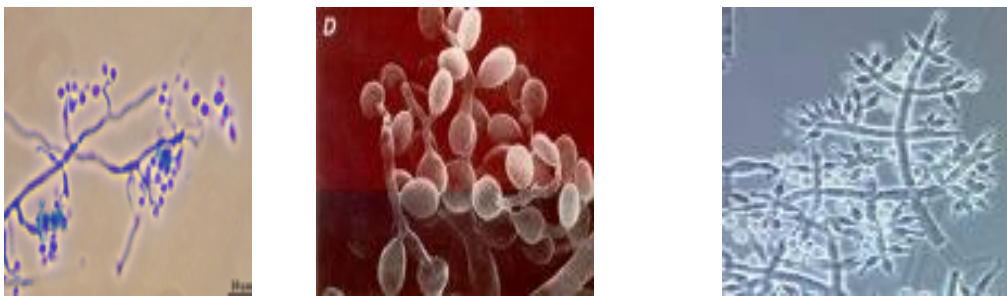
Nấm *E. grylli* chuyên tính trên các loài châu chấu, có ý nghĩa thực tiễn rất lớn. Sau dịch do nấm này gây ra, quần thể châu chấu giảm đi 80 - 90%. Nó cũng có thể gây thành dịch lớn cho nhiều loài côn trùng cánh thẳng.

Trong quá trình phát triển của bệnh, nấm *E. grylli* phân huỷ toàn bộ các mô của cơ thể vật chủ. Sợi nấm xâm nhập vào tất cả các bộ phận, kể cả chân côn trùng, chỉ trừ trứng và buồng trứng là không bị nấm xâm nhập. Châu chấu bị bệnh thường bò lên phía ngọn cây cỏ bám chắc và chết ở đó với tư thế đầu hướng lên phía trên. Xác chết này tồn tại trên ngọn cỏ khá lâu. Sau khi côn trùng chết, trên bề mặt xác chết tạo thành bào tử. Châu chấu khỏe tụ tập quanh xác chết sau một đêm là bị nhiễm bào tử của nấm này. Nấm *E. grylli* khó nuôi cấy trên quy mô lớn, vì các loài nấm *Entomophaga* nói chung không nuôi cấy trên môi trường thức ăn nhân tạo, mà chỉ nuôi cấy qua vật chủ sống. Các bào tử của nấm này tồn tại lâu trong điều kiện tự nhiên.

- Nấm bạch cương *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana thuộc họ *Moilliales*. Nấm *Beauveria bassiana* sinh ra những bào tử đơn bào, không màu, hình cầu hoặc hình trứng, đường kính từ 1 – 4 μ m, sợi nấm có đường nằm ngang kích thước khoảng 3 – 5 μ m, phát triển mạnh trên môi trường nhân tạo hoặc trên cơ thể côn trùng, chúng mang nhiều giá sinh bào tử, phồng to ở phía dưới với 3 – 5 x 3 – 6 μ m. Các giá bào tử trần thường tạo thành các nhánh ở phần ngọn hoặc trực tiếp tạo thành nhánh của giá, phần ngọn của bào tử có dạng cuống hình dích đặc không đều. Trên cơ thể côn trùng, nấm có dạng phấn trắng, khi khô ngả màu vàng sữa. Nấm có khả năng sinh độc tố *beauvericin*, có bản chất depsipeptide vòng, rất độc đối với côn trùng.

Trên môi trường thạch đĩa hoặc thạch nghiêng, nấm *B.bassiana* phát triển sợi từ màu trắng sang màu kem có pha một ít màu đỏ, da cam đôi khi pha một ít màu lục, có thể tiết vào môi trường sắc tố màu vàng, màu đỏ nhạt. Sợi nấm xốp, có vách ngăn, bào tử cuống trần đứng riêng rẽ hoặc tụ thành đám, phân nhánh hoặc không phân nhánh. Trên cơ thể tằm và các côn trùng khác, sợi nấm mọc rất nhanh và bao phủ kín khắp cơ thể côn trùng, sợi nấm có dạng phấn trắng khi khô biến thành màu vàng sữa.



Hình 6.15. Hình dạng của *Beauveria bassiana*

+ Chu trình sống của nấm *Beauveria bassiana* chia làm hai giai đoạn chính: Giai đoạn thể sinh dưỡng, giai đoạn bào tử.

Giai đoạn sinh dưỡng nấm *Beauveria bassiana* có dạng sợi phân nhánh, có vách ngăn ngang, rất mảnh, màu trắng. Chúng phát triển trên cơ thể côn trùng thành hệ sợi nấm, phát triển rất nhanh, tạo thành khối xốp màu trắng, khi khô sợi nấm chuyển từ màu trắng sang màu trắng ngà đôi khi có pha ít màu đỏ, da cam.

Giai đoạn bào tử: Khi gặp điều kiện khắc nghiệt hay môi trường dinh dưỡng cạn kiệt nấm hình thành bào tử. Dạng bào tử trần, đơn bào, không màu, có dạng hình cầu hay hình trứng..

+ Cơ chế lây nhiễm độc của *Beauveria bassiana*:

- Xâm nhập vào cơ thể côn trùng không qua đường miệng mà qua tầng chitin, tại khớp nối giữa các đốt của côn trùng.

- Chúng thường xâm nhập vào cơ thể côn trùng khi côn trùng đó đang ở giai đoạn ấu trùng và không có tác động qua lại với các vi sinh vật khác.

- Nấm sinh trưởng rất nhanh khi nhiễm vào cơ thể côn trùng. Dạng bào tử có thể tồn tại lâu dài trong tự nhiên mà hoạt tính diệt côn trùng không thay đổi.

- Có tính đặc hiệu cao đối với một số loài côn trùng nhất định.

Trong tự nhiên khi bào tử nấm *Beauveria bassiana* rơi vào cơ thể côn trùng, gặp điều kiện thích hợp chỉ sau 12 – 24 giờ thì bào tử nấm nảy chồi. Sợi nấm đâm xuyên vào cơ thể côn trùng. Nấm cũng tiết ra các enzyme như protease, chitinase và lipase để giúp cho quá trình phân hủy da côn trùng, đồng thời tiết độc tố như beaverin, dextruxin để hạ gục nhanh chóng côn trùng. Với các chủng không sinh độc tố, côn trùng cũng bị diệt do sợi nấm phát triển rất mạnh và dày đặc bên trong cơ thể, phá hủy các nội quan. Sợi nấm tiếp tục phát triển cho đến khi toàn bộ nội quan bị phá hủy, sau đó chui ra, mọc kín bề mặt côn trùng, rồi hình thành bào tử. Bào tử tiếp tục xâm nhập vào cơ thể côn trùng khác và tiếp tục chu trình sống, cứ như vậy nấm sẽ gây bệnh từ côn trùng này qua côn trùng khác và phát triển thành dịch làm côn trùng chết hàng loạt.



Hình 6.16. Sự xâm nhiễm của *Beauveria* lên côn trùng

*** Quy trình sản xuất thuốc trừ sâu vi sinh từ nấm *Beauveria bassiana***

- Nhân giống: giống từ môi trường thạch nghiêng được chuyển vào bình tam giác 250ml, nuôi lắc trong khoảng thời gian 24 giờ ở điều kiện nhiệt độ 25 – 28°C.

- Lên men: Cấy 2 – 10% giống vào nồi lên men. Môi trường lên men giống như môi trường nhân giống, bao gồm 2% nấm men chăn nuôi, 1% tinh bột, 0,2% NaCl, 0,01% MgCl₂, 0,05% KCl, pH 5 – 5,6. Nuôi ở 25 – 28°C trong 3 – 4 ngày, vừa khuấy vừa thổi khí. Lượng khí thổi vào khoảng 2 – 2,5 lít không khí/1 lít môi trường/1 phút và kết hợp khuấy trộn 500 vòng/phút. Trong quá trình lên men, nếu thiếu vitamin sẽ làm giảm tốc độ sinh trưởng và khả năng hình thành đỉnh bào tử, nồng độ vitamin thường dùng là 10 – 15mg. Nếu thừa thì sẽ hình thành chủ yếu nội bào tử (gonidi) thay vì đỉnh bào tử (conidi). Cuối giai đoạn lên men một lượng lớn enzyme được tạo thành để thủy phân sợi nấm và thúc đẩy việc tạo thành nội bào tử. Lượng bào tử được hình thành thường đạt 0,3 – 1,3 x 10⁹/ml, trong đó 90 – 92% là đỉnh bào tử, không quá 3 – 5% là nội bào tử và hoàn toàn không còn sợi.

- Cho dịch nuôi vào máy ly tâm lạnh 3000vòng/phút trong vòng 40 phút và tách nước, thu bào tử dạng sệt có độ ẩm 70 – 80% và lượng bào tử 6 – 8 x 10⁹/g, sau đó được đưa đi phun sấy để làm khô.

- Sau khi ly tâm xong ta bổ sung với các chất phụ gia như caolin và chất bám dính. Cuối cùng đem đi đóng gói và bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ từ 5 – 10°C và kiểm tra chất lượng. Bào tử khô phải có dạng bột mịn, độ ẩm 10% chứa 8.10⁹ bào tử/ml

Beauverin cũng có thể được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt trong môi trường dịch thể, hoặc môi trường đặc, có hoặc không khử trùng, có hoặc không khuấy trộn và thổi khí.

*** Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm côn trùng**

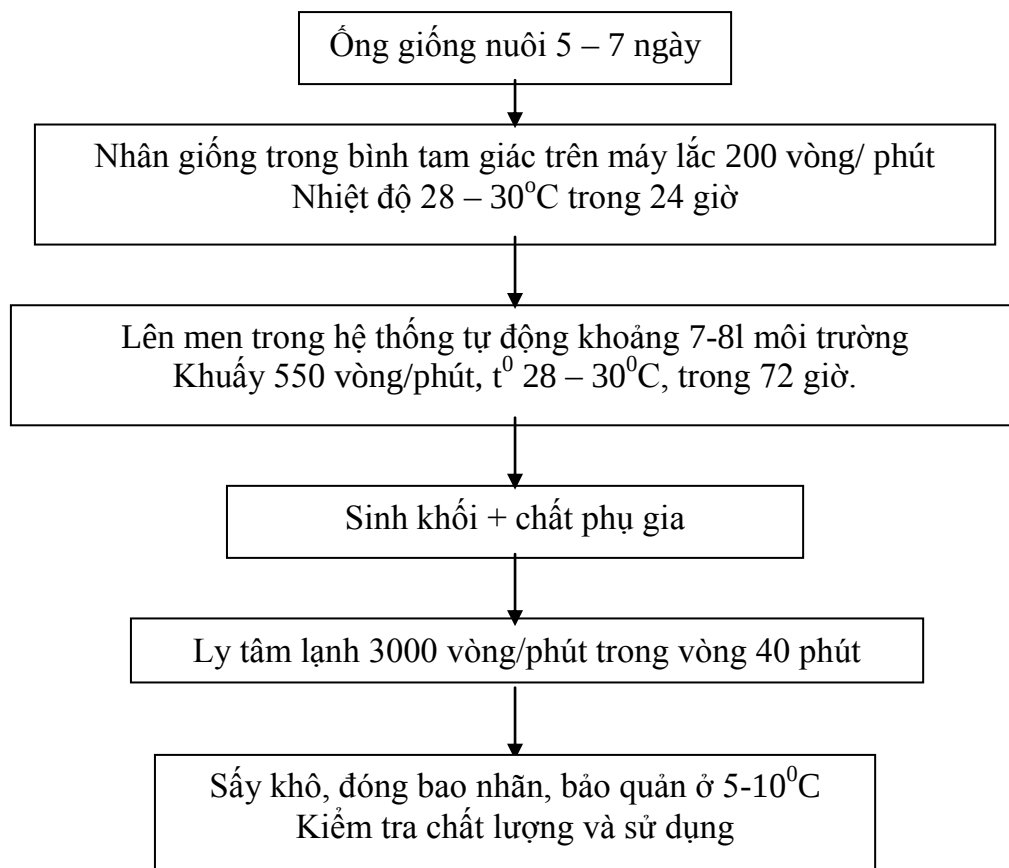
- Môi trường nuôi cấy: Là yếu tố quan trọng cho nấm sinh trưởng và phát triển, nếu môi trường không tốt nấm không phát triển hoặc chậm phát triển. Trong quá trình này nấm để hình thành bào tử nấm cần nguồn C, N. Môi trường thích hợp cho nấm phát triển là môi trường có chứa chitin và glucose.

- Nhiệt độ và độ ẩm: Quyết định sự phát triển của nấm, nhiệt độ thích hợp 25 – 30°C, độ ẩm là 80 – 90%.

- Ánh sáng: Nấm côn trùng phát triển tốt trong điều kiện ánh sáng yếu, chỉ cần một lượng ánh sáng nhỏ trong ngày với thời gian 6 – 8 giờ. Tuy nhiên phòng nuôi nấm cần tránh ánh sáng mặt trời để hạn chế tia tử ngoại.

- Độ thoáng khí: Hầu hết các loại nấm côn trùng thuộc loại hiếu khí, trong quá trình nuôi cần cung cấp lượng oxygen thích hợp cho sự phát triển của nấm.

- pH môi trường: pH thích hợp cho nấm phát triển là 5 – 6.



Hình 6.17. Quy trình lên men chìm chế phẩm *Beauverin bassiana*

5.2.3. Thuốc trừ sâu vi sinh sản xuất từ virus *Baculovirus* (NPV)

Virus gây bệnh côn trùng là một nhóm vi sinh vật có nhiều triển vọng trong công tác phòng chống côn trùng hại cây trồng. Virus có kích thước nhỏ chỉ có khả năng sống, phát triển ở trong các mô, tế bào sống mà không thể nuôi cấy trên các môi trường dinh dưỡng nhân tạo. Virus gây bệnh côn trùng có đặc điểm nổi bật khác với các nhóm virus khác là: khả năng chuyên tính rất hẹp, chỉ gây bệnh ở những mô nhất định của vật chủ. Virus côn trùng có vỏ protein (vỏ capsid) bao bọc phần lõi là nucleic acid virus tạo nên các thể vùi đa diện hay dạng hạt. Tuy vậy, không phải tất cả

virus gây bệnh côn trùng đều tạo thành thể vùi. Vì vậy, người ta chia virus gây bệnh côn trùng thành hai nhóm lớn, đó là:

- Virus tạo thành thể vùi bao gồm virus đa diện ở nhân (NPV - Nuclear polyhedrosis virus), virus đa diện ở dịch tế bào (CPV - Cytoplasm polyhedrosis virus), virus hạt (GV - Granulovirus), virus thuộc nhóm *Entomopoxvirus* (EPV).

- Virus không tạo thành thể vùi như *Iridovirus*, *Densovirus*.

Hiện nay người ta đã mô tả được hơn 700 bệnh virus trên 800 loài côn trùng. Các virus gây bệnh côn trùng được xếp thành 7 họ sau: *Baculoviridae*, *Reoviridae*, *Iridoviridae*, *Parvoviridae*, *Picaviridae*, *Poxviridae* và *Rhabdoviridae*. Hai họ *Baculoviridae* và *Reoviridae* có nhiều loài là những tác nhân rất triển vọng trong việc phát triển biện pháp sinh học trừ sâu hại.

Họ *Baculoviridae*: rất nhiều loài virus gây bệnh côn trùng đã phát hiện được thuộc họ này. Khoảng hơn 500/700 virus gây bệnh cho côn trùng đã biết hiện nay là thuộc họ *Baculoviridae*, trong đó quan trọng là những loài virus đa diện ở nhân và virus hạt. Nhiều loài đã được nghiên cứu sử dụng để trừ sâu hại.

Họ *Reoviridae* với điển hình là các virus đa diện ở dịch tế bào.

*** Các nhóm virus chính gây bệnh côn trùng**

- Nhóm virus đa diện nhân (NPV)

Nhóm NPV gồm những virus gây bệnh côn trùng thuộc họ *Baculoviridae*, có thể vùi là hình khối đa diện và chúng ký sinh trong nhân tế bào vật chủ. Thể vùi của NPV ở tằm gồm 17 loại amino acid. Trong thể vùi chứa nhiều hạt virus (virion) hình que.

NPV chứa nhiều hạt virus (virion) trong mỗi thể vùi đa diện nhân, chia làm 2 nhóm SNPV (single nuclear polyhedrovirus) là chỉ có 1 nucleocapsid trong mỗi hạt virus; MNPV (multiple nuclear polyhedrovirus) là có nhiều nucleocapsid trong mỗi hạt virus.

Sâu bị bệnh do NPV trở nên ít hoạt động, ngừng ăn; cơ thể chúng có màu sắc sáng hơn sâu khỏe; căng phồng, trương phù, chứa toàn nước. Khi có tác động cơ giới lên bề mặt cơ thể dễ dàng bị phá vỡ và giải phóng dịch virus. Các sâu bị chết bệnh do NPV đều bị treo ngược trên cây. Nếu sâu bị chết do NPV ở tế bào thành ruột thì phần đầu lại bám chặt vào các bộ phận của cây.

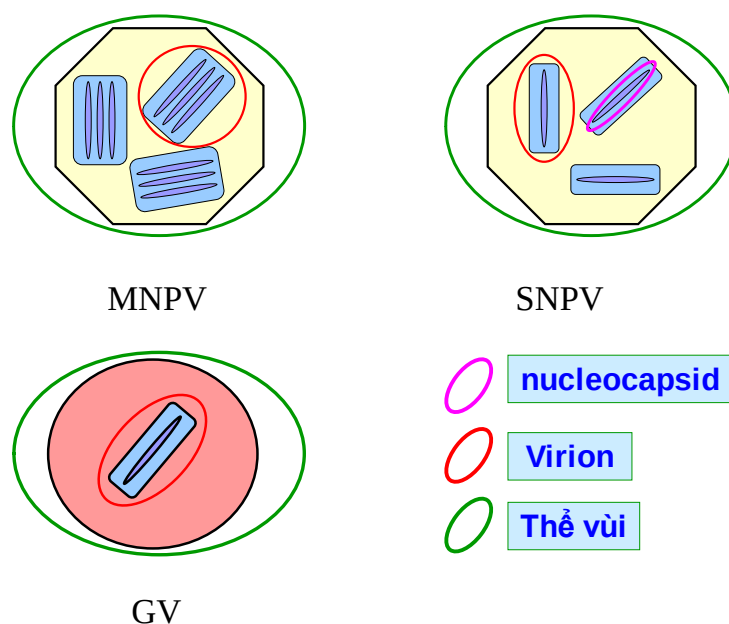
NPV có tính chuyên hóa cao đứng thứ 2 sau GV. Thường NPV của loài côn trùng nào thì gây bệnh cho loài đó. Riêng NPV của sâu xanh *Baculovirus heliothis* thì có thể gây bệnh cho 7 loài sâu xanh *Heliothis* trên thế giới. Một số NPV khác có thể gây bệnh cho 2 hoặc vài loài côn trùng. Các virus NPV thường ký sinh trong tế bào hạ bì, thể mỡ, khí quản, dịch huyết tương và biểu mô ruột giữa. NPV có thể gây bệnh cho côn trùng thuộc 7 bộ: cánh cứng, hai cánh, cánh màng, cánh vẩy, cánh mạch, cánh thẳng và cánh nửa.

- Nhóm virus hạt (GV)

GV virus thuộc họ *Baculoviridae*, có thể vùi dạng hạt. Mỗi thể vùi chỉ chứa có một virion, hiếm khi chứa hai virion. Virion của virus hạt cũng có dạng que.

Sâu bị bệnh do GV thường còi, chậm lớn, cơ thể phân đốt rất rõ ràng, tăng biểu bì cơ thể trở nên sáng màu, đôi khi có phát màu hồng, huyết tương có màu trắng sữa. Virus hạt có tính chuyên hóa cao nhất trong các virus gây bệnh côn trùng. Virus hạt gây bệnh cho sâu xám mùa đông *Agrotis segetum* mà không gây bệnh cho các loài sâu xám khác gần gũi với sâu xám mùa đông. Virus hạt chỉ gây bệnh cho côn trùng thuộc

bộ cánh vảy. Chưa thấy côn trùng thuộc bộ khác bị bệnh do GV. Virus hạt thường xâm nhiễm mô mỡ, lớp hạ bì và huyết tương. Người ta đã nghiên cứu được siêu cấu trúc của GV ở 9 loài côn trùng.



Hình 6.18 . Mô hình cấu tạo của NPV và GV

- Nhóm virus đa diện ở dịch tế bào (CPV)

Virus đa diện ở dịch tế bào thuộc họ *Reoviridae* ký sinh trong chất dịch tế bào ở các tế bào biểu mô ruột giữa của côn trùng. Virus CPV cũng tạo thành thể vùi. Trong thể vùi của CPV chứa các virion hình cầu gồm 2 sợi RNA. Sâu bị nhiễm CPV sẽ chậm lớn, đôi khi đầu quá to so với cơ thể. Ở giai đoạn cuối của sự phát triển bệnh lý, màu sắc cơ thể sâu có màu sáng giống như phấn trắng, đặc biệt là ở mặt bụng cơ thể. Nếu sâu non bị nhiễm CPV thì đến pha trưởng thành sẽ bị chết với tỷ lệ khá cao. Côn trùng bị nhiễm CPV thường tạo thành khối u.

Bệnh do CPV được phát hiện ở côn trùng thuộc 5 bộ: cánh cứng, hai cánh, cánh màng, cánh vảy, cánh mạch. Virus CPV có phổ ký chủ rộng, sự lan truyền của bệnh tăng lên còn nhờ qua nhiều ký chủ khác loài. Các mẫu CPV phân lập từ các ký chủ khác nhau thì có tính độc khác nhau. Người ta đã nghiên cứu được siêu cấu trúc của CPV ở 12 loài côn trùng. Nhóm CPV ít được sử dụng trong biện pháp sinh học hơn so với NPV và GV.

Độc tố của virus côn trùng: Là các thể vùi tùy từng loại sâu mà các thể vùi có khác nhau, cụ thể là với sâu có virus đa diện nhân (NPV) thì các thể vùi là PIB. Những loại sâu GV thì thể vùi của nó là OB (Occlusion Body)

* **Đặc điểm của virus *Baculovirus***

- Nhóm *Baculovirus*: Thuộc họ *Baculoviridae*, có dạng hình que, hình gậy, kích thước 40 – 70 x 250 – 400nm. Các virus tập hợp lại trong một thể có dạng đa diện, có kích thước khác nhau từ các nhóm nhỏ. Virus có một protein nằm trong lõi DNA được bao bọc bởi 1 lớp vỏ lipoprotein trong đó có các virion. Các virion này được bao quanh bởi 1 tinh thể protein lưới mắt cáo các nhà khoa học gọi là thể vùi Polyhedrosis Inclustion Body (PIB).

Đặc điểm cấu trúc và hệ gen của nhóm virus côn trùng *Baculovirus*: *Baculovirus* chứa DNA kép, khép kín. Kích thước hệ gen từ 80 – 180 kb. Người ta đã tìm thấy 120 – 160 khung đọc trên trình tự giải mã bộ gen của virus. Trên hệ gen, ngoài các trình tự mã hóa còn có nhiều trình tự ngắn lặp lại (gọi là các vùng tương đồng) trải khắp hệ gen. Những vùng này giúp tăng cường khả năng phiên mã sớm của gen, đồng thời hoạt động như những vùng khởi đầu phiên mã. Nhiều gen trong hệ gen của *Baculovirus* có gen gối nhau cho phép mã hoá được nhiều gen trong khi chúng có hệ gen với kích thước nhỏ.

- Nhóm *Baculovirus* bao gồm 4 loại như sau:

+ Virus đa diện nhân: Là virus đa diện nhân có hình đa giác bên trong chứa nhiều hạt virion hay gọi là các thể vùi PIB, loại virus này có thể lây bệnh rất mạnh với nhiều loại côn trùng thuộc bộ cánh vẩy *Lepidoptera* tập trung ở 2 họ chủ yếu ngài đêm *Noctuidae*, ngài sáng *Pyrilidae*.

+ Virus hạt: Là virus dạng hạt có hình ovan, hình elip, loại virus này chỉ xâm nhập chủ yếu vào tế bào hạ bì của mô mỡ và huyết tương, có khả năng diệt sâu cao.

+ Virus có thể protein khác nhau bên trong có chứa các virion cũng khác nhau có khả năng diệt sâu hại nhưng tỉ lệ thấp hơn GV

+ Virus không tạo thể vùi: Có khả năng diệt sâu nhưng tỉ lệ rất thấp.

- Chu trình sống và cơ chế lây nhiễm gây độc của *Baculovirus*

+ Chu trình sống:

Baculovirus có hình que điển hình, có đường kính 30 – 60nm, dài 250 - 300nm. Trong quá trình sống của chúng tập hợp lại trong một thể bọc có dạng đa diện, có kích thước khác nhau tùy các nhóm nhỏ. Dạng thể bọc này được quan sát rõ dưới kính hiển vi quang học.

Các thể bọc của virus được tạo ra trong giai đoạn muộn trong chu kỳ lây nhiễm của virus và được gói bọc trong lớp giàu protein, giúp cho virus lây nhiễm sang các vật chủ mới và cho phép chúng chống lại điều kiện ngoài tự nhiên, do đó có thể tồn tại trong thời gian dài ngoài cơ thể vật chủ. Ngoài dạng tồn tại này, *Baculovirus* còn có một dạng hình thái nữa, được thấy khi virus đã lây nhiễm vào cơ thể côn trùng, hoặc nuôi dưỡng trong môi trường dinh dưỡng thích hợp. Dạng này được gọi là virus nảy chồi, chỉ mang duy nhất một nucleocapsid và được bao bọc là màng tế bào chất của vật chủ. Chính những protein có mặt trên lớp vỏ này như protein GP64 đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong việc giúp virus lây nhiễm trên tế bào vật chủ.

+ Cơ chế lây nhiễm gây độc:

Khi bị bệnh virus, sâu non thường hoạt động yếu giảm ăn, cơ thể bị biến màu. Sau 2 – 3 ngày các đốt chân và thân căng phồng mọng nước cơ thể có màu trắng đục, da sâu mỏng dần và dễ bị vỡ sau 3 – 5 ngày thì dịch trắng chảy ra. Ở ngoài ruộng sâu bị chết nhũn và treo ngược lên cành cây, đầu chúc xuống dưới, người ta thường gọi sâu chết do virus là sâu bị bệnh thối nhũn.

Khi sâu non ăn thức ăn vào ruột có chứa virus lẫn trong thức ăn cũng như vi khuẩn Bt bằng con đường tiêu hoá virus xâm nhiễm vào cơ thể côn trùng đã thực hiện một quá trình phá hủy toàn bộ chức năng trong dịch ruột của sâu.

Cơ chế gây bệnh được mô tả như sau: Khi virus đi vào ruột của côn trùng các thể vùi của PIB của virus sẽ giải phóng ra virion, dưới tác dụng của dịch tiêu hoá qua biểu bì mô ruột giữa các virion xâm nhập vào dịch huyết tương, chúng tiếp xúc với các tế

bào máu và xâm nhập vào bên trong cơ thể để thực hiện 1 chu trình gây bệnh lên côn trùng, quá trình này trải qua 3 giai đoạn:

- Giai đoạn tiềm ẩn: Thường kéo dài từ 6 – 12 giờ, đây là giai đoạn các thể vùi PIB xâm nhập vào trong tế bào, các virion được phóng thích ra và tự đính vào các vị trí thích hợp trên màng nhân của tế bào thành ruột côn trùng.

- Giai đoạn tăng trưởng: Kéo dài 16 – 48 giờ, đây là giai đoạn tăng nhanh của virus trong tế bào vật chủ, xuất hiện quá trình tổng hợp protein và các nucleic acid virus, dưới sự điều khiển của nucleic acid virus để hình thành những cấu trúc giống như dạng lưới. Sau 32 giờ thì trong nhân tế bào vật chủ chứa các nucleic acid virus dạng trần.

- Giai đoạn cuối: đây là giai đoạn tạo thành các hạt virus do sự lắp ráp phần lõi nucleic acid virus với phần vỏ capsid protein để tạo thành các virion. Các virion này hoàn thiện dần và tạo các hạt virus hoàn chỉnh. Virus hoàn thiện được giải phóng ra khỏi tế bào bằng cách phá hủy màng tế bào trên nhiều vị trí và nhanh chóng giải phóng các hạt virus làm cho tế bào ký chủ nhanh chóng bị tiêu diệt, một số loài khác sẽ giải phóng từ từ khỏi tế bào chủ.

Thời kỳ ủ bệnh của sâu thường kéo dài từ 3 – 7 ngày phụ thuộc vào tuổi sâu, điều kiện nhiệt độ, ẩm độ, lượng thức ăn.

*** Sự lây truyền nguồn bệnh virus ở côn trùng**

- Lây truyền ngang: Nguồn bệnh lây lan giữa các cá thể trong cùng một thế hệ trong điều kiện bệnh phát thành dịch, nguồn virus có thể bám bên ngoài vỏ trứng của vật chủ. Khi nở, ấu trùng gặm vỏ trứng chui ra và bị nhiễm nguồn bệnh.

- + Lây truyền dọc: Là sự truyền nguồn bệnh qua trứng (qua phôi). Không chỉ có virus NPV, GV mới truyền qua trứng, mà cả virus không tạo thành thể vùi (*Iridoviridae*) cũng có thể truyền qua trứng.

Ngoài ra trong một số trường hợp virus có thể xâm nhiễm trực tiếp vào dịch máu qua các vết thương trên cơ thể (qua vết chọc đẻ trứng của ong ký sinh, lỗ xâm nhiễm của một số ấu trùng ký sinh vào bên trong vật chủ).

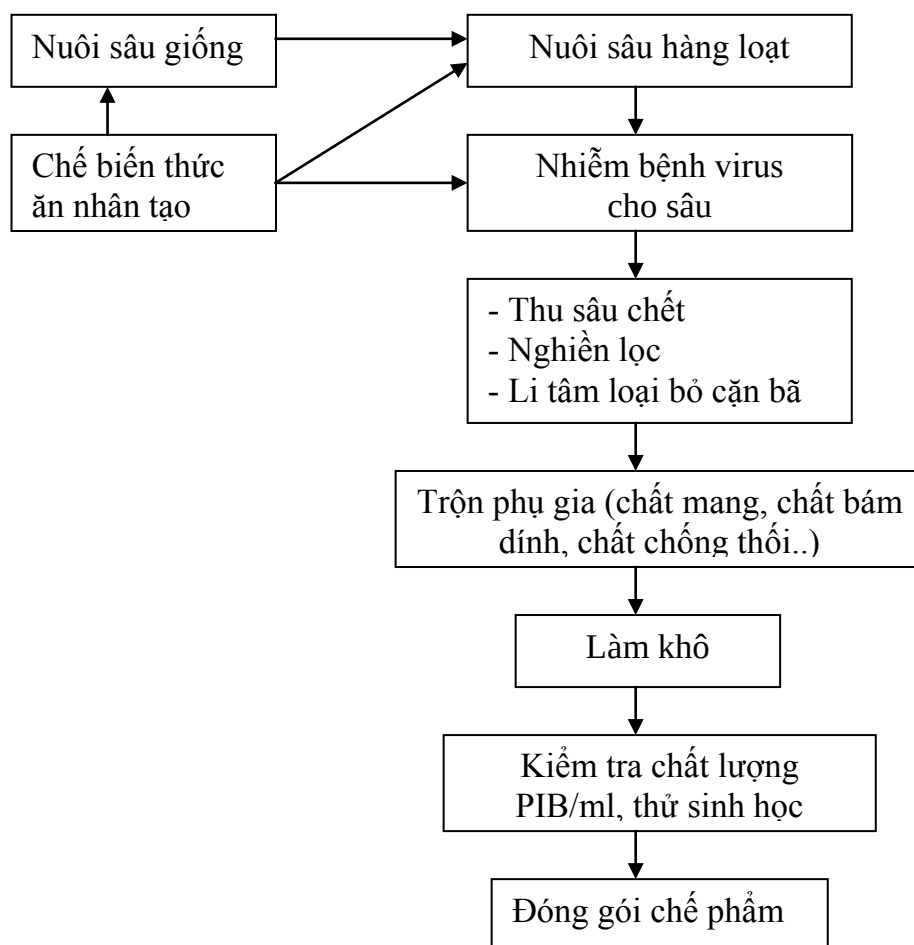
Trong quần thể tự nhiên của côn trùng thường quan sát thấy sự nhiễm bệnh hỗn hợp của 2 loài virus trở lên như nhiễm hỗn hợp giữa NPV và GV trên sâu xám mùa đông hoặc NPV với CPV. Tác động qua lại giữa các virus trong sự nhiễm bệnh hỗn hợp biểu hiện 3 kiểu: đồng tác động, tác động không phụ thuộc vào nhau và tác động gây nhiễu cho nhau. Khi có hiện tượng đồng tác động của virus trong cùng một vật chủ sẽ làm tăng tỷ lệ chết của vật chủ, rút ngắn thời gian để gây chết 50% số lượng vật chủ. Điều này rất có ý nghĩa trong biện pháp sinh học. Hiện tượng tác động nhiễu làm giảm hiệu lực gây bệnh của virus và hiệu quả sử dụng virus trừ sâu hại trong trường hợp này rất thấp. Vì vậy, khi sản xuất chế phẩm virus cần loại trừ những virus có tác động nhiễu. Chế phẩm NPV không được dùng khi trong quần thể tự nhiên có bệnh virus do CPV, vì giữa 2 nhóm này thường có tác động nhiễu.

Các thể vùi của virus có thể bảo vệ các virion chống lại các tác động của môi trường. Đây là điều kiện để virus có thể vùi tồn tại lâu trong nhiều năm ở ngoài tự nhiên. Thí dụ, thể vùi của NPV gây bệnh tằm nghệ không hòa tan trong cồn, acetone và các dung môi hữu cơ khác, không thối trong thời gian bảo quản lâu dài.

Thể vùi đa diện của virus gây bệnh cho ong xẻ hại cây vân sam *Picea* có thể bảo tồn sức sống trong xác chết khô của vật chủ ở điều kiện 4 – 5 °C trong 10 năm. Có

những thể vùi có thể tồn tại trên lớp đất canh tác khoảng 5 năm, một số trường hợp tới 25 năm.

*** Quy trình sản xuất chế phẩm virus trừ sâu**



Hình 6.19. Quy trình sản xuất chế phẩm NPV dạng bột

- Quá trình nuôi sâu giông trải qua 2 bước sau:

Bước 1: ghép cặp bướm mới vũ hóa ra 1 – 2 ngày khoảng 15 – 20 con đực + 15 – 20 con cái trong 1 lồng, tùy theo kích thước của lồng mà có thể cho nhiều hơn, trong lồng phải có cây để làm nơi cho bướm đậu. Phải đảm bảo điều kiện như ở ngoài tự nhiên và nuôi thức ăn cho bướm là dung dịch đường 3% (đường ăn: sacharose). Sau khi giao phối 1 – 2 ngày thì mới thu trứng, thu trứng để riêng từng ngày và thu trong 35 ngày rồi loại.

Bước 2: để riêng trứng từng ngày vào trong điều kiện (tủ định ôn) rồi theo dõi để trứng nở ra sâu. Nuôi sâu non mới nở bằng thức ăn nhân tạo ngay từ đầu, riêng sâu xanh bông ở tuổi nhỏ 1 – 2 thì nuôi tập thể, tuổi 3 phải tách ra để tránh cắn lẫn nhau, khi sâu tuổi 4 có thể nhiễm virus hoặc nuôi tiếp thành nhộng. Quá trình nuôi sâu non phải chú ý nhất khâu vệ sinh phải đảm bảo thức ăn tươi mới trong điều kiện thích hợp, chú ý thu từng đợt, người ta lại tiếp tục chu trình mới như bước 1, trung bình vòng đời của sâu trong 30 – 35 ngày. Tùy điều kiện trong quá trình nuôi phải cải tiến phương pháp để tránh tạp nhiễm nhằm đạt hiệu suất cao, làm cho sâu không có hiện tượng còi cọc.

- Sau khi nuôi sâu giống xong ta tiến hành lây nhiễm virus như sau:

Tiến hành nuôi sâu giống đến một giai đoạn phát triển nhất định thường là giai đoạn ấu trùng thì ta bắt đầu cấy dịch huyền phù virus vào thức ăn của sâu nhằm lây nhiễm cho sâu.

Lây nhiễm NPV cho sâu: Pha dịch virus 1 lượng nhất định sau đó trộn vào thức ăn nhân tạo cho sâu ăn, sau đó đem sâu đã nhiễm đi vào nuôi trong vài ngày và theo dõi thấy sâu chết thì thu lại. Thu hàng ngày, để riêng.

- Sau khi lây nhiễm virus ta tiến hành nuôi sâu trong khoảng từ 7 – 9 ngày và theo dõi thấy sâu chết thì thu lại. Thu hàng ngày, để riêng vào lọ tối.

- Quá trình nghiền và ly tâm:

Sau khi đưa lọ virus đã được ủ bệnh ra dùng nước cất để nghiền lọc bỏ bã. Thu dịch virus NPV đưa vào máy ly tâm ở tốc độ thấp 500-1000 vòng/ phút, ly tâm trong 5 phút, thu phần dịch ở phía trên. Sau đó lại tiếp tục ly tâm ở tốc độ cao 5000 vòng/ phút trong 15-20 phút. Người ta chỉ thu phần dưới. Sau khi ly tâm xong chúng ta thêm các chất phụ gia và sấy nhẹ (nếu ở dạng bột) ở 35°C cho đến khi khô.

- Quá trình phối chế:

+ Dịch thể: trước khi tạo thuốc trừ sâu phải kiểm tra và đếm số lượng thể vùi. Thêm chất phụ gia, bả dính (Casein), chống thối, chống tia tử ngoại. Đóng chai màu tối để bảo quản và sử dụng.

+ Dạng bột: đem sấy phun, đông khô, phối chế để tạo ra thuốc dạng bột đòi hỏi điều kiện hàm ẩm trong chế phẩm 7-10 %.

Thuốc dạng bột bảo quản lâu hơn so với dạng lỏng.

- Quá trình kiểm tra chất lượng và đóng gói:

+ Đối với dạng dịch thể: chúng ta phải kiểm tra lại các chỉ số như độ đục, pH, hoạt tính,...

+ Đối với dạng bột: chúng ta kiểm tra lại độ ẩm, hoạt tính...

+ Tính ổn định của thuốc trừ sâu virus: được thông qua một số chỉ tiêu

* Một số chế phẩm NPV

- Chế phẩm virus NPV sâu xanh: Sản xuất theo quy trình công nghệ trên được thử nghiệm và áp dụng trên đồng ruộng trừ sâu xanh trên bông và thuốc lá ở Sơn La, Hà Nội, Đồng Nai, Sông Bé, Ninh Thuận, v.v... đều cho kết quả phòng trừ tốt và bảo vệ được năng suất cây trồng. Chế phẩm virus sâu xanh cùng với ong mắt đỏ là những tác nhân sinh học quan trọng trong hệ thống phòng trừ tổng hợp (PTTH) sâu hại bông. Chế phẩm có giá thành cao và người nông dân chưa quen sử dụng nên phạm vi áp dụng còn hạn chế.

- Chế phẩm virus NPV sâu đo xanh đay: Cho đến nay chưa tìm được môi trường thức ăn nhân tạo nuôi sâu này. Do đó, để có sâu vật chủ nhân virus phải nuôi bằng thức ăn tự nhiên. Vì vậy, chế phẩm virus sâu đo đay được sản xuất bằng phương pháp thủ công như sau: dùng nguồn NPV của sâu đo đay phun lên đồng đay nơi có nhiều sâu, thu gom sâu chết bệnh lại để nghiền lọc lấy dịch virus. Sau đó lại đem phun lên đồng đay. Cứ như vậy có thể tạo ra chế phẩm virus tại chỗ để trừ sâu đo đay. Việc sản xuất và sử dụng chế phẩm virus sâu đo đay tại chỗ là một biện pháp có triển vọng vì rẻ tiền, có hiệu quả kinh tế nên người nông dân vùng trồng đay có thể chấp nhận được.

- Chế phẩm virus NPV sâu róm thông: Chế phẩm virus phòng trừ sâu róm thông cũng bằng phương pháp thủ công như sản xuất chế phẩm virus sâu đo xanh đay. Hiệu quả diệt sâu róm thông của chế phẩm virus đạt 55,2 – 83,3%. Sử dụng chế phẩm virus sâu róm thông đã hạn chế sử dụng thuốc hóa học và tỷ lệ ký sinh tự nhiên của một số ong ký sinh sâu róm thông tăng lên.

Ngoài các chế phẩm kể trên còn có chế phẩm virus NPV sâu keo da láng cũng được sản xuất theo phương pháp thủ công. Chế phẩm này được sử dụng rộng rãi ở Ninh Thuận, Lâm Đồng mang lại hiệu quả kinh tế xã hội cao.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Hãy nêu các ưu điểm của việc sử dụng phân vi sinh.
2. Hãy phân biệt các dạng phân hữu cơ sinh học.
3. Hãy kể tên các nhóm vi sinh vật tham gia vào quá trình sản xuất phân vi sinh vật.
4. Nêu các ưu, nhược điểm của thuốc trừ sâu vi sinh vật.
5. So sánh các đặc điểm của quá trình sản xuất các chế phẩm thuốc trừ sâu từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, nấm *Beauveria bassiana*, virus *Baculovirus*
6. Hãy phân tích và so sánh các quá trình lây nhiễm độc tố của các tác nhân vi sinh vật cho côn trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (1997), *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục.
2. Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn (2000), *Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học*, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
3. PGS. TS. Lê Gia Hy (chủ biên) – PGS. TS. Khuất Hữu Thanh (2010), *Cơ sở công nghệ vi sinh vật và ứng dụng*, NXB Giáo dục Việt Nam.
4. Nguyễn Đức Lượng (2002), *Công nghệ vi sinh tập 1, 2*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh.
5. Lê Văn Nhung (chủ biên) – Nguyễn Văn Cách (chủ biên) cùng cộng sự (2010), *Cơ sở Công nghệ sinh học -Tập 4 – Công nghệ vi sinh*, NXB Giáo dục Việt Nam.
6. Lương Đức Phẩm (1998), *Công nghệ vi sinh vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Lương Đức Phẩm, Vũ Kim Dũng (1980), *Vi sinh vật lương thực và thực phẩm*, Nhà xuất bản Bộ lương thực - thực phẩm.
8. Lê Xuân Phương (2001), *Vi sinh vật công nghiệp*, Đại học Đà Nẵng.
9. Trần Minh Tâm (2000), *Công nghệ vi sinh ứng dụng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
11. Trần Thị Thanh (2000), *Công nghệ vi sinh*, Nhà xuất bản Giáo dục.
12. PGS. TS. Nguyễn Xuân Thành (2003), *Giáo trình Công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
13. PGS. TS. Phạm Thị Thùy (2010), *Giáo trình Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
14. GS. TS. Phạm Văn Ty, TS. Vũ Nguyên Thành (2006), *Công nghệ sinh học tập 5 – Công nghệ vi sinh vật và môi trường*, Nhà xuất bản Giáo dục.
15. Alexander N. Glazer and Hiroshi Nikaido(2004), *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*, Second Edition, Cambridge University Press.
16. Michael T. Madigan, John M. Martiko, Jack Parker (2000), *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall.
17. Robert W. Bauman (2004), *Microbiology*, Benjamin Cummings.
18. I. EdWard Alcamo (1991), *Fundamentals of microbiology*, Third Edition The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc.

19. Smith, C.A. Wood, E. J. (1991), *Molecular biology and biotechnology*, First Edition Avon: Chapman Hall limited.