

PGS. TS. LÊ GIA HY (*Chủ biên*)

PGS. TS. KHUẤT HỮU THANH

cơ sở

CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT VÀ ỨNG DỤNG

DÙNG CHO SINH VIÊN CÁC TRƯỜNG ĐẠI HỌC, CAO ĐẲNG
CÓ LIÊN QUAN ĐẾN SINH HỌC, Y HỌC, NÔNG NGHIỆP



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

PGS.TS. LÊ GIA HY (Chủ biên) – PGS.TS. KHUẤT HỮU THANH

CƠ SỞ
**CÔNG NGHỆ VI SINH
VẬT VÀ ỨNG DỤNG**

(Dùng cho sinh viên các trường Đại học, Cao đẳng có liên quan đến sinh học, y học, nông nghiệp)

(Tái bản lần thứ nhất)



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

Lời nói đầu

Công nghệ vi sinh vật được hiểu là công nghệ lên men, là một phần không thể thiếu của công nghệ sinh học, bởi chính công nghệ vi sinh vật góp phần quan trọng đưa các thành quả của công nghệ sinh học vào sản xuất công nghiệp.

Hiểu các quá trình công nghệ vi sinh vật, các ứng dụng của vi sinh vật trong thực tiễn sản xuất là nhiệm vụ chính của các cán bộ nghiên cứu phát triển công nghệ sinh học.

Cuốn “Cơ sở công nghệ vi sinh vật và ứng dụng” này gồm hai phần:

Phần thứ nhất : Nguyên lý cơ bản của công nghệ vi sinh vật.

Phần thứ hai : Các ứng dụng công nghệ vi sinh vật trong sản xuất các sản phẩm ứng dụng trong các ngành công nghiệp chế biến thực phẩm, nông nghiệp, thuỷ sản, y dược, bảo vệ môi trường, phát triển nguồn năng lượng sinh học mới...

Tuy nhiên, mỗi lĩnh vực áp dụng cần có các phần chuyên sâu hơn, do đó trong cuốn sách này chủ yếu đề cập các nguyên lý chung và một số ví dụ cụ thể để làm rõ các nguyên lý đó.

Ngoài những kiến thức cơ bản về công nghệ vi sinh vật, cuốn sách còn cập nhật một số các thành tựu mới hiện nay của công nghệ vi sinh vật.

Phần cuối mỗi chương có các câu hỏi ôn tập và đáp án các câu hỏi ở phần cuối của cuốn sách nhằm giúp người học tự kiểm tra và hệ thống lại các kiến thức đã đọc.

Cuốn sách sẽ là tài liệu tham khảo bổ ích cho sinh viên học các ngành có liên quan đến Sinh học, Y học, Nông nghiệp và nó cũng rất cần cho những cán bộ nghiên cứu, sản xuất có liên quan đến công nghệ vi sinh và ứng dụng của công nghệ vi sinh vật.

Tuy nhiên, việc biên soạn chưa thật đầy đủ, chắc chắn còn nhiều thiếu sót, rất mong sự đóng góp ý kiến của độc giả để cuốn sách được bổ sung hoàn thiện hơn.

*Hà Nội, tháng 11 năm 2009
Các tác giả*

Phần thứ nhất

NGUYÊN LÝ CƠ BẢN CỦA CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

Chương 1

NHẬP MÔN CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

1.1. CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT LÀ GÌ?

Thuật ngữ "Công nghệ sinh học" xuất hiện vào những năm 1970 dùng để mô tả các quá trình công nghệ, nghiên cứu các cơ thể sống và các sản phẩm của chúng, mà công việc cụ thể là thiết kế, điều khiển các nồi lên men, phát hiện và tinh sạch các sản phẩm. Phần lớn các nhà khoa học cho rằng, tất cả các quá trình sử dụng cơ thể sống thiết lập lên công nghệ sinh học.

Các định nghĩa về công nghệ sinh học rất khác so với "khoa học sinh học ứng dụng" chỉ đơn giản nhằm đến việc "nghiên cứu khoa học mang tính thực hành và hướng đến công nghiệp (Crafts-Lighty, 1983).

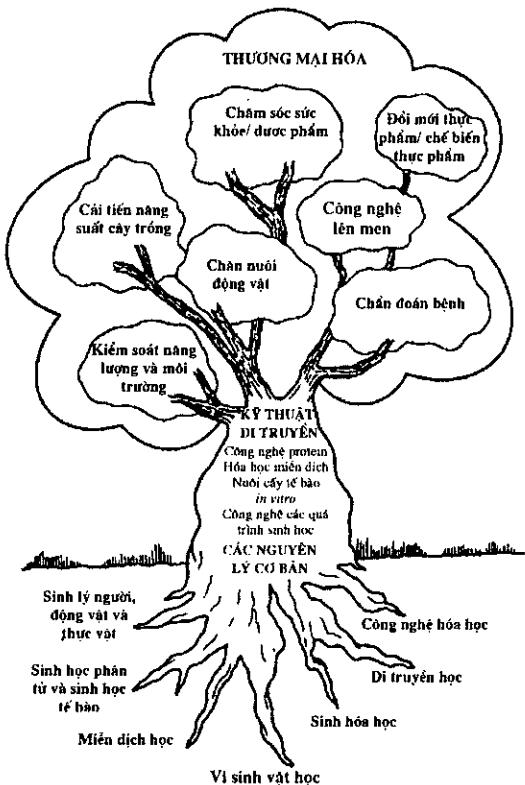
Kết quả của sự tranh luận về công nghệ sinh học đã có ít nhất 10 định nghĩa về công nghệ sinh học khác nhau, mỗi định nghĩa theo những bối cảnh riêng. Những định nghĩa được sử dụng rộng rãi hơn cả là:

– "ứng dụng các cơ thể, hệ thống hoặc quá trình sinh học nhằm sản xuất và dịch vụ công nghiệp" (HMSO, 1980).

– "ứng dụng các nguyên lý khoa học và kỹ thuật để chuyển hoá nguyên vật liệu nhờ các tác nhân sinh học để cung cấp hàng hoá và dịch vụ" (Bull et al., 1982). Các tác nhân ở đây bao gồm các hợp chất sinh học như enzym, cũng như toàn bộ tế bào hay các cơ thể đa bào.

– "sử dụng phối hợp sinh hoá, vi sinh vật và kỹ nghệ hoá học nhằm khai thác nguyên vật liệu thực vật và các tài nguyên di truyền để sản xuất các sản phẩm và dịch vụ đặc thù" (Mantell, 1989).

Nhiều định nghĩa thật sự không chính xác về bản chất của cơ thể và các tác nhân được sử dụng trong công nghệ sinh học. Điều đó được lập luận là tại sao hệ thống trang trại trồng cây và chăn nuôi để cung cấp thực phẩm và sản xuất nhiên liệu lại không đưa vào định nghĩa này.



Hình 1.1. Mô hình cây công nghệ sinh học

nấm men sản xuất bia và làm bánh hoặc giới thiệu các đặc tính mới để tăng năng suất cho cây trồng, đấu tranh sinh học chống dịch hại cho cây và đưa ra các phương pháp mới phòng chống bệnh cho cây trồng, cho người và động vật. Bất kỳ định nghĩa công nghệ sinh học nào cũng đề cập đến việc sản xuất thực nghiệm các cơ thể mới, là một trong các mục tiêu quan trọng của công nghệ sinh học.

Nói một cách đơn giản hơn, công nghệ sinh học có nghĩa là sử dụng các cơ thể hoặc các sản phẩm của chúng ở mức độ công nghiệp. Công nghệ sinh học hiện nay là lĩnh vực khoa học hầu như bao gồm các mặt khoa học, công nghệ và thương mại của mọi lĩnh vực hoạt động của con người từ sản xuất nông nghiệp đến bảo vệ môi trường. Do vậy, công nghệ sinh học là gì? Theo định nghĩa của Liên đoàn châu Âu và Công nghệ sinh học (năm 1981) thì “Công nghệ sinh học được coi là một tập hợp các ngành sinh hoá học, vi sinh vật học, tế bào học, di truyền học với mục tiêu đạt tới sự ứng dụng công nghệ các vi sinh vật, các mô, các tế bào nuôi và các cấu phần của tế bào”.

Các quy trình lên men thực phẩm như làm bánh mỳ, rượu vang, phomat, bơ,... đã có từ xa xưa cách đây 6000 năm và được phát triển trước khi con người hiểu biết về sự tồn tại của các vi sinh vật thực hiện quá trình đó, cũng được hiểu là công nghệ sinh học – công nghệ sinh học truyền thống. Triển vọng của “công nghệ sinh học hiện đại” có tác động rất có ý nghĩa lên “công nghệ sinh học truyền thống” cũng như kỹ thuật di truyền đã cải biến

Để hiểu rõ khái niệm này, người ta thể hiện trên mô hình cây công nghệ sinh học (hình 1.1). Trong ba thành phần trung tâm của công nghệ sinh học thì vi sinh vật học chính là nền tảng cho sự phát triển của công nghệ sinh học.

Công nghệ sinh học là một lĩnh vực rộng lớn. Nếu sắp xếp theo đối tượng sinh học, công nghệ sinh học được chia thành các ngành:

1– Công nghệ sinh học 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 (công nghệ lên men).

2– Công nghệ tế bào (tế bào động vật và thực vật) 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. Công nghệ chủ yếu của công nghệ tế bào là kỹ thuật nuôi cấy mô.

3– 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.

Công nghệ sinh học vi sinh vật học trở thành nền tảng cho sự phát triển của công nghệ sinh học theo 3 giai đoạn:

Giai đoạn 1. Công nghệ sinh học truyền thống là các quá trình dân dã nhằm chế biến, bảo quản các loại thực phẩm, xử lý đất đai, phân bón để phục vụ nông nghiệp,....

Giai đoạn 2. Công nghệ sinh học cận đại là quá trình sử dụng các nòi lén men công nghiệp để sản xuất ở quy mô lớn các sản phẩm sinh học như mỳ chính, axit amin, axit hữu cơ, dung môi hữu cơ, chất kháng sinh, một số vitamin (như vitamin B₂, B₁₂, C,...), nhiều loại enzym,...

Giai đoạn 3. Công nghệ sinh học hiện đại chia ra các lĩnh vực như: Công nghệ di truyền (genetic engineering), công nghệ tế bào (cell engineering), công nghệ enzym và protein (enzym/protein engineering), công nghệ vi sinh vật/ công nghệ lên men (microbial engineering/ fermentation), công nghệ môi trường (environmental engineering). Công nghệ sinh học hiện đại thường gắn liền với các cơ thể mang gen tái tổ hợp (recombination gen).

Như vậy, công nghệ sinh học vi sinh vật là ngành công nghệ nhằm khai thác tốt nhất khả năng kỳ diệu của vi sinh vật. Vi sinh vật được coi là nhà máy cực kỳ nhỏ và cực kỳ tinh vi, mà nhiệm vụ của công nghệ vi sinh vật là tạo ra các điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất. Chính vì vậy, trước đây, ngoài ngành vi sinh vật học đại cương, người ta còn phát triển thành ngành vi sinh vật công nghiệp. Chỉ từ khi công nghệ sinh học hình thành thì người ta cũng coi đây là ngành công nghệ vi sinh vật,

mà điều kiện thuận lợi để cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất chính là điều kiện nuôi cấy vi sinh vật. Về bản chất của công nghệ sinh học vi sinh vật chính là công nghệ lên men.

1.2. CÔNG NGHỆ LÊN MEN

1.2.1. Nguyên lý cơ bản

Công nghệ lên men là công nghệ lâu đời nhất trong tất cả các quá trình công nghệ sinh học. Theo tiếng Latin, động từ *fevere*, có nghĩa là sự sôi xuất hiện trong nước chiết quả hoặc malt nghiên dưới tác động của nấm men trong quá trình sản xuất rượu.

Lên men là quá trình chuyển hoá hoá học nhờ các cơ thể sống hoặc sản phẩm của chúng, thường sinh khí và sinh nhiệt thể sống hoặc sản phẩm của chúng. Các nhà vi sinh vật xem sự lên men như là “bất kỳ quá trình sản xuất một sản phẩm bằng cách nuôi cấy một lượng lớn vi sinh vật”, còn các nhà sinh hoá học xem sự lên men như là một quá trình sinh năng lượng trong một hợp chất hữu cơ của cả chất nhường và nhận điện tử; vì thế lên men là quá trình kỹ khí mà ở đó năng lượng được sản sinh không có sự tham gia của oxy hoặc chất nhận điện tử vô cơ.

Trong công nghệ sinh học, khái niệm công nghệ lên men được sử dụng theo nghĩa rộng, nghĩa là không chỉ sử dụng các vi sinh vật lên men (fermentative microorganisms) trong điều kiện kỹ khí tạo ra các sản phẩm lên men truyền thống, mà sử dụng cả các vi sinh vật hiếu khí, các tế bào động vật và thực vật lên men trong các nồi lên men và nồi phản ứng sinh học có sục khí để sinh tổng hợp các sản phẩm mong muốn.

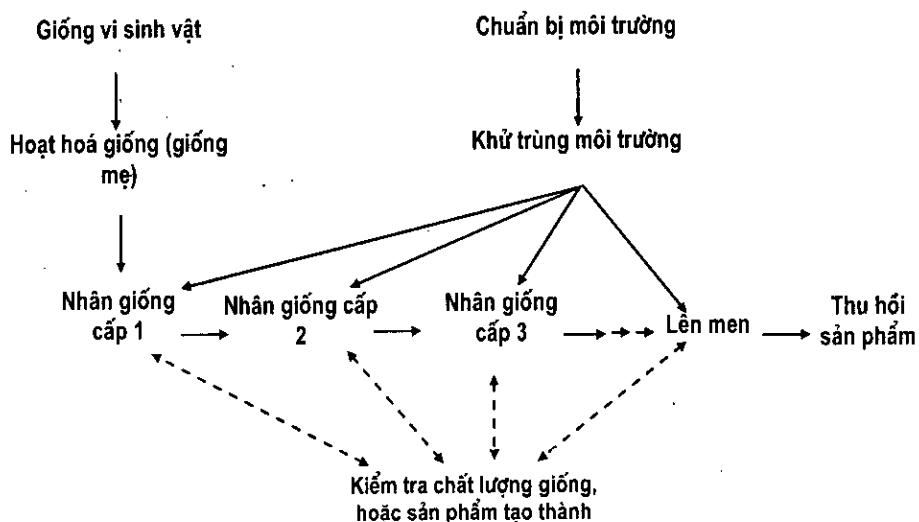
Như trên đã đề cập, công nghệ sinh học vi sinh vật là ngành công nghệ nhằm khai thác tốt nhất khả năng kỳ diệu của vi sinh vật, tạo ra điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật hoạt động với hiệu suất cao nhất. Trước hết chúng ta xem xét các nguyên tắc cơ bản của nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp.

Quy trình lên men cơ bản trong công nghiệp thường được tiến hành theo các giai đoạn sau đây: Giống vi sinh vật → Hoạt hoá trên máy lắc (giống mẹ) → Nhân giống (cấp 1, cấp 2,...) → Lên men → Thu hồi sản phẩm như sơ đồ tóm tắt trên hình 1.2.

Để hiểu rõ quy trình lên men nói chung, chúng ta cần tìm hiểu các khâu chính trong quy trình.

1.2.2. Chủng giống vi sinh vật

Trong công nghệ lên men, ngoài điều kiện cần có một quy trình công nghệ hợp lý, thì vấn đề chất lượng giống là khâu quan trọng, quyết định hiệu quả kinh tế của quy trình sản xuất. Trong lên men công nghiệp, nhiều loài thuộc hệ thống phân loại vi sinh vật sau đây được sử dụng trong quá trình lên men như các cơ thể nhân sơ đơn bào: Vi khuẩn, vi khuẩn lam; các cơ thể nhân chuẩn đơn bào như nấm men, vi tảo; các cơ thể đa bào như nấm sợi và tảo.



Hình 1.2. Sơ đồ quy trình lên men công nghiệp

Quần thể các cơ thể động vật đơn bào và nhỏ rất hân hữu tham gia vào quá trình lên men, nhưng các tế bào được tách ra từ động vật đa bào lại thường xuyên được nuôi cấy để sản xuất các sản phẩm sử dụng trong phòng chống bệnh hoặc các hợp chất có hoạt tính sinh học.

1.2.3. Sinh trưởng của vi sinh vật

a) Yêu cầu của nuôi cấy nhân tạo

Sinh trưởng của cơ thể vi sinh vật liên quan đến quá trình lên men dựa vào nhu cầu năng lượng phức tạp của từng loại vi sinh vật. Tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật phụ thuộc vào nhiều điều kiện nuôi cấy để nó có thể cung cấp năng lượng cần thiết cho hàng loạt quá trình phản ứng. Việc sản xuất một chất đặc hiệu đòi hỏi điều kiện nuôi cấy đặc biệt với tốc độ sinh trưởng cụ thể. Hiện nay, nhiều hệ thống lên men có thể tiến hành dưới sự kiểm soát của máy tính.

Nguồn dinh dưỡng chính cho lêmen công nghiệp được liệt kê trên bảng 1.1.

BẢNG 1.1. NGUỒN DINH DƯỠNG CHO LÊMEN CÔNG NGHIỆP

Dinh dưỡng	Nguyên liệu thô
Nguồn cacbon	
Glucozơ	Đường từ ngô, tinh bột, xylulozơ
Saccarozơ	Mía, rỉ đường
Lactozơ	Huyết thanh sữa
Chất béo	Dầu thực vật
Hydrocacbon	Phân tách dầu mỏ
Nguồn nitơ	
Protein	Bột đậu tương, nước ngâm ngô, dịch hém
Amoni	Amoni tinh khiết hay các muối amon
Nitrat	Các dạng muối nitrat
Nitơ	Không khí
Nguồn photpho	Các dạng muối photphat

Tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật và quá trình sinh tổng hợp nhiều hợp chất hoá học trong nuôi cấy nhân tạo đòi hỏi phải có các hợp chất hoá học đặc hiệu cho từng loại cơ thể sống như môi trường để chúng sinh trưởng (còn gọi là môi trường dinh dưỡng). Loại môi trường và nồng độ thành phần của chúng, pH, nhiệt độ, độ thuần khiết của cơ thể nuôi cấy,... cũng ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển (tổng lượng vật chất của tế bào hoặc cơ thể được nuôi cấy) và sự tổng hợp hàng loạt các hợp chất khác nhau của vi sinh vật.

b) Các pha sinh trưởng của vi sinh vật

Khi nuôi một chủng vi sinh vật trên một môi trường đã chọn, khả năng sinh trưởng không diễn ra ngay, mà cần một thời gian nhất định mới bắt đầu phát triển. Khoảng thời gian này là thời gian thích nghi, gọi là pha lag (ổn định). Tiếp theo pha ổn định, tốc độ sinh trưởng của giống tăng đều, khoảng thời gian này là pha log hay còn gọi là pha tăng tốc. Sau một khoảng thời gian nhất định, tốc độ sinh trưởng giảm dần do nồng độ các chất dinh dưỡng giảm và tích tụ các chất độc đối với vi sinh vật tăng. Trong pha này, tốc độ sinh trưởng giảm dần và chuyển sang pha ổn định hay còn gọi là trạng thái ổn định. Sinh khối trong môi trường nuôi cấy không thay đổi, cho đến khi các chất không cần thiết tích tụ trong tế bào làm cho tế bào bị dung giải.

Ngoài ra, do các vi sinh vật khác nhiễm vào môi trường, làm cho cấu tạo hoá học môi trường bị thay đổi, hoặc do các tế bào trong môi trường giống bị đột biến, cũng có thể gây nên sự lây nhiễm do phage (còn gọi là gây nhiễm nội sinh) gây nên hiện tượng giảm sinh khối.

1.2.4. Thiết bị lên men và thiết bị phản ứng sinh học

Thiết bị lên men (fermentor) dùng để thực hiện quá trình lên men. Thiết bị lên men trong phòng thí nghiệm có chứa từ 1 đến 3 lít, còn ở mức độ công nghiệp thiết bị lên men có dung tích đến hàng trăm lít hoặc hơn.

Thiết bị phản ứng sinh học (bioreactor) khác nồi lên men ở chỗ chỉ nuôi cấy khôi tế bào thực vật và động vật thay cho vi sinh vật. Các hợp chất hoá học được tổng hợp bằng các tế bào nuôi cấy này như các tác nhân chữa bệnh có thể tách chiết dễ dàng khỏi sinh khối tế bào.

Kỹ thuật thiết kế và các thông số thực hành của cả nồi lên men và nồi phản ứng sinh học giống nhau. Tuy nhiên, tuỳ thuộc vào loại vi sinh vật cũng như sản phẩm tạo thành thì hình thức và cấu tạo nồi lên men có những điểm khác nhau.

1.2.5. Thiết kế các quá trình lên men công nghiệp

Các quá trình lên men đòi hỏi các yêu cầu sau:

1) Giống thuần của một cơ thể đã chọn cả về chất lượng cũng như trạng thái sinh lý.

2) Phải vô trùng, cần quan tâm đến môi trường cho sinh trưởng của vi sinh vật.

3) Nồi nhân giống: Nồi trung gian để phát triển giống đáp ứng cho nồi lên men chính.

4) Nồi lên men: Cấp độ phòng thí nghiệm và cấp độ sản xuất lớn.

5) Thiết bị: (i) Lấy môi trường nuôi cấy ở trạng thái ổn định, (ii) Phân tách tế bào (sinh khối), (iii) Thu nhận dịch nuôi đã loại bỏ tế bào, (iv) Tinh sạch sản phẩm, và (v) Xử lý chất thải nước thải đầu ra.

Từ 1) đến 4) ở trên là quá trình lên men (upstream) và 5) là quá trình thu hồi (down-stream) của quy trình lên men sản xuất.

Nồi lên men hay nồi phản ứng sinh học được chế tạo với cánh khuấy và có cấp khí oxy trong quá trình hiếu khí, cánh khuấy luôn giữ cho nồng độ môi trường đồng nhất và hệ thống điều chỉnh nhiệt độ, kiểm tra pH và phương thức kiểm soát tương ứng.

1.2.6. Các hệ thống nuôi cấy

a) Nuôi cấy hay quá trình lên men theo mẻ (batch processing)

Kết thúc pha ổn định, thu nhận sinh khối (tế bào, cơ thể) hoặc các hợp chất mà nó tích lũy trong môi trường nuôi cấy (rượu, axit amin) và bắt đầu mẻ lên men mới. Ưu điểm của quá trình này là thu hồi sản phẩm đạt mức tối ưu. Nhược điểm là lãng phí môi trường không sử dụng hết, phải ngắt quãng thời gian giữa các mẻ.

b) Nuôi cấy liên tục (continuous processing)

Môi trường được bổ sung liên tục vào nồi lên men và lấy ra dịch đã lên men để thu nhận sản phẩm theo từng giai đoạn đã định trước. Nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường tĩnh, hàm lượng chất dinh dưỡng cạn kiệt dần, sản phẩm trao đổi chất tăng lên làm cho pha log chỉ kéo dài trong một thời gian ngắn, làm thay đổi tốc độ sinh trưởng riêng, hình thái và các đặc điểm sinh lý – sinh hoá của vi sinh vật, gây khó khăn cho quá trình công nghệ và sản xuất công nghiệp. Để tránh sự "già" của giống, giữ giống luôn ở cùng một trạng thái ở pha log, người ta dùng các môi trường đổi mới liên tục bằng cách liên tục đưa môi trường dinh dưỡng vào và đồng thời loại bỏ một lượng dịch huyền phù vi sinh vật ra. Đây là nguyên tắc cơ bản cho quá trình nuôi liên tục trong hệ thống các nồi lên men kiểu Chemostat và Turbidostat.

Như vậy, ta có thể điều chỉnh quá trình này ở Chemostat (đo mật độ huyền phù) hay ở Turbidostat (đo độ đục nhờ tế bào quang điện). Khi làm cho dòng môi trường chảy vào chậm, thì số lượng tế bào trong bình tăng lên và vì thế dẫn đến làm giảm tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật, giảm cho đến lúc đúng bằng tốc độ dòng môi trường vào bình (đúng hơn là hệ số pha loãng). Ngược lại, khi tăng tốc độ môi trường cho vào, số lượng tế bào giảm đi, vì vậy tốc độ sinh trưởng của chúng tăng lên một cách tương ứng.

Ưu điểm của nuôi cấy liên tục là làm cho tốc độ sinh trưởng riêng của vi sinh vật cao, thu được lượng sinh khối cao, nghiên cứu cụ thể được sự thay đổi cơ chất, sản xuất được các chất trao đổi với hoạt tính mong muốn, tiết kiệm do không có thời gian chết và tối ưu dễ dàng điều kiện nuôi cấy, bằng cách thêm chất dự trữ hay thay đổi các thông số hoạt động.

Nhược điểm khó tránh khỏi là sản xuất các chất trao đổi thứ cấp không luôn luôn được ổn định; dễ bị tạp nhiễm, tập hợp ngẫu nhiên vật thể lạ trên bề mặt tế bào, dẫn đến quá trình không đồng bộ và sau thời gian dài có thể dẫn đến biến mất tính trạng của giống nguyên thuỷ.

c) Nuôi cấy theo mẻ có bổ sung (fed-batch processing)

Trong hệ thống lên men theo mẻ có bổ sung, môi trường mới được bổ sung liên tục và theo giai đoạn vào bình nuôi nhưng không loại bỏ dịch nuôi cấy khỏi bình cho đến khi kết thúc quá trình lên men. Nói lên men được thiết kế với dung tích tăng hơn dung tích lên men ban đầu. Lên men theo mẻ có bổ sung chỉ thành công ở một số quá trình và sản phẩm được kiểm soát hợp lý.

Nuôi cấy theo mẻ có bổ sung có các ưu điểm sau:

- Giữ các điều kiện trong quá trình nuôi cấy có cấp khí vào nồi lên men.
- Loại bỏ sự kiềm chế của các thành phần môi trường như việc sử dụng quá nhanh nguồn cacbon, nitơ và photphat.
- Loại trừ được ảnh hưởng độc tính của các thành phần môi trường.
- Cung cấp có giới hạn các chất dinh dưỡng cho các chủng dinh dưỡng thụ động.

Sản xuất nấm men bánh mỳ phần lớn sử dụng nuôi cấy theo mẻ có bổ sung, ở đó sinh khối là sản phẩm mong muốn. Việc làm loãng dịch nuôi bằng môi trường mới nhằm ngăn cản chúng sản sinh etanol.

Sản xuất penixilin, một chất trao đổi thứ cấp, cũng bằng phương pháp theo mẻ có bổ sung, vì quá trình lên men penixilin là có hai pha, sau pha sinh trưởng là pha sản xuất. Việc nuôi cấy luôn được giữ ở mức độ sinh khối và axit phenyl axetic thấp và được bổ sung liên tục vào nồi lên men với tốc độ thấp, bởi vì tiền chất này gây độc cho chủng sản xuất ở nồng độ cao.

1.3. SẢN PHẨM CỦA CÁC QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Sự sinh trưởng của vi sinh vật và các tế bào khác tạo ra nhiều loại sản phẩm khác nhau, mỗi giống có thể được thực hiện nhờ một hay một vài quá trình lên men khác nhau dựa trên các điều kiện cần thiết và các loại sản phẩm tối ưu khác nhau. Như vậy, quá trình lên men dựa trên một hay nhiều cách sau đây: (a) Sản xuất sinh khối (tế bào) như nấm men; (b) Chiết xuất các sản phẩm trao đổi chất như axit amin, protein (cả enzym), vitamin, rượu,... để người và/hoặc động vật sử dụng hoặc sử dụng trong nông nghiệp như sản xuất phân bón cho cây trồng; (c) Cải biến các hợp chất hoá học (through qua chuyển hoá sinh học); (d) Sản xuất các sản phẩm tái tổ hợp; (e) Sản xuất nhiên liệu sinh học từ nguyên vật liệu thực vật,...

1.3.1. Sinh khối vi sinh vật

Sinh khối vi sinh vật được sản xuất mức độ thương mại như protein đơn bào (single cell protein-SCP) bằng các tảo đơn bào như loài Chlorella hoặc Spirulina phục vụ nhu cầu con người và động vật, hoặc tế bào nấm men sử dụng cho công nghiệp làm bánh. Sinh khối vi khuẩn và Fusarium graminearum sử dụng làm thức ăn bổ sung cho động vật.

1.3.2. Các chất trao đổi của vi sinh vật

a) Các chất trao đổi sơ cấp

Trong pha tăng tốc, vi sinh vật sản sinh hàng loạt các chất cần thiết cho sinh trưởng của chúng như các nucleotit, axit nucleic, axit amin, protein, cacbohydrat, lipit,... hoặc các sản phẩm phụ của quá trình trao đổi chất nhường năng lượng như etanol, axeton, butanol,... Đây được mô tả như là pha thích nghi (tropophase) và sản phẩm thường được gọi là các chất trao đổi sơ cấp. Một số sản phẩm thương mại được chỉ ra trên bảng 1.2.

BẢNG 1.2. MỘT SỐ CÁC CHẤT TRAO ĐỔI SƠ CẤP ĐƯỢC THƯƠNG MẠI HOÁ

Chất trao đổi sơ cấp	Cơ thể	Ý nghĩa ứng dụng
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Đồ uống có cồn
Axit xitic	<i>Aspergillus niger</i>	Công nghiệp thực phẩm
Axeton và butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Dung môi hữu cơ
Lyzin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Bổ sung dinh dưỡng
Axit glutamic	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Tăng hương vị
Riboflavin	<i>Ashbya gossipii</i> , <i>Eremothecium ashbyi</i>	Dinh dưỡng
Vitamin B12	<i>Pseudomonas denitrificans</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i>	Dinh dưỡng
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Công nghiệp và nông nghiệp
Xanthan gum	<i>Xanthomonas campestris</i>	Công nghiệp khai thác dầu mỏ

b) Các chất trao đổi thứ cấp

Các vi sinh vật sản sinh hàng loạt các sản phẩm khác chất trao đổi sơ cấp. Trong pha này, không có vai trò rõ ràng trong quá trình trao đổi chất của cơ thể vi sinh vật được sản sinh ra, pha này còn được gọi là pha tự phát (idiophase) và sản phẩm tạo ra được gọi là chất trao đổi thứ cấp.

Nhiều chất trao đổi thứ cấp được sinh ra từ các chất trung gian và sản cuối cùng của quá trình trao đổi chất sơ cấp. Một số sản phẩm như vậy của nhóm vi khuẩn Enterobacteriaceae không trải qua quá trình trao đổi thứ cấp. Một số chất trao đổi thứ cấp được liệt kê trên bảng 1.3.

BẢNG 1.3. MỘT SỐ CÁC CHẤT TRAO ĐỔI THỨ CẤP ĐÃ ĐƯỢC THƯƠNG MẠI HOÁ

Chất trao đổi thứ cấp	Vi sinh vật	Ý nghĩa ứng dụng
Penixilin	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Kháng sinh chống vi khuẩn Gram (+)
Erythromyxin	<i>Streptomyces erythreus</i>	Kháng sinh chống vi khuẩn Gram (-)
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Kháng sinh chống vi khuẩn Gram (-)
Xephalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Điều chế kháng sinh bán tổng hợp
Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvin</i>	Kháng sinh chống nấm
Xyclosporin A	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ngăn cản miễn dịch
Gibberellin	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Chất điều hoà sinh trưởng thực vật

Quá trình trao đổi chất thứ cấp có thể bị kiềm chế trong trường hợp nào đó. Glucozơ kiềm chế quá trình sản xuất các chất kháng sinh actinomycin, penixilin, neomyxin và streptomycin; photphat kiềm chế quá trình sản xuất streptomycin và tetracyclin. Do vậy, môi trường nuôi cấy để sản xuất các chất trao đổi thứ cấp cần phải được lựa chọn cẩn thận.

c) Sản xuất enzym

Sản xuất enzym ở mức độ công nghiệp cần thiết cho sản xuất thực phẩm và đồ uống. Enzym cũng được sử dụng trong chẩn đoán bệnh, phân tích công nghiệp và ngày nay còn được bổ sung vào bột giặt (xenlulaza, proteaza, lipaza). Enzym có thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy vi sinh vật, thực vật và động vật. Nhiều enzym thực vật và động vật có thể được sản xuất bằng

lên men vi sinh vật. Trong khi phần lớn enzym được sản sinh trong pha tiên phát, nhưng một số như amylaza (nhờ *Bacillus stearothermophilus*) được sinh ra trong pha tự phát (idiophase) và là chất trao đổi thứ cấp. Một số enzym tiêu biểu được sản xuất thông qua quá trình lên men được liệt kê trên bảng 1.4.

BẢNG 1.4. MỘT SỐ ENZYM ĐƯỢC SẢN XUẤT Ở MỨC ĐỘ CÔNG NGHIỆP

Vi sinh vật	Enzym
<i>Aspergillus oryzae</i>	Amylaza
<i>Aspergillus niger</i>	Glucoamylaza
<i>Trichoderma reesii</i>	Xenlulaza
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertaza
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactaza
<i>Saccharomyces lipolytica</i>	Lipaza
Các loài <i>Aspergillus</i>	Pectinaza và proteaza
Các loài <i>Bacillus</i>	Proteaza
<i>Mucor pusillus</i>	Rennet vi sinh vật
<i>Mucor meihei</i>	Rennet vi sinh vật

c) Các sản phẩm thực phẩm

Rất nhiều sản phẩm của công nghiệp thực phẩm như sữa chua, phomat, thịt lên men, bánh mỳ hay các loại bánh khác, đồ uống có cồn, dấm, rau quả muối chua, nước mắm,... được sản xuất thông qua quá trình lên men vi sinh vật. Hiệu quả của chủng vi sinh vật sử dụng và quá trình lên men liên tục được cải tiến nhằm đưa ra các sản phẩm có chất lượng được thị trường chấp nhận với giá cả hợp lý hơn.

d) Các sản phẩm tái tổ hợp

Công nghệ ADN tái tổ hợp đã chuyển gen từ bất kỳ cơ thể nào đó vào vi sinh vật khác và tạo ra cơ thể vi sinh vật chuyển gen và sau đó sản sinh các sản phẩm gen. Các *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, các nấm men và thậm chí cả nấm sợi cải biến gen hiện nay cũng đang được sử dụng để sản xuất interferon, insulin, albumin huyết thanh người và hàng loạt các sản phẩm khác.

e) Chuyển hoá sinh học

Việc sản xuất các hợp chất có cấu trúc tương tự từ một chất cụ thể nào đó trong quá trình lên men là sự chuyển hóa (còn gọi là chuyển hóa

sinh học). Một ví dụ cổ điển nhất của quá trình này là sản xuất axit axetic từ etanol.

Tế bào thực vật cố định cũng có thể sử dụng để chuyển hóa sinh học. Việc sử dụng alginat như là chất polyme làm chất cố định, digitoxin từ *Digitalis lanata* được chuyển hóa thành digoxin, một chất có tác dụng chữa bệnh với nhu cầu rất lớn. Tương tự như vậy, codeinon được chuyển hóa thành codein và tyrosin nhờ *Mucuna pruriens* và sau đó được chuyển hóa thành DOPA.

1.4. 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 genom của cơ thể đó. Thực tế đã chứng minh, dù thiết kế và chế tạo nồi 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.

1.4.1. Đột biến

Sự thay đổi genom bằng đột biến tự nhiên là rất thấp. Việc gây đột biến chủng giống vi sinh vật bằng tia UV, bức xạ ion hay hợp chất hoá học nào đó sẽ làm tăng đột biến. Đây cũng là nhiệm vụ to lớn của các nhà di truyền công nghiệp để sàng tuyển 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 của tế bào được kiểm soát bằng “ức chế bổ sung ngược” (feed-back inhibition). Khi một hợp chất đạt đến mức độ tích tụ cụ thể nào đó, quá trình tổng hợp chung sẽ dừng lại. Quá trình tổng hợp lai bắt đầu trở lại, khi mức độ của chất đó xuống dưới mức đặc hiệu. Nếu một thể đột biến không tạo tín hiệu ức chế bổ sung ngược thì sản phẩm tiếp tục được tổng hợp gọi là sự tổng hợp thừa hay là siêu tổng hợp. Bằng kỹ thuật như vậy, người ta đã tạo được chủng *Corynebacterium glutamicum* sản xuất lizin 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 (hay là dinh dưỡng thụ động).

1.4.2. 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 lizin

cao, nhưng lại bị giới hạn bằng khả năng hấp thụ glucozơ kém. Một chủng vi khuẩn khác có khả năng hấp thu glucozơ tuyệt vời nhưng không sản sinh lizin được sử dụng để phát triển thành chủng tái tổ hợp thông qua dung hợp tế bào trần (protoplast fusion). Chủng mới này vừa có khả năng sử dụng glucozơ cao, vừa có hiệu suất sinh tổng hợp lizin cao.

Gen tổng hợp phenylalanin được chuyển vào chủng *E. coli* đã lựa chọn, nó không phải là chủng sản xuất, nhưng là công cụ để thực nghiệm và phát triển các chủng sản xuất có năng suất cao.

Việc biến đổi di truyền tạo chủng *Cephalosporium acremonium* sản sinh xephalosporin C cao nhờ plasmid mang gen REXH đã nâng cao hiệu suất của chủng sản xuất.

Hàng loạt các protein người như insulin, hormon kích thích sinh trưởng, các nhân tố sinh trưởng xương, alpha, beta và gamma interferon, interleukin-2, các tác nhân gây chết tế bào ung thư, các chất hoạt hoá plasminogen của mô, tác nhân đông máu VIII, tác nhân kích thích sinh trưởng mô biểu bì, tác nhân kích thích bạch cầu hạt, erythropoietin,... đang được sản xuất thông qua các vi sinh vật tái tổ hợp.

1.4.3. Kỹ thuật ADN

Công nghệ ADN in vitro đã được sử dụng để số lượng các bản sao các gen của các con đường trao đổi chất (operon), ví dụ như sản xuất treonin ở *E. coli*, với tốc độ tăng từ 40–50 lần cao hơn bình thường (chi tiết xem chương 3).

Công nghệ vi sinh vật (công nghệ lên men) là một lĩnh vực của công nghệ sinh học đang phát triển nhanh và mạnh mẽ, hấp dẫn ở chỗ không những làm tăng các quy trình công nghệ mà đa dạng hóa các sản phẩm lên men. Với lịch sử phát triển lâu dài hơn bất kỳ lĩnh vực nào của khoa học sinh học, công nghệ lên men có tương lai lâu dài và sáng lạn hơn trong việc phục vụ con người, nhất là các lĩnh vực quan trọng như thực phẩm và y học.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 1

1. Công nghệ sinh học vi sinh vật học trở thành nền tảng cho sự phát triển của công nghệ sinh học, người ta chia thành mấy giai đoạn phát triển và tên các giai đoạn?
2. Khái niệm công nghệ sinh học khác với sinh học ứng dụng trước đây ở điểm nào ?

3. Các quy trình lên men thực phẩm như làm bánh mỳ, rượu vang, phomat, bơ ... đã có từ xa xưa được hiểu là công nghệ lên men gì đúng nhất?
4. Khả năng sinh trưởng của vi sinh vật trong môi trường ổn định trong hệ thống lên men tĩnh thường diễn ra mấypha?
5. Trong lên men, ngoài các cơ thể vi sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn đơn bào và đa bào, người ta còn sử dụng các loại nào để sản xuất các sản phẩm công nghệ sinh học?
6. Các sản phẩm của quá trình lên men là các chất kháng sinh, chúng là chất trao đổi sơ cấp hay thứ cấp?
7. Axit glutamic (mỳ chính) là sản phẩm của quá trình lên men, là chất trao đổi sơ cấp hay thứ cấp?
8. Định nghĩa nào là định nghĩa công nghệ sinh học được cho là đúng nhất?
9. Các công nghệ: Công nghệ tế bào, công nghệ hoá sinh, công nghệ lên men và công nghệ gen, công nghệ nào thực chất là công nghệ vi sinh vật?
10. Các ngành khoa học: Sinh hoá học, vi sinh vật học, di truyền học và tế bào học, ngành nào là nền tảng của công nghệ vi sinh vật (công nghệ lên men)?
11. Theo các nhà vi sinh vật học, lên men được định nghĩa như thế nào là đúng nhất?
12. Trong công nghệ sinh học, khái niệm công nghệ lên men được sử dụng cho các quá trình nào là đúng nhất?
13. Quá trình lên men theo phương pháp nuôi cấy theo mẻ có bổ sung so với các kiểu lên men khác, thì loại trừ được các yếu tố nào ảnh hưởng đến quá trình lên men?
14. Các sản phẩm: Nucleotit, axit amin, chất kháng sinh và protein, loại nào quá trình lên men không phải là chất trao đổi sơ cấp?
15. Các sản phẩm nào sau đây: Penicillin, etanol, lizin và axit xitic của quá trình lên men là chất trao đổi thứ cấp?

Chương 2

TUYÊN CHỌN VÀ BẢO QUẢN GIỐNG SẢN XUẤT TRONG CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

2.1. TIÊU CHUẨN CỦA CHỦNG GIỐNG TRONG CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

2.1.1. Chủng giống vi sinh vật

Trong công nghệ lên men, ngoài điều kiện cần có một quy trình công nghệ hợp lý, thì vấn đề chất lượng giống là khâu quan trọng, quyết định hiệu quả kinh tế của quy trình sản xuất. Trong lên men công nghiệp, người ta sử dụng các vi sinh vật thuộc nhóm cơ thể nhân sơ (nhân nguyên thuỷ) như vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam,... và nhóm cơ thể nhân thật như nấm men, nấm sợi, tảo,...

Vi sinh vật sống khắp mọi nơi trên Trái Đất, ngay cả nơi mà điều kiện sống tưởng chừng hết sức khắc nghiệt vẫn thấy có sự phát triển của vi sinh vật (ở đáy đại dương, ở nhiệt độ 85– 90°C, ở môi trường có pH = 10–11, trong dung dịch bão hòa muối, đồng hoá dầu mỏ, phenol, khí thiên nhiên,...).

Trong 1g đất lấy ở tầng canh tác thường có khoảng 1 – 22 tỷ vi khuẩn; 0,5 – 14 triệu xạ khuẩn; 3 – 50 triệu vi nấm; 10 – 30 nghìn vi tảo,... Trong 1 m³ không khí phía trên chuồng gia súc thường có 1 – 2 triệu vi sinh vật, trên đường phố có khoảng 5.000, nhưng trên mặt biển chỉ có khoảng 1 – 2 vi sinh vật mà thôi.

Vi sinh vật sống trong đất và trong nước tham gia tích cực vào quá trình phân giải các chất hữu cơ, biến chúng thành CO₂ và các hợp chất vô cơ khác dùng làm thức ăn cho cây trồng. Các vi sinh vật cố định nitơ thực hiện việc biến khí nitơ (N₂) trong không khí thành hợp chất nitơ (NH₄⁺) cung cấp cho cây cối. Vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất khó tan chứa P, K, S và tạo ra các vòng tuần hoàn trong tự nhiên. Vi sinh vật còn tham gia vào quá trình hình thành chất mùn.

Vi sinh vật tham gia tích cực vào việc phân giải các phế phẩm nông nghiệp, phế thải đô thị, phế thải công nghiệp cho nên có vai trò quan trọng

trong việc bảo vệ môi trường. Các vi sinh vật gây bệnh thì lại tham gia vào việc làm ô nhiễm môi trường ở nơi có điều kiện vệ sinh kém.

Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong lĩnh vực năng lượng (sinh khói hoá thạch như dầu hoả, khí đốt, than đá). Trong các nguồn năng lượng mà con người hy vọng sẽ khai thác mạnh mẽ trong tương lai có năng lượng thu từ sinh khối, khối lượng chất sống của sinh vật.

Vi sinh vật là lực lượng sản xuất trực tiếp của ngành công nghiệp lên men, bởi chúng có thể sản sinh ra rất nhiều sản phẩm trao đổi chất khác nhau. Nhiều sản phẩm đã được sản xuất công nghiệp (các loại axit, enzym, rượu, các chất kháng sinh, các axit amin, các vitamin,...).

Hiện nay người ta đã thực hiện thành công công nghệ di truyền ở vi sinh vật. Đó là việc chủ động chuyển một gen hay một nhóm gen từ một vi sinh vật hay từ một tế bào của các sinh vật bậc cao sang một tế bào vi sinh vật khác. Vi sinh vật mang gen tái tổ hợp nhiều khi mang lại những lợi ích to lớn bởi có thể sản sinh ở quy mô công nghiệp những sản phẩm trước đây chưa hề được tạo thành bởi vi sinh vật.

Trong công nghiệp tuyển khoáng, nhiều chủng vi sinh vật đã được sử dụng để hòa tan các kim loại quý từ các quặng nghèo hoặc từ các bãi chứa xỉ quặng.

Vi sinh vật có hại thường gây bệnh cho người, cho gia súc, gia cầm, tôm, cá và cây trồng. Chúng làm hư hao hoặc biến chất lương thực, thực phẩm, vật liệu, hàng hoá. Chúng sản sinh các độc tố, trong đó có những độc tố hết sức nguy hiểm. Chỉ riêng sự tấn công của virut HIV cũng đủ gây ra ở cuối thế kỷ XX khoảng 30 – 50 triệu người nhiễm HIV.

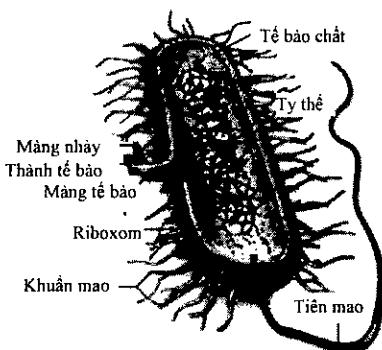
2.1.2. Đặc điểm và cấu tạo tế bào các vi sinh vật nhân sơ (nhân nguyên thuỷ)

Vi sinh vật nhân nguyên thuỷ bao gồm: Vi khuẩn thật (Eubacteria) và cổ khuẩn (Archaea). Trong vi khuẩn thật gồm rất nhiều nhóm khác nhau, chủ yếu là vi khuẩn (Bacteria), xạ khuẩn (Actinomycetes), vi khuẩn lam (Cyanobacteria) và nhóm vi khuẩn nguyên thuỷ (Micoplasma, Rickettsia và Chlamydia).

a) Vi khuẩn

Vi khuẩn có nhiều hình thái, kích thước và sắp xếp khác nhau. Đường kính của phần lớn vi khuẩn thay đổi trong khoảng $0,2 - 2,0\mu\text{m}$, chiều dài cơ thể khoảng $2,0 - 8,0\mu\text{m}$. Những hình dạng chủ yếu của vi khuẩn là hình cầu,

hình que, hình dấu phẩy, hình xoắn, hình ống, hình sợi,... Vi khuẩn hình cầu (cầu khuẩn – coccus) tùy theo hướng của mặt phẳng phân cắt và cách liên kết được chia thành: Song cầu khuẩn (Diplococcus), liên cầu khuẩn (Streptococcus), tứ cầu khuẩn (Graffkya), tụ cầu khuẩn (Staphylococcus). Ở vi khuẩn hình que – trực khuẩn (Bacillus), Bacterium có thể gấp dạng đơn, dạng đôi, dạng chuỗi,... Ở vi khuẩn hình xoắn có dạng hình dấu phẩy: phẩy khuẩn (Vibrio), hình xoắn thưa (Xoắn khuẩn – Spirillum), hình xoắn khít (Xoắn thể – Spirochaetes). Ngoài ra, còn có thể gấp các hình dạng khác của vi khuẩn (hình khối vuông, khối tam giác, khối hình sao,...). Chi *Beggiatoa* và *Saprositria* có tế bào nối dài dạng sợi, chi *Caryophanon* có tế bào hình đĩa xếp lồng vào nhau như một xâu các đồng xu.

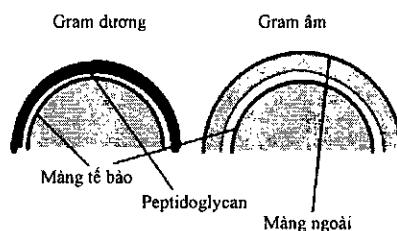


Hình 2.1. Cấu tạo của vi khuẩn



Hình 2.2. Ảnh kính hiển vi điện tử của *E. coli*

Tiên mao (hay lông roi) là những sợi lông dài, uốn khúc, mọc ở mặt ngoài của một số vi khuẩn có tác dụng giúp các vi khuẩn này có thể chuyển động trong môi trường lỏng.



Hình 2.3. Sự khác nhau về cấu tạo thành và màng tế bào giữa vi khuẩn Gram dương và Gram âm

Vi khuẩn di động trong môi trường lỏng theo kiểu nào phụ thuộc vào nhiều lý do khác nhau, nhiều khi hoàn toàn là ngẫu nhiên. Cũng không ít trường hợp là do tìm đến hay tránh khỏi một số yếu tố nào đó, ví dụ như tìm

đến nguồn thức ăn, tìm tới chỗ có ánh sáng, tránh chỗ có hoá chất độc hại. Vi khuẩn Gram âm thường có khuẩn mao, giúp vi khuẩn bám vào giá thể, nhiều loại là tác nhân gây bệnh.

So với các sinh vật khác, vi khuẩn có tốc độ sinh sản cao và ở điều kiện tối ưu, sự phát triển nhân đôi tế bào xảy ra trong vòng 20–30 phút.

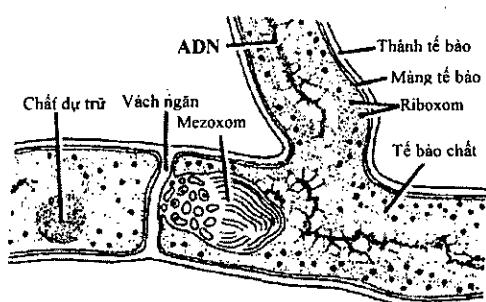
Vi khuẩn được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp vi sinh khi sản xuất axit amin, vitamin, chất bảo vệ thực vật, làm sạch dòng nước thải bằng phương pháp sinh học. Dùng vi khuẩn để sản xuất các chế phẩm protein từ metan và hydro là một trong những hướng có triển vọng.

b) Xạ khuẩn

Xạ khuẩn được phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. Trong mỗi gam đất nói chung thường có trên một triệu xạ khuẩn. Phần lớn xạ khuẩn là tế bào Gram dương, hiếu khí, hoại sinh, có cấu tạo dạng sợi phân nhánh (khuẩn ty). Trong số 8.000 chất khoáng sinh hiện đã được biết đến trên thế giới thì trên 80% là do xạ khuẩn sinh ra. Xạ khuẩn còn được dùng để sản xuất nhiều loại enzym, một số vitamin và axit hữu cơ. Một số ít xạ khuẩn ký khí hoặc vi hiếu khí có thể gây ra các bệnh cho người, cho động vật và cho cây trồng. Một số xạ khuẩn (thuộc chi Frankia) có thể tạo nốt sần trên rễ một số cây không thuộc họ đậu và có khả năng cố định nitơ.

Hệ sợi của xạ khuẩn chia ra thành khuẩn ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh. Đường kính khuẩn ty xạ khuẩn thay đổi trong khoảng 0,2–1,0 μm đến 2–3 μm . Đa số xạ khuẩn có khuẩn ty không có vách ngăn và không tự đứt đoạn. Màu sắc của khuẩn ty của xạ khuẩn hết sức phong phú. Có thể có các màu trắng, vàng, da cam, đỏ, lục, lam, tím, nâu, đen,...

Khuẩn ty cơ chất phát triển một thời gian thì dài ra trong không khí thành những khuẩn ty khí sinh. Sau một thời gian phát triển, trên đỉnh khuẩn ty khí sinh sẽ xuất hiện các sợi bào tử. Sợi bào tử có thể có nhiều loại hình dạng khác nhau: thẳng, lượn sóng, xoắn, mọc đơn, mọc vòng,... Một số xạ khuẩn có sinh nang bào tử, bên trong có chứa các bào tử nang.

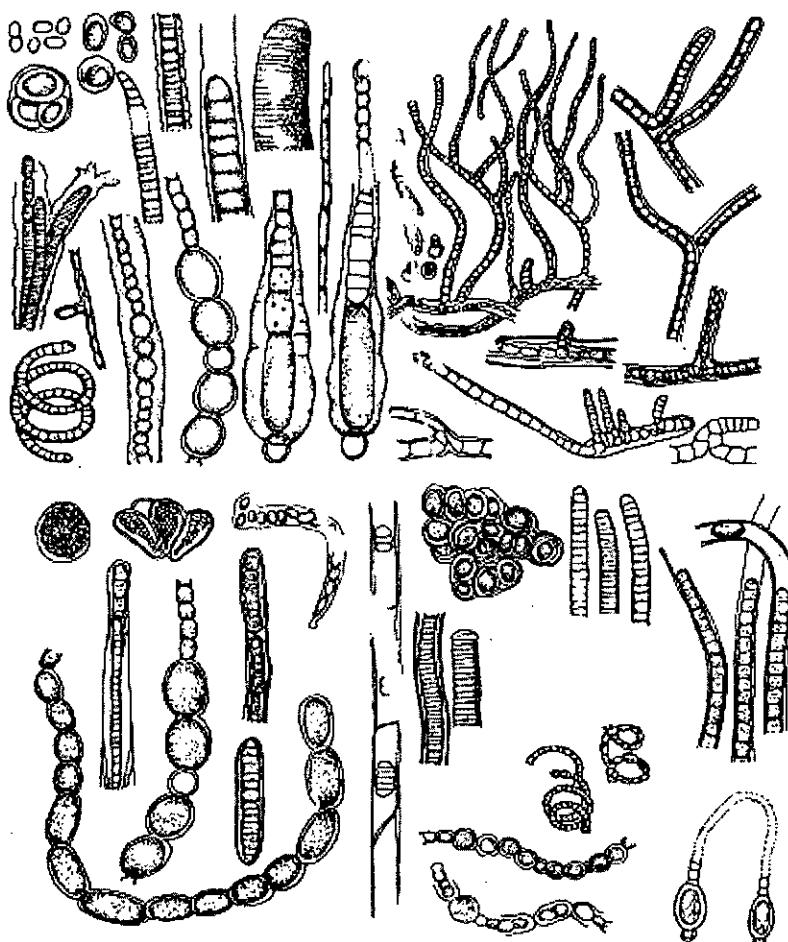


Hình 2.4. Cấu trúc khuẩn ty ở xạ khuẩn

Khuẩn lạc của xạ khuẩn rất đặc biệt, nó không trơn ướt như ở vi khuẩn hoặc nấm men mà thường có dạng thô ráp, dạng phấn, không trong suốt, có các nếp toả ra theo hình phồng xạ, vì vậy mới có tên xạ khuẩn.

c) *Vi khuẩn lam*

Vi khuẩn lam trước đây thường được gọi là tảo lam (Cyanophyta). Thật ra đây là một nhóm vi sinh vật nhân nguyên thuỷ thuộc vi khuẩn thật. Vi khuẩn lam có khả năng tự dưỡng quang năng nhờ chứa sắc tố quang hợp là chất diệp lục.



Hình 2.5. Một số dạng cấu trúc hình thái của vi khuẩn lam

Quá trình quang hợp của vi khuẩn lam là quá trình photphoryl hoá quang hợp phi tuần hoàn, giải phóng oxy như ở cây xanh. Quá trình này khác hẳn với quá trình photphoryl hoá quang hợp tuần hoàn không giải

phóng oxy ở nhóm vi khuẩn ký khí màu tía không chứa lưu huỳnh trong tế bào thuộc bộ Rhodospirillales.

Vi khuẩn lam không thể gọi là tảo vì chúng khác biệt rất lớn với tảo: Vi khuẩn lam không có lục lạp, không có nhân thực, có ribosom 70S, thành tế bào có chứa peptidoglycan, do đó rất mẫn cảm với penicillin và lysozym.

Đại bộ phận vi khuẩn lam sống trong nước ngọt và tạo thành thực vật phù du của các thuỷ vực. Một số phân bố trong vùng nước mặn giàu chất hữu cơ hoặc trong nước lợ. Một số vi khuẩn lam sống cộng sinh. Nhiều vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ và có sức đề kháng cao với các điều kiện bất lợi, cho nên có thể gặp vi khuẩn lam trên bề mặt các tảng đá hoặc trong vùng sa mạc.

Một số vi khuẩn lam vì có giá trị dinh dưỡng cao, có chứa một số hoạt chất có giá trị y học, lại có tốc độ phát triển nhanh, khó nhiễm tạp khuẩn và thích hợp được với các điều kiện môi trường khá đặc biệt (Spirulina thích hợp với pH rất cao) cho nên đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp để thu nhận sinh khối.

Vi khuẩn lam có hình dạng và kích thước rất khác nhau, chúng có thể là đơn bào hoặc dạng sợi đa bào.

d) Nhóm vi khuẩn nguyên thuỷ

Nhóm vi khuẩn này có kích thước rất nhỏ bao gồm 3 loại: *Mycoplasma*, *Rickettsia* và *Chlamydia*.

Mycoplasma là vi sinh vật nguyên thuỷ chưa có thành tế bào, là loại sinh vật nhỏ nhất trong sinh giới có đời sống dinh dưỡng độc lập. Nhiều loại *Mycoplasma* gây bệnh cho động vật và người. *Mycoplasma* có kích thước ngang khoảng 150–300nm, sinh sản theo phương thức cắt đôi. Chúng có thể sinh trưởng độc lập trên các môi trường nuôi cấy nhân tạo giàu dinh dưỡng, có thể phát triển cả trong điều kiện hiếu khí lân ký khí, nghĩa là có cả kiểu trao đổi chất oxy hoá lân kiểu trao đổi chất lên men.

Rickettsia là loại vi sinh vật nhân nguyên thuỷ gram âm chỉ có thể tồn tại trong các tế bào nhân thật. Chúng đã có thành tế bào và không thể sống độc lập trong các môi trường nhân tạo. *Rickettsia* có các đặc điểm sau: (1) Tế bào có kích thước thay đổi, loại nhỏ nhất 0,25–1,0µm, loại lớn nhất 0,6–1,2µm; (2) Tế bào có thể hình que, hình cầu, song cầu, hình sợi,...; (3) Ký sinh bắt buộc trong tế bào các sinh vật nhân thật. Vật chủ thường là các

động vật có chân đốt như ve, bọ, rận,... Các động vật nhỏ bé này sẽ truyền mầm bệnh qua người và (4) Sinh sản bằng phương thức phân cắt thành hai phần bằng nhau.

Chlamydia là loại vi khuẩn rất bé nhỏ, qua lọc, gram âm, ký sinh bắt buộc trong tế bào các sinh vật nhân thực. *Chlamydia* có một chu kỳ sống rất đặc biệt: dạng cá thể có khả năng xâm nhiễm được gọi là nguyên thể. Đó là loại tế bào hình cầu có thể chuyển động, đường kính nhỏ bé ($0,2 - 0,5\mu\text{m}$). Nguyên thể bám chắc được vào mặt ngoài của tế bào vật chủ và có tính cảm nhiễm cao. Nhờ tác dụng thực bào của tế bào vật chủ mà nguyên thể xâm nhập vào trong tế bào, phần màng bao quanh nguyên thể biến thành không bào. Nguyên thể lớn dần lên trong không bào và biến thành thuỷ thể. Thuỷ thể còn gọi là thể dạng lưỡi, là loại tế bào hình cầu màng mỏng, khá lớn (đường kính $0,8 - 1,5\mu\text{m}$). Thuỷ thể liên tiếp phân cắt thành hai phần đều nhau và tạo thành khuẩn lạc trong tế bào chất của vật chủ. Về sau, một lượng lớn các tế bào con này lại phân hoá thành các nguyên thể nhỏ hơn nữa. Khi tế bào vật chủ bị phá vỡ, các nguyên thể được giải phóng ra sẽ xâm nhiễm vào các tế bào khác.

2.1.3. Hình thái và cấu tạo tế bào các vi sinh vật nhân chuẩn (eukaryote)

Loại này bao gồm các vi nấm (microfungi), một số động vật nguyên sinh, một số tảo đơn bào. Vi nấm lại được chia thành nấm men (yeast) và nấm sợi (filamentous fungi). Trong phần này chỉ xem xét về vi nấm (cụ thể là nấm men và nấm sợi).

a) **Nấm men:** Nấm men phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong các môi trường có chứa đường, có pH thấp (trong hoa quả, rau dưa, mật mía, rỉ đường, mật ong, trong đất ruộng mía, đất vườn cây ăn quả, trong đất nhiễm dầu mỏ). Loại nấm men nhà máy rượu, nhà máy bia thường sử dụng là *Saccharomyces cerevisiae*, có kích thước thay đổi trong khoảng $(2,5-10) \times (4,5-21)\mu\text{m}$.

Tùy loài nấm men mà tế bào có rất nhiều hình dạng khác nhau. Có loại nấm men có khuẩn ty hoặc khuẩn ty giả. Khuẩn ty giả chưa thành sợi rõ rệt mà chỉ là nhiều tế bào nối với nhau thành chuỗi dài. Có loài có thể tạo thành váng khi nuôi cấy trên môi trường dịch thể.

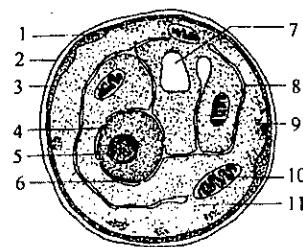
Các tế bào nấm men khi già sẽ xuất hiện không bào. Trong không bào có chứa các enzym thuỷ phân, lipoit, ion kim loại, các sản phẩm trao đổi

chất trung gian,... Ngoài tác dụng một kho dự trữ, không bào còn có chức năng điều hoà áp suất thẩm thấu của tế bào.

Nấm men có hai phương thức sinh sản: Sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính. Nảy chồi là phương pháp sinh sản phổ biến nhất ở nấm men. Ở điều kiện thuận lợi nấm men sinh sôi nảy nở nhanh, hầu như tế bào nấm men nào cũng có chồi. Khi một chồi xuất hiện, các enzym thuỷ phân sẽ làm phân giải phần polysaccarit của thành tế bào làm cho chồi chui ra khỏi tế bào mẹ. Vật chất mới được tổng hợp sẽ được huy động đến chồi và làm chồi phình to dần lên, khi đó sẽ xuất hiện một vách ngăn giữa chồi với tế bào mẹ. Còn phần cắt là hình thức sinh sản ở chi nấm men *Schizosaccharomyces*. Tế bào dài ra, ở giữa mọc ra vách ngăn chia tế bào ra thành hai phần tương đương nhau. Mỗi tế bào con có một nhân.

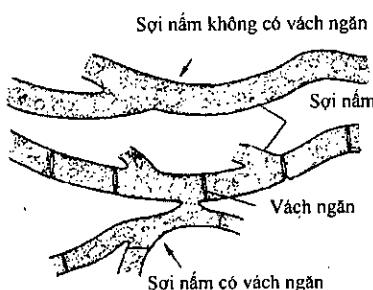
Nhiều loại nấm men đã được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất bia, rượu, nước giải khát, sinh khói, lipit nấm men, các enzym, một số axit, vitamin B₂, các axit amin.

Tuy nhiên cũng có không ít các nấm men có hại. Có khoảng 13–15 loài nấm men có khả năng gây bệnh cho người và cho động vật chăn nuôi.

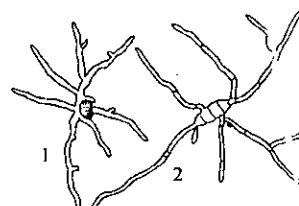


Hình 2.6. Cấu trúc của tế bào nấm men

1. Thể biển;
2. Thành tế bào;
3. Màng tế bào;
4. Nhân tế bào;
5. Hạch nhân;
6. Màng nhân;
7. Không bào;
8. Mạng lưới nội chất;
9. Hạt dự trữ;
10. Ty thể;
11. Tế bào chất



Hình 2.7. Khuẩn ty của nấm



Hình 2.8. Sự nảy mầm bào tử để tạo hệ sợi nấm

1. Ở nấm *Coprinus sterquilinus*;
2. Ở nấm *Lachnella willkomii*.

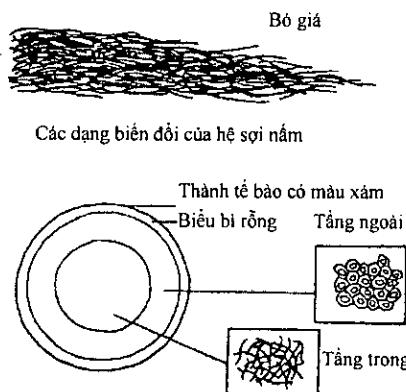
b) Nấm sợi (còn được gọi là nấm mốc). Chúng phát triển rất nhanh trên nhiều nguồn chứa chất hữu cơ khi gặp khí hậu nóng ẩm. Trên nhiều vật liệu vô cơ, do dính bụi bặm, nấm mốc vẫn có thể phát triển, sinh axit và làm mờ các vật liệu này.

Nhiều nấm sợi ký sinh trên người, trên động vật, thực vật và gây ra các bệnh khá nguy hiểm. Nhiều nấm sợi sinh ra các độc tố có thể gây ra bệnh ung thư và nhiều bệnh tật khác.

Rất nhiều loài nấm sợi được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm (làm tương, nước chấm, nấu côn, rượu sakê, axit xitic, axit gluconic,...), trong công nghiệp enzym, công nghiệp dược phẩm, sản xuất thuốc trừ sâu sinh học, kích thích tố sinh trưởng thực vật, sản xuất sinh khối nấm sợi phục vụ chăn nuôi, sản xuất các bình nấm giống để mở rộng nghề trồng nấm ăn các loại.

Các nấm đều có chiều ngang tương tự như đường kính nấm men. Cấu trúc của sợi nấm cũng tương tự như cấu trúc của tế bào nấm men. Bên ngoài có thành tế bào, rồi đến màng tế bào chất, bên trong là tế bào chất với nhân phân hoá. Màng nhân có cấu tạo hai lớp và trên màng có nhiều lỗ nhỏ. Trong nhân có hạch nhân. Bên trong tế bào nấm còn có không bào, thể màng biên,...

Đỉnh sợi nấm bao gồm một chóp nón, dưới chóp nón là một phần có thành rất mỏng, dưới nữa là phần tạo ra thành tế bào và dưới cùng là phần tăng trưởng. Ngọn sợi nấm tăng trưởng được là nhờ phân này. Tiếp phần dưới cùng là phần thành cứng hay còn gọi là phần thành thục của sợi nấm. Bắt đầu từ phần này trở xuống là chấm dứt sự tăng trưởng của sợi nấm. Ở phần tăng trưởng, sợi nấm chứa đầy nguyên sinh chất với nhiều nhân, nhiều



Hình 2.9. Các dạng biến đổi của hệ sợi nấm và hạch nấm

cơ quan tử, nhiều enzym, nhiều axit nucleic. Đây là phần quyết định sự tăng trưởng và sự phân nhánh của sợi nấm.

Khi bào tử nấm rơi vào điều kiện môi trường thích hợp, nó sẽ nảy mầm theo cả không gian ba chiều tạo thành hệ sợi nấm hay gọi khuẩn ty thể. Khuẩn ty thể có hai loại: Khuẩn ty cơ chất hay khuẩn ty dinh dưỡng và khuẩn ty khí sinh. Khuẩn ty cơ chất cắm sâu vào môi trường, còn khuẩn ty khí sinh phát triển tự do trong không khí.

Tùy theo mục đích sản xuất, người ta sử dụng một hay nhiều loại vi sinh vật trong quá trình sản xuất. Ví dụ như trong quá trình xử lý nước thải, rác thải, thường sử dụng tập hợp chủng giống vi sinh vật; trong lên men rượu cổ truyền hay rượu vang, người ta phối hợp một số chủng vi sinh vật để vừa thực hiện quá trình đường hoá, vừa thực hiện quá trình lên men hoặc tạo các hương vị phù hợp. Còn hầu hết các quá trình lên men được thực hiện do một chủng vi sinh vật thuần khiết.

Các chủng vi sinh vật tạp nhiễm trong quá trình lên men, ngoài các loại vi sinh vật kể ở trên còn thêm các thể thực khuẩn (bacteriophage).

2.1.4. Tiêu chuẩn của giống đưa vào sản xuất

Một chủng vi sinh vật được coi là chủng giống tốt sử dụng trong sản xuất nếu hội tụ được nhiều các đặc tính ưu việt, trước hết phải có năng suất cao, đồng thời phải có thêm những đặc điểm sau: (1) Có khả năng sử dụng các nguyên liệu rẻ tiền, dễ kiếm như các phụ phẩm, các nguyên liệu thô,...; (2) Không tạo sản phẩm phụ trong quá trình lên men sản xuất; (3) Ít mẫn cảm với các vi sinh vật tạp nhiễm và thể thực khuẩn; (4) Tách chiết sinh khối hay sản phẩm khỏi dịch lên men dễ dàng.

Việc lựa chọn chủng giống vi sinh vật cho một quy trình công nghệ là hết sức quan trọng. Người ta thường lựa chọn chủng có hoạt tính cao bằng cách hoàn thiện genotype nhờ các phương pháp chọn lọc tự nhiên, lai tạo, gây đột biến bằng các tác nhân vật lý như tia UV, tia X, tia Gamma hoặc bằng các chất gây đột biến như etylenimin, axit nitric, nitrozo-guanidin,... Hiện nay, nhờ hiểu biết các con đường trao đổi chất, bằng phương pháp gây đột biến tạo được nhiều biến đổi về gen và chọn lọc định hướng như bổ sung chất chọn lọc vào môi trường trong quá trình tuyển chọn sẽ nâng cao được hoạt tính sinh tổng hợp của chúng, không những thế, sử dụng chọn lọc bằng phương pháp đột biến, chọn lọc những ưu điểm của chủng thuận lợi cho quá

trình sản xuất. Do vậy, trong vài thập niên gần đây, người ta đã sử dụng các phương pháp của kỹ thuật di truyền hiện đại để tạo chủng giống có tính chất mong muốn một cách chủ động. Rõ ràng, việc hoàn thiện genotyp của chủng giống là không có điểm dừng và phải làm thường xuyên. Chính vì vậy, các chủng giống được dùng trong sản xuất có đặc tính ngày càng hoàn hảo hơn, năng suất ngày càng cao, giá thành sản phẩm ngày càng hạ, đáp ứng ngày càng tốt hơn các yêu cầu của con người.

2.1.5. Các công tác chính trong việc chuẩn bị giống cho sản xuất

Các chủng có hoạt tính cao được chọn lọc nhân tạo, thường có thiên hướng thoái hoá (lại giống) do đặc tính chung của vi sinh vật là sinh sản nhanh và phân ly liên tục. Do vậy, những cơ sở sản xuất bằng phương pháp lén men thường phải thành lập phòng kỹ thuật làm nhiệm vụ sau đây:

- Kiểm tra độ thuần khiết của giống trong lén men.
- Kiểm tra khả năng hồi biến của giống.
- Hoạt hoá giống sau một thời gian sử dụng. Để hoạt hoá giống, người ta thường sử dụng môi trường có thành phần giàu các chất kích thích sinh trưởng như cao nấm men, nước chiết cà chua, hỗn hợp các vitamin, axit béo,...
- Chọn chủng có hoạt tính cao thường xuyên bằng phương pháp chọn lọc tự nhiên.
- Bảo quản giống bằng các phương pháp thích hợp để phục vụ cho sản xuất.

2.1.6. Những nguyên tắc điều hoà trao đổi chất

Những đặc thù chung của vi sinh vật công nghiệp cũng như các vi sinh vật khác là rất phong phú các enzym (có tới hàng ngàn enzym). Ví dụ, trong tế bào *E. coli*, người ta đã xác định được khoảng 2.000 enzym và có thể nhiều hơn nữa nếu nuôi nó trong môi trường thích hợp. Các enzym đóng vai trò quan trọng trong đời sống vi sinh vật, chúng là chất xúc tác cho các phản ứng sinh hoá xảy ra trong và ngoài tế bào để phân huỷ 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 hoá vật chất trong sinh giới.

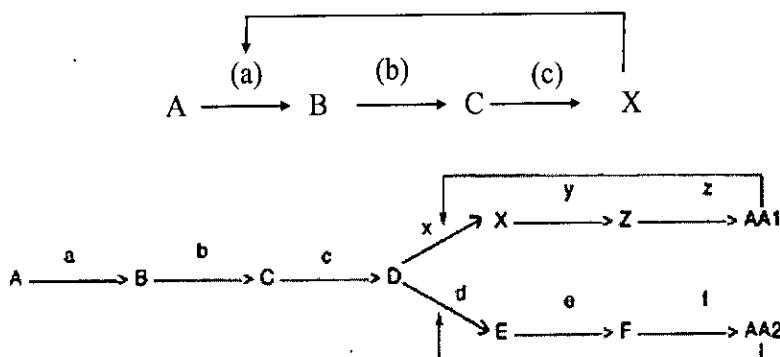
Các vi sinh vật tồn tại trong tự nhiên hình thành cơ chế điều hoà phát triển cao sao cho các sản phẩm trao đổi chất sinh ra và các thành phần của tế bào chỉ ở mức độ cần thiết cho sự sinh sản và duy trì loài. Trong tự nhiên,

theo lẽ thông thường, không có sự tạo dư thừa các chất trao đổi bậc một, bậc hai và các enzym.

Nguyên tắc điều hoà trao đổi chất gồm 3 cơ chế:

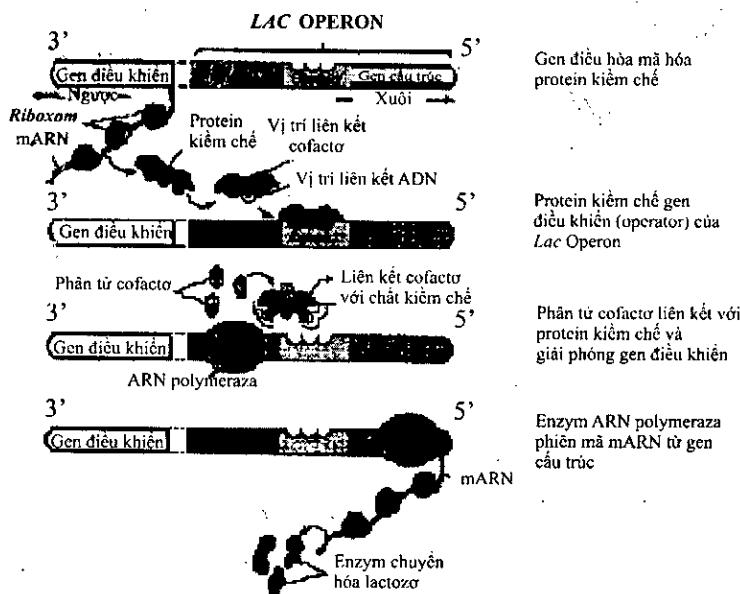
- Điều hoà các hoạt tính enzym nhờ sự ức chế ngược bằng sản phẩm cuối cùng (hay còn gọi là sự kìm hãm theo liên kết ngược).
- Điều hoà tổng hợp enzym nhờ sự kiềm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiềm chế.
- Điều hoà sinh tổng hợp enzym bằng sự kiềm chế dị hoá.

Tổng hợp protein được xem như là kết quả của quá trình biểu gen. Việc tổng hợp một sản phẩm trong tế bào dựa trên cơ sở sử dụng thông tin di truyền mã hoá một gen liên quan đến hàng loạt quá trình chuyển hoá. Trước hết là sự phiên mã thông tin từ phân tử ADN, nơi lưu giữ thông tin di truyền, sang ARN thông qua việc tổng hợp ARN thông tin. Sau đó là việc sinh tổng hợp protein cần thiết cho cơ thể. Như vậy, quá trình này có thể khái quát: ADN được sao mã (nhân bản trong quá trình tái sinh) quá trình này thường được xúc tác bởi các enzym ADN-polymeraza, sau đó được phiên mã sang ARN nhờ sự xúc tác của các enzym ARN-polymeraza và transcriptaza. Thường trong cơ thể sinh vật có 3 loại ARN-polymeraza. Tuy vậy, trong tế bào, việc tổng hợp protein không phải diễn ra lộn xộn, mà theo cơ chế điều hoà hoạt tính enzym nhờ sự ức chế bằng sản phẩm cuối cùng hay còn gọi là sự kìm hãm do liên kết ngược. Ví dụ, sơ đồ chuỗi các phản ứng sinh hoá xảy ra để tổng hợp sản phẩm cuối cùng của quá trình chuyển hoá (X) như hình 2.10.



Hình 2.10. Sơ đồ tổng quát về để điều hòa con đường trao đổi chất bằng quá trình ức chế ngược

Enzym đầu tiên (a) là một enzym 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. Enzym này ngoài vị trí gắn với cơ chất A (trung tâm xúc tác), nó có một hay nhiều vị trí gắn với sản phẩm cuối cùng X gọi là trung tâm dị lập thể. 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 bị biến đổi cấu hình không gian đến mức khiến cho enzym (a) không gắn vào chất A mà chỉ gắn với X. Như vậy, không có sự chuyển hóa chất A thành B, chuỗi sinh tổng hợp X bị gián đoạn. Sự điều hòa này ở mức độ enzym. Quá trình tổng hợp enzym cũng được điều hòa bởi sự cảm ứng và ức chế quá trình sinh tổng hợp enzym nhờ sự kiềm chế bằng sản phẩm cuối cùng và sự giải kiềm chế. Quá trình này được trình bày ở hình 2.11.



Hình 2.11. Sự điều hoà Lac operon cụm gen sinh tổng hợp các phân tử protein-enzym ở *Escherichia coli*. Gen điều hoà ức chế mã hoá protein kiềm chế, nó thường liên kết với gen điều khiển của operon. Sự liên kết của chất cảm ứng (cofactor) loại bỏ protein kiềm chế khỏi vị trí trên gen điều khiển. Điều đó cho phép enzym ARN polymerase liên kết với gen khởi động (promoter) và sao mã gen cấu trúc mã hoá các enzym chuyển hóa lactose.

Gen là một chuỗi ADN nằm trong nhiễm sắc thể, quá trình này được sao mã chỉ khi phân chia tế bào và được bảo tồn thông tin di truyền. Tuy nhiên, quá trình sinh tổng hợp protein ở những cơ thể vi sinh vật như một số virut, vật liệu mang thông tin di truyền không phải là ADN mà là ARN. ARN này

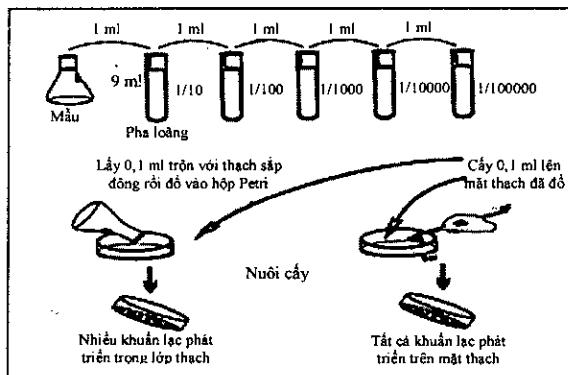
có cấu trúc sợi đơn, đảm nhiệm luôn chức năng mRNA và sự tổng hợp protein diễn ra đơn giản ARN → protein. Ở tế bào ung thư, người ta phát hiện thấy một sự tổng hợp protein dựa trên nguyên tắc sao chép ngược: ARN → ADN → mRNA → Protein. Như vậy, ở đây xuất hiện tổng hợp gen bằng con đường enzym phiên mã ngược. Quá trình tổng hợp gen bằng con đường enzym phiên mã ngược được trình bày kỹ ở phần sau về tách dòng ADN bằng kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi polymeraza).

2.2. PHÂN LẬP GIỐNG THUẦN CHỦNG VÀ CHỌN GIỐNG VI SINH VẬT

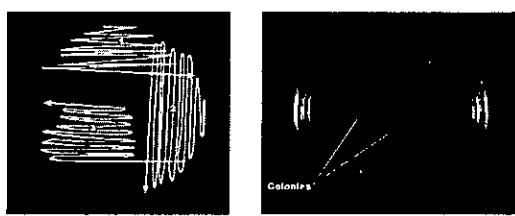
2.2.1. Phân lập vi sinh vật thuần chủng

a) Phân lập: Vi sinh vật có ở trong các cơ chất khác nhau (phân, rác, các chất thối rữa), trong đất, nước, không khí. Vi sinh vật được phân lập theo các kỹ thuật sau:

- Phân lập vi sinh vật trong không khí: Sau khi chế môi trường, thanh trùng và đổ vào các hộp Petri, rồi để hộp không đậy nắp trong 20–30 phút ở những nơi muốn phân lập. Các loại vi sinh vật (nấm mốc, nấm men, xạ khuẩn, vi khuẩn) trong không khí sẽ rơi vào hộp môi trường thạch. Tuỳ theo số lượng vi khuẩn có trong không khí, sẽ mọc lên các khuẩn lạc sau 48 –120 giờ nuôi. Từ đó đánh giá được mức độ ô nhiễm môi trường không khí nơi phân lập.
- Phân lập vi sinh vật từ các chất rắn, nước: Cân 1g cơ chất rồi hòa vào 10ml nước sinh lý vô trùng, sau đó dùng



Hình 2.12. Phương pháp phân lập vi sinh vật



Hình 2.13. Phương pháp nuôi cấy “rích rắc” để thu nhận các khuẩn lạc riêng rẽ

nước sinh lý pha loãng đến nồng độ mong muốn (nếu từ nước chỉ cần pha loãng), sau đó sử dụng pipet nhỏ 0,1ml lên mặt môi trường thạch, dùng que trang trang đều trên mặt thạch (hình 2.12) hay cấy "rich rắc" trên mặt thạch (hình 2.13) của hộp lồng. Sau thời gian nuôi trong tủ ấm có nhiệt độ và thời gian thích hợp, nhóm vi sinh vật sẽ hình thành khuẩn lạc và dùng que cấy truyền sang ống nghiệm thạch nghiêng.

b) Nuôi cấy vi sinh vật

– Môi trường nuôi cấy:

Tính chất của môi trường phụ thuộc vào thành phần của vi sinh vật. Người ta sử dụng môi trường vào các mục đích: nghiên cứu, chẩn đoán, lên men công nghiệp,...

Trên môi trường đặc, từ tế bào riêng rẽ sẽ phát triển thành khuẩn lạc (colony), kích thước, mép, cấu tạo bề mặt khuẩn lạc là những tính chất để định loại. Khi điều chế môi trường đặc, người ta thường bổ sung 1,5–2% thạch (agar). Đây là một loại polysaccharit tách chiết từ các loại tảo có công thức hoá học chung D-galactozơ + L-3,6-anhydro galactozơ, trong suốt, có điểm nóng chảy thường ở 40°C. Tùy từng mục đích, người ta có thể tạo các loại thạch có độ dẻo cứng, điểm nóng chảy khác nhau.

Trước đây, người ta chia môi trường thành 2 loại theo nhu cầu dinh dưỡng của các vi sinh vật: tự dưỡng (autotroph) và dị dưỡng (heterotroph). Ngày nay, người ta thường chia thành các loại môi trường theo tính chất của chúng:

+ 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 sau: Cao thịt 5g; pepton 10g, NaCl 5g và nước 1.000ml.

Cao thịt được làm từ thịt bò nạc như sau: Thịt bò được xay nhỏ, ngâm vào trong nước đã hạ pH xuống 2 bằng axit sunphuro (để tránh nhiễm khuẩn), sau đó để 24–48 giờ trong tủ 40°C để các chất như gluxit, các hợp chất nitơ, muối khoáng, các vitamin trích ly hết vào trong nước, sau đó lọc. Dịch lọc được đun sôi (khi sôi không quá 1 phút) để các chất không hòa tan vón lại, lọc qua giấy lọc nhanh và cô ở nhiệt độ không cao quá 60°C cho đến khô. Trong công nghiệp, người ta sử dụng máy sấy phun.

Pepton có nhiều loại, đây là sản phẩm của việc sử dụng thuỷ phân bằng phương pháp hoá học hay enzym (ví dụ trypsin) các chất hữu cơ chứa protein như thịt, casein, gelatin đến độ phân giải được các pepton chứa polypeptit, các tripeptit, dipeptit hay các axit amin khác nhau.

Trong lén men công nghiệp, người ta thường dùng các phụ phẩm hoặc các bã thải của công nghiệp thực phẩm làm nền của môi trường như mạt rỉ cù cải đường, rỉ đường, bột đậu tương ép, bột cá, cám, bột kiều mạch, sắn,... với mục đích hạ giá thành sản phẩm.

+ Môi trường tổng hợp: là môi trường đã biết thành phần hoá học. Ví dụ, môi trường dùng để nuôi cấy *Desulfo desulfuricans* như sau: K_2HPO_4 – 1g, NH_4Cl – 1g; $CaSO_4$ – 1g; $MgSO_4$ – 2g; và nước nguyên chất – 1.000ml. Một ví dụ khác về môi trường xác định để chẩn đoán các loại Enterobacteria, môi trường này cho phép nghiên cứu enzym ureaza và các tính chất indol từ tryptophan: Urea 20g; L-tryptophan 3g; K_2HPO_4 – 1g; KH_2PO_4 – 1g; NaCl – 5g; cồn 95% 10ml; phenol đỏ – 25g; nước cất – 1.000ml.

Việc chuẩn bị môi trường có nhiều thao tác, cho nên môi trường tổng hợp này chỉ được sử dụng để nghiên cứu nhu cầu dinh dưỡng của một số loại 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 có một số hợp chất có nguồn gốc tự nhiên và một số chất hoá học đã biết thành phần hoá học. Đây là loại môi trường rất hay sử dụng trong nghiên cứu vi sinh vật. Ví dụ, môi trường EMB thường sử dụng định loại *E. coli*: Pepton – 10g; K_2HPO_4 – 2g; lactozơ – 10g; eosin – 0,4g, xanh metylen – 0,065g; thạch – 15g và nước cất – 1.000ml. Môi trường loại này thường được phân thành các nhóm theo cách sử dụng chúng.

+ 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. Những môi trường này thường chứa các tác nhân ức chế như tím kết tinh, 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 các vi sinh vật cần nghiên cứu, ví dụ như môi trường Muller-Kaufman: Nước thịt – 900ml; $CaCO_3$ – 0,5g;

dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 50% – 100ml; dung dịch iot 1% – 20ml; lục ánh –0,01g; mật –50ml. Môi trường này cho phép làm giàu *Salmonella* và ức chế các vi khuẩn Gram dương và Gram âm khác. Loại môi trường này thường thích hợp cho các vi sinh vật mà ta cần nghiên cứu phát triển nhanh lên.

+ Môi trường dùng để phân lập và định tên. Ví dụ với nấm men và vi nấm, người ta hay sử dụng các môi trường: Khoai tây–glucozơ, Sabouraud, Hansen; đối với xạ khuẩn, người ta hay sử dụng môi trường Gauze 1 và Gauze 2; đối với vi khuẩn, người ta hay sử dụng môi trường thạch thịt (MPA) để phân lập các chủng vi sinh vật. Tuy nhiên, đối với các loại vi sinh vật đặc biệt, người ta phải tìm các môi trường đặc hiệu, những môi trường này được trình bày theo các khoá phân loại các nhóm, các loài vi sinh vật. Các môi trường này cũng thường sử dụng để định tên các loài vi sinh vật.

– Nuôi cấy vi sinh vật:

Tùy theo tính chất cũng như các loại vi sinh vật mà lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp. Trong phòng thí nghiệm, thông thường người ta nuôi cấy vi sinh vật đã cấy trong môi trường đặc hay nuôi các bình trong tủ ấm có nhiệt độ được điều chỉnh phù hợp. Đối với vi khuẩn, thời gian thế hệ ngắn, thường thời gian nuôi được kéo dài 24 đến 48 giờ; còn đối với nấm men, vi nấm và xạ khuẩn, thường thời gian nuôi kéo dài 72 đến 120 giờ. Tuy nhiên, tùy từng loại vi khuẩn, thời gian nuôi có thể kéo dài hơn.

Nuôi cấy vi sinh vật thường khó thực hiện với các loại vi sinh vật kỵ khí. Thông thường các loại này được nuôi trong các thiết bị đặc biệt.

c) **Sàng lọc các chủng có hoạt tính sinh học**

Việc sàng lọc các chủng có hoạt tính sinh học mong muốn, thường người ta có những biện pháp riêng. Ví dụ, tuyển chọn các chủng có hoạt tính kháng sinh, người ta sử dụng các vi sinh vật kiểm định bằng các phương pháp thạch, đục lỗ hay khoanh giấy lọc; tuyển chọn các chủng có hoạt tính enzym người ta lựa chọn trên môi trường có bổ sung các cơ chất tương ứng như đối với amylazơ sử dụng cơ chất là tinh bột, proteaza sử dụng cơ chất là sữa hay casein. Sau khi ủ trong tủ ấm với nhiệt độ thích hợp, đo vòng vô khuẩn hay vòng phân giải. Ngoài ra, để tuyển chọn các chủng vi sinh vật, người ta sử dụng các loại kháng sinh nhằm ức chế các chủng không phù hợp, ví dụ như nấm men, người ta có thể bổ sung nistatin vào môi trường tuyển chọn.

2.2.2. Tạo giống vi sinh vật công nghiệp

Các chủng vi sinh vật phân lập từ tự nhiên thường có hoạt tính thấp. Ví dụ, các chủng *Penicillium chrysogenum* sinh penixilin phân lập từ đất chỉ có 10–30đv/ml, chủng *Streptomyces streptomycini* sinh streptomyxin cao nhất cũng chỉ đạt 100mcg/ml. Để đưa vào sản xuất có ý nghĩa kinh tế, người ta phải tiến hành chọn lọc chủng có hoạt tính cao bằng hai cách có liên quan mật thiết với nhau như sau: Chọn lọc các chủng có khả năng sinh kháng sinh cao nhất và nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng nhận được với mục đích thu nhận hoạt tính sinh tổng hợp cao nhất.

a) *Lựa chọn chủng có hoạt tính cao*

Có nhiều cách để chọn lọc các chủng có hoạt tính cao dựa trên các phương pháp và quy luật di truyền, bởi vì các chủng vi sinh vật có sự thay đổi trong quá trình sinh trưởng, phát triển. Chúng thường có khả năng tự đột biến tự nhiên, nghĩa là trong số các tế bào hoặc bào tử có thể thay đổi các tính chất hình thái, sinh lý, sinh hoá cũng như khả năng sinh kháng sinh so với chủng gốc. Do vậy, cần thiết phải thường xuyên chọn chủng có hoạt tính cao nhất.

Bào tử hoặc tế bào sinh dưỡng của chủng sản sinh kháng sinh sau khi được pha loãng vào nước sinh lý, hoặc sau khi xử lý tác nhân gây đột biến được cấy trên môi trường dinh dưỡng trong hộp Petri sao cho chỉ hình thành 40–50 khuẩn lạc trong mỗi hộp. Sau khi khuẩn lạc phát triển chúng được kiểm tra hoạt tính kháng sinh bằng 2 phương pháp sau:

– *Phương pháp 1:* Sau khi đĩa Petri được nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp 5–6 ngày, khuẩn lạc phát triển tốt, môi trường thạch thích hợp cho vi khuẩn kiểm định được đun nóng chảy, làm nguội đến 45–50°C và cấy vi khuẩn kiểm định rồi đổ một lớp mỏng lên mặt môi trường thạch trong đĩa Petri (hình 2.14). Đĩa Petri được nuôi tiếp 20–24 giờ trong tủ ấm có nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn kiểm định phát triển và đo vòng vô khuẩn xung quanh khuẩn lạc. Vòng vô khuẩn càng lớn hoạt tính kháng sinh càng cao. Từ đó chọn được chủng có hoạt tính cao nhất. Tuy nhiên,



Hình 2.14. Sơ đồ thử nghiệm xác định hoạt tính kháng sinh của các khuẩn lạc bằng cách phủ môi trường có vi khuẩn kiểm định

1. Môi trường thạch với vi khuẩn kiểm định;
2. Môi trường thạch để phát triển khuẩn lạc chủng sản sinh kháng sinh; 3. Khuẩn lạc;
4. Vùng khuếch tán của kháng sinh.

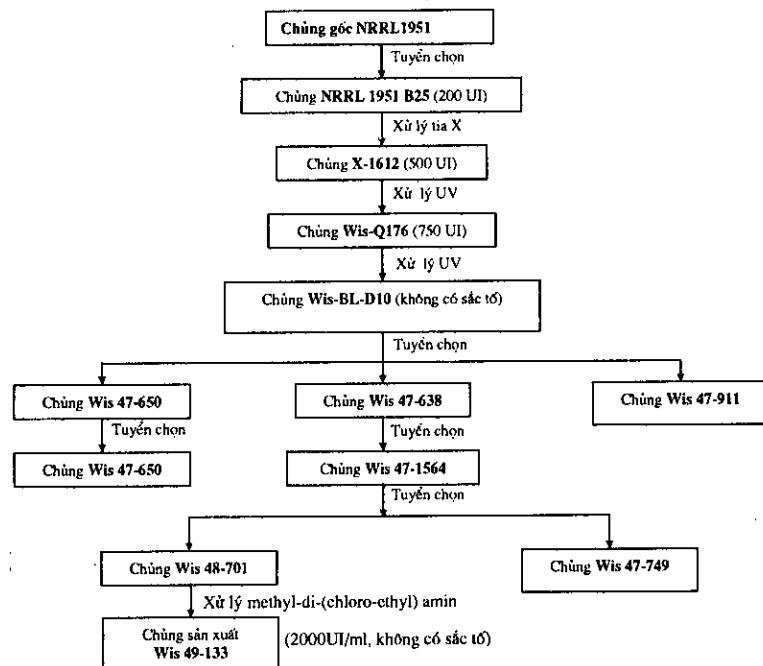
phương pháp này khó thực hiện với các chủng sinh kháng sinh có hoạt tính mạnh như penixillin, vì vòng vây khuẩn thường chồng lên nhau. Để khắc phục điều này, khuẩn lạc sau khi phát triển, dùng que cấy vô trùng cấy chuyển đồng thời một khuẩn lạc sang mặt môi trường thạch ở 2 đĩa Petri khác sao cho các khuẩn lạc cách nhau 20–30mm, đánh số thứ tự các khuẩn lạc, nuôi trong tủ ấm để khuẩn lạc phát triển tốt, sau đó đổ lớp môi trường thạch có vi khuẩn như trinh bày ở trên lên một đĩa Petri, đĩa còn lại để tách các chủng có hoạt tính cao.

– *Phương pháp 2:* Sau khi đĩa thạch được đặt vào tủ ấm 1–2 ngày, khuẩn lạc của chủng phát triển rõ, dùng đột thạch đột các cục thạch có một khuẩn lạc phát triển chuyển sang hộp Petri vô trùng, tiếp tục nuôi trong tủ ấm 4–5 ngày cho khuẩn lạc phát triển tốt và xác định hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp cục thạch (xem phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh). Phương pháp này có ưu điểm là lượng kháng sinh của từng khuẩn lạc khác nhau khuếch tán vào cục thạch có kích thước bằng nhau thì xác định hoạt tính sẽ chính xác hơn. Chú ý trong một đĩa Petri cần để số lượng cục thạch nhiều hoặc tạo độ ẩm trong hộp Petri cao để tránh làm khô cục thạch.

Chủng tuyển chọn có hoạt tính cao bằng các phương pháp trên cần được kiểm tra bằng lén men trong môi trường dịch thể để xác định hiệu suất sinh kháng sinh so với chủng ban đầu. Quy trình tuyển chọn các chủng có hoạt tính cao nhất như thế này được làm thường xuyên vì, các chủng vi sinh vật dễ bị biến dị và hoạt tính bị thoái hóa trong quá trình nuôi cấy nhiều lần bởi tác động của môi trường sống của chúng. Phương pháp tuyển chọn chủng có hoạt tính cao chỉ là kết quả do đột biến tự nhiên, không có ý nghĩa tạo chủng có năng suất cao đáp ứng được yêu cầu của sản xuất.

b) *Lựa chọn chủng có hoạt tính cao bằng phương pháp đột biến*

Những chủng sản sinh kháng sinh phân lập và tuyển chọn từ tự nhiên thường hiệu suất kháng sinh thấp, phải nâng cao năng suất chủng giống bằng các biện pháp di truyền. Phương pháp có ý nghĩa quyết định thành công trong việc tạo giống có năng suất cao là các phương pháp chọn lọc gây đột biến dưới tác động mạnh của các tác nhân như tia UV, tia X, tia Gamma hoặc các chất gây đột biến như ethylenimin, axit nitric, nitrozo-guanidin,... Bằng phương pháp gây đột biến tạo được nhiều biến đổi về gen và chọn lọc định hướng như bổ sung chất kháng sinh vào môi trường trong quá trình tuyển chọn, sẽ nâng cao được hoạt tính kháng sinh của chủng. Bằng cách này, không những chọn lọc được chủng có hoạt tính cao mà còn chọn lọc những ưu điểm của chủng thuận lợi cho quá trình sản xuất.



Hình 2.15. Sơ đồ tuyển chọn chủng *Penicillium chrysogenum* Wis 49-133 dùng để sản xuất penixilin G, năm 1951

Ví dụ, chủng nấm *Penicillium notatum* mà Fleming phát minh ra, hoạt tính kháng sinh chỉ đạt 2dv/ml môi trường lên men, sau khi phát hiện ra chủng nấm *P.chrysogenum* sản sinh lượng kháng sinh cao hơn. Bằng quá trình chọn lọc tự nhiên và đột biến, từ chủng ban đầu (năm 1941), chủng *P.chrysogenum* hoạt tính chỉ có 30dv/ml thì đến năm 1967 đã đạt 5.000 dv/ml. Các chủng dùng để sản xuất kháng sinh penixilin hiện nay đều bắt nguồn từ một chủng gốc, do vậy chúng có quan hệ huyết thống trên cơ sở của chủng ban đầu (chủng gốc NRRL1951). Hình 2.14 chỉ rõ huyết thống của chủng *P.chrysogenum* Wis 49-133 dùng trong công nghiệp sản xuất penixilin G năm 1951, được thao tác gây biến dị trên chủng Wis-Q176. Tuy nhiên, một số chủng tuyển chọn được không những có hoạt tính cao hơn chủng gốc, mà còn có ưu điểm là không tạo ra sắc tố tan vào môi trường làm cho quá trình tách chiết kháng sinh dễ dàng hơn.

Đầu tiên việc tuyển chọn các chủng có hoạt tính cao bằng phương pháp gây đột biến theo bậc thang, đó là từ những chủng có hoạt tính cao nhất người ta tiếp tục gây đột biến chọn lọc để chọn các chủng có hoạt tính cao hơn (hình 2.15 và bảng 2.1).

BẢNG 2.1. KẾT QUẢ CHỌN MỘT SỐ CHỦNG CÓ HOẠT TÍNH CAO SÍNH MỘT SỐ LOẠI KHÁNG SINH (theo Sacharosa & Kbitko, 1967).

Chủng sản	Tác nhân gây đột biến	Hoạt tính kháng sinh (dv/ml)	
		Ch主意ng bố mẹ	Ch主意ng đã chọn
Penixilin	X, UV, AI, EI	220	5200
Streptomycin	X, UV	250	4200
Clotetraacyclin	X, UV	600	2200
Erythromyxin	UV, EI	500	1000
Albomyxin	X	-	Hơn 600% chủng gốc

Ghi chú: X – tia Rögen; UV – tia tử ngoại; AI – axit nitric; EI – ethylenimine

Tuyển chọn các chủng có hoạt tính cao bằng phương pháp chọn lọc bậc thang đòi hỏi nhiều công sức, chi phí cao mà hiệu suất chủng không ổn định. Nhờ các nghiên cứu về con đường chuyển hoá của kháng sinh, người ta nghiên cứu chọn lọc có định hướng nhằm tạo ra chủng siêu tổng hợp. Ví dụ, trong con đường sinh tổng hợp penixilin, liên quan đến con đường sinh tổng hợp lizin của nấm *P. chrysogenum*, nếu sinh tổng hợp thừa lizin thì quá trình sinh tổng hợp penixilin dừng, do vậy, người ta gây đột biến chọn lọc các chủng khuyết dưỡng lizin, cho nên quá trình ức chế ngược lại enzym α-ketoglutarat-transferaza không diễn ra, tạo khả năng siêu sinh tổng hợp penixilin G (over-production). Những con đường sinh tổng hợp kháng sinh rất phức tạp, tham gia nhiều enzym và được mã hoá bởi nhiều gen. Do vậy, muốn nâng cao hoạt tính của các chủng sinh các loại kháng sinh khác nhau người ta phải hiểu rõ con đường sinh tổng hợp của chúng. Hơn nữa, để chọn lọc nhanh các chủng có hoạt tính cao, người ta đã bổ sung kháng sinh của chính chủng đó vào môi trường chọn lọc nhằm làm cho chủng nhận được chịu được nồng độ kháng sinh có trong môi trường cao, không gây ức chế quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp của chúng.

Ngày nay, sản xuất penixilin và xephalosporin ở mức độ công nghiệp vẫn dựa chính vào các chủng *P. chrysogenum* và *A. chrysogenum* tương ứng. Hầu hết các chủng này được tạo ra bằng cách tuyển chọn và chọn lọc bằng phương pháp gây đột biến. Năm 1972, chủng *P.chrysogenum* của hãng Panlabs có hiệu suất 20.000dv penixilin trong 1ml môi trường lên men sau 7 ngày nuôi cấy (tương đương 12mg penixilin G-Na tinh khiết) thì năm 1990,

chủng sinh penixilin đã đạt được 70.000đv/ml sau 7 ngày lên men. Hiệu suất kháng penixilin trong công nghiệp năm 1993 đã đạt 100.000đv/ml.

c) Tạo chủng có hoạt tính cao bằng kỹ thuật di truyền

Tạo chủng tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp enzym cao bằng cách chọn dòng gen enzym mong muốn và sử dụng vectơ là các plasmid để biến nạp tạo chủng tái tổ hợp có năng suất cao (chi tiết chương 3).

2.3. PHÂN LOẠI VI SINH VẬT

Phân loại vi sinh vật là sự sắp xếp các cơ thể vào các nhóm dựa trên mối quan hệ của chúng, danh pháp được đặt tên theo đơn vị phân loại (taxon) và được mô tả trong hệ thống phân loại và định tên.

Trước đây, vi khuẩn được định nghĩa là nhóm cơ thể có tế bào tiền nhân bao gồm: Vi khuẩn thật (Eubacteria), vi khuẩn lam (Cyanobacteria) và vi khuẩn cổ (Archaeabacteria). Các nhóm phân loại của vi khuẩn trước hết dựa trên các đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh lý và được mô tả trong khoa phân loại vi khuẩn của Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) như sau: 1. Xoắn khuẩn (Spirochetes); 2. Vi khuẩn hiếu khí hoặc vi hiếu khí, Gram âm, xoắn/cong; 3. Trực khuẩn và Cầu khuẩn hiếu khí Gram âm; 4. Trực khuẩn kỵ khí Gram âm; 6. Cầu khuẩn kỵ khí Gram âm; 7. Rickettsia và Chlammydia; 8. Mycoplasma; 9. Nội cộng sinh (Endosymbiont); 10. Cầu khuẩn Gram dương; 11. Trực khuẩn và cầu khuẩn sinh nội bào tử; 12. Vi khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, trực khuẩn hình dạng theo quy tắc; 13. Trực khuẩn Gram dương có hình dạng bất quy tắc (vi khuẩn dạng Coryne); 14. Trực khuẩn có lông mao và không có lông mao kỵ khí; 15. Mycobacteria và Nocardioform; 16. Vi khuẩn quang dưỡng; 17. Vi khuẩn nảy chồi và nhánh phu; 18. Vi khuẩn hoá dưỡng; 19. Vi khuẩn cổ (Archaeabacteria) và 20. Xạ khuẩn (Actinomycetales).

Vi nấm là vi sinh vật nhân thật, chúng không phải là nấm bậc cao. Căn cứ vào hình thái, người ta chia vi nấm thành hai nhóm khác nhau: Nấm men (Yeast) và Nấm sợi (Filamentous fungi), khác nhau về hình thái nhưng không phải là những đơn vị phân loại (taxon) riêng biệt. Nhiều nấm men cũng có dạng sợi và rất khó phân biệt với nấm sợi. Năm 1970, J. Lodder đã xác định được 349 loài nấm men thuộc 39 chi khác nhau. Đến năm 1983, J.A. Barnett, R.W. Payne và D. Yarrow đã xác định và tập hợp thành Hệ thống phân loại nấm men có 66 chi, bao gồm 483 loài.

Động vật nguyên sinh là những cơ thể đơn bào, nhân thật, thường là thể dinh dưỡng hữu cơ, một số thuộc cơ thể quang dưỡng. Trước đây, giới động vật được chia thành 2 giới phụ: Động vật nguyên sinh (động vật đơn bào) và ký sinh trùng (động vật đa bào). Theo hình thái của động vật nguyên sinh, người ta chia nhóm này vào 4 nhóm như sau: 1) Sarconastighiphora với các nhánh Sarcodina, Mastigophora và Opalinata; 2) Sporzoa: các loại ký sinh trên động vật, có thể một hay nhiều vật chủ; 3) Cnidospora: các loại ký sinh trên động vật có xương và không xương và 4) Ciliophora: loại cơ thể có hai loại nhân: nhân to và nhân bé.

Virut là nhóm vi sinh vật quan trọng, là tác nhân gây bệnh nguy hiểm cho người, động vật và thực vật. Virut sống ký sinh trên các sinh vật chủ khác bao gồm vi khuẩn; thực vật, động vật và con người. Virut được phân loại chủ yếu dựa trên đặc điểm cấu trúc vỏ capsit của virut và cấu trúc lõi axit nucleic hoặc dựa vào loại sinh vật chủ virut ký sinh. Tuỳ theo đặc điểm phân loại, virut được chia thành 3 nhóm lớn:

1. Virut thực vật: Virut thực vật có 14 họ, 70 chi trong đó có 27 chi chưa xếp vào họ nào. Có 2 loại loài: Loài đã xác định và loài giả định.

2. Thể thực khuẩn (virut ký sinh trên vi khuẩn –bacteriophage): được phân chia thành hai họ: Họ virut không có vỏ ngoài, phần lõi chứa ADN chuỗi kép, ADN chuỗi đơn hoặc ARN chuỗi đơn và họ Virut có vỏ ngoài, phần lõi chứa ADN chuỗi kép hay ARN chuỗi kép

3. Nhóm virut phân loại theo sinh vật chủ gồm 6 nhóm: 1) Virut vừa nhân lên ở động vật có xương sống, vừa nhân lên ở các cơ thể khác: gồm 9 họ. 2). Virut nhân lên ở động vật có xương sống: gồm 11 họ; 3) Virut nhân lên ở động vật không xương sống: gồm 2 họ; 4) Virut chỉ nhân lên ở thực vật: gồm 8 họ; 5) Virut chỉ lên trong tảo, nấm và protozoa: bao gồm 2 họ và 6) Virut chỉ nhân lên trong vi khuẩn: bao gồm 10 họ.

Phân loại các nhóm vi sinh vật trước đây thường dựa vào các hệ thống phân loại truyền thống. Vi khuẩn được phân loại dựa vào Hệ thống phân loại của Bergey. Nấm sợi phân loại theo Hệ thống phân loại nấm mốc (Giáo trình Nấm học CBS –CBS Course of Mycology, Baarn, Delft, 1998). Nấm men phân loại dựa theo Hệ thống phân loại nấm men của J. Lodder (1970). Virut được phân loại theo Hệ thống phân loại của Uỷ ban Quốc tế về phân loại virut (ICTV, 1995),...

Các tiêu chuẩn phân loại vi sinh vật theo các khoá phân loại truyền thống thường dựa vào một số đặc điểm cơ bản:

1. Đặc điểm hình thái dưới kính hiển vi như hình dạng tế bào, kích thước tế bào, cách sắp xếp tế bào, cách sắp xếp tiên mao, màng nhày, khả năng sinh bào tử, cuống sinh bào tử,... và phản ứng nhuộm Gram.
2. Khả năng sinh trưởng như có khả năng phát triển trong nuôi cấy chìm, hình dạng tế bào và khả năng sinh sắc tố (pigment).
3. Đặc điểm sinh hoá như thành phần thành tế bào, tính chất sinh hoá của pigment (sắc tố tan), thể vùi dự trữ, kháng nguyên và đặc điểm phân tử ADN hoặc ARN.
4. Đặc điểm sinh lý như khoảng nhiệt độ sinh trưởng và nhiệt độ tối ưu, mối liên quan đến oxy, khả năng chịu pH, khả năng chịu áp suất thẩm thấu, nhu cầu và khả năng chịu muối và khả năng mãn cảm các chất kháng sinh.
5. Đặc điểm dinh dưỡng như nguồn năng lượng, nguồn cacbon, nguồn nitơ, sản phẩm lên men và phương thức trao đổi chất (tự dưỡng, dị dưỡng, lên men hoặc hô hấp).
6. Đặc điểm di truyền như tỷ lệ G + X của ADN và ARN

Từ năm 1980, Carl Woese (nhà vi sinh vật học người Mỹ) xây dựng khoá phân loại vi sinh vật dựa trên đặc điểm trình tự của gen mã hoá 16S rARN và 18S rARN của các loài vi sinh vật. Hiện nay, bên cạnh các phương pháp phân loại truyền thống, người ta còn dựa vào các khoá phân loại phân tử (trình tự gen mã hoá 16S rARN, 18S rARN; dựa vào trình tự của một số gen đặc hiệu,...) để xác định vị trí phân loại chính xác của các loài vi sinh vật hoặc tìm kiếm các loài vi sinh vật mới.

Theo các nghiên cứu cơ bản, số lượng loài vi sinh vật gây bệnh ít hơn so với số lượng loài vi sinh vật có lợi, nhưng trên thực tế, vi sinh vật có hại đã gây hại rất lớn cho con người. Một số vi sinh vật gây bệnh nguy hiểm đối với sức khỏe cho người không những lây lan qua thực phẩm và nước mà còn lây lan qua không khí, qua tiếp xúc như các virut viêm gan A, virut gây bệnh cúm, bệnh sốt phát ban,... Do vậy, để hiểu rõ các loại vi sinh vật cũng như các tác nhân gây bệnh, cần tham khảo các tài liệu đã công bố để thực hiện phòng ngừa trong công tác nghiên cứu, giảng dạy và ứng dụng trong sản xuất và bảo vệ môi trường.

2.4. BẢO QUẢN CHỦNG GIỐNG VI SINH VẬT

Bảo quản các 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 sản xuất các chất có hoạt tính sinh học ở mức độ công

nghiệp cũng như nghiên cứu trong phòng thí nghiệm. Hoạt tính sinh học của các chủng thường không phụ thuộc nhiều vào điều kiện nuôi cấy mà phụ thuộc nhiều vào việc bảo quản chúng. 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 được chủng có hoạt tính mong muốn, người ta thường sử dụng các phương pháp bảo quản lâu dài các chủng này. Tuy nhiên, tùy theo trang thiết bị và loại vi sinh vật cần bảo quản mà có thể sử dụng một trong các phương pháp khác nhau, mỗi phương pháp đều có ưu nhược điểm riêng, tùy theo hoàn cảnh cụ thể mà chọn phương pháp thích hợp.

2.4.1. Các phương pháp bảo quản

Ngày nay người ta sử dụng nhiều phương pháp bảo quản giống, nhưng phương pháp thường dùng là những phương pháp sau:

a) Đông khô chủng giống

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

– 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 có hiệu quả cao cho bảo quản các đối tượng vi sinh vật khác nhau như nấm sợi, nấm men, vi khuẩn và một số virut. 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): Ngoài phương pháp đông khô như mô tả ở trên, còn có phương pháp đông khô trực tiếp. Khác biệt với phương pháp trên ở chỗ dịch huyền phù vi sinh vật được làm khô nhanh ở chế độ chân không thích hợp mà mẫu không cần làm lạnh từ trước. Phương pháp này đặc biệt có ý nghĩa đối với nhóm vi khuẩn không có khả năng sống trong nhiệt độ thấp của giai đoạn tiền đông. Các thông số quan trọng cần được quan tâm khi thực hiện phương pháp này là: Tuổi của vi sinh vật bảo quản, thành phần dịch huyền phù tế bào vi sinh vật, tốc độ đông khô, nhiệt độ đông khô thấp nhất, khoảng thời gian làm khô mẫu và độ ẩm cuối cùng của mẫu.

Phương pháp này nhanh và thuận lợi cho các đợt bảo quản số lượng lớn mẫu. Thông thường theo phương pháp này, vi sinh vật được bảo quản từ 10-

20 năm. Nói chung, cả hai phương pháp này có nhiều ưu điểm so với các phương pháp trước như thời gian bảo quản lâu, tiết kiệm được công sức, giảm sai sót nhẫn mạc và tạp nhiễm. Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của phương pháp này là giá thành thiết bị. Độ ổn định của các chủng vi sinh vật bảo quản theo các đợt đông khô là khác nhau. Hơn thế nữa, các chủng trước khi đem ra sử dụng phải được hoạt hoá trên môi trường thích hợp một số lần để phục hồi các đặc tính sinh học.

b) *Giữ bào tử trong cát và các loại hạt vô trùng*

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

– Bảo quản trong cát: Cát sông đem rửa sạch bằng nước nhiều lần, sau đó ngâm trong HCl đậm đặc và đun sôi 1–2 giờ, rửa nhiều lần đến trung tính (dùng phenol–phtalein làm chỉ thị màu), sấy khô $100^{\circ}\text{C}/3$ giờ, cho vào ống nghiệm và thanh trùng $130^{\circ}\text{C}/90$ phút. Các chủng vi sinh vật đem nuôi cấy trên môi trường thạch thích hợp để chúng tạo nhiều bào tử (vi khuẩn: 7 ngày; nấm mốc: 7–8 ngày ; xạ khuẩn: 14 ngày). Sau đó trộn bào tử vào cát bằng cách cho 1–2g cát đã vô trùng vào ống giống đã hình thành bào tử, dùng que cấy vô trùng trộn đều bào tử với cát, sau đó cho cát vào ống nghiệm vô trùng, đậy nút bông, giữ ở tủ sấy 40°C hoặc tủ sấy chân không có các chất hút ẩm như CaCl_2 trong 2–3 ngày cho cát thật khô, dung parafin đặc đun nóng chảy phết lên nút bông để tránh hút ẩm trở lại, bảo quản trong phòng mát hoặc tủ lạnh 4°C , thời gian bảo quản trên 1 năm. Giống trước khi dùng cấy ria lên môi trường thạch, chọn các khuẩn lạc điển hình.

– Bảo quản trong hạt vô trùng: Hạt thóc hay hạt lúa mì được ngâm nước sạch, sau đó lấy 1–2g vào ống nghiệm và hấp thanh trùng ở 121°C , kéo dài 30 phút, hạt thóc và hạt lúa mì bị nở ra. Sau đó cấy 1ml giống vi sinh vật lên hạt và nuôi tiếp trong tủ ấm thích hợp đến khi vi sinh vật phát triển sinh bào tử mạnh thì đậy nút bông, được hàn kín bằng parafin đặc và bảo quản trong tủ lạnh nhiệt độ ($+4$ đến $+6^{\circ}\text{C}$). Thời gian bảo quản có thể được 6 tháng.

c) *Bảo quản bào tử trong thạch anh vô trùng*

Cách làm: Thạch anh hoặc silicagen nghiền mịn, kích thước nhỏ hơn 1mm, sau đó xử lý và tiến hành như phương pháp giữ giống trên cát vô trùng.

d) *Giữ chủng cấy trong môi trường thạch có phủ dầu vô trùng*

Phương pháp này được A. Lumière và J. Chevotier đề nghị đầu tiên năm 1914 và hiện nay đang được sử dụng để bảo quản chủng giống vi sinh vật.

Cách làm như sau: Cho môi trường thạch thích hợp vào 1/3 ống nghiệm, thanh trùng ở 121°C, 30 phút, lấy ra, để nghiêng thạch 45° chờ thạch đông, sau đó cấy giống và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp để vi sinh vật phát triển tốt khoảng 1–2 tuần (tuỳ giống). Sau đó đổ parafin lỏng đã thanh trùng (ở 121°C/30 phút, để nguội) vào ống nghiệm dày 2cm và cuối cùng, dùng parafin đặc đun chảy đổ trên nút bông, đem bảo quản.

Phương pháp này có thể bảo quản giống khoảng 12 tháng, đỡ tốn công cấy truyền như phương pháp thạch nghiêng và ít có nguy cơ bị thoái hoá hoặc nhiễm tạp.

e) Bảo quản ở nhiệt độ thấp (+4, +5°C)

Phương pháp này còn được gọi là phương pháp giữ giống trên môi trường thạch nghiêng. Đây là phương pháp khá phổ biến vì rất đơn giản và tiện lợi, tuy nhiên, thời gian giữ giống chỉ nên kéo dài trong 1 tháng, sau đó phải cấy truyền lại trên môi trường mới. Do đó tốn nhiều công sức và dễ bị mất các đặc tính di truyền ban đầu.

Phương pháp này được tiến hành như sau: Sau khi thuần khiết chủng vi sinh vật trên môi trường thạch ở đĩa Petri, chọn các khuẩn lạc điển hình và cấy lên môi trường thạch nghiêng thích hợp, sau đó nuôi cấy 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 truyền lại vào môi trường mới. Nên cho thêm vào môi trường 0,1M xitrat natri để chống nhiễm thể thực khuẩn (bacteriophage); thêm vào môi trường 1% dầu thực vật như dầu lạc, dầu dừa.

f) Bảo quản trong nitơ 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°C đến -80°C).

Với phương pháp này, tế bào có thể bị vỡ trong quá trình làm lạnh và làm tan mẫu. Một nguyên nhân dẫn đến làm vỡ tế bào là việc tích luỹ 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 đã bổ sung các chất làm hạn chế tốc độ lạnh sâu và làm tan nhanh như glyxerin, DMSO (dimetyl sunfoxid). Việc bảo quản theo phương pháp lạnh sâu này được thực hiện ở các thang nhiệt độ khác nhau. Nói chung mức nhiệt độ cao hơn -30°C cho

hiệu quả thấp do tế bào chịu nồng độ muối cao sinh ra từ các chất điện giải. Phương pháp bảo quản này có hiệu quả với nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau như nấm sợi, nấm men, vi khuẩn, xạ khuẩn và virut.

Đặc biệt, phương pháp bảo quản lạnh sâu trong nitơ lỏng là phương pháp vạn năng hơn cả. Phương pháp này thích hợp với nhiều đối tượng vi sinh vật khác nhau như vi khuẩn, nấm sợi, nấm men, virut, tảo và cả các dòng tế bào động vật. Tuy nhiên, phương pháp này cũng bộc lộ một số nhược điểm như đầu tư kinh phí cho thiết bị và điện, nitơ lỏng hoắc rủi ro như cháy nổ,... Đặc biệt phương pháp này không thích hợp với các chủng vi sinh vật thường xuyên dùng đến. Nói chung, phương pháp này thường được dùng với các chủng vi sinh vật có những đặc tính quý mà không thích hợp với phương pháp đông khô.

Ngoài các phương pháp trên, hiện nay có một phương pháp cũng dễ áp dụng và thuận tiện cho việc sử dụng là bảo quản tế bào sinh dưỡng hay bào tử huyền phù trong môi trường dịch thể có bổ sung thêm một lượng glyxerin vô trùng bằng lượng nước huyền phù và bảo quản trong lạnh.

Trong các phương pháp trên, thì phương pháp đông khô là phương pháp bảo quản được chủng không thay đổi tính chất sinh lý, sinh hoá cũng như khả năng sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học tốt nhất. Bằng phương pháp đông khô, vi khuẩn có thể bảo quản được 16–18 năm; bào tử nấm có thể bảo quản được 10 năm không bị thay đổi tính chất cơ bản của chúng.

2.4.2. Kiểm tra chất lượng chủng vi sinh vật bảo quản

a) Kiểm tra độ sống sót của giống

– Môi trường để kiểm tra: Dùng môi trường nuôi cấy chọn lọc làm môi trường để kiểm tra. Môi trường được pha chế theo thứ tự các hoá chất trong thành phần đã cho. Sau đó phân phổi vào các dụng cụ thuỷ tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở những điều kiện phù hợp. Để nguội môi trường đến 45–50°C rồi phân phổi vào các đĩa Petri vô trùng. Thao tác này được thực hiện trong điều kiện vô trùng.

– Dịch pha loãng: Nước muối sinh lý (NaCl 0,85%), không chứa các hợp chất nitơ, sau khi khử trùng có độ pH là 7,0. Phân phổi dịch pha loãng vào các ống nghiệm có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi khử trùng, mỗi ống nghiệm chứa 9ml. Làm nút bông và khử trùng ở 1 atmopthe (121°C) trong 30 phút. Nếu chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4–10°C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị. Để tránh làm ảnh hưởng đến các vi sinh vật

do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nên điều chỉnh nhiệt độ của dịch pha loãng đến nhiệt độ phòng thử nghiệm trước khi sử dụng.

– Chuẩn bị dịch huyền phù tế bào (suspension):

Lấy ống giống bảo quản cân kiểm tra ra khỏi nơi bảo quản (bình nitơ lỏng, tủ lạnh,...) và nếu bảo quản ở nhiệt độ lạnh để ấm lên tự nhiên (trong điều kiện phòng thử nghiệm). Lau bên ngoài của ống nghiệm hoặc ampul bằng gạc vô trùng có thấm etanol 70% (V/V), đặc biệt chú ý đến vùng giữa nút và thân ống. Mở nút ống nghiệm trong điều kiện vô trùng. Dùng bơm tiêm đã vô trùng hút 1ml dịch huyền phù trong ống nghiệm cho vào 9 ml dịch pha loãng, tránh chạm bơm tiêm vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần, hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5 đến 10 giây. Lặp lại các thao tác này để thu được dịch pha loãng $10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$.

Cấy mẫu: dùng pipet vô trùng lấy từ dịch mẫu pha loãng một lượng 0,05 ml mẫu (1 giọt) cấy vào 1 đĩa Petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (tuỳ thuộc từng loại vi sinh vật). Mỗi mẫu pha loãng được cấy vào 3 đĩa Petri (mỗi độ pha loãng sử dụng 1 pipet vô trùng riêng). Dùng que gạt vô trùng gạt đều dịch mẫu trên bề mặt thạch, đợi khô bề mặt thạch, úp ngược đĩa Petri, để trong tủ ấm với nhiệt độ và thời gian thích hợp. Đếm số lượng khuẩn lạc đặc trưng của mẫu giống vi sinh vật trên mỗi đĩa Petri.

Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra (ml) được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + n_2 \cdot 10^{-1} + \dots + n_n \cdot 10^{-(n-1)}) \cdot m}$$

Trong đó:

N : Số lượng tế bào/ ml

$\sum C$: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa Petri;

n_1 : Số khuẩn lạc trong đĩa Petri ở tỷ lệ pha loãng lần 1;

n_2 : Số khuẩn lạc trong đĩa Petri ở tỷ lệ pha loãng lần 2;

n_n : Số khuẩn lạc trong đĩa Petri ở tỷ lệ pha loãng lần n;

m : Thể tích dịch cho vào (ml).

Ghi chú: Số lượng khuẩn lạc trung bình được tính là trung bình cộng số khuẩn lạc của các đĩa Petri được cấy từ cùng một độ pha loãng, trong đó chỉ tính các đĩa Petri chứa từ 30–300 khuẩn lạc. Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính là trung bình cộng số lượng khuẩn lạc của các đĩa Petri được cấy từ hai độ pha

loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình cộng ở mỗi độ pha loãng, trong đó số khuẩn lạc ở độ pha loãng cao hơn được nhân với 10, sau đó lấy trung bình cộng của hai giá trị trên nếu tỷ số giữa giá trị lớn và giá trị nhỏ không lớn hơn 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả. Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số giữa 1,00 và 9,99 nhân với 10^n , n là số mũ thích hợp.

Độ sống sót của chủng giống vi sinh vật:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{\text{số lượng tế bào sống}}{\text{số lượng tế bào giống gốc khi bảo quản}} \times 100$$

b) Xác định đặc tính sinh học

Tiến hành theo những phương pháp cụ thể phụ thuộc vào đặc tính sinh học của từng chủng vi sinh vật.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 2

1. Nhóm cơ thể vi sinh vật nhân sơ, nhưng màng tế bào chất bao gồm các chuỗi hydrocacbon phân nhánh gắn với glycerol bằng liên kết ete và thành tế bào không chứa peptidoglycan và thường sống trong môi trường khắc nghiệt gọi là gì ?
2. Các chủng vi khuẩn Gram dương có màu gì sau khi nhuộm Gram?
3. Hãy chỉ rõ thành phần nào của thành tế bào vi khuẩn Gram âm có chức năng bán thấm, ngăn ngừa một số chất độc gây hại cho tế bào như lysozym và penicillin G đi vào trong tế bào, hơn nữa lipopolysaccharit (LPS) của nó cũng mang chức năng như là nội độc tố?
4. Một cơ thể không có màng nhân, ADN của chromoxom dạng vòng, riboxom là 70S, màng tế bào không có sterol và có khả năng quang hợp. Đó là loại vi khuẩn nào?
5. Trước đây, xạ khuẩn (Actinomycetales) được xếp vào nhóm nấm (cơ thể nhân thật), do chúng có hình dạng bên ngoài dạng sợi (khuẩn ty) giống như nấm sợi. Vì lý do nào mà người ta lại xếp xạ khuẩn vào nhóm cơ thể nhân sơ?
6. Nhiều vi khuẩn lam có giá trị dinh dưỡng cao, có hoạt chất có giá trị trong y học. Loại vi khuẩn lam nào có khả năng phát triển nhanh trong điều kiện môi trường pH rất cao để sản xuất các sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao ở mức độ công nghiệp?
7. Nấm men (yeast) thường là cơ thể đơn bào, sinh sản bằng phương pháp phân cắt và nảy chồi thuộc nhóm vi sinh vật nhân thật nào?

8. Nhóm vi sinh vật, mà màng tế bào bao gồm các chuỗi axit béo thẳng gắn với glycerol bằng liên kết ester và nếu có thành tế bào, thì thành tế bào không chứa peptidoglycan, nhóm này thuộc nhóm vi sinh vật nào?
9. Đặc điểm nào sau đây **không** phải của vi khuẩn: Là cơ thể đơn bào hoặc đa bào và nhân của tế bào có màng nhân; Hình dạng cơ bản nhất là hình que, hình cầu và hình xoắn; Hầu hết có thành tế bào chứa peptidoglycan; Sinh sản bằng cách phân đôi tế bào và chúng có thể có tiền mao và có thể sử dụng rất nhiều chất hóa học để dinh dưỡng ?
10. Nhóm vi sinh vật nhân sơ có màng tế bào bao gồm các chuỗi axit béo thẳng, gắn với glycerol bằng liên kết ester và trong thành tế bào có chứa peptidoglycan. Chúng thuộc nhóm vi sinh vật nào sau đây: Cổ khuẩn, vi khuẩn, vi nấm hay động vật nguyên sinh?
11. Chức năng nào sau đây **không** phải chức năng của bao nhày ở vi khuẩn: Bảo vệ tế bào vi khuẩn tránh khô hạn và thực bào, dự trữ thức ăn cho vi khuẩn; Tích luỹ một số sản phẩm trao đổi chất và giúp tế bào bám vào mặt một số giá thể?
12. Một cơ thể không có màng nhân, ADN của chromoxom dạng vòng, không có khả năng gây nội độc tố, màng tế bào không có sterol và riboxom không phải là 80S. Đó là loại vi sinh vật nào sau đây: Động vật nguyên sinh; Nấm men; Cổ khuẩn hay Nấm sợi?
13. Cơ thể là tế bào nhân sơ (procaryotic) mà màng tế bào của chúng có các chuỗi hydrocarbon gắn với glycerol bằng liên kết ete, thành tế bào không chứa peptidoglycan (murein) và thường sống trong các môi trường cực đoan (ví dụ như nhiệt độ cao, độ mặn cao, độ kiềm cao,...), cơ thể này thuộc loại nào?
14. Trước đây nhóm vi khuẩn lam được gọi là tảo lam hay tảo lục, vì những lý do nào sau đây: Thành tế bào có peptidoglycan; Tế bào có lục lạp, thành tế bào không có peptidoglycan hay tế bào có nhân chuẩn mà chúng được xếp vào nhóm sinh vật nhân sơ?
15. Nấm men phân bố rộng rãi trong tự nhiên, nhất là trong các môi trường có chứa đường, có pH thấp như hoa quả, rau dưa, mật mía, rỉ đường và nhiều loại sống trong đất, chúng luôn ở trạng thái đơn bào hay đa bào?

Chương 3

KỸ THUẬT TẠO CHỦNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP

3.1. MỘT SỐ KHÁI NIỆM CHUNG VỀ VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP

Chủng vi sinh vật tái tổ hợp là những 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 cài gắn thêm một hoặc một số gen từ các loài sinh vật khác (vi sinh vật, thực vật, động vật hoặc con người) tạo nên các chủng vi sinh vật tái tổ hợp. Các chủng vi sinh vật tái tổ hợp thường được loại bỏ một số gen độc, gen có hại, được tạo dòng thuần có độ ổn định cao và lâu dài.

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

– Ứng dụng trong công nghiệp: sản xuất enzym (proteaza, amylaza,...); sản xuất axit hữu cơ (axit lactic, axit axetic,...); sản xuất cồn và nhiên liệu sinh học,...

– Ứng dụng trong y học bảo vệ sức khỏe con người: nhiều chủng vi khuẩn và vi nấm tái tổ hợp được sử dụng để sản xuất các protein dược liệu sử dụng trong điều trị bệnh cho con người (Insulin, Interferon, Factor VIII, Erythropoetin,...). Một số chủng virut tái tổ hợp được sử dụng trong sản xuất vacxin, hoặc làm vectơ liệu pháp gen trong điều trị bệnh cho con người...

– Ứng dụng trong nghiên cứu cơ bản: nhiều chủng vi sinh vật tái tổ hợp được sử dụng trong tách dòng gen, biểu hiện gen (ví dụ, chủng *E. coli* DH 5α, *E. coli* BL21, nấm men,...), sử dụng trong thiết lập các ngân hàng hàng gen,...

– Ứng dụng trong kỹ thuật chuyển gen tạo các giống vật nuôi cây trồng mới. Ví dụ: chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (CV58, CV59, CV.WC156, CV.UC82,...), được sử dụng để chuyển các gen khác nhau vào nhiều loài 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 enzym phân giải các chất hữu cơ mạnh, được sử dụng tạo chế phẩm xử lý phế thải rắn, nước thải, nước ao nuôi thuỷ sản có hiệu quả cao, góp phần làm giảm thiểu ô nhiễm môi trường, đồng thời tăng giá trị gia tăng của sản xuất nông nghiệp.

3.2. KỸ THUẬT TẠO CHỦNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP

Trong công nghệ sinh học hiện đại nói chung và công nghệ vi sinh nói riêng, vấn đề tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp và định hướng ứng dụng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp trong thực tiễn là khâu then chốt, giữ vị trí quan trọng trong quyết định thành quả của công nghệ vi sinh.

Năm 1978, công ty Genetech đã thành công tạo chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang gen mã hoá insulin người, mở đầu cho kỷ nguyên sản xuất các protein tái tổ hợp nhờ vi sinh vật biến đổi gen. Đến nay, đã có hàng trăm chế phẩm protein, enzym được sản xuất nhờ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, trong đó có hơn 50 chế phẩm được phép sử dụng ở Mỹ và châu Âu. Các chế phẩm protein tái tổ hợp như interferon, interleukin, hormon, enzym, vacxin tái tổ hợp,... ngày càng được ứng dụng rộng rãi, phục vụ điều trị nhiều loại bệnh cho con người, hoặc ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp, mang lại lợi ích cho con người.

Các chủng vi sinh vật tái tổ hợp được tạo nên từ các nguồn vật liệu khác nhau (vi khuẩn, vi nấm hoặc virut) mang tính đặc trưng riêng, đòi hỏi các điều kiện nuôi cấy và kỹ thuật phù hợp nhất định. Về cơ bản, kỹ thuật tạo các chủng vi sinh vật tái tổ hợp gồm các bước sau:

3.2.1. Xác định và tách chiết gen đích

Mỗi chủng vi sinh vật tái tổ hợp được cài gắn thêm một hoặc một số gen đích khác nhau, tùy theo mục đích của con người. Xác định chính xác nguồn vật liệu mang gen đích (thường là các gen mã hoá các protein cần thiết cho con người) để tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp, là bước khởi đầu quan trọng giúp con người tách chiết được đúng gen đích cần thiết. Ví dụ: để có gen đích mã hoá protein tinh thể diệt côn trùng, nhằm tạo chủng vi khuẩn *E. coli* hoặc vi khuẩn *Bacillus* tái tổ hợp làm thuốc trừ sâu, trừ muỗi sinh học,... cần phải xác định và tách chiết và tinh sạch từng loại gen Cry (I, II, IV,...) từ các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Để sản xuất insulin người, cần phải tách gen mã hoá insulin từ các tế bào beta của tuyến tụy ở người; để tách gen mã hoá Interleukin-2 người cần tách gen đích từ các tế bào lách người,...

Để có thể tách chiết chính xác các gen đích, cần phải sử dụng một số kỹ thuật phân tử đặc trưng riêng khác nhau. Đối với các gen đích tách chiết từ vi khuẩn, có thể sử dụng kỹ thuật nhân gen PCR với các cặp mồi đặc hiệu để nhân gen đích cần thiết. Ngược lại, các gen đích tách chiết từ các tế bào sinh

vật bậc cao, cần sử dụng kỹ thuật phiên mã ngược để tạo các đoạn cADN từ các ARN thông tin hoặc phân lập gen đích bằng kỹ thuật RT-PCR.

3.2.2. Lựa chọn loại vectơ tách dòng

Căn cứ vào đặc điểm đặc trưng, nguồn gốc, kích thước của gen đích và loại tế bào chủ để lựa chọn loại vectơ tách dòng phù hợp. Có nhiều loại vectơ tách dòng khác nhau, mỗi loại vectơ tách dòng cho phép cài gắn thêm các gen đích có kích thước nhất định. Một số loại vectơ tách dòng thường sử dụng và kích thước gen đích có thể cài gắn:

Loại vectơ tách dòng	Kích thước đoạn gen đích có thể cài gắn
Plasmid	1–5 kb
Phage	15–25 kb
Phagemid	20–10 kb
Cosmid	30–50 kb
BAC (thiết kế từ một phần ADN <i>E. coli</i> và các plasmid)	100–300 kb
TAC (thiết kế từ một phần đoạn vir gen của Ti-plasmid)	100–300 kb
BiBAC (thiết kế từ một phần ADN bộ gen <i>Agrobacterium</i>)	100–500 kb
PAC (bộ gen của phage P1 + plasmid)	100–300 kb
YAC (thiết kế từ một phần ADN bộ gen của nấm men)	2. 000 kb
Viral vecto: Adenoviral vecto, Retroviral vecto, AAV...	

Trong sản xuất các chất hoạt tính sinh học phục vụ con người nhờ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, người ta thường lựa chọn vectơ tách dòng là các plasmid hoặc thể thực khuẩn (phage).

3.2.3. Tạo vectơ tái tổ hợp

Sau khi đã tách chiết được gen đích và lựa chọn vectơ tách dòng phù hợp, dựa vào đặc trưng cơ bản của gen đích và vectơ tách dòng để lựa chọn các loại enzym giới hạn thích hợp. Thực hiện các kỹ thuật phân tử thông dụng trong phòng thí nghiệm, làm cho gen đích được nối với vectơ tách dòng tạo nên các vectơ tái tổ hợp. Tạo vectơ tái tổ hợp có thể thực hiện theo các bước chủ yếu sau:

– Chuẩn bị nguyên liệu: Gen đích đã tinh sạch cần được nhân gen bằng PCR, để có một hàm lượng sản phẩm PCR đủ lớn cho các thí nghiệm (thông thường thực hiện PCR với khoảng 20 – 25 chu kỳ). Sử dụng các loại enzym giới hạn phù hợp để cắt mở vòng các vectơ tách dòng phù hợp (ví dụ, pBR 322, pBluescript, pUC18,...).

– Thực hiện phản ứng nối gen đích với vectơ tách dòng: chuẩn bị thành phần phản ứng phù hợp với mỗi loại vectơ tách dòng. Ví dụ: sử dụng vectơ tách dòng là pBluescript (hoặc pUC 18) có thể chuẩn bị hỗn hợp phản ứng gồm các thành phần: 1,0 μ l đệm phản ứng; 0,5 μ l ATP 10mM; 1,0 μ l enzym T4 ADN ligaza; 1,0 μ l vectơ pBluescript (pUC18); 5,0 μ l sản phẩm PCR gen đích; 1,5 μ l H₂O khử ion.

Hỗn hợp các thành phần phản ứng được ủ qua đêm ở nhiệt độ 16°C. Sau đó, tiến hành điện di với thang ADN chuẩn để kiểm tra kết quả tạo vectơ tái tổ hợp. Vectơ tái tổ hợp tạo được cất giữ trong tủ lạnh sâu ở -80°C đến -85°C để tiếp tục các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.4. Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào vi sinh vật để tạo chủng tái tổ hợp

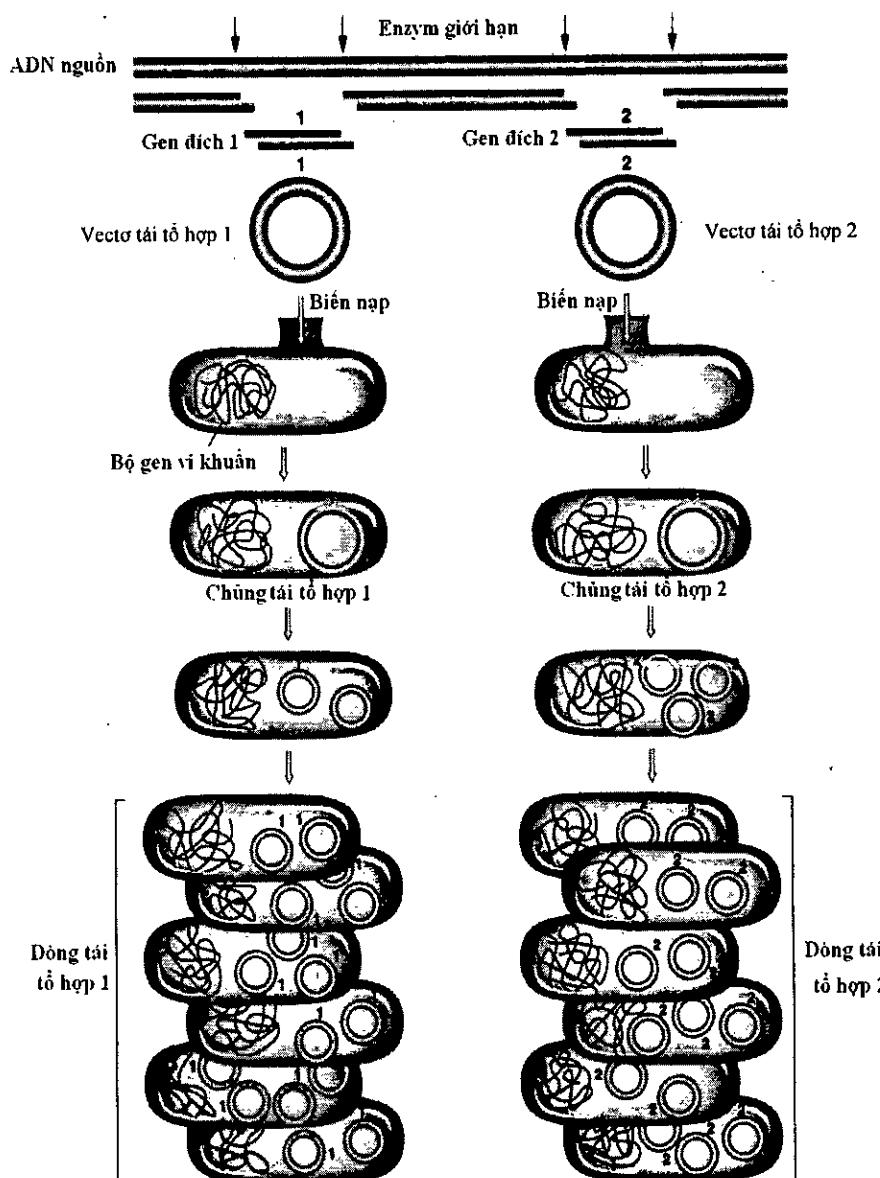
Tùy thuộc mục đích nghiên cứu và sử dụng của con người, các chủng vi sinh vật tái tổ hợp khác nhau được sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau: sản xuất protein, enzym tái tổ hợp hoặc làm vectơ chuyển gen. Để tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp ứng dụng trong sản xuất các protein tái tổ hợp, các chất hoạt tính sinh học hoặc protein dược liệu (insulin, IL-2, hormon sinh trưởng người,...), người ta sử dụng chủng các vi khuẩn *E. coli* BL 21, nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*,... tạo nên các dòng vi sinh vật tái tổ hợp mang gen người. Ngược lại, để phục vụ mục đích nghiên cứu, tách dòng gen, chuyển gen,... người ta sử dụng chủng *E. coli* DH 5α,...

Hiệu quả biến nạp vectơ tái tổ hợp tùy thuộc vào kích thước của vectơ, loại tế bào chủ và kỹ thuật biến nạp. Có thể sử dụng kỹ thuật biến nạp là sốc nhiệt, siêu âm, điện xung,... để biến nạp tạo các chủng vi khuẩn tái tổ hợp. Để biến nạp vectơ tái tổ hợp vào nấm men, nấm sợi, có thể sử dụng kỹ thuật điện xung hoặc bắn gen,... Trong phạm vi giáo trình này, chúng tôi giới thiệu 2 kỹ thuật biến nạp được sử dụng phổ biến trong công nghệ tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp là kỹ thuật sốc nhiệt và kỹ thuật điện xung.

a) Kỹ thuật biến nạp bằng sốc nhiệt ở vi khuẩn *E. coli*

Tạo dòng vi sinh vật tái tổ hợp với vi khuẩn *E. coli*, có thể sử dụng các chủng *E. coli* khác nhau (DH5α, LE 392, MC 1061, BL 21,...) tùy theo mục đích nghiên cứu và sử dụng của con người. Kỹ thuật biến nạp trên các tế bào vi khuẩn *E. coli* có sử dụng CaCl₂ nồng độ cao và sốc nhiệt được Mandel và Hinga phát hiện năm 1970. Sau đó, kỹ thuật biến nạp bằng sốc nhiệt được

hoàn thiện bởi nhiều tác giả và được sử dụng có hiệu quả ở nhiều phòng thí nghiệm khác nhau. Biến nạp các vectơ tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* bằng phương pháp súc nhiệt, gồm 2 giai đoạn chính là chuẩn bị tế bào khả biến và thực hiện kỹ thuật biến nạp.



Hình 3.1. Sơ đồ kỹ thuật tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp

– Chuẩn bị tế bào khả biến:

Tế bào *E. coli* (DH5 α , LE 392, MC 1061, BL 21,...) được nuôi cấy trên môi trường thạch LB (5% cao nấm men, 10% trypton, 10% NaCl). Lấy 1 khuẩn lạc *E. coli* vào môi 5ml môi trường LB lỏng, nuôi ở 37°C, lắc với tốc độ 200 vòng / phút trong 12 – 16 giờ. Lấy 1ml dịch vi khuẩn + 99ml môi trường LB nuôi lắc 2 – 3 giờ, khi kiểm tra mật độ tế bào bằng quang phổ kế có chỉ số OD600 đạt 0,4 – 0,6 là phù hợp. Lấy dịch nuôi cấy để lên đá lạnh trong 1,0 – 1,5 giờ, sau đó thực hiện ly tâm lạnh ở tốc độ 4.500 – 5.000 vòng trong 8 – 10 phút để thu cặn tế bào.

Hoà cặn tế bào trong 100ml CaCl₂ 100mM lạnh, để trên khay đá 15 phút và tiến hành ly tâm lạnh thu cặn tế bào. Cặn tế bào hòa trong 40ml CaCl₂ 100mM lạnh, để 1 giờ trên đá lạnh, sau đó ly tâm thu cặn tế bào với tốc độ 4.000 vòng trong 10 phút, thêm 500μl CaCl₂ 100mM lạnh, có chứa 15% glycerol vào cặn tế bào để thu nhận các tế bào khả biến (các tế bào vi khuẩn có khả năng biến nạp). Lấy vào mỗi ống Eppendorf 50μl tế bào khả biến, giữ trong tủ lạnh sâu ở nhiệt độ -75°C đến -80°C để thực hiện biến nạp.

– Thực hiện kỹ thuật biến nạp :

Lấy 50μl tế bào khả biến đang giữ trong ống Eppendorf ở nhiệt độ -75°C đến -80°C (trong tủ lạnh sâu) để trên đá lạnh khoảng 15 phút, sau đó thêm 0,5ng vectơ tái tổ hợp (ADN), đảo nhẹ ống 3 – 4 lần và để trên đá khoảng 15 – 20 phút.

Thực hiện kỹ thuật sốc nhiệt: Lấy mẫu đặt vào bể ổn nhiệt có nhiệt độ 42°C trong 2 phút, đặt nhanh lên đá lạnh 2 phút. Sau đó thêm khoảng 1.000μl môi trường LB lạnh, nuôi trong 37°C ở máy lắc trong 30 – 60 phút. Lấy 100μl dịch tế bào đã sốc nhiệt, trải lên hộp Petri có môi trường LB 2% thạch (aga) có bổ sung ampicillin với nồng độ 50μg/ml, IPTG và X-gal. Ủ hộp Petri ở 37°C trong 12 – 16 giờ, kiểm tra các khuẩn lạc phát triển trên hộp Petri. Thu nhận khuẩn trắng, cấy vào môi trường lỏng để kiểm tra kết quả.

Biến nạp *E. coli* bằng kỹ thuật sốc nhiệt có hiệu quả khoảng 1/10.000. Sàng lọc các tế bào mang vectơ tái tổ hợp, chuyển sang ống thạch nghiêng để giữ chủng *E. coli* tái tổ hợp.

b) Kỹ thuật biến nạp bằng điện xung ở nấm men

– Chuẩn bị tế bào khả biến:

Lấy 1 khuân lạc nấm men cho vào 5ml môi trường YPD (1% cao nấm men, 2% pepton, 2% glucozơ), nuôi ở 28°C với tốc độ lắc 250 vòng/phút trong 1 ngày đêm. Lấy 30µl dịch nuôi cấy vào 100ml YPD, lắc 16 – 18 giờ, đo chỉ số mật độ quang OD 600 để xác định mật độ tế bào, chỉ số OD thích hợp khoảng 1,3 đến 1,5. Đặt dung dịch mẫu trên đá lạnh 5 – 10 phút, ly tâm với tốc độ 4.500 – 5.000 vòng trong 5 phút, thu cặn tế bào hoà trong 100ml nước khử ion lạnh. Sau đó, ly tâm thu cặn tế bào. Hoà cặn tế bào trong 20ml sorbitol 1M và thực hiện ly tâm 4.500 vòng trong 5 phút để thu cặn tế bào. Hoà cặn tế bào với 0,2ml sorbitol, chia đều mỗi ống Eppendorf 50µl dịch tế bào khả biến giữ trong tủ lạnh sâu –75°C đến –80°C.

– Thực hiện kỹ thuật điện xung:

Lấy 50µl dịch tế bào khả biến trong ống Eppendorf đang được cất giữ trong tủ lạnh sâu, thêm vào 10 – 15µg vectơ tái tổ hợp (ADN), trộn đều và chuyển vào cuvet xung điện 0,2cm. Thực hiện điện xung ở chế độ 0,25µF, 200Ω, 1,5kV trong 4 – 5 phần nghìn giây. Sau điện xung, thêm 1ml sorbitol 1M lạnh, đảo đều, chuyển sang ống mới, cấy lên môi trường thạch đĩa để kiểm tra kết quả biến nạp. Hiệu quả biến nạp bằng xung điện tương đối cao (khoảng 1%).

3.2.5. Chọn lọc và tạo dòng vi sinh vật tái tổ hợp

Sau khi thực hiện kỹ thuật biến nạp, cần nuôi cấy các tế bào đã biến nạp ở môi trường dinh dưỡng thuận lợi, căn cứ vào các gen chỉ thị đã có trong vectơ tái tổ hợp để sàng lọc các chủng mang vectơ tái tổ hợp. Sử dụng kỹ thuật phân tử để kiểm tra sự có mặt của gen đích trong các chủng tái tổ hợp và thực hiện quá trình nhân sinh khối trong các thiết bị lên men để tạo sinh khối và thu các chất hoạt tính sinh học.

Dòng tế bào vi sinh vật tái tổ hợp bao gồm các tế bào mang vectơ tái tổ hợp, được nuôi ở môi trường thích hợp tạo thành các khuân lạc. Tuỳ theo đặc điểm của gen chỉ thị (marker) có trong vectơ tái tổ hợp, có thể lựa chọn các tế bào tái tổ hợp theo nhiều phương pháp khác nhau: sử dụng chỉ thị kháng sinh, sử dụng chỉ thị màu hoặc lai phân tử với mẫu dò đánh dấu phóng xạ, huỳnh quang...

a) Sàng lọc dòng tế bào tái tổ hợp bằng chỉ thị kháng sinh

Chọn lọc dòng tái tổ hợp bằng chỉ thị kháng sinh là phương pháp đơn giản và dễ sử dụng. Do hiệu quả biến nạp thường rất thấp, nên sau khi biến nạp, cần phải chọn lọc được các tế bào mang vectơ tái tổ hợp.

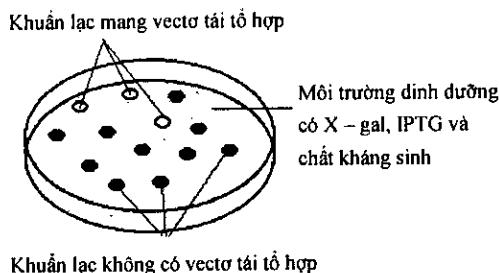
Dựa vào gen kháng chất kháng sinh được làm gen chỉ thị đã cài trong vectơ tái tổ hợp, để chuẩn bị môi trường dinh dưỡng có bổ sung chất kháng sinh tương ứng nuôi cấy các tế bào sau biến nạp. Trong môi trường có chất kháng sinh, các tế bào chứa vectơ tái tổ hợp có gen kháng chất kháng sinh tồn tại và phát triển được, những tế bào không có vectơ tái tổ hợp không phát triển được. Tuỳ theo loại vectơ tách dòng được sử dụng mang gen kháng ampicillin (am^R), tetracyclin (te^R) hoặc gentamycin có thể bổ sung ampicillin, tetracyclin hoặc gentamycin vào môi trường nuôi cấy sau biến nạp với hàm lượng thích hợp. Từ các khuẩn lạc phát triển được trong môi trường có chất kháng sinh, có thể lựa chọn được các dòng tái tổ hợp.

Phương pháp sàng lọc sử dụng chỉ thị kháng sinh thường có hiệu quả không cao, do một số tế bào không mang vectơ tái tổ hợp vẫn có thể phát triển được do có các đột biến kháng chất kháng sinh. Để đảm bảo hiệu quả sàng lọc chuẩn xác, thường kết hợp sử dụng chỉ thị hai loại kháng sinh, hoặc đồng thời sử dụng gen chỉ thị kháng sinh cùng với các gen chỉ thị màu, chỉ thị enzym,...

b) Sàng lọc dòng tế bào tái tổ hợp bằng gen chỉ thị màu

Sử dụng chỉ gen chỉ thị màu kết hợp với gen chỉ thị kháng sinh là phương pháp chọn lọc dòng tái tổ hợp có hiệu quả cao. Kỹ thuật sàng lọc tế bào tái tổ hợp ở tế bào vi khuẩn thường sử dụng gen chỉ thị màu gen LacZ. Gen LacZ là gen chỉ thị màu hiệu quả cao, dễ nhận biết dòng tái tổ hợp nhờ màu sắc của khuẩn lạc, được sử dụng nhiều trong kỹ thuật gen.

Gen LacZ mã hoá enzym β -galactosidaza của vi khuẩn *E. coli*, khi môi trường có chất cảm ứng IPTG (isopropyl thiogalactosid – chất đồng đẳng của đường lactozơ), enzym β -galactosidaza được tổng hợp trong tế bào *E. coli*. Nếu môi trường đồng thời có X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid), enzym β -galactosidaza tạo thành sê thực hiện phản ứng thuỷ phân X-gal (không màu) tạo thành một phức chất có màu xanh. Do đó, ở môi trường nuôi cấy vi khuẩn, sau khi biến nạp có bổ sung X-gal và chất cảm ứng IPTG, các tế bào vi khuẩn có gen LacZ nguyên vẹn (không tạo vectơ tái tổ hợp) tổng hợp enzym β -galactosidaza phân huỷ X-gal, các tế bào này phát triển thành khuẩn lạc có màu xanh.

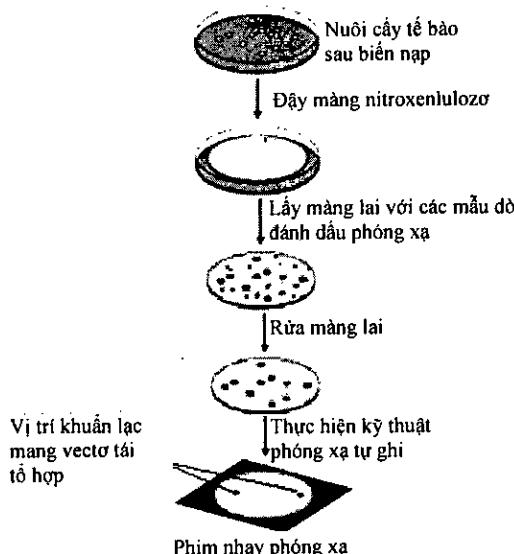


Hình 3.2. Sàng lọc dòng tái tổ hợp bằng màu sắc khuẩn lạc

Khi gen đích được cài gắn vào giữa gen LacZ (tạo vectơ tái tổ hợp) làm cho gen LacZ mất hoạt tính, enzym β -galactosidaza không được tổng hợp, tế bào vi khuẩn phát triển thành các khuẩn lạc có màu trắng. Lựa chọn các khuẩn lạc có màu trắng, cấy truyền vào môi trường dinh dưỡng có thạch, thu nhận được các dòng tế bào mang vectơ tái tổ hợp.

c) Sàng lọc dòng tế bào tái tổ hợp bằng lai phân tử

Phương pháp lai phân tử là một trong những phương pháp chọn lọc dòng tái tổ hợp có hiệu quả cao. Tuỳ theo điều kiện nghiên cứu, có thể sử dụng phương pháp lai axit nucleic (ADN, ARN) với mẫu dò đánh dấu phóng xạ hoặc đánh dấu huỳnh quang (mẫu dò là các đoạn oligo nucleotit được đánh dấu phóng xạ, hoặc huỳnh quang). Có thể thực hiện kỹ thuật sàng lọc bằng lai phân tử theo các bước thực hiện chủ yếu sau:



Hình 3.3. Sàng lọc dòng tái tổ hợp bằng lai phân tử

– Sau khi biến nạp, các tế bào vi khuẩn (hoặc nấm men) được nuôi cấy ở hộp Petri ở môi trường có 2% agar, đặt trong tủ âm với nhiệt độ và thời gian thích hợp. Khi mỗi tế bào phát triển thành một khuẩn lạc riêng rẽ, đặt một màng lai (nitrocellulose) lên trên hộp Petri, để các khuẩn lạc in dấu lên màng lai ở các vị trí tương ứng.

– Lấy màng lai đã in dấu các khuẩn lạc vi khuẩn sau biến nạp, đem lai phân tử với mẫu dò đánh dấu phóng xạ (hoặc huỳnh quang). Các mẫu dò đã biết trước trình tự, và có trình tự tương ứng với đoạn đặc hiệu của gen đích trong các tế bào tái tổ hợp.

– Tạo nhiệt độ lai và thời gian thích hợp để thực hiện phản ứng lai. Rửa màng lai để loại bỏ các mẫu dò không được lai và thực hiện kỹ thuật phóng xạ tự ghi.

Kết quả hiện hình phóng xạ cho thấy, ở những vị trí có phản ứng lai sẽ có các chấm đen trên phim nhạy phóng xạ, hoặc các vết màu khi hiện hình huỳnh quang. Lựa chọn các khuẩn lạc ở các vị trí tương ứng trong hộp Petri thu được các dòng tái tổ hợp.

3.2.6. Thu nhận sản phẩm tái tổ hợp

Căn cứ vào mục đích của con người và sản phẩm tạo thành của các chủng vi sinh vật tái tổ hợp là sản phẩm ngoại bào hoặc nội bào, lựa chọn các kỹ thuật ly tâm và tách chiết phù hợp để thu nhận và tinh sạch các chất hoạt tính sinh học. Các loại chất hoạt tính sinh học phần lớn có bản chất protein, có các đặc điểm đặc trưng riêng. Do vậy, công nghệ sản xuất mỗi loại chất hoạt tính sinh học có các đặc điểm đặc trưng riêng, tùy thuộc loại tế bào vi sinh vật tái tổ hợp được sử dụng làm tế bào chủ để sinh tổng hợp chất hoạt tính sinh học. Sau khi thu nhận và tinh sạch các chất hoạt tính sinh học từ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, cần kiểm tra độ tinh sạch, độc tố, tạp chất và kiểm tra tác dụng theo đúng các quy định hiện hành, trước khi đưa sản phẩm ra thương mại hoá.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 3

1. Thế nào chủng vi sinh vật tái tổ hợp?
2. Mục đích của việc tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp là gì?
3. Trong công nghiệp sản xuất enzym, sản xuất axit hữu cơ, sản xuất cồn và nhiên liệu sinh học, người ta tạo các chủng tái tổ hợp nhằm mục đích gì?

4. Về kỹ thuật, quá trình tạo chủng tái tổ hợp tạo các chủng vi sinh vật tái tổ hợp gồm mấy bước? Kể tên các bước.
5. Gen đích là gì?
6. Cho ví dụ một gen đích.
7. Người ta thường lựa chọn loại vectơ nào để tách dòng gen?
8. Để có hàm lượng gen đích đủ lớn cho các thí nghiệm, người ta thường phải nhân lên bằng PCR với bao nhiêu chu kỳ?
9. Vì sao khi tiến hành điện di để kiểm tra kết quả tạo vectơ tái tổ hợp lại phải so sánh với thang ADN chuẩn?
10. Để biến nạp vectơ tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli* để tạo chủng tái tổ hợp, người ta thường sử dụng kỹ thuật biến nạp nào nhiều nhất?
11. Để biến nạp vectơ tái tổ hợp vào nấm men, người ta có thể sử dụng kỹ thuật nào nhiều nhất?
12. Để sàng lọc dòng tế bào tái tổ hợp, người ta thường dùng các loại chỉ thị nào?
13. Vì sao bổ sung chất kháng sinh vào môi trường để chọn dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp mà chủng này không chết?

Chương 4

MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG VÀ ĐỘNG HỌC CỦA QUÁ TRÌNH LÊN MEN VI SINH VẬT

4.1. DINH DƯỠNG VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

4.1.1. Thành phần dinh dưỡng ở tế bào vi sinh vật

Chất dinh dưỡng vi sinh vật là nguyên liệu cung cấp cho các quá trình sinh tổng hợp tạo ra các thành phần của tế bào và các quá trình trao đổi năng lượng ở vi sinh vật. Quá trình dinh dưỡng là hấp thu các chất dinh dưỡng để thỏa mãn mọi nhu cầu sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Đây là cơ sở để có thể nghiên cứu, ứng dụng hoặc chế vi sinh vật. Chất dinh dưỡng phải là những hợp chất có tham gia vào quá trình trao đổi chất nội bào.

Để nghiên cứu môi trường dinh dưỡng thích hợp cho vi sinh vật, người ta phải nghiên cứu thành phần hóa học của tế bào vi sinh vật, nó quyết định nhu cầu dinh dưỡng của chúng. Thành phần dinh dưỡng của tế bào vi sinh vật được xây dựng từ các nguyên tố đa lượng (C, H, O, N), các nguyên tố khoáng đa lượng và khoáng vi lượng. Ví dụ: thành phần các nguyên tố chủ yếu của tế bào vi khuẩn *E. coli* được trình bày trên bảng 4.1.

BẢNG 4.1. THÀNH PHẦN CÁC NGUYÊN TỐ CHỦ YẾU CỦA TẾ BÀO VI KHUẨN *E. COLI*

Nguyên tố	% chất khô	Nguyên tố	% chất khô
C	50	Na	0,5
N	20	Ca	0,5
O	14	Mg	0,5
H	8	Cl	0,2
P	3	Fe và các nguyên tố khác	0,3
S	1		
K	1		

Hàm lượng các nguyên tố ở vi sinh vật khác nhau và ở các giai đoạn phát triển khác nhau của vi sinh vật là khác nhau. Tuy nhiên, chúng bao gồm 2 loại chính: Nước và các chất hữu cơ (bảng 4.2).

BẢNG 4.2. CÁC NHÓM HỢP CHẤT CHỦ YẾU CỦA TẾ BÀO VI KHUẨN *E. COLI*

Loại hợp chất	Nước	Protein	ADN	ARN	Hydrat-cacbon	Lipit	Các chất hữu cơ phân tử nhỏ	Các phân tử vô cơ
Hàm lượng (%)	70	15	1	6	3	2	2	1

4.1.2. Quá trình dinh dưỡng ở tế bào vi sinh vật

Trao đổi chất (metabolism) của tế bào hay của cơ thể là tất cả các phản ứng hoá học diễn ra trong tế bào hoặc cơ thể. Nó bao gồm hai quá trình: Dị hoá (catabolism) là các phản ứng phân giải và đồng hoá (anabolism) là các phản ứng tổng hợp các chất khác nhau để xây dựng và kiến tạo tế bào hoặc tiêu tốn năng lượng. Nhu cầu năng lượng của vi sinh vật có thể thỏa mãn nhờ: Quang hợp—sử dụng ánh sáng làm nguồn năng lượng hoặc oxy hoá các hợp chất hoá học, chất cao phân tử chứa nhiều năng lượng.

Hai quá trình đồng hoá và dị hoá tương tác với nhau và diễn ra đồng thời. Các quá trình oxy hoá – phân huỷ kèm theo sự giải phóng năng lượng cần thiết cho hoạt động sống được gọi là quá trình trao đổi năng lượng.

Phần lớn các vi sinh vật thuộc loại dị dưỡng hoá năng, sử dụng hợp chất hoá học làm nguồn năng lượng thông qua truyền trực tiếp bằng điện tử – electron; còn nhóm tự dưỡng hoá năng là sử dụng hợp chất vô cơ; nhóm vi sinh vật dinh dưỡng quang năng là nhóm dinh dưỡng quang năng vô cơ và dinh dưỡng quang năng hữu cơ.

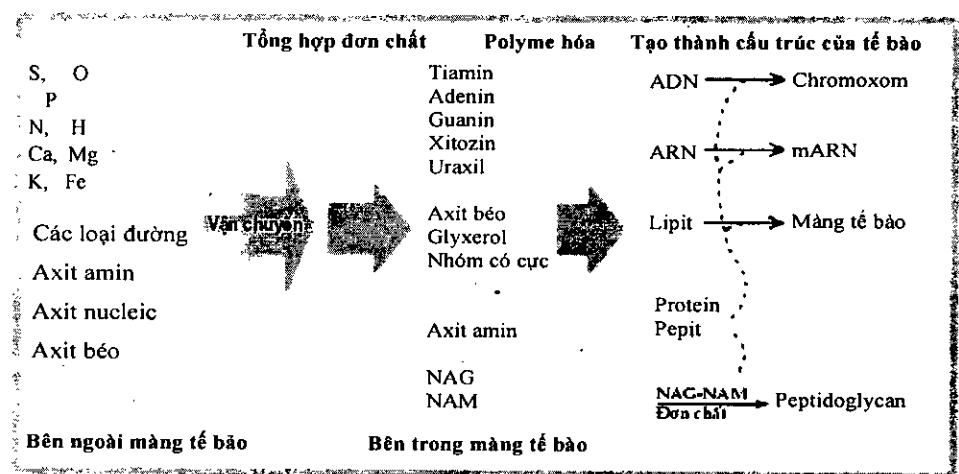
Tất cả các vi sinh vật có nhu cầu các nguyên tố rất giống nhau để xây dựng lên tế bào của chúng. Vi sinh vật nhận các "khối xây dựng cơ bản" này từ môi trường. Hầu hết không phải ở dạng tự do mà là một phần của phân tử: nitơ thường tìm thấy là NO_3^{-2} ; cacbon là đường, axit amin và CO_2 ; lưu huỳnh từ SO_4^{2-} hoặc H_2S ,...

Vi sinh vật phải tìm kiếm trong môi trường, sau đó thu thập vào trong tế bào.

Tìm kiếm: Vi sinh vật không chuyển động tạo ái lực lớn xung quanh để hấp thu chất dinh dưỡng; còn loại chuyển động thường là các loại hoá dưỡng, chúng chuyển động tới nơi có nồng độ các chất dinh dưỡng cao.

Vận chuyển: Chất dinh dưỡng được vận chuyển theo 2 quá trình: Quá trình nhận biết và quá trình vận chuyển qua màng (đòi hỏi năng lượng).

Sơ đồ con đường sinh tổng hợp tế bào từ các nguyên tố thành cấu trúc của tế bào (hình 4.1):



Hình 4.1. Sơ đồ các con đường vận chuyển các chất dinh dưỡng và sinh tổng hợp tế bào vi sinh vật

- Thu thập các nguyên tố: Là tìm kiếm các nguyên tố và tích tụ vào tế bào.
- Tổng hợp các đơn chất (monome): Lấy phân tử thu thập được từ môi trường và sử dụng chúng tạo các đơn chất cần thiết cho tế bào.
- Hình thành các polyme: Các đơn chất này liên kết với nhau hình thành các polyme trong tế bào.
- Cuối cùng, hình thành các cấu trúc của tế bào. Đây là khái niệm quan trọng trong việc tạo nên các cấu trúc của tế bào.

Sự thẩm thấu qua màng tế bào tuỳ thuộc vào các hợp chất và có thể phân biệt theo hai nhóm cơ bản:

+ Khuếch tán thụ động theo nguyên tắc vật lý, dòng phân tử hướng từ vùng có nồng độ cao sang vùng có nồng độ thấp hơn và hướng tới trạng thái cân bằng. Sự vận chuyển này không phụ thuộc vào năng lượng của tế bào.

+ Vận chuyển tích cực được thực hiện một cách độc lập không phụ thuộc vào gradien nồng độ. Cơ chất có thể tập trung với nồng độ lớn trong tế bào chất (có thể đến 100 lần) nhờ enzym đặc trưng, gọi là pecmeaza. Một pecmeaza đặc trưng cho một cơ chất và hướng vận chuyển thường là từ môi trường vào trong nội bào. Tuỳ theo nguồn năng lượng cần thiết để thăng gradien nồng độ mà hướng vận chuyển được chia thành: Vận chuyển tích cực sơ cấp (vận chuyển đơn), vận chuyển tích cực thứ cấp (đóng vận chuyển), vận chuyển cùng chiều, vận chuyển ngược chiều hay vận chuyển

nhờ thay đổi vị trí của nhóm chất. Như vậy, có 4 kiểu vận chuyển chất dinh dưỡng vào tế bào: Khuếch tán đơn giản, khuếch tán xúc tiến, chuyển vận nhóm và vận chuyển chủ động.

4.1.3. Nhu cầu dinh dưỡng của vi sinh vật

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

Một số loài có thể sử dụng một số 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 được tổng hợp tất cả các phân tử hợp chất cần thiết cho sinh trưởng. Những vi 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. Do vậy, chúng phải thu nhận các hợp chất này từ môi trường.

Tuỳ thuộc vào nhu cầu các chất là nhân tố sinh trưởng, vi sinh vật thường được chia làm hai nhóm:

- Tự dưỡng (prototrophes) là những vi sinh vật không nhất thiết cần các nhân tố sinh trưởng, những yếu tố của môi trường nuôi cấy là đầy đủ đối với chúng.
- Khuyết dưỡng (còn có tên dị dưỡng—auxotrophes) là những vi sinh vật đòi hỏi các chất hữu cơ nhất định cần cho sự sinh trưởng của chúng.

Các vi sinh vật nguyên dưỡng có thể nuôi cấy được trên môi trường tối thiểu, loại môi trường này chỉ chứa các nguyên tố dinh dưỡng chủ yếu. Ví dụ: môi trường tối thiểu có thành phần như sau (g/l): Glucosơ – 10,5; K_2HPO_4 – 1; KH_2PO_4 – 3,5; NH_4Cl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 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 – 1.000ml.

Một số các nhân tố sinh trưởng bao gồm:

- + Các vitamin không phải là thành phần, không phải là protein của nhiều enzym.
- + Các axit amin cho sinh tổng hợp protein.
- + Các axit nucleic để tổng hợp ADN và ARN.

Nhu cầu và sự thiếu các nhân tố sinh trưởng phản ánh khả năng sinh tổng hợp của vi sinh vật và nó được phản ánh ngược lại trong môi trường mà vi sinh vật sống, nó giống như khả năng tổng hợp các hợp chất bị mất do nó luôn luôn nhận từ bên ngoài.

Các chất dinh dưỡng đa lượng và vi lượng được trình bày trên bảng 4.3.

BẢNG 4.3. CÁC CHẤT DINH DƯỠNG ĐA LƯỢNG, VI LƯỢNG, NGUỒN GỐC VÀ CHỨC NĂNG ĐỐI VỚI TẾ BÀO VI SINH VẬT

Nguyên tố	% khối lượng khô (*)	Nguồn gốc	Chức năng
Thức ăn đa lượng			
Cacbon	50	Hợp chất hữu cơ hoặc CO_2	Xây dựng thành phần vật chất cơ bản của tế bào
Oxy	20	H_2O , hợp chất hữu cơ, CO_2 và O_2	Xây dựng nên vật chất và nước trong tế bào, O_2 là chất nhận điện tử trong hô hấp hiếu khí
Nitơ	14	NH_3 , NO_3 , hợp chất hữu cơ, N_2	Xây dựng nên axit amin, nucleotit của axit nucleic và coenzym
Hydro	8	H_2O , hợp chất hữu cơ, H_2	Xây dựng nên các hợp chất hữu cơ; Tham gia vào quá trình sinh năng lượng như các proton
Photpho	3	Photphat vô cơ (PO_4)	Xây dựng nên axit nucleic, nucleotit, photpholipit, LPS, axit teichoic
Thức ăn vi lượng			
Lưu huỳnh	1	SO_4 , H_2S , SO , hợp chất hữu cơ chứa lưu huỳnh	Xây dựng nên xystein, methionin, glutathion và nhiều coenzym
Kali	1	Muối kali	Xây dựng nên các cation vô cơ của tế bào và là cofactor cho các enzym
Magiê	0,5	Muối magiê	Dạng cation vô cơ của tế bào, cofactor cho nhiều phản ứng enzym
Canxi	0,5	Muối canxi	Cation vô cơ là cofactor cho nhiều enzym và là cấu phần của nội bào tử
Sắt	0,2	Muối sắt	Cấu phần của xitocrom và các protein khác và cũng là cofactor cho một số phản ứng enzym

* % khối lượng khô cho tế bào *E. coli* tiêu biểu trong pha log.

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

Ngày nay, người ta kiểm tra tỷ lệ cacbon: nitơ : photpho : kali 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 trong điều kiện hiếu khí, một nửa nguồn cacbon 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, ví dụ xử lý rác thải kỵ khí (chôn lấp rác), thì khoảng 90% nguồn cacbon phân huỷ được dùng vào trao đổi năng lượng. Do vậy, tỷ lệ các nguồn tốt nhất là C : N : P : K = 500 : 10 : 4 : 1 để cung cấp chất khoáng cần thiết.

Tuy nhiên, để tính chính xác nguồn cacbon 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 cacbon bằng 50% khối lượng của nó và có thể biến đổi được 50% cacbon có trong cơ chất thì cơ chất đó phải chứa: [(40x50)/100] x (100/50) = 40g (cacbon). Còn nếu lượng cacbon đó được cung cấp dưới dạng glucozơ thì trong công thức của mỗi môi trường cần có: 40 x (180/72) = 100g (glucozơ).

Phép tính tương tự cho phép ta xác định được khối lượng hợp chất nitơ cần phải đưa vào công thức môi trường. Tuy nhiên, sử dụng dạng nào của nguồn cacbon và nitơ là tối ưu hoàn toàn phụ thuộc vào bản thân vi sinh vật và chỉ có thể xác định chính xác bằng thực nghiệm. Như vậy, nguồn cacbon 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. Với axit amin và vitamin thì tế bào chỉ cần nồng độ 1–100μg/l.

Một thành phần cần thiết cho sinh trưởng của vi sinh vật hiếu khí là oxy. Johnson (1959) đã đưa ra công thức cho phép tính lượng oxy cần thiết cho sinh trưởng của một vi sinh vật hiếu khí, phát triển trong cơ chất gồm những hydratcacbon như sau:

$$mM O_2 /phút = (3333 : \gamma) - (40,8 \times G)$$

Trong đó, γ là khối lượng tế bào vi khuẩn khô tạo thành từ 100g glucozơ; G là tốc độ phát triển tính bằng g/phút.

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

4.1.5. Tối ưu hoá thành phần môi trường

Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật được xác định bằng thực nghiệm, với mục đích lựa chọn môi trường dinh dưỡng để nuôi cấy nhằm thu nhận được lượng sản phẩm tối đa. Đây là công việc vất vả, lâu dài đòi hỏi người nghiên cứu phải có kiến thức sâu về sinh lý vi sinh vật. Thành phần môi trường và điều kiện tối ưu được xác định bằng hai cách: chọn lọc thực nghiệm lâu dài qua nhiều giai đoạn và sử dụng phương pháp toán học mô hình hoá thực nghiệm.

Cách thứ nhất là phổ biến từ trước tới nay trong công tác nghiên cứu vi sinh vật. Người ta xác định tính chất, thành phần môi trường dựa trên đặc điểm sinh lý của vi sinh vật, còn nồng độ được xác định bằng hàng loạt các thí nghiệm, trong đó cấu tử của môi trường được thay đổi trong khoảng giới hạn, còn cấu tử khác giữ nguyên. Cách này đáng tin cậy, nhưng mất nhiều thời gian.

Cách thứ hai là sử dụng phương pháp toán học kế hoạch hoá thực nghiệm cho phép xác định nhanh các chế độ và thành phần tối ưu của môi trường dinh dưỡng. Tối ưu hoá gồm hai giai đoạn: ở giai đoạn đầu cần xác lập bằng hàng loạt thí nghiệm nhằm xác định ý nghĩa của các yếu tố nghiên cứu, xác định hướng và mức độ biến đổi của mỗi yếu tố trong thí nghiệm của quá trình tối ưu hoá. Sau đó thực hiện kế hoạch hoá dựa theo các yếu tố 2^n là việc thể hiện tất cả các tổ hợp có thể có giữa n các yếu tố nghiên cứu. Mỗi yếu tố đều được kiểm tra đồng thời và không phụ thuộc vào nhau ở 2 mức độ: cận trên (+) và dưới (-) khi tối ưu hoá thành phần môi trường. Trung tâm của thực nghiệm là mức độ trung bình hay là mức cơ bản (0), tức là số trung bình cộng giữa mức trên và mức dưới của mỗi yếu tố. Giai đoạn thứ hai là bản thân quá trình tối ưu hoá môi trường theo phương pháp lén dốc (phương pháp Box-Wilson). Nhiệm vụ trong giai đoạn này là tìm một tương quan tối ưu cho các yếu tố quan trọng nhất (có ý nghĩa nhất) trên cơ sở cố định các yếu tố còn lại.

4.1.6. Nguyên liệu trong sản xuất vi sinh vật

1) Các nguyên liệu tinh bột: Các loại bột ngũ cốc và bột sắn. Ngoài thành phần tinh bột là chủ yếu còn chứa một lượng nhỏ các hợp chất protein, các chất xơ và các chất khoáng.

2) Các nguồn nguyên liệu thuỷ phân tinh bột: Đó chính là glucozơ được thuỷ phân bằng axit hoặc bằng enzym amylaza.

3) Các loại mật rỉ: Mật rỉ hydrol: dịch nharen được từ sau khi kết tinh glucozơ ở các xí nghiệp thuỷ phân bột bằng axit để sản xuất glucozơ. Rỉ đường: Rỉ củ cải đường và rỉ đường mía.

4) Các nguồn nguyên liệu giàu nitơ hữu cơ: Bột đậu tương; nước chiết ngô và cao ngô; nước chiết nấm men và cao men.

5) Các nguồn chất sinh trưởng: Nước chiết cám, dịch ép khoai tây, các dịch ép giá đậu, dịch ép cà chua, bắp cải,...

6) Chất béo nguồn dinh dưỡng cacbon và phá bọt: các loại dầu thực vật.

7) Nước trong công nghệ vi sinh vật.

4.2. ĐỘNG HỌC CỦA QUÁ TRÌNH LÊN MEN VI SINH VẬT

4.2.1. Các thông số đánh giá quá trình lên men

Sinh trưởng và phát triển là thuộc tính của sinh vật. Sinh trưởng là sự tăng lên kích thước và khối lượng của tế bào, còn phát triển (hoặc sinh sản) là sự tăng số lượng tế bào. Ở vi sinh vật, sự tăng số lượng tế bào không phải bao giờ cũng diễn ra song song với sự tăng sinh khối. Ví dụ, khi chất dinh dưỡng của môi trường đã cạn, vi khuẩn tuy còn phân chia 1–2 lần, nhưng cho 2–4 tế bào nhỏ hơn bình thường. Điều đáng chú ý, khi nói đến sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật là đề cập đến sinh trưởng và phát triển của một số lượng lớn tế bào cùng một loại. Việc nghiên cứu sinh trưởng, phát triển ở một cá thể vi khuẩn là rất khó, không thể thực hiện được. Tuy nhiên, cần phân biệt các thông số và hằng số khác nhau khi xác định số lượng hoặc khối lượng vi khuẩn (bảng 4.4). Đối với số lượng, thời gian từ 1 tế bào tăng lên 2 tế bào, gọi là thời gian thế hệ, giá trị nghịch đảo thời gian thì gọi là hằng số tốc độ phân chia, tương ứng với khối lượng là thời gian tăng đôi khối lượng và hằng số tốc độ sinh trưởng.

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, thường chúng ta theo dõi ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn nhờ các phương pháp nuôi cấy thích hợp. Tuỳ theo sự thay đổi hệ thống vi khuẩn–môi trường mà ta phân biệt hai phương pháp cơ bản nuôi cấy vi khuẩn: nuôi cấy tĩnh và nuôi cấy liên tục.

BẢNG 4.4. CÁC THÔNG SỐ VÀ HẰNG SỐ DÙNG KHI XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG HOẶC KHỐI LƯỢNG VI KHUẨN

Thông số	Số lượng	Khối lượng
Với đơn vị thể tích	Nồng độ vi khuẩn (số tế bào/ml)	Mật độ vi khuẩn (sinh khối khô/ml)
Số lần tăng đôi sau đơn vị thời gian	Hằng số tốc độ phân chia, $V(h^{-1})$	Hằng số tốc độ sinh trưởng, $\mu(h^{-1})$
Thời gian cho sự tăng đôi	Thời gian thế hệ, g (h)	Thời gian tăng đôi, tđ (h)

Xác định số lượng tế bào vi sinh vật bằng các phương pháp khác nhau: đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu qua kính hiển vi, so sánh độ đục dịch nuôi cấy, đếm trực tiếp trên đĩa thạch,...

Xác định khối lượng bằng các phương pháp trực tiếp cân sinh khối tế bào sau khi đã sấy khô đến khối lượng không đổi, hoặc gián tiếp thông qua đo độ đục.

4.2.2. Mẫu lý thuyết về sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn

Nếu chúng ta bắt đầu từ một tế bào vi sinh vật, sau một thời gian g sẽ có 2 tế bào, tiếp theo có 4 tế bào, tiếp theo có 8 tế bào,... Nên số lượng của chúng tăng theo cấp số mũ:

$$1 (2^0) \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 (4) \rightarrow 2^3 (8) \rightarrow 2^4 (16) \rightarrow, \dots \rightarrow 2^n$$

Trong điều kiện thích hợp, thời gian nhân đôi của một tế bào (thời gian thế hệ, g) của *E. coli* là 20 phút, của *Vibrio parahaemolyticus* – 10 phút, của *Mycobacterium tuberculosis* – 1.000 phút...

Như vậy, chúng ta có thể xác định số lần phân chia trong một đơn vị thời gian V (1 giờ), tức là số đảo ngược (1/g), ứng với các vi sinh vật trên ta có: *E. coli* là 3, *Vibrio parahaemolyticus* – 6, *Mycobacterium tuberculosis* – 0,06,...

Nếu trong một đơn vị thể tích lúc đầu có N_0 tế bào thì sau n lần phân chia số tế bào sẽ là:

$N = N_0 \cdot 2^n$ (1), logarit hoá ta có: $\log N = \log N_0 + n \cdot \log 2$ (2), từ đó tính được số lần phân chia theo công thức: $n = (\log N - \log N_0) / \log 2$ (3).

Số lần phân chia trong một giờ hay là hằng số tốc độ phân chia là:

$$C = n/t = (\log N - \log N_0) / \log 2 (t - t_0) = 1/n = 1/C \quad (4)$$

Thời gian cần cho một chu kỳ phân chia trong thời gian một lần phân chia sẽ là:

$$g = 1 / n = 1/C \quad (5)$$

Ví dụ: sau 10 giờ nuôi cấy, số tế bào trong môi trường lỏng từ 10^2 lên đến 10^9 thì hằng số tốc độ phân chia là:

$$C = (\lg 10^9 - \lg 10^2) / 0,310 \times 10 = 6/3 = 2 \quad (6)$$

và thời gian của một lần phân chia là:

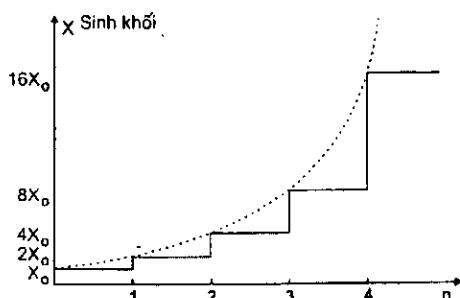
$$g = 1 / C = 1 / 2 \text{ giờ.}$$

Như vậy, nếu biết hằng số tốc độ phân chia và thời gian, ta có thể tính được con số lý thuyết số tế bào N theo phương trình sau:

$$C = n / 1 \text{ nên } n = C.t$$

Thay n = C.t vào phương trình (1) ta có:

$$N = N_0 \cdot 2^{Ct}$$



Hình 4.2. Đường cong lý thuyết về sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật

Sự sinh trưởng đồng bộ (.....)
và không đồng bộ (—)

quần thể vi sinh vật không phải theo nấc thang (mà đồng bộ hóa-synchronism) mà theo một đường cong liên tục (hình 4.2).

4.2.3. Động thái sinh trưởng, phát triển của quần thể vi sinh vật trong hệ “kín” (hệ tĩnh)

Hệ “kín” ở đây có nghĩa là môi trường không đổi mới. Trên môi trường đặc (thạch đĩa), một tế bào vi khuẩn sau 24 – 48 giờ sẽ tạo thành một khuỷu lạc (colony). Tuy nhiên cần lưu ý, sự tăng số lượng vi khuẩn là một thông số không liên tục, trong khi đó sự tăng khối lượng là một thông số liên tục theo thời gian. Phương pháp đếm số lượng khuỷu lạc trên môi trường

Rõ ràng, nếu thời gian của một lần phân chia (thời gian thế hệ) càng ngắn thì vi khuẩn sinh trưởng và phát triển càng nhanh. Hằng số tốc độ phân chia phụ thuộc vào loài vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy.

Tuy nhiên, trong quần thể vi sinh vật, không phải toàn bộ tế bào đều phân chia đồng thời, tức là không đồng bộ (asynchronism).

Sự sinh trưởng và phát triển của

thức ăn có thể biết được giá trị gần đúng số vi khuẩn sống trong cơ chất ban đầu, nhưng phương pháp này không cho phép nghiên cứu động thái sinh trưởng của vi khuẩn. Vì vậy, người ta thường nghiên cứu sinh trưởng, phát triển trong môi trường lỏng (dịch thể).

Khi cấy vào môi trường dinh dưỡng, vi khuẩn sẽ sinh sôi nở cho đến lúc hàm lượng một chất nào đó cần thiết cho chúng ở môi trường giảm đến mức thấp nhất, khi đó sự sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn giảm dần và đình trệ, mặc dù tế bào vẫn tiếp tục vài lần phân chia, nhưng cho các thế hệ tế bào bé hơn và khối lượng nhỏ hơn. Nếu trong cả thời kỳ đó, chất dinh dưỡng không được bổ sung thêm và các sản phẩm trao đổi chất cũng được loại bỏ thì ta có quần thể tế bào trong không gian sống có giới hạn. Sự sinh trưởng trong hệ “kín” như vậy phải tuân theo những quy luật chi phối không chỉ với cơ thể đơn bào mà còn đối với cả cơ thể đa bào nữa.

a) *Đồ thị sinh trưởng của vi sinh vật*

Động thái của quá trình sinh trưởng của vi khuẩn trong hệ “kín” có thể biểu thị bằng đồ thị. Đồ thị này được biểu thị sự phụ thuộc của log số tế bào với thời gian.

Đồ thị này có thể chia thành 4 pha liên tiếp, có thể tóm tắt các pha như sau:

– *Pha lag (tiền phát)*: là pha tính từ lúc bắt đầu cấy đến khi vi khuẩn đạt được tốc độ sinh trưởng cực đại. Trong pha lag, vi sinh vật chưa phân chia (nghĩa là chưa có khả năng sinh sản), nhưng thể tích và khối lượng tế bào vi sinh vật tăng lên do quá trình sinh tổng hợp các chất diễn ra mạnh mẽ. Một số enzym xúc tác cho quá trình phân giải tăng, tế bào chất tăng.

Ở pha lag, số lượng tế bào (X) không tăng, tức là bằng X_0 được đặc trưng khi $\mu x = 0$, khi đó:

$$\frac{dx}{dt} = X \cdot \mu x = 0$$

Độ dài của pha lag phụ thuộc vào các yếu tố sau đây:

+ Tuổi của giống: Tuổi của quần thể giống cấy vào môi trường nuôi mà chúng đang ở giai đoạn sinh trưởng nào ảnh hưởng rõ rệt đến pha lag. Thực nghiệm trong môi trường và điều kiện nuôi cấy như nhau cho thấy, nếu cấy giống đang ở pha log (pha sinh trưởng phát triển theo luỹ thừa) thì pha lag sẽ ngắn. Ngược lại, nếu giống cấy ở pha lag hay pha suy thoái thì pha lag sẽ kéo dài. Thông thường tế bào càng già thì pha lag càng dài. Trong pha lag diễn ra việc xây dựng lại các tế bào ở giai đoạn nghỉ thành các tế bào sinh trưởng logarit (sinh trưởng theo luỹ thừa).

+ Lượng giống cấy: Nói chung lượng giống cấy nhiều thì pha lag ngắn và ngược lại. Trong công nghiệp lên men, tỷ lệ giống cấy vào môi trường lên men thường ở mức 1/10.

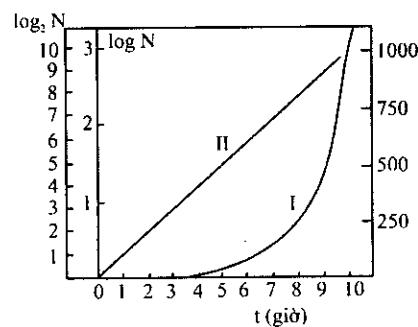
+ Thành phần môi trường: Thông thường môi trường có thành phần giàu dinh dưỡng (môi trường có cơ chất tự nhiên) thì pha lag ngắn. Trong công nghiệp lên men, người ta sử dụng thành phần môi trường lên men không khác nhiều so với môi trường nhân giống.

- *Pha log (tăng tốc)*: là pha vi khuẩn sinh trưởng và phát triển theo lũy thừa, nghĩa là sinh khối và số lượng tế bào tăng theo phương trình $N = N_0 \cdot 2^{ct}$ hay $X = X_0 \cdot e^{\mu t}$. Kích thước của tế bào, thành phần hoá học, hoạt tính sinh lý ... nói chung không thay đổi theo thời gian. Tế bào ở trạng thái động học và được coi như là “những tế bào tiêu chuẩn”.

Nếu ta lấy trục tung là số tế bào, trục hoành là thời gian ta có đường biểu diễn là đường cong số lượng tế bào (như đường I) và được logarit số lượng đó (đường II) trong đồ thị ở hình 4.3.

Để thuận tiện cho việc biểu diễn kết quả thực nghiệm (hình 4.3), người ta thường dùng logarit cơ số 2 là thích hợp hơn cả, vì sự thay đổi một đơn vị của \log_2 trên trục tung chính là sự tăng đôi số lượng vi khuẩn và thời gian cần để tăng một đơn vị của \log_2 lại là thời gian thế hệ. Thời gian thế hệ của một số loài vi khuẩn khác nhau. Ví dụ, *Escherichia coli* nuôi trong môi trường nước thịt ở 37°C thì thời gian thế hệ là 17 phút, còn nuôi trên môi trường sữa ở 37°C là 12,5 phút; *Lactobacillus acidophilus* nuôi trên môi trường sữa ở 37°C là 66 – 87 phút; *Mycobacterium tuberculosis* nuôi trên môi trường tổng hợp ở 37°C là 792 đến 932 phút.

Ở pha log, x tăng theo thời gian theo cấp số nhân và $\ln X$ tỷ lệ thuận với thời gian, ở suốt pha này thì hằng số sinh trưởng μX là không đổi và cực đại đối với điều kiện nuôi cấy cụ thể và đổi với một chủng vi sinh vật nhất định. Như vậy thì: $\mu X = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$.



Hình 4.3. Sinh trưởng theo tuý thừa của vi sinh vật đơn bào

- I. Phương pháp thông thường biểu diễn kết quả;
- II. Thang logarit; N. Số lượng tế bào.

c) *Pha cân bằng*: Số lượng vi sinh vật đạt đến cực đại và không đổi theo thời gian. Số tế bào mới sinh ra bằng số tế bào chết đi. Chính ở pha này $\mu x = 0$, do đó: $dx/dt = 0$

d) *Pha suy vong*: Trong pha này, số lượng tế bào có khả năng sống giảm theo luỹ thừa. Số lượng vi sinh vật X giảm dần, tế bào tự phân giải do các enzym nội bào và các chất ngoại bào. Người ta có thể xác định tỷ suất chết của quần thể.

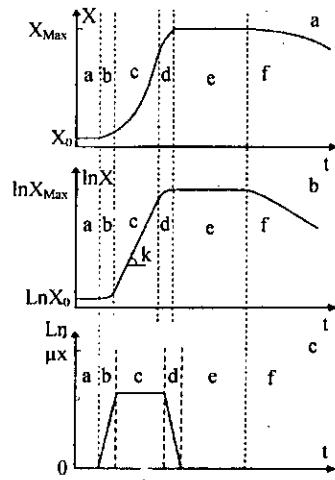
Thực ra chưa có quy luật chung cho pha suy vong. Sự chết của tế bào có thể nhanh hay chậm, có liên quan đến sự tự phân hay không tự phân. Do sức sống, phần lớn bào tử bị chết chậm nhất (trong điều kiện thích hợp như khô và nhiệt độ thấp, bào tử có thể duy trì được khả năng sống hàng trăm năm).

Tốc độ tử vong của tế bào liên quan trực tiếp đến thực tiễn vi sinh vật học và kỹ thuật. Đó là vấn đề bảo quản các chủng vi sinh vật quan trọng về mặt lý thuyết (các chủng và các biến chủng đặc biệt và kỹ thuật) các chủng sinh các chất có hoạt tính sinh học cao. Ngoài việc bảo quản khả năng sống, mà còn cần bảo quản cả các đặc tính di truyền của vi sinh vật. Có nhiều phương pháp bảo quản vi sinh vật (chương 2).

Đồ thị sinh trưởng phát triển của vi sinh vật được chia làm 6 pha, có nghĩa là thêm pha tăng tốc trước khi sang pha log và pha giảm dần trước pha cân bằng.

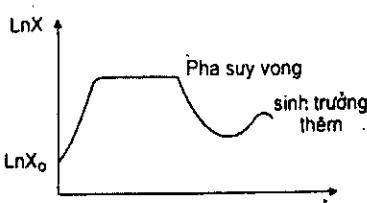
b) *Hiện tượng sinh trưởng kép và sinh trưởng thêm*

Trong pha suy vong, các vi sinh vật không phân chia nữa, rất nhiều tế bào chết và tự phân do các enzym của chúng giải phóng ra. Một số nhỏ sống sót lại có thêm vài lần phân chia nữa phụ thuộc vào cơ chất do những tế bào tự phân huỷ giải phóng ra. Hiện tượng này gọi là hiện tượng sinh trưởng thêm (hình 4.5). Nếu trong môi trường tổng hợp gồm hỗn hợp hai cơ chất cacbon, thì có thể thấy đường cong không diễn ra bình thường, mà thấy hiện



Hình 4.4. Đồ thị sinh trưởng của vi sinh vật trong hệ kín

a) $x = f(t)$; b) $\ln x = f(t)$ (lấy logarit cả hai vế, tương ứng với bán logarit); c) $\ln \mu x = f(t)$, trong đó μx là hằng số tốc độ sinh trưởng riêng của vi sinh vật, x là sinh khối và t là thời gian



Hình 4.5. Hiệu tượng sinh trưởng thêm

tương lúc đâu vi khuẩn sinh enzym phân huỷ cơ chất dễ đồng hoá hơn (ở pha lag), phát triển sang pha log, sau khi chất này đã cạn, vi khuẩn lại được chất thứ hai cảm ứng để tổng hợp enzym phân huỷ chất thứ hai này, vi sinh vật lại phát triển tăng tốc. Trên đồ thị sinh trưởng, phát triển thấy có 2 pha tiên phát, hai pha

tăng tốc (hình 4.6). Hiện tượng này được Monod gọi là hiện tượng sinh trưởng kép.

Hiện tượng sinh trưởng kép đã được nghiên cứu ở hàng loạt các nguồn đường làm nguồn cacbon kết hợp với đường glucozơ. Người ta đã chia những đường này thành hai nhóm:

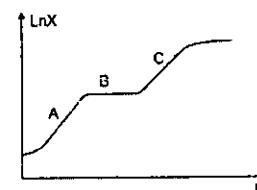
- Nhóm A: không sinh trưởng kép với glucozơ là fructozơ, mannozơ, mannitol.
- Nhóm B: sinh trưởng kép với glucozơ là galactozơ, arabinozơ, xylozơ, ramnozơ, sorbitol, dulxitol, maltozơ, lactozơ.

Các chất giữa nhóm A và nhóm B kết hợp với nhau cho hiện tượng sinh trưởng kép (nhị cấp – diauxie). Người ta còn mô tả hiện tượng sinh trưởng tam cấp (triauxie), như là khi nuôi cấy vi khuẩn trong hỗn hợp 3 loại nguồn cacbon: glucozơ, glycerol và socbitol.

Hiệu tượng trên không chỉ hạn chế ở nguồn cacbon và năng lượng mà thấy cả ở nguồn nitơ và photpho. Chẳng hạn, *Aerobacter aerogenes* có thể sử dụng làm nguồn nitơ là các axit amin, muối amon và nitrat. Nếu từ nước thịt cấy chuyên vi khuẩn sang môi trường

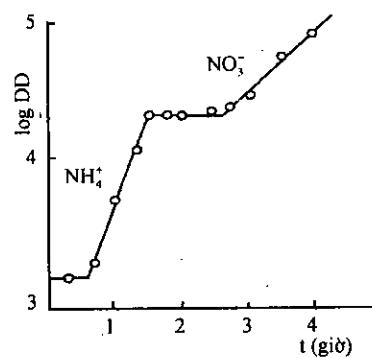
chứa hỗn hợp hai muối ta sẽ thấy hiện tượng sinh trưởng kép. Các ion NH_4^+ được đồng hoá trước, đồng thời kiềm chế việc tổng hợp cảm ứng enzym

tương lúc đó vi khuẩn sinh enzym phân huỷ cơ chất dễ đồng hoá hơn (ở pha lag), phát triển sang pha log, sau khi chất này đã cạn, vi khuẩn lại được chất thứ hai cảm ứng để tổng hợp enzym phân huỷ chất thứ hai này, vi sinh vật lại phát triển tăng tốc. Trên đồ thị sinh trưởng, phát triển thấy có 2 pha tiên phát, hai pha



Hình 4.6. Hiệu tượng sinh trưởng kép
ở *E. coli* khi nuôi trên môi trường có fructozơ và arabinozơ là nguồn carbon.

- A. Sử dụng fructose;
- B. Pha thích ứng với arabinozơ;
- C. Sử dụng arabinozơ.



Hình 4.7. Sinh trưởng kép của
A. aerogenes trong hỗn hợp muối
amon và nitrat

nitrat-reductaza. Chỉ sau khi muối amon đã cạn, muối nitrat mới được sử dụng (hình 4.7).

c) *Ba thông số của đồ thị sinh trưởng*

Trong kỹ thuật nuôi cấy vi sinh vật, sinh khối cần được quan tâm trước tiên, muốn thế cần lưu ý đến 3 thông số sinh trưởng quan trọng sau đây: sản lượng tế bào, tốc độ sinh trưởng và thời gian kéo dài của pha log.

– *Sản lượng tế bào*: Sản lượng tế bào được tính bằng hiệu số giữa khối lượng cực đại và khối lượng ban đầu khi nuôi cấy vi khuẩn. Đơn vị tính bằng gram.

$$X = X_{\max} - X_0$$

Tỷ số giữa sản lượng tế bào (X) với lượng cơ chất được dùng (S – được tính bằng đơn vị khối lượng) gọi là Hệ số kinh tế (Y): $Y = X / S$.

Nếu sản lượng tính bằng gram và cơ chất tính bằng mol thì gọi là hệ số kinh tế mol (Ymol) hay (Ym). Hệ số kinh tế mol (Ym) cho phép ta liên hệ sản lượng tế bào với số lượng ATP thu được do phân giải một lượng cơ chất nào đó.

BẢNG 4.5. LƯỢNG ATP ĐƯỢC TẠO THÀNH TRONG TRAO ĐỔI CHẤT KÝ KHÍ PHỤ THUỘC VÀO NGUỒN CACBON, NĂNG LƯỢNG VÀ LOÀI VI SINH VẬT

Nguồn cacbon	mol ATP/mol nguồn cacbon	Vi sinh vật	Con đường trao đổi chất
Glucozơ	2	<i>Streptococcus faecalis</i>	Embden-Meyerhoff
Glucozơ	1	<i>Pseudomonas lindneri</i>	Entner-Doudoroff
Glucozơ	2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Embden-Meyerhoff
Acginin	1	<i>Streptococcus faecalis</i>	Acg • Xit-Orm • P ATP

Từ kết quả trên, ta có thể tính được sản lượng tế bào (tính bằng g) cho 1 mol ATP đã được tiêu thụ (bảng 4.5). Đại lượng này ta gọi là hệ số năng lượng (YATP). Hệ số năng lượng phụ thuộc vào nguồn năng lượng và loài vi sinh vật (bảng 4.6). Hệ số năng lượng được tính dễ dàng nếu ta biết được con đường phân giải của loại cơ chất và năng lượng ATP sinh ra do sự phân giải đó. Ví dụ, đối với *Saccharomyces cerevisiae* và *Streptococcus faecalis* khi dùng glucozơ để lên men ký khí thông qua con đường EMP thì $Ym = 20$ và

để dễ dàng tính ra YATP = 10, vì cứ tiêu thụ một phân tử gram glucozơ thông qua con đường EMP đã giải phóng ra 2 ATP.

BẢNG 4.6. HỆ SỐ NĂNG LƯỢNG YM TUỲ THEO NGUỒN NĂNG LƯỢNG VÀ LOÀI VI SINH VẬT

Vi sinh vật	Cơ chất	Mol ATP/mol cơ chất	Ym	YATP
<i>Streptococcus faecalis</i>	Glucozơ	2	22	11
<i>S. faecalis</i>	Glucozơ	2	23	11,5
<i>S. faecalis</i>	Glucozơ	2	18,5	9,3
<i>S. faecalis</i>	Ribozơ	1,67	21	12,6
<i>S. faecalis</i>	Acginin	1	10	10
<i>S. faecalis</i>	Acginin	1	10,5	10,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucozơ	2	21	10,5
<i>Pseudomonas lindneri</i>	Glucozơ	1	8,3	8,3

– *Hằng số tốc độ sinh trưởng:*

Hằng số tốc độ sinh trưởng của tế bào vi sinh vật trong pha log được tính theo công thức sau:

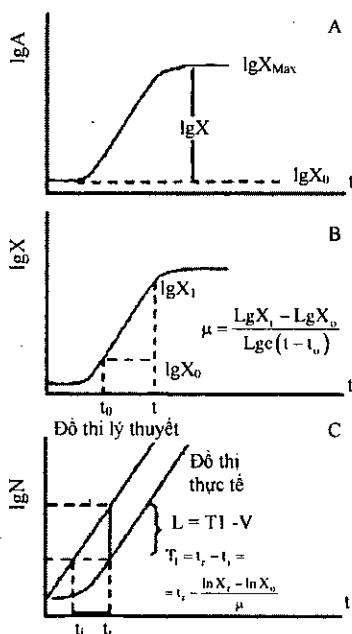
$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{(t - t_0)} = \frac{\log X_t - \log X_0}{\log e(t - t_0)}$$

Trong công thức trên, X_0 và X_t là mật độ huyền phù tế bào tại các thời điểm t_0 và t , còn $\log e = 0,43429$.

– *Thời gian của pha lag (T_l):*

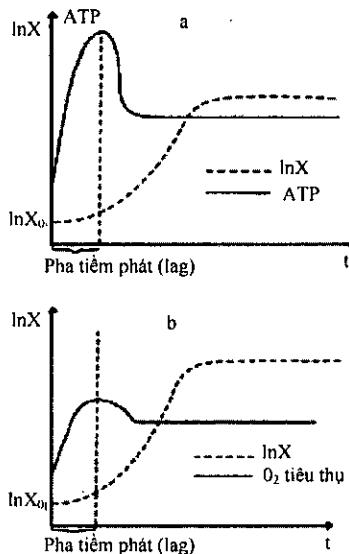
Đây là một thông số quan trọng để xem xét tính chất của vi khuẩn và môi trường nuôi cấy có thích hợp không. Thông số này được xác định bằng hiệu số giữa thời điểm t_r (tại đây huyền phù tế bào có mật độ xác định nào đó X_r) và t_i (tại đây sinh khối tế bào có thể đạt được mật độ mà sau đó nếu đem nuôi cấy thì chúng bắt đầu pha log ngay).

$$T_l = t_r - t_i = t_r - \frac{\ln X_r - \ln X_0}{\mu}$$



Hình 4.8. Thông số sinh trưởng

- A. Sản lượng tế bào;
- B. Tốc độ sinh trưởng;
- C. Thời gian pha log.



Hình 4.9. Pha tiềm phát (lag)

- a) Thay đổi sự tích luỹ ATP;
- b) Thay đổi của sử dụng oxy.

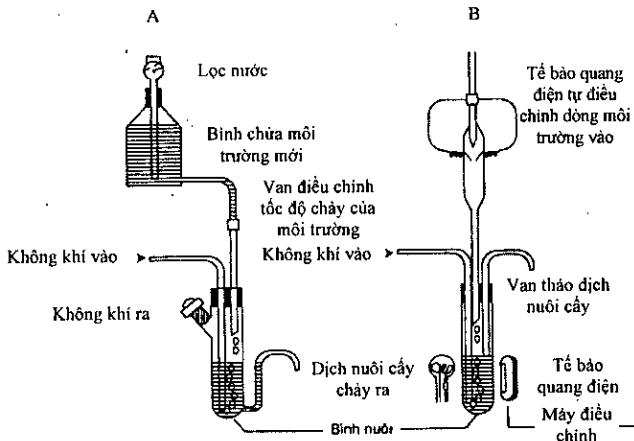
Vì T_1 chỉ thuận lợi khi so sánh 2 giống cùng với tốc độ sinh trưởng giống nhau, nên người ta thường biểu thị thời gian của pha log không phải bằng thời gian tuyệt đối, mà thông qua thời gian sinh lý, tức là thời gian của một lần phân chia. Hiệu số giữa sự sinh trưởng thực tế và lý thuyết là $L = T_1 \times C$.

Đại lượng L cho ta biết, giống phát triển trong thực tế chậm hơn phát triển theo lý thuyết bao nhiêu thế hệ tại thời điểm cuối pha lag và chuyển vào đầu pha log. Thông số này thường dùng để so sánh các số liệu về ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng khác nhau, các chất ức chế sinh trưởng và điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật. Các thông số trên được biểu thị ở các hình 4.8 và 4.9.

4.2.4. Sinh trưởng của vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy liên tục

Nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường tĩnh, hàm lượng chất dinh dưỡng cạn kiệt dần, sản phẩm trao đổi chất tăng lên làm cho pha log chỉ kéo dài trong một thời gian ngắn, làm thay đổi tốc độ sinh trưởng riêng, hình thái và các đặc điểm sinh lý-sinh hoá của vi sinh vật, gây khó khăn cho quá trình

công nghệ và sản xuất công nghiệp. Để tránh sự "già" của giống, giữ giống luôn ở cùng một trạng thái ở pha log, người ta dùng các môi trường đổi mới liên tục bằng cách liên tục đưa môi trường dinh dưỡng vào và đồng thời loại bỏ một lượng dịch huyền phù vi sinh vật ra. Đây là nguyên tắc cơ bản cho quá trình nuôi liên tục trong hệ thống các nồi lên men kiểu Chemostat và Turbidostat (hình 4.10).



Hình 4.10. Sơ đồ hệ thống nuôi cấy liên tục Chemostat (A) và Turbidostat (B)
(theo Nguyễn Thành Đạt)

Nếu ta gọi dung tích của bình nuôi cấy là V (lít) và tốc độ dòng môi trường đi vào là f (lít) trong 1 (giờ), thì khi đó tốc độ pha loãng (còn gọi là hệ số pha loãng) D sẽ là:

$$D = f / V \quad (1)$$

Như vậy đại lượng D biểu thị sự thay đổi dung tích môi trường trong 1 giờ. Nếu cho Chemostat chạy, trong nồi có chứa một lượng vi khuẩn là X không sống được vì một nguyên nhân nào đó thì chúng sẽ bị rửa "sạch" khỏi bình nuôi cấy, tốc độ rửa sạch vi khuẩn khỏi bình được tính bằng công thức:

$$Dx = - dx / dt \quad (2)$$

Còn nếu vi sinh vật phát triển trong bình nuôi cấy thì số lượng vi sinh vật sẽ tăng lên theo thời gian và phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng riêng:

$$\mu x = dx / dt \quad (3)$$

Do đó tốc độ thay đổi mật độ huyền phù vi khuẩn trong bình sẽ bằng tổng của μx và $-Dx$, kết hợp phương trình (2) và (3) ta có:

$$dx / dt = \mu x - Dx \text{ hay } dx / dt = (\mu - D)x \quad (4)$$

Từ phương trình (4) ta thấy có thể xảy ra 3 trường hợp:

– Khi tốc độ sinh trưởng (μ) của vi sinh vật lớn hơn tốc độ pha loãng (D) thì mật độ huyền phù vi khuẩn sẽ tăng lên theo thời gian: $\mu > D$ thì $dx/dt > 0$.

– Khi $\mu < D$ thì $dx/dt < 0$, trong trường hợp này mật độ huyền phù vi khuẩn giảm, kết quả cuối cùng có thể làm cho vi sinh vật bị rửa "sạch" khỏi bình.

– Nếu tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật đúng bằng hệ số pha loãng, thì số tế bào mất đi do di ra khỏi bình và số tế bào tăng thêm do chúng nhân lên là bằng nhau. Tức là mật độ tế bào trong dịch huyền phù không thay đổi theo thời gian.

Nghĩa là $\mu = D$ thì $dx/dt = 0$, tức là x không đổi theo thời gian.

Như vậy, ta có thể điều chỉnh quá trình này ở Chemostat (đo mật độ huyền phù) hay ở Turbidostat (đo độ đục nhờ tế bào quang điện). Khi làm cho dòng môi trường chảy vào chậm, thì số lượng tế bào trong bình tăng lên và vì thế dẫn đến làm giảm tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật, giảm cho đến lúc đúng bằng tốc độ dòng môi trường vào bình (đúng hơn là hệ số pha loãng D). Ngược lại, khi tăng tốc độ môi trường, số lượng tế bào giảm đi, vì vậy tốc độ sinh trưởng của chúng tăng lên một cách tương ứng.

– **Ưu điểm** của nuôi cấy liên tục:

+ Làm cho tốc độ sinh trưởng riêng của vi sinh vật cao, thu được lượng sinh khối cao.

+ Nghiên cứu cụ thể được sự thay đổi cơ chất.

+ Sản xuất được các chất trao đổi với hoạt tính mong muốn.

+ Tiết kiệm do không có thời gian chết.

+ Tối ưu hóa dễ dàng điều kiện nuôi cấy, bằng cách thêm chất dự trữ hay thay đổi các thông số hoạt động.

– **Nhược điểm** khó tránh khỏi là:

+ Sản xuất các chất trao đổi thứ cấp không luôn luôn được ổn định.

+ Dễ bị tạp nhiễm, tạp hợp ngẫu nhiên vật thể lạ trên bề mặt tế bào, dẫn đến quá trình không đồng bộ.

+ Sau thời gian dài có thể dẫn đến biến mất tính trạng của giống nguyên thuỷ.

4.3. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH LÊN MEN VI SINH VẬT

4.3.1. Nhiệt độ

Nhiệt độ môi trường với vi sinh vật có mối quan hệ mật thiết, vì nhiệt độ không chỉ đơn thuần ảnh hưởng đến cường độ phát triển của từng loại vi sinh vật mà chính khả năng sinh trưởng của chúng ở nhiệt độ đó. Mỗi loại vi sinh vật đều có nhiệt độ phát triển tối thiểu, tối thích và tối đa mà chúng có thể chịu được khác nhau.

Dựa vào khả năng của vi sinh vật phát triển trong khoảng nhiệt độ tối ưu khác nhau, người ta phân chia vi sinh vật thành các nhóm sau: Vi sinh vật ưa lạnh (psychrophytic): Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu dưới 20°C; vi sinh vật ưa ấm (mesophytic): Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu từ 25 đến 45°C; vi sinh vật ưa nhiệt (thermophytic): Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu từ 45 đến 70°C và vi sinh vật cực ưa nhiệt (superthermophytic): Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu trên 70°C.

Sự phân định các nhóm vi sinh vật theo nhiệt độ trên không phải là tuyệt đối mà thường giới hạn giữa các nhóm có phần xen cài lên nhau. Tuy nhiên, phần lớn các vi sinh vật là vi sinh vật ưa ấm. Nấm sợi và nấm men là những vi sinh vật ưa mát, nghĩa là thường từ 20 đến 30°C, tối ưu ở 25 – 26°C, nhưng cũng có một số loài sống được ở 45°C, cũng có loài sống được ở 1°C.

Ngày nay, người ta phát hiện được nhiều loài có thể sinh trưởng, phát triển ở nhiệt độ rất cao, như các chủng ở suối nước nóng, miệng núi lửa. Gần đây, khoa học đã phát hiện thấy các vi khuẩn cổ sống ở đáy biển, ở nguồn nước nóng có thể chịu được nhiệt độ lên tới 250°C, với áp suất 256atm, ví dụ như loài *Pyroditium occultum*.

Trong quá trình phân lập và nuôi cấy vi sinh vật cũng cần chú ý đến nguồn vị trí lấy mẫu mà nuôi cấy thích hợp. Điều đó cũng có nghĩa là tuỳ thuộc vào mục đích sử dụng mà người ta phân lập các chủng vi sinh vật ở những nơi có điều kiện sống tương ứng. Ví dụ, trong xử lý rác thải, yếu tố nhiệt độ rất quan trọng, vì với nguyên lý “càng nóng, càng tốt” thì vi sinh vật ưa nhiệt sẽ phát triển và thúc đẩy nhanh quá trình phân giải các chất trong bể ủ, đồng thời khi nhiệt độ hạ xuống sau ủ, các vi sinh vật ưa nhiệt sẽ chết làm cho bể ủ sạch. Người ta phân lập các chủng chịu được nhiệt độ cao ở những đống rác ủ thích hợp.

Trong quá trình lên men sản xuất trong nồi lên men thường người ta giữ ở nhiệt độ phù hợp cho từng chủng vi sinh vật và không thay đổi trong suốt quá trình lên men. Tuy nhiên, quá trình lên men thường làm tăng nhiệt độ bình, do vậy phải có hệ thống làm lạnh để giữ ở nhiệt độ phù hợp.

4.3.2. Độ ẩm (đối với việc nuôi trên môi trường xốp)

Thành phần nước chiếm từ 70 – 90% khối lượng cơ thể vi sinh vật, tất cả các quá trình phân huỷ thức ăn và các phản ứng chuyển hoá 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 vi sinh vật chỉ tồn tại ở dạng nghỉ hoặc bào tử.

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

4.3.3. Oxy (thông khí)

Phụ thuộc vào khả năng sử dụng oxy, người ta chia vi sinh vật thành 3 nhóm chính: Vi sinh vật hiếu khí: phát triển ở hiệu thế oxy hoá cao (nhu cầu oxy cao); vi sinh vật yếm khí: phát triển ở hiệu thế oxy hoá thấp (không cần oxy) và vi sinh vật yếm khí tuỳ tiện: Phát triển ở cả hiệu thế oxy hoá cao và hiệu thế oxy hoá thấp.

Trong tế bào vi sinh vật hiếu khí có đầy đủ hệ thống men hô hấp, trong quá trình oxy hoá dùng phân tử oxy làm chất nhận hydro (H^+), còn trong quá trình oxy hoá được thực hiện nhờ sự tham gia của các enzym dehydrolaza, chúng dùng các chất hữu cơ có liên kết không bão hòa làm chất nhận H^+ .

Với đặc tính của từng nhóm vi sinh vật, nghiên cứu điều kiện nuôi cấy vi sinh vật là cần thiết. Ví dụ, trong quá trình xử lý rác thải, việc lựa chọn các loại vi sinh vật vừa có hoạt tính phân giải nhanh, vừa tạo điều kiện nuôi phù hợp với từng biện pháp xử lý là rất quan trọng và cần thiết như phương pháp ủ hiếu khí cần cung cấp lượng oxy thích hợp, phương pháp chôn lấp rác thải hoặc lên men sinh metan cần tạo điều kiện kỵ khí hoàn toàn.

Trong lên men chìm, lượng oxy cần thiết phải là lượng oxy hòa tan vào môi trường nuôi, do đó trong các bình lên men, người ta thường bố trí cánh khuấy và máng chắn sóng để tăng cường sự hoà tan của oxy. Thông thường lượng khí cấp cho vào nồi lên men là 1 lít/1 phút/1 lít môi trường lên men.

Tuy nhiên lượng oxy hòa tan phụ thuộc chính vào cấu tạo và tốc độ của cánh khuấy.

4.3.4. pH môi trường

pH môi trường nuôi cấy vi sinh vật rất quan trọng, vì mỗi loại vi sinh vật có khả năng sinh trưởng phát triển ở pH môi trường khác nhau. Người ta chia vi sinh vật thành các nhóm theo khả năng phát triển ở các pH môi trường như sau: pH từ 2–4 là nhóm axit mạnh; 4–5: nhóm axit; 5–6: nhóm axit yếu; 6–7: nhóm trung tính; 7–8: nhóm kiềm nhẹ; 8–9: nhóm kiềm và trên 9: nhóm kiềm mạnh.

Đa số các vi sinh vật sinh trưởng, phát triển bình thường trong phạm vi pH trung tính, có loại chịu được pH thấp như *Thiobacillus ferrooxydans* có thể sinh trưởng ở pH 1–2, nấm mốc chịu được pH 4–5. Ngược lại, nhiều loài có thể sinh trưởng ở môi trường kiềm, pH 10.

Sự thay đổi pH là do hàm lượng ion H⁺ trong môi trường tạo nên. Hàm lượng H⁺ trong môi trường ảnh hưởng đến sự hoạt động của các enzym trong tế bào ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của chúng. Dựa vào khả năng chịu pH khác nhau của vi sinh vật, người ta thay đổi pH tạo điều kiện cho vi sinh vật phát triển hoặc ức chế khả năng phát triển của chúng.

Trong quá trình lên men sinh tổng hợp, pH môi trường thường giảm nhẹ vào thời gian đầu do sự phân huỷ các chất, như các protein thành các axit amin mang tính axit, sau đó pH thường tăng dần do quá trình trao đổi chất tạo ra các chất mang tính kiềm như các amoni,... Tuy nhiên, quá trình này còn phụ thuộc vào từng chủng vi sinh vật và sản phẩm tạo thành.

4.3.5. Áp suất

Phần lớn vi khuẩn không chịu ảnh hưởng của sự thay đổi áp suất, vì chúng được bảo vệ nhờ thành tế bào cứng. Nếu thành tế bào này bị phá huỷ, thì chất nguyên sinh bị giải phóng ra bên ngoài do áp suất bên trong tế bào thường cao hơn bên ngoài. Nếu ta tạo tế bào trần bằng cách dùng lysozym bóc vỏ tế bào, thì cần giữ cân bằng áp suất bằng cách đưa vào dung dịch đường saccarozơ 20%, nếu không chất nguyên sinh bị nổ vỡ. Tuy nhiên, điều đó không đúng với nhiều loại vi khuẩn có thể thích nghi với môi trường chứa đến 35g NaCl trong 1 lít. Tuỳ theo sự mãn cảm của chúng đối với áp suất thẩm thấu mà người ta chia thành các nhóm:

- Vi khuẩn không ưa mặn (non-halophiles) phát triển trong môi trường có nồng độ muối dưới 0,2 M như vi khuẩn Enterobacteria, Pseudomonas,...

– Ví khuẩn ưa mặn (halophile) cần nồng độ muối 0,2% đối với các loài ưa mặn trung bình (*P. mariana*); 5,2% đối với những loài ưa rất mặn như *Halococcus morrhueae*, *Halobacterium salinarium*,...

– Vi sinh vật chịu mặn (Halotolerants) như *Staphylococcus*, một số nấm men và nấm mốc, một số *Lactobacillus*.

Để tránh nhiễm trùng, thông thường trong nồi lên men người ta thường giữ ở áp suất dư (khoảng 0,3 đến 0,5atm). Nếu áp suất trong nồi lên men cao sẽ ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 4

1. Sinh trưởng và phát triển là thuộc tính của sinh vật, sự tăng lên về kích thước và khối lượng của tế bào thì đó là thuộc tính nào?
2. Việc nghiên cứu sinh trưởng, phát triển ở một cá thể vi sinh vật là rất khó, không thể thực hiện được. Vậy, khi nói đến sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật là đề cập đến sinh trưởng và phát triển của thông số nào?
3. Đối với số lượng tế bào vi khuẩn, mà thời gian từ 1 tế bào tăng lên 2 tế bào, thì được gọi là gì?
4. Đối với sinh khối tế bào vi sinh vật, mà khối lượng tế bào tăng lên gấp đôi hết bao nhiêu đơn vị thời gian (h), thì được gọi là gì?
5. Đếm trên đĩa thạch chuẩn (đếm các khuẩn lạc nhìn thấy) được biểu hiện số lượng nhìn thấy và thừa nhận mỗi vi sinh vật phát triển thành một khuẩn lạc thì số lượng vi sinh vật được trình bày bằng đơn vị nào?
6. Để nghiên cứu động thái sinh trưởng, phát triển của quần thể vi sinh vật trong hệ 'kin' (môi trường không đổi mới), người ta thường sử dụng loại môi trường nào?
7. Dựa vào đâu mà người ta chia vi sinh vật thành 2 nhóm sinh lý: vi sinh vật tự dưỡng và vi sinh vật dị dưỡng?
8. Vi sinh vật không có khả năng hấp thụ trực tiếp protein mà chỉ hấp thu được polypeptit không quá 5 gốc axit amin. Để có thể sử dụng được nguồn protein, vi sinh vật phải thuỷ phân protein bằng enzym nào?
9. Môi trường thường không cung cấp bổ sung các nguyên tố khoáng và nguyên liệu thường là khoai tây, nước thịt, sữa, huyết thanh, pepton,... có đủ các nguyên tố khoáng cần thiết, môi trường như vậy là môi trường có tên là gì?
10. Những vi sinh vật không nhất thiết cần các nhân tố sinh trưởng, những yếu tố của môi trường nuôi cấy là đầy đủ đối với chúng, những vi sinh vật này có tên là gì?

11. Với mục đích nghiên cứu sinh trưởng của hầu hết các cơ thể vi sinh vật dị dưỡng hữu cơ, người ta thường sử dụng môi trường loại nào?
12. Với mục đích ức chế các vi sinh vật không muốn, kích thích các vi sinh vật mong muốn để tuyển chọn nhanh các chủng cần thiết, người ta thường sử dụng môi trường loại gì?
13. Trong động thái của quá trình sinh trưởng và phát triển ở vi sinh vật, pha lag (tiền phát) là pha tính từ lúc bắt đầu cấy đến khi vi khuẩn đạt được tốc độ sinh trưởng cực đại, trong pha này sẽ xảy ra hiện tượng gì?
14. Quá trình phân giải khí các hợp chất hữu cơ, trong đó vi sinh vật dùng một chất làm chất cho điện tử (electron) và một chất làm chất nhận điện tử, tế bào thu năng lượng dưới dạng ATP do quá trình photphoryl hoá cơ chất, quá trình này được gọi là quá trình gì?
15. Vi sinh vật chỉ phát triển trong môi trường không có oxy và trong thực tế chúng thường bị ức chế hay bị giết chết khi môi trường có oxy. Vi sinh vật này thuộc loại nào?

Chương 5

KỸ THUẬT LÊN MEN VI SINH VẬT

5.1. CÁC PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN

Nghiên cứu một quá trình lên men thực chất là nghiên cứu các đặc điểm sinh lý – sinh hoá và hoạt động sống của một vi sinh vật, cũng như các đặc điểm sống của nó với các thông số như thành phần dinh dưỡng, các yếu tố ảnh hưởng và động học của toàn bộ quá trình này trong sản xuất công nghiệp nhằm đạt hiệu quả cao nhất, đáp ứng được yêu cầu của thị trường. Tuy nhiên, hiệu quả của quá trình lên men còn phụ thuộc vào vấn đề kỹ thuật lên men.

Chương này đề cập đến vấn đề kỹ thuật lên men, nghĩa là tìm các phương pháp và biện pháp kỹ thuật để tiến hành một quá trình lên men có hiệu quả.

5.1.1. Nuôi cấy vi sinh vật

Tùy theo tính chất cũng như các loại vi sinh vật mà lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp. Trong phòng thí nghiệm, thông thường người ta nuôi cấy vi sinh vật đã cấy trong môi trường đặc hay nuôi các bình trong tủ ấm có nhiệt độ được điều chỉnh phù hợp. Đối với vi khuẩn, thời gian thế hệ ngắn, thường thời gian nuôi được kéo dài 24 đến 48 giờ; còn đối với nấm men, vi nấm và xạ khuẩn, thường thời gian nuôi kéo dài 72 đến 120 giờ. Tuy nhiên, tùy từng loại vi khuẩn, thời gian nuôi có thể kéo dài hơn.

Phụ thuộc vào khả năng sử dụng oxy, người ta chia vi sinh vật thành 3 nhóm chính: (a) Vi sinh vật hiếu khí: phát triển ở hiệu thế oxy hoá cao (như cầu oxy cao); (b) Vi sinh vật yếm khí: phát triển ở hiệu thế oxy hoá thấp (không cần oxy); và (c) Vi sinh vật yếm khí tuỳ tiện: phát triển ở cả hiệu thế oxy hoá cao và hiệu thế oxy hoá thấp.

Trong tế bào vi sinh vật hiếu khí có đầy đủ hệ thống men hô hấp, trong quá trình oxy hoá dùng phân tử oxy làm chất nhận hydro (H^+); còn trong quá trình oxy hoá được thực hiện nhờ sự tham gia của các enzym dehydrolaza, chúng dùng các chất hữu cơ có liên kết không bão hòa làm chất nhận H^+ .

Với đặc tính của từng nhóm vi sinh vật, nghiên cứu điều kiện nuôi cấy vi sinh vật là cần thiết. Vì từ đó người ta xây dựng các công nghệ lên men phù hợp. Trong phòng thí nghiệm, nuôi cấy vi sinh vật kỵ khí thường khó thực hiện hơn các vi sinh vật hiếu khí. Tuy nhiên, các quá trình lên men kỵ khí trong thực tế lại dễ dàng hơn lên men các vi sinh vật hiếu khí.

Trên thực tế cũng cần làm rõ khái niệm lên men theo nghĩa rộng và nghĩa hẹp. Thông thường trước đây, khái niệm lên men theo nghĩa hẹp là chỉ sử dụng các vi sinh vật lên men kỵ khí như lên men rượu bia, lên men lactic, lên men một số dung môi hữu cơ, lên men metan,... Khái niệm lên men (fermentation) như vậy được hiểu là quá trình nhường năng lượng mà ở đó các phân tử hữu cơ vừa là chất cho electron, lại vừa là chất nhận electron, các phân tử được trao đổi này không có thể năng (potential energy) của nó được chiết ra. Nói cách khác, nó không bị oxy hoá hoàn toàn. Như vậy, cũng có thể định nghĩa như sau: Lên men là một quá trình chuyển hoá sinh học (biotrans–formation) các chất hữu cơ nhờ các vi sinh vật tạo thành năng lượng hoá học dưới dạng ATP không có oxy phân tử tham gia. Các quá trình lên men ở đây theo nghĩa hẹp và cũng còn được hiểu đây là các quá trình lên men các sản phẩm truyền thống. Còn lên men theo nghĩa rộng và thường sử dụng trong công nghiệp sản xuất là lên men sinh tổng hợp các sản phẩm như các chất kháng sinh, các loại enzym và các chất có hoạt tính sinh học khác.

Vi sinh vật có các hệ thống lên men phong phú. Hầu hết các hợp chất tự nhiên bị phân huỷ bởi một số loại vi sinh vật và thậm chí các hợp chất nhân tạo cũng có thể bị vi sinh vật tấn công mà không có oxy (hoặc các chất nhận điện tử vô cơ thích hợp khác), sự phân giải này liên quan đến sự lên men.

5.1.2. Các phương pháp lên men

Phụ thuộc vào đặc điểm sinh lý của vi sinh vật nuôi cấy đối với oxy, người ta coi các quá trình đó là hiếu khí, kỵ khí hay kỵ khí không bắt buộc (hiếu khí tùy tiện). Để thực hiện được những quá trình này, người ta đưa ra các phương pháp lên men dựa vào các phương pháp nuôi cấy:

a) Phương pháp lên men bề mặt (surface fermentation)

Thường vi sinh vật phát triển trên bề mặt môi trường. Ví dụ, vi sinh vật phát triển trên bề mặt môi trường thạch trong hộp Petri hay phát triển trên môi trường dịch thể trong bình nuôi. Phương pháp này đã được sử dụng nuôi cấy lên men sản xuất amylaza, axit xitic từ nấm *Aspergillus niger* và oxy được cung cấp trực tiếp từ không khí.

b) Phương pháp lên men trên môi trường xốp (solid-state fermentation)

Môi trường thường ở thể rắn và vi sinh vật cũng phát triển trên bề mặt vật liệu nuôi cấy. Oxy được cấp trực tiếp từ không khí như nuôi bề mặt. Phương pháp này thường được sử dụng trongủ mốc làm tương, nuôi mốc trên môi trường cơm để đường hoá trong quá trình làm rượu. Phương pháp này được sử dụng trongủ rác (composting) làm phân bón hữu cơ...

c) Phương pháp lên men chìm (immersed cultivation)

Đây là phương pháp nuôi cấy phổ biến trong công nghiệp sản xuất các chế phẩm sinh học. Phương pháp này không những chỉ sử dụng nuôi cấy các chủng vi sinh vật mà ngày nay người ta còn dùng nuôi cấy các tế bào động, thực vật. Theo nguyên tắc nuôi cấy chìm, các vi sinh vật phát triển trong môi trường dịch thể, đối với các vi sinh vật kỵ khí thì người ta không cấp khí, còn đối với vi sinh vật hiếu khí người ta thường cấp khí để cung cấp oxy cho vi sinh vật phát triển. Tuỳ theo nhu cầu oxy của từng loại vi sinh vật mà người ta sử dụng các phương pháp khác nhau để tăng lượng oxy hòa tan trong môi trường: tăng cường lượng khí cấp, sử dụng cánh khuấy với các tốc độ khác nhau, dùng cánh chắn làm tan bọt khí lớn,... (hình 5.2).

d) Phương pháp lên men bằng tế bào cố định

Các tế bào được cố định trên chất mang là các chất hữu cơ (như algenat, chitosan, polyacrelamit,...) hoặc các chất vô cơ có lỗ xốp (như zeolit, diaomit,...) thực hiện quá trình lên men. Phương pháp này sử dụng để sản xuất enzym, chuyển hoá các chất hữu cơ,...

Ngoài các phương pháp lên men chính kể trên, người ta còn cải tiến thành nhiều kiểu lên men khác nhau: như lên men có bổ sung cơ chất, lên men nhiều cấp,...

5.2. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TRUYỀN THỐNG

5.2.1. Khái niệm về lên men

Lên men (fermentation) là quá trình nhuường năng lượng mà ở đó các phân tử hữu cơ vừa là chất cho electron, lại vừa là chất nhận electron. Các phân tử được trao đổi này không có thế năng (potential energy) của nó được chiết ra. Các quá trình lên men ở đây theo nghĩa hẹp, còn lên men sinh tổng

hợp các sản phẩm như các chất kháng sinh, các loại enzym, các chất có hoạt tính sinh học khác không phải là đối tượng nghiên cứu của chương này.

5.2.2. Đặc điểm của quá trình lên men

Mặc dù có nhiều phương pháp mà vi sinh vật lên men các hợp chất hữu cơ, nhưng chỉ có một số khái niệm thống nhất được thật sự xem là sự lên men:

a) NAD⁺ hầu như luôn luôn bị khử thành NADH

Từ chương trước đã đề cập rằng, trao đổi chất bao gồm cả sự oxy hoá cơ chất. Các electron được chuyển sang từ các phân tử hữu cơ và hầu như luôn luôn nhường cho NAD (có trong cả trong lên men (fermentation) và trong hô hấp (respiration)).

b) Quá trình lên men cho nhiều NADH

Sự tích luỹ NADH là nguồn năng lượng cho vi sinh vật kỵ khí (anaerobe), chúng có nhiều NADH để thực hiện oxy hoá cơ chất làm cho không có NAD⁺ để nhận electron. Trong nhiều con đường lên men, sau khi sinh năng lượng, các bước được thực hiện tiếp theo là giải phóng NADH.

c) Pyruvat, chất trung gian quan trọng

Pyruvat là chất trung gian có giá trị, bởi vì nó có thể được sử dụng để tổng hợp tế bào và tạo ra các sản phẩm lên men. Điều đó cũng nhờ tính linh hoạt của vi sinh vật.

d) Năng lượng nhận được từ photphoryl hoá cơ chất (Substrate-level phosphorylation-SLP)

Cơ chất được chuyển tới hợp chất bị photphoryl hoá và các năng lượng được chuyển tới ATP.

e) Năng lượng tạo thành thấp

Photphoryl hoá cơ chất là quá trình không sinh năng lượng cao, nhiều năng lượng của electron bị mất. Tiêu biểu là các năng lượng sinh ra là 1 đến 4 ATP cho một phân tử cơ chất bị lên men (glucоз).

f) Oxy không tham gia

Lên men có thể không liên quan đến quá trình oxy hoá. Tuỳ thuộc vào cơ chất, trong đó có loại đường (như glucоз), mà sản phẩm được tạo thành

có thể là các axit amin, axit lactic, axit axetic, các loại rượu (ethanol, metanol, butanol), các keton (acetone) và khí (H_2 và CO_2).

5.2.3. Con đường chuyển hóa trong quá trình lên men - *Con đường glycolysis (EMP)*

EMP hầu như sử dụng hàng loạt các phản ứng để oxy hóa glucose thành pyruvate và nhiều vi sinh vật, động vật và thực vật ưa thích con đường này trong quá trình dị dưỡng của mình. EMP rất thường gặp ở những vi sinh vật thích sử dụng nó để lên men. Nó là một phần thiết yếu của quá trình dị hóa ở các cơ thể sinh vật. Tuy nhiên, vi sinh vật lên men là trường hợp ngoại lệ, ở các vi sinh vật khác còn có các con đường chuyển hóa khác nhau ở những loài khác nhau. EMP có thể chia làm 3 giai đoạn: hoạt hóa glucose, phân cắt hexose và thu nhận năng lượng:

– Hoạt hóa glucose:

Glucose là phân tử bền vững và muốn phân giải trước hết cần làm yếu bằng cách bổ sung photphat năng lượng cao. Bước đầu tiên, photphat được nhường từ ATP (hoặc photphoenol-pyruvate-nguồn photphat phụ thuộc vào loài vi sinh vật) đến glucose để hình thành glucose-6-photphat. Phân tử này được isomer hóa đến fructose-6-photphat (loại đường khác) và một photphat thứ hai lại được thêm vào để tạo thành fructose-1,6-bisphotphat dễ bị enzym tấn công hơn so với glucose và dễ dàng phân cắt làm hai phân.

– Phân cắt hexose :

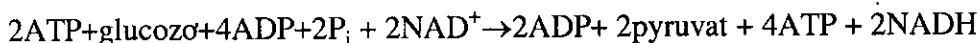
Enzyme fructose-bisphotphat aldolaza cắt photphat đính vào fructose thành 2 hợp chất 3 cacbon: glyceraldehyde-3-photphat (GAP) và dihydroxyacetone – photphat (DAP). Đó là bước quyết định trong con đường EMP, chuyển phân tử glucose-6-cacbon đến 2 phân tử 3 cacbon, cuối cùng thành pyruvate.

– Thu nhận năng lượng:

Trong phản ứng tiếp theo, DAP sẽ chuyển thành GAP, nó có thể được hoạt hóa lên bởi khâu cuối cùng của con đường EMP. Bước tiếp theo, photphat vô cơ được gắn vào GAP tạo nên 1,3-bisphotpho-glycerat (BPG). Không đòi hỏi năng lượng và các electron cuối cùng được chuyển từ GAP đến NAD^+ . Phản ứng này làm cho photphat được chuyển vào ADP tạo thành

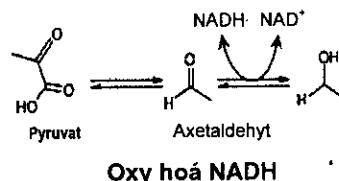
ATP. Sau hàng loạt các phản ứng enzym, sản phẩm cuối cùng của con đường EMP là pyruvat.

Các phản ứng được tóm tắt như sau:



Năng lượng nhận được tích luỹ trong 2 ATP cho 1 glucozơ. Lên men không sinh năng lượng lớn và điều này giải thích tại sao vi sinh vật lên men có thể có nhiều cơ chất không sinh trưởng mạnh.

Một số NADH được sinh ra có thể sử dụng để sinh tổng hợp tế bào, nhưng giới hạn năng lượng khử (reducing power). Vì khuẩn lên men nhất thiết phải tìm cách giải phóng năng lượng dư và để làm việc đó chúng giải phóng các electron dư và lại được bổ sung vào quá trình hình thành các sản phẩm cuối cùng.



Oxy hoá NADH

5.2.4. Các sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men

Một trong số các lên men quen thuộc là sự chuyển hoá glucozơ thành etanol – đồ uống có cồn. Sau khi hình thành pyruvat, etanol được hình thành bởi 2 phản ứng đơn giản. Thứ nhất, CO_2 tách khỏi pyruvat hình thành axetaldehyt, sau đó axetaldehyt bị khử bởi NADH).

Axetaldehyt bị khử thành etanol (thành phần chính trong đồ uống có cồn). Đây là giai đoạn cuối cùng trong lên men nấm men chuyển hoá glucozơ thành etanol.

Loại lên men ưa thích khác của vi khuẩn là sự hình thành axit lactic. Nó được thực hiện nhờ vi khuẩn lactic. Vi khuẩn lên men lactic đồng hình (homo-fermentation) sử dụng con đường chuyển hoá EMP đến pyruvat và sau đó khử pyruvat đến lactat bằng cách sử dụng nhiều NADH trong quá trình. Ở vi khuẩn có các con đường chuyển hoá xen kẽ để hình thành lactat từ glucozơ. Kiểm tra quá trình lên men dị hình (hetero-fermentation) cho thấy, nó không chỉ sử dụng con đường EMP.

Con đường chuyển hoá sử dụng được xác định là con đường đường phân (glycolysis). Sản phẩm cuối cùng là lactat được vi khuẩn bài tiết ra môi trường.

Ở vi sinh vật, quá trình lên men được thực hiện bằng nhiều con đường so với những con đường được nêu ở đây, nhưng những ví dụ ở đây cũng chỉ cho

ta một số ý tưởng chung. Trong những phần tiếp theo, chúng ta sẽ xem xét một số quy trình sử dụng để sản xuất các sản phẩm thực phẩm.

5.2.5. Các quá trình lên men

a) *Lên men rượu (etylic)*

- Sản xuất rượu etylic (cồn)
- Sản xuất rượu vang
- Sản xuất bia
- Sản xuất nấm men bánh mỳ
- Sản xuất sinh khối nấm men, sản xuất protein đơn bào.

b) *Lên men lactic*

- Sử dụng vi khuẩn lactic trong công nghiệp chế biến thịt, sữa.
- Sử dụng vi khuẩn lactic trong muối chua rau quả và ủ chua thức ăn xanh cho gia súc.
- Ứng dụng của vi khuẩn lactic trong sản xuất các loại đồ uống lên men.
- Vai trò nâng cao sức khoẻ và ngăn ngừa bệnh tật cho người và động vật.
- Lên men chua tôm, cá, sản phẩm truyền thống của Việt Nam.

c) *Lên men hỗn hợp axit hữu cơ và lên men butandiol*

d) *Lên men propionic*

e) *Lên men butyric và axeton–butyric*

f) *Lên men fomic*

g) *Lên men metan (trước đây còn có tên lên men fomenic)*

5.2.6. Tóm tắt các quá trình lên men

Xuất phát từ bản chất và sản phẩm cuối cùng của các quá trình lên men mà người ta có thể tóm tắt các quá trình theo bảng 5.1.

Lên men theo nghĩa hẹp để chỉ các quá trình lên men khí, các chất để thu năng lượng, mà trong đó hydro được tách ra từ một chất 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.

Hô hấp hiếu khí là các hợp chất được phân huỷ hoàn toàn, hydro được chuyển qua hàng loạt các giai đoạn trung gian và cuối cùng kết hợp với oxy để tạo thành nước và giải phóng CO_2 . Trong hô hấp khí, vi sinh vật sống trong điều kiện khí (bắt buộc hay không bắt buộc) thì chất nhận điện tử

cuối cùng không phải là oxy phân tử, mà là oxy của nitrat hoặc sunphat, một số trường hợp là CO_2 .

BẢNG 5.1. TÓM TẮT CÁC VI SINH VẬT, CƠ CHẾ VÀ SẢN PHẨM CỦA CÁC QUÁ TRÌNH LÊN MEN CHÍNH

Lên men	Vi sinh vật	Cơ chế và sản phẩm	Ghi chú
Rượu	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S. slippsoides</i> <i>S. carlsbergensis</i> <i>Zymomonas mobilis</i> Một số nấm mốc	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ + 113,4kJ (tỷ lệ các sản phẩm lên men bởi <i>Saccharomyces</i> (%): etanol – 48,4, CO_2 – 46,6; glycxrol – 3,3; axit succinic – 0,6; sinh khối – 1,2.	pH 4,5 Đường có thể lên men. Ky khí. Nhiệt độ 25–33°C. Lượng men giống 0,26%.
Lactic	Lactic đồng hình <i>Streptococcus lactis</i> <i>Pediococcus</i> Lên men dị hình <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> Và một số nấm mốc, vi khuẩn khác Lên men mololactic <i>Lactobacillus oenos</i> và một số vi khuẩn khác	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 + 136\text{kJ}$ Trong lên men đồng hình: 1 mol lactozơ → 4 lactat + 5 ATP (2ATP/1 glucozơ). Trong lên men dị hình: 1 mol lactozơ → 3 lactat + 4 ATP (1ATP/1 glucozơ). Axit hữu cơ → axit (axit xitic, axit axetic, axit malic,...)	Lên men do <i>Bifidobacterium</i> khác với lên men do vi khuẩn lactic ở chỗ chúng sinh ra một số lớn axit axetic so với axit lactic (3 : 2). – Lên men lactic đồng hình thì không cho CO_2 , khác với dị hình. – Môi trường giàu axit hữu cơ như axit malic, axit xitic,... quá trình xảy ra sau lên men rượu vang.
Hỗn hợp axit hữu cơ và butandiol	Vi khuẩn họ: <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Aerobacter</i>)	Glucozơ → Etanol + axetat + lactat + succinat + CO_2 + H_2 . $\text{Glucozơ} \rightarrow \text{butandiol} + \text{etanol} + \text{fumarate} + \text{lactate} + \text{succinate} + \text{CO}_2$.	pH axit yếu.
Propionic	<i>Propiobacterium</i> (con đường succinat) <i>Clostridium</i> (con đường	Glucozơ → axit propionic + axit axetic + CO_2 + H_2O .	Ky khí không bắt buộc.

	acrylat) và một số vi sinh vật khác	(3 lactat → 2 propionat + axetat + CO ₂ + 1 ATP)	
Butyric và axeton-butyric	<i>Clostridium butyrium</i> <i>C. pasteurianum</i> <i>C. acetobutylicum</i>	Glucosz → Axetat + butyrat + CO ₂ + H ₂ (3ATP/ glucosz). Glucosz → butanol + axeton + CO ₂ + H ₂ (2 ATP/ glucosz)	
Fomic	Vì khuẩn đường ruột	Glucosz → axit fomic + axit succinic... HCOOH → CO ₂ + H ₂ .	
Metan	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanosarcina</i>	CO ₂ → CH ₄ + 2H ₂ O (~32,4 kcal). 4 CH ₃ OH → 3CH ₄ + CO ₂ + 2H ₂ O (~76,4 kcal).	

Ví dụ, sự lên men giúp cho nấm men có thể sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí, về mặt sử dụng chất dinh dưỡng cho sinh trưởng thì lên men là không kinh tế, vì phần lớn năng lượng còn ở trong cơ chất đang được phân giải và thải vào môi trường.

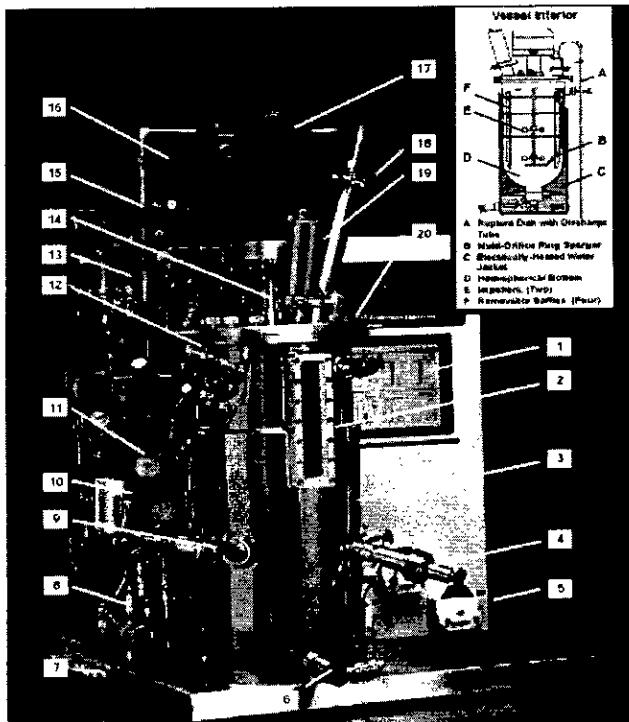
5.3. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ LÊN MEN SINH TỔNG HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN CHÌM

5.3.1. Các giai đoạn chính của quá trình lên men sản xuất sản phẩm có hoạt tính sinh học

Sau khi phát hiện ra khả năng sinh các hợp chất mong muốn, chủng vi sinh vật được nuôi trong bình nhỏ trong phòng thí nghiệm để lựa chọn môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp (hình 5.1). Thông thường, hệ thống lên men trong phòng thí nghiệm thường có dung tích lên men nhỏ từ 1–10 lít. Hiện nay, các thiết bị lên men trong phòng thí nghiệm thường có các hệ thống kiểm soát chặt chẽ các điều kiện lên men như tốc độ khuấy, nhiệt độ, pH, nồng độ oxy hòa tan, khả năng sinh bọt,... Chế độ lên men đã định sẵn được lập trình bằng máy tính và kiểm soát toàn bộ quá trình lên men. Các thông số lên men nhận được, được ghi lại trên máy tính để tìm được điều kiện lên men tối ưu.

Để khẳng định các điều kiện và môi trường lên men thích hợp, hiệu suất lên men đảm bảo đưa vào sản xuất công nghiệp, thì bước tiếp theo phải được

sản xuất thử nghiệm ở mức độ lớn hơn, mức độ pilot với thiết bị lên men ở các cấp độ 100 đến 500 lít (hình 5.2). Nếu chất lượng sản phẩm cũng như điều kiện lên men đã ổn định thì tiến hành sản xuất sản phẩm ở mức độ công nghiệp.



Nồi lên men 20 lít

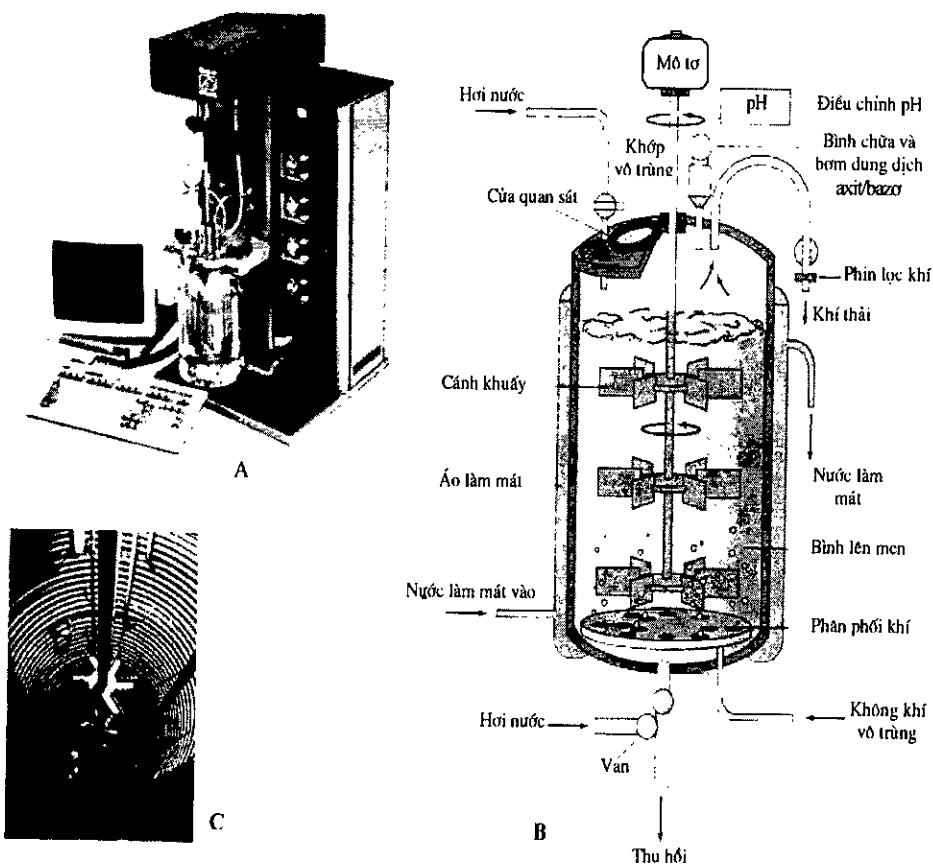
1. Bảng hiển thị
2. Cửa sổ
3. Vô bảo vệ
4. Cầm lấy mẫu
5. Bơm nhu động
6. Van thu nhận dịch, xả đáy
7. Van cấp nước, khí, hơi nước
8. Van an toàn
9. Cửa lắp đặt các đầu đo
10. Điều chỉnh nhiệt độ
11. Đèn nhiệt độ
12. Van kiểm tra vô trùng
13. Phin lọc khí thái
14. Van an toàn áp suất dư
15. Thiết bị điều chỉnh áp suất
16. Đường dẫn khí thái
17. Motor
18. Vô bảo vệ motor
19. Cửa soi đèn
20. Cửa có thể lắp đặt thiết bị

Hình 5.1. Thiết bị lên men nhỏ trong phòng thí nghiệm

Ví dụ, những thành công của lĩnh vực sản xuất kháng sinh có thể khẳng định là năng suất phụ thuộc vào quá trình công nghệ bao gồm các giai đoạn chính sau:

a) Giai đoạn sinh tổng hợp (tạo thành) sản phẩm

Đây là giai đoạn bao gồm các quá trình phức tạp để thu nhận sản phẩm. Nhiệm vụ chính của giai đoạn này là tối ưu điều kiện để phát triển sinh khối của chủng sản xuất và tổng hợp sản phẩm mong muốn cao nhất. Điều này phụ thuộc vào hoạt tính sinh tổng hợp của chủng, thời gian tích luỹ kháng sinh cao nhất, chất lượng môi trường nuôi cấy chủng sản xuất, loại tiền chất bổ sung, cũng như năng lượng tiêu hao liên quan đến sự phát triển của chủng sản xuất.



Hình 5.2. Thiết bị lên men

- A. Hệ thống lên men với bình lên men nhỏ (5 lít) dùng trong nghiên cứu
- B. Sơ đồ thiết bị lên men; C. Bên trong thiết bị lên men lớn.

b) Giai đoạn tiền xử lý dịch nuôi cấy (để tách sinh khối khỏi dịch nuôi cấy)

Giai đoạn này ảnh hưởng nhiều bởi thành phần môi trường nuôi cấy, khả năng sinh trưởng của chủng sản xuất và vị trí tích luỹ các hoạt chất (trong dịch nuôi cấy hay trong sinh khối).

c) Giai đoạn tách chiết và tinh sạch sản phẩm

Giai đoạn này phụ thuộc nhiều vào tính chất, cấu trúc của hoạt chất và vị trí mà chúng tích tụ chính khi sử dụng các phương pháp tách chiết và tinh sạch khác nhau. Các phương pháp chính thường là: Chiết rút bằng dung môi, kết tủa, hấp thụ trên các vật liệu trao đổi ion, cô đặc và sấy khô.

d) Giai đoạn thu nhận thành phẩm và chế biến thành phẩm

Để đảm bảo chất lượng sản phẩm (ví dụ như thuốc kháng sinh, vacxin, thực phẩm chức năng,...) thì giai đoạn này cần vệ sinh quá trình chế biến theo tiêu chuẩn an toàn: An toàn thực phẩm hay an toàn thuốc (GMP).

Hiện nay, trong sản xuất các sản phẩm sinh học hiện đại cần thiết phải xác định giảm chi phí tối đa cho một đơn vị sản phẩm. Muốn đạt được điều đó cần phải:

- Sử dụng các chủng sản xuất có hiệu suất cao nhất.
- Tạo điều kiện thuận lợi cho sinh trưởng, phát triển của chủng sản xuất, đặc biệt là môi trường nuôi cấy.
- Sử dụng các phương pháp lập quy hoạch thực nghiệm để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy (môi trường và điều kiện lên men) để thu nhận sản phẩm với hiệu suất cao nhất.
- Sử dụng hệ thống thiết bị của toàn bộ quá trình được điều khiển tự động dựa trên các thông số chính cho sự phát triển của chủng sản xuất và sinh tổng hợp các sản phẩm sinh học.

5.3.2. Các phương pháp nuôi cấy chủng vi sinh vật sản sinh các chất có hoạt tính sinh học

Trong điều kiện hiện nay, ở mức độ sản xuất công nghiệp, phương pháp nuôi cấy các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh cũng như các chất có hoạt tính sinh học khác thường được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy chìm. Đó là phương pháp nuôi cấy chủng sản xuất trong môi trường dinh dưỡng dịch thể được cấp không khí vô trùng và đảo trộn liên tục. Từ đó có thể cải biến thành các phương thức lên men theo phương pháp nuôi cấy chìm các chủng vi sinh vật như sau:

a) Lên men theo mẻ

Cả quá trình phát triển của vi sinh vật diễn ra chỉ trong một nồi lên men, sau khi giải phóng dịch nuôi cấy của mẻ trước, rửa sạch cho môi trường lên men mới, sau thanh trùng lại tiếp tục lên men mẻ mới.

b) Lên men theo mẻ có bổ sung

Nuôi cấy vi sinh vật trong nồi lên men chỉ có 30–60% thể tích dịch lên men, sau một thời gian lên men nhất định, bổ sung thêm lượng môi trường mới cho đủ 100% thể tích môi trường lên men.

c) Lên men nhiều bình lên men

Vi sinh vật được phát triển trong các bình lên men liên tiếp. Dịch nuôi cấy của một giai đoạn phát triển nhất định của vi sinh vật sẽ được chuyển

từ nồi lên men thứ nhất sang nồi thứ hai, sau đó từ nồi thứ hai sang nồi thứ ba,... Khi nồi lên men được giải phóng, nhanh chóng bổ sung môi trường và cấy giống mới. Với cách nuôi cấy vi sinh vật này có thể sử dụng dung tích nồi lên men hợp lý hơn.

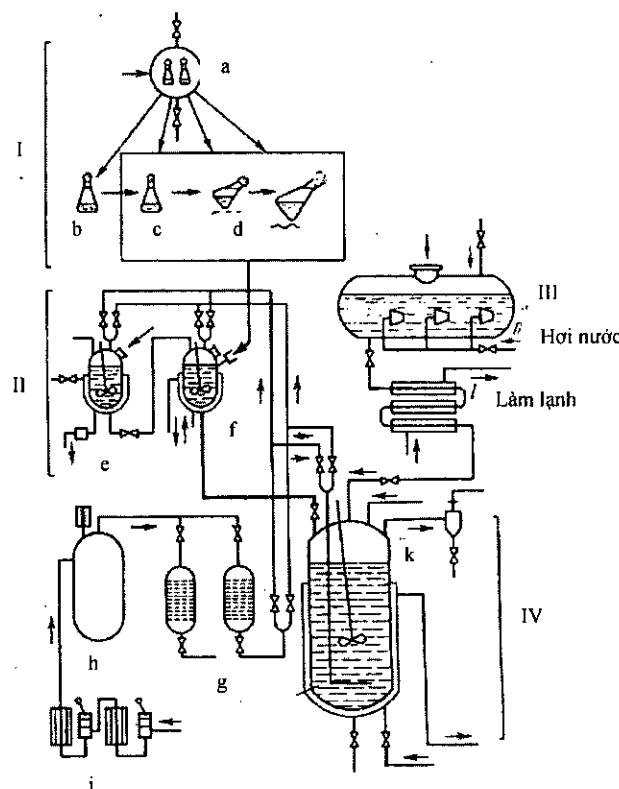
d) Lên men liên tục

Giống như phương pháp lên men chiểu sâu, nhưng vi sinh vật phát triển trong điều kiện dòng chảy của môi trường dinh dưỡng và dịch nuôi cấy liên tục vào và ra khỏi nồi lên men, cho phép luôn giữ sự sinh trưởng của vi sinh vật ở một giai đoạn nhất định. Giai đoạn sinh trưởng đó được xác định là giai đoạn vi sinh vật sinh tổng hợp lượng sản phẩm cao nhất. Hiện nay, phương pháp lên men liên tục đang được nghiên cứu phát triển bằng cách: các chủng sản xuất được cố định (immobilization) tế bào trên các chất mang khác nhau như alginat-Na, chitosan,... Ưu điểm của phương pháp này là kiểm soát được quá trình lên men, tiết kiệm được nguyên liệu sản xuất và không đòi hỏi dung tích nồi lên men lớn.

5.3.3. Lên men sản xuất ở mức độ công nghiệp

I. Chuẩn bị vật liệu nhân giống (giống mẹ); II. Nhân giống để nhận lượng giống cao hơn; III. Thiết bị khử trùng môi trường cho nồi lên men lớn; IV. Bộ phận chính để sinh tổng hợp kháng sinh

a. Thanh trùng môi trường trong bình thuỷ tinh; b. Đè nguội và cấy giống từ ống thạch nghiêng; c và d. Nhân giống mẹ bằng lên men tĩnh hoặc trên máy lắc; e và f: Nồi nhân giống môi trường đã thanh trùng hay với môi trường đã cấy giống của chủng sản xuất; g. Phin lọc khí vô trùng; h. Bình chứa khí; i. Máy nén khí; k. Nồi lên men; l. Áo làm lạnh nồi lên men.



Hình 5.3. Sơ đồ quá trình công nghệ sản xuất kháng sinh (Egorov, 1970)

Trong sản xuất các sản phẩm sinh học từ vi sinh vật ở mức độ công nghiệp, đây là giai đoạn quan trọng nhất, bao gồm các quá trình phức tạp. Ngoài việc tạo được chủng sản xuất có hiệu suất cao, nhiệm vụ chính của giai đoạn này là tối ưu điều kiện lên men để phát triển sinh khối và tổng hợp kháng sinh cao nhất.

Quá trình công nghệ lên men sản xuất kháng sinh cũng như các chất có hoạt tính sinh học từ các chủng vi sinh vật được Kohler, 1956, mô tả theo sơ đồ ở hình 5.3, bao gồm các bước: Chuẩn bị giống, nhân giống và lên men sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học.

a) Chuẩn bị môi trường

Khâu chuẩn bị môi trường nhân giống cũng như môi trường lên men là khâu quan trọng, vì phụ thuộc vào từng loại chủng sản khác nhau được chuẩn bị khác nhau. Một môi trường chất lượng tốt phải đáp ứng các yêu cầu sau: (1) đảm bảo cho vi sinh vật phát triển và cho hoạt tính cao nhất, (2) thành phần dễ kiểm, (3) dễ lọc và (4) thuận tiện cho việc tách chiết và tinh sạch sản phẩm.

Điều quan trọng nhất của khâu chuẩn bị môi trường là thanh trùng, nếu môi trường có chất dễ bị phân huỷ ở nhiệt độ cao kéo dài thì phải có chế độ khử trùng riêng. Tuy nhiên, hầu hết các loại môi trường được thanh trùng trong nồi áp suất cao, thời gian thanh trùng rút ngắn, vừa đảm bảo chất lượng môi trường, vừa tiết kiệm năng lượng. Môi trường trong các bình nhỏ như bình tam giác hay bình thuỷ tinh được thanh trùng trong nồi áp suất riêng, còn ở môi trường lớn người ta thanh trùng ngay trong nồi lên men.

Có 2 phương pháp thanh trùng môi trường chính: gián đoạn và liên tục.

– Phương pháp gián đoạn thường sử dụng cho thanh trùng môi trường lên men không lớn bằng cách đun nóng môi trường lên nhiệt độ và áp suất nhất định, kéo dài 30 đến 60 phút, sau đó được làm lạnh đến 27–30°C. Đối với môi trường lên men sản xuất lớn thường thời gian giữ nhiệt giảm hơn (bảng 5.2).

BẢNG 5.2. THỜI GIAN THANH TRÙNG Ở NHIỆT ĐỘ CAO VỚI THỂ TÍCH MÔI TRƯỜNG KHÁC NHAU

Kích thước nồi lên men (lít)	Thời gian khử trùng (phút)		Kích thước nồi lên men (lít)	Thời gian khử trùng (phút)	
	105°C	121°C		105°C	121°C
230	28,0	17,5	9.800	41,3	11,3
980	33,7	12,5	98.000	51,5	8,8

– Phương pháp liên tục sử dụng cho việc thanh trùng môi trường có thể tích lớn, bằng cách như sau: Môi trường sau khi chuẩn bị, chuyển vào thiết bị khử trùng dạng cột có hệ thống ống xoắn bằng máy bơm đặc biệt, cho hơi nước qua với áp suất khoảng 5 atm, nhiệt độ đạt 125–130°C, kéo dài 5–10 phút. Sau đó được làm lạnh và chuyển vào nồi lên men. Phương pháp này có nhiều ưu điểm: Có thể tự động hóa quá trình, thời gian nhanh và đồng đều, đảm bảo độ vô trùng cao hơn,...

b) Chuẩn bị vật liệu nhân giống

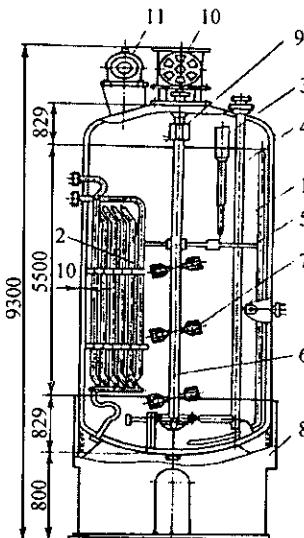
Chuẩn bị vật liệu nhân giống là bước quan trọng cho cả quá trình lên men sinh tổng hợp. Chủng sản xuất thông thường được nuôi trong môi trường giàu dinh dưỡng. Quá trình này bao gồm các bước: Giống được hoạt hóa trên môi trường dinh dưỡng thạch trong ống nghiệm, sau đó cấy sang môi trường dinh dưỡng lỏng và nuôi trên máy lắc 2 – 3 ngày. Sau kiểm tra chất lượng, giống được cấy truyền 0,5 – 1% sang môi trường nhân giống cấp 1.

c) Lên men chủng sản xuất trong nồi lên men

Quá trình phát triển của chủng sản sinh kháng sinh trong môi trường lên men phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của chúng. Ngoài thành phần môi trường dinh dưỡng (nguyên cacbon, nitơ, photphat,...), thì điều kiện tối ưu cho vi sinh vật: nhiệt độ, pH môi trường, mức độ cấp khí và oxy hòa tan cũng phải được kiểm soát. Điều này phụ thuộc rất lớn vào chất lượng của nồi lên men (fermentor).

Để nghiên cứu điều kiện hình thành các chất có hoạt tính sinh học ở mức độ công nghiệp thì cần thiết sử dụng nồi lên men để đánh giá khả năng lên men của các chủng sản xuất.

Nồi lên men là một thiết bị khá phức tạp, tạo điều kiện thuận



Hình 5.4. Cấu tạo nồi lên men dung tích 50m³

(theo Egorov, 1970)

1. Vò nồi; 2. Hệ thống trao đổi nhiệt;
3. Nhiệt kế; 4. Ống cấp khí;
5. Thanh đỡ trực cánh khuấy;
6. Trục cánh khuấy; 7. Cánh khuấy;
8. Giá đỡ nồi lên men; 9. Khớp nối;
10. Bộ phận chuyển động ; 11. Mô tơ

lợi cho chủng sản xuất phát triển và sinh tổng hợp kháng sinh trong điều kiện nuôi cấy chìm. Nồi lén men phải có các hệ thống phân phôi khí, khuấy trộn môi trường, giữ được nhiệt độ cần thiết cũng như có thiết bị lấy mẫu và kiểm tra được các thông số cần thiết (hình 5.4).

Cấp khí cho nồi lén men thông qua ống dẫn khí và được đảo trộn, làm không khí tan trong môi trường bằng cánh khuấy, muốn tăng lượng oxy hòa tan cần có hệ thống khuấy được cải tiến, ngoài việc sử dụng cánh khuấy đảo trộn môi trường, người ta còn đặt các hệ thống chắn sao cho không khí tan đều vào môi trường lên men.

Giữ nhiệt độ thích hợp cho chủng sản sinh kháng sinh cũng là làm tăng khả năng sinh trưởng và hoạt tính sinh lý, sinh hoá của chủng. Do vậy, cần có hệ thống làm mát bằng cách cho nước đã làm lạnh qua hệ thống ruột gà hoặc qua lớp vỏ áo của nồi lén men, vì quá trình sinh trưởng của chủng sản xuất là quá trình oxy hoá, nhiệt sinh ra lớn làm cho môi trường nóng lên.

Để giữ cho quá trình lên men theo quy trình đã định, cần có hệ thống kiểm soát và điều khiển các thông số cần thiết như điều chỉnh nhiệt độ, điều chỉnh pH bằng hệ thống cung cấp dung dịch axit hay bazo, điều chỉnh lượng oxy hòa tan và giữ áp suất nồi lén men,... đặc biệt, quá trình lên men có sục khí, độ nhớt của môi trường tăng lên, tạo lượng bọt lớn, do vậy phải có hệ thống kiểm soát bọt và bổ sung dầu phá bọt, thường bổ sung dầu chống bọt từ từ, nếu cho nhiều sẽ ảnh hưởng đến quá trình lên men.

Phụ thuộc vào nhu cầu mà sử dụng các nồi lén men có dung tích khác nhau, trong phòng thí nghiệm thường sử dụng bình lén men bằng thuỷ tinh hoặc bằng thép không gỉ có dung tích không vượt quá 30 lít và thanh trùng rời. Còn sử dụng ở mức độ bán sản xuất (pillot) thường sử dụng nồi lén men bằng thuỷ tinh hay bằng thép không gỉ với dung tích nồi không quá 100 lít. Trong điều kiện sản xuất công nghiệp, dung tích nồi lén men có khác nhau: từ 500 lít đến $50m^3$ và $100m^3$. Ở mức độ bán sản xuất và sản xuất công nghiệp, khử trùng môi trường thường kết hợp với thanh trùng nồi lén men theo một hệ thống hơi chung.

Không khí dùng để cấp vào môi trường lên men được thanh trùng bằng cách cho không khí qua phin lọc đặc biệt xếp đầy bông thuỷ tinh và than hoạt tính. Trong công nghiệp, phin lọc bông thuỷ tinh được sử dụng rộng rãi nhất. Tuy nhiên, tế bào vi khuẩn hoặc bào tử cũng thường lọt qua theo dòng khí, nếu áp suất và tốc độ dòng khí lớn. Thường tốc độ của dòng khí tối đa

giới hạn 10 – 25cm/giây (phụ thuộc vào mật độ của các lớp bông thuỷ tinh trong phin lọc).

d) Xử lý dịch lên men, tách chiết và tinh sạch sản phẩm

Phần lớn các chủng vi sinh vật sản sinh các chất có hoạt tính sinh học tách ra khỏi sinh khối vào môi trường xung quanh, nhưng nhiều trường hợp chỉ một phần tiết vào môi trường lên men, phần còn lại vẫn nằm trong sinh khối. Ngược lại, cũng có chủng vi sinh vật sau quá trình lên men, các chất lại chỉ tích tụ trong sinh khối.

Phụ thuộc vào bản chất hoá học của chúng mà lựa chọn phương pháp tách chiết phù hợp. Nếu các chất nằm trong dịch nuôi cấy thì lựa chọn các phương pháp chiết rút dung môi không hỗn hợp với nước, kết tủa thành dạng hợp chất không hòa tan hoặc hấp thụ bằng nhựa trao đổi ion; còn các chất nằm trong tế bào vi sinh vật thì chọn phương pháp chiết rút dung môi hữu cơ. Trước khi tiến hành chiết rút kháng sinh từ dịch nuôi cấy, phải loại tế bào (sinh khối) của chủng sản xuất bằng phương pháp lọc hay ly tâm. Có 2 loại máy lọc phổ biến: 1) lọc ép khung bản và 2) lọc tang trống,... Quá trình lọc ép khung bản thường được thực hiện bởi áp suất nén, còn lọc tang trống thực hiện bằng máy hút chân không. Một điều đáng lưu ý, pH của dịch nuôi cấy không những ảnh hưởng sản phẩm đi ra môi trường nhiều hay tích tụ trong sinh khối nhiều (ví dụ, nếu pH của dịch nuôi cấy *Streptomyces rimosus* thấp (axit), oxytetracyclin đi ra môi trường nhiều, ngược lại, nếu pH kiềm lại tích tụ trong sinh khối nhiều hơn) mà chúng còn ảnh hưởng đến quá trình lọc. Dịch lên men của một số loại vi sinh vật có độ nhớt cao gây khó khăn cho quá trình lọc, do vậy người ta cũng thường bổ sung một số chất trợ lọc để quá trình lọc diễn ra tốt hơn. Để không những chỉ tách sinh khối mà còn loại bỏ các chất không có lợi trong dịch lên men, người ta sử dụng phương pháp ly tâm, thường tốc độ quay lớn 15.000 vòng/phút.

Mục đích làm sạch hoá học là sau khi các chất (ví dụ các chất kháng sinh) tách khỏi dịch lọc hay khỏi sinh khối, được cô đặc và loại bỏ các tạp chất, cuối cùng nhận được chế phẩm sạch. Điểm đáng chú ý là các chất này thường bị mất hoạt tính trong điều kiện nhiệt độ cao, axit hoặc kiềm cao. Do vậy, khi tách chiết và làm sạch, sử dụng các điều kiện thích hợp sao cho các chất giữ được hoạt tính.

Các phương pháp cơ bản tinh sạch các chất kháng sinh như sau:

- Phương pháp chiết rút: Làm sạch các chất nhiều lần bằng chiết rút dung môi, sau đó kết tủa và tinh chế.
- Phương pháp hấp thụ trao đổi ion: Phương pháp này dựa trên bản chất hoá học của các chất: axit, bazơ hay hợp chất vô định hình được hấp phụ trên nhựa trao đổi ion mang điện tích dương hay âm, dạng cationit hay anionit trong cột, sau đó sử dụng dung dịch để thải các chất mong muốn khỏi nhựa ion. Dung dịch nhận được tinh sạch hơn.

- Phương pháp kết tủa: Dựa trên bản chất hoá học của các chất là chất hữu cơ hay vô cơ có thể kết tủa. Chất kết tủa được lọc hay ly tâm khỏi dịch lọc. Sau khi sấy khô nhận được ở dạng bột tinh sạch hơn.

Sau khi dịch các chất nhận được ở dạng dung dịch đậm đặc, sử dụng máy đông khô hay máy sấy phun để nhận được chế phẩm ở dạng bột.

Phương pháp tách chiết và tinh sạch hoá học cũng như chất lượng của thiết bị và hoá chất có ý nghĩa to lớn đến chất lượng của chế phẩm sinh học nhận được.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 5

1. Yếu tố nào sau đây: Thành phần môi trường dinh dưỡng; Nhiệt độ bên trong thiết bị lên men; Nhiệt độ bên ngoài không khí và Chế độ cấp khí không ảnh hưởng đến quá trình lên men trong nồi lên men?
2. Phụ thuộc vào khả năng sử dụng oxy, người ta chia vi sinh vật thành mấy nhóm?
3. Trong tế bào vi sinh vật hiếu khí có đầy đủ hệ thống men hô hấp, trong quá trình oxy hoá dùng phân tử nào để làm chất nhận hydro?
4. Định nghĩa các quá trình lên men theo nghĩa hẹp là chỉ sử dụng các vi sinh vật lên men là lên men kỵ khí như lên men rượu bia, lên men lactic, lên men một số dung môi hữu cơ, lên men metan?
5. Các chất nào sau đây: Etanol, axit lactic, axit xitic và axit propionic, không phải sản phẩm của các quá trình lên men theo nghĩa hẹp?
6. Phương pháp đã được sử dụng nuôi cấy lên men sản xuất amyłaza, axit xitic từ nấm *Aspergillus niger*, oxy được cung cấp trực tiếp từ không khí lên bề mặt môi trường lỏng. Phương pháp này thuộc phương pháp lên men nào?
7. Quá trình lên men xử lý rác thải bằng phương pháp ủ (composting) có cấp khí thuộc phương pháp lên men nào?

8. Dựa vào các vi sinh vật, cơ chế và sản phẩm của các quá trình lên men chính bằng các sản phẩm lên men khí, người ta đã tóm tắt thành mấy loại lên men?
9. Trong các loại lên men sau đây: Lên men rượu (etyllic), lên men lactic, lên men propionic và lên men butandiol, thì sản xuất rượu vang thuộc loại lên men nào?
10. Nuôi cấy vi sinh vật trong nồi lên men chỉ có 30 – 60% thể tích dịch lên men, sau một thời gian lên men nhất định, bổ sung thêm lượng môi trường mới cho đủ 100% thể tích môi trường lên men. Đây là phương pháp lên men nào?
11. Trong sản xuất các sản phẩm sinh học từ vi sinh vật ở mức độ công nghiệp, sau bước nhân giống trong nồi nhân giống, thì bước tiếp theo là giai đoạn nào?
12. Sau khi phát hiện ra khả năng sinh các hợp chất mong muốn, chủng vi sinh vật được nuôi trong bình nhỏ trong phòng thí nghiệm để lựa chọn môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp. Dung tích nồi lên men nhỏ trong phòng thí nghiệm thường là bao nhiêu lít?
13. Để khẳng định các điều kiện và môi trường lên men thích hợp, hiệu suất lên men đảm bảo đưa vào sản xuất công nghiệp, thì bước tiếp theo phải được sản xuất thử nghiệm ở mức độ lớn hơn, mức độ pililot với dung tích nồi lên men ở các cấp độ bao nhiêu lít?
14. Lên men theo nghĩa hẹp để chỉ các quá trình lên men khí (nhờ các vi sinh vật lên men) các chất để thu năng lượng, vì lý do nào?
15. Lên men theo nghĩa rộng là quá trình phân giải các chất nhờ hoạt động sống của vi sinh vật. Các quá trình lên men liệt kê sau đây: Lên men sản xuất các chất kháng sinh, lên men sản xuất các axit amin, lên men sản xuất cồn và lên men sản xuất enzym, quá trình nào không phải là lên men theo nghĩa rộng?

Phân thứ hai

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT

Chương 6

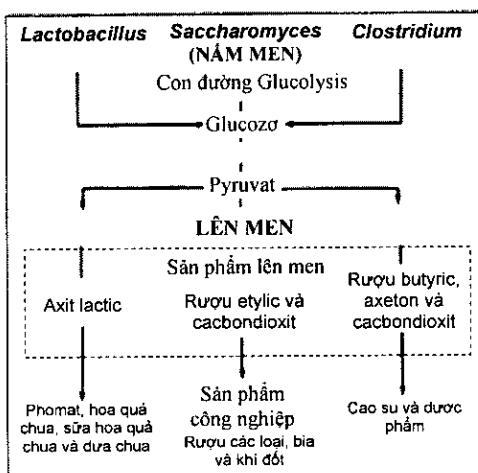
CÔNG NGHỆ LÊN MEN TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM

6.1. CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM

Lên men (fermentation) là một quá trình chuyển hoá sinh học (biotransformation) các chất hữu cơ nhờ các vi sinh vật tạo thành năng lượng hoá học dưới dạng ATP và không có oxy phản ứng tham gia. Trong chương này, các sản phẩm lên men được thực hiện bởi các quá trình lên men ở đây theo nghĩa hẹp (quá trình lên men truyền thống), nghĩa là sử dụng các vi sinh vật lên men trong chế biến thực phẩm.

Như ta đã biết, các sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men đã được ứng dụng từ lâu là lên men chuyển hoá glucozơ thành etanol – đồ uống có cồn. Sau khi hình thành pyruvat, etanol được hình thành bởi 2 phản ứng đơn giản. Thứ nhất, CO_2 tách khỏi pyruvat hình thành axetaldehyt, sau đó axetaldehyt bị khử bởi NADH. Sau đó axetaldehyt bị khử thành etanol (thành phần chính trong đồ uống có cồn). Đây là giai đoạn cuối cùng trong lên men nấm men chuyển hoá glucozơ thành etanol.

Loại lên men ưa thích khác của vi khuẩn là sự hình thành axit lactic. Nó được thực hiện nhờ vi khuẩn lactic. Vi khuẩn lên men lactic đồng hình (homo-fermentation) sử dụng con đường chuyển hoá EMP đến pyruvat và



Hình 6.1. Các con đường chuyển hóa sản xuất một số loại thực phẩm lên men.

sau đó khử pyruvat đến lactat bằng cách sử dụng nhiều NADH trong quá trình. Vì khuẩn các con đường chuyển hoá xen kẽ để hình thành lactat từ glucozơ. Kiểm tra quá trình lên men dị hình (hetero-fermentation) cho thấy, nó không chỉ sử dụng con đường EMP. Sản phẩm cuối cùng là lactat được vi khuẩn bài tiết ra môi trường.

Vi sinh vật thực hiện quá trình lên men nhiều hơn nhiều được nêu ở đây, nhưng những ví dụ ở đây cũng chỉ cho ta một số ý tưởng chung.

Xuất phát từ bản chất và sản phẩm cuối cùng của các quá trình lên men mà người ta có thể tóm tắt các quá trình lên men truyền thống: Lên men rượu, lên men lactic, lên men hỗn hợp axit hữu cơ và butanol, lên men propionic, lên men butyric và axeton-butyric, lên men fomic và lên men metan.

Các con đường chuyển hoá sản xuất một số loại thực phẩm lên men được tóm tắt trên các hình 6.1 và 6.2. Trong chương này đề cập đến sự lên men rượu và lên men lactic ứng dụng trong chế biến thực phẩm.



Hình 6.2. Các sản phẩm công nghệ lên men

6.2. ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG CÓ CỒN

6.2.1. Nguyên lý

Lên men rượu là quá trình vi sinh vật học đã được con người ứng dụng từ xa xưa, nhưng bản chất hoá học thì ngày nay mới được làm sáng tỏ.

Lên men rượu là quá trình lên men phức tạp nhưng cần có sự tham gia của nấm men và một số vi sinh vật khác. Quá trình lên men rượu, đường được biến đổi thành rượu etylic, CO₂ và giải phóng năng lượng.

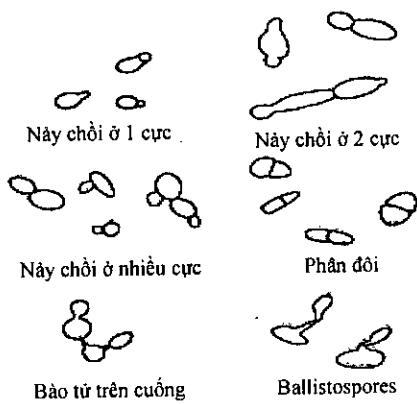
a) Tác nhân của quá trình lên men rượu

Tác nhân chính của quá trình lên men rượu là các loài nấm men *Saccharomyces*. Nấm men có nhiều loại (xem chương 2). Các loài nấm

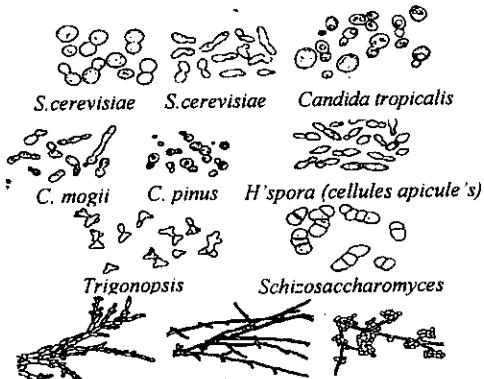
men chính *Saccharomyces* có tế bào hình ovan, kích thước khoảng $(3-10) \times (5-12)\mu\text{m}$. Trong công nghệ vi sinh, người ta có thể tuyển chọn các chủng nấm men có kích thước lớn, đa bội và có hoạt tính sinh học cao. *Saccharomyces* sinh sản vô tính theo phương pháp nảy chồi, có khả năng hình thành bào tử trong điều kiện nhất định, thường là 1-4 bào tử và thường sống ký khí không bắt buộc. Chúng có khả năng phân giải ký khí các loại đường khác nhau, có thể sử dụng nhiều nguồn nitơ và hữu cơ, không có khả năng đồng hóa nitrat (đặc biệt loài *S.cerevisiae* được sử dụng nhiều trong lên men rượu).

Hình 6.3 nêu lên các hình thức sinh sản vô tính của nấm men. Trên môi trường thạch – dextroza – khoai tây (PDA), hoặc trên môi trường Hansen, *Saccharomyces* phát triển mạnh sau 4-5 ngày nuôi cấy, chúng hình thành khuẩn lạc, bề mặt khuẩn lạc thường nhẵn, bóng và khuẩn lạc có kích thước lớn hơn khuẩn lạc của vi khuẩn, thông thường chúng không sinh sắc tố tan, bề mặt trên và trong cơ chất không màu. Trên môi trường PDA, hình dạng của tế bào ở các loại nấm men khác nhau, có loại hình thành hệ sợi giả được trình bày trên hình 6.4 và một số nấm men sinh sản bằng cách tạo túi và bào tử túi (hình 6.5). Trong sản xuất rượu công nghiệp, người ta thường tuyển chọn các chủng nấm men *Saccharomyces* dựa theo các tiêu chuẩn sau:

Những đặc điểm tốt: Tạo được nhiều rượu; chịu được nồng độ rượu cao, hình thành các ester, sản sinh glycerol, chịu được nhiệt độ (quá cao hoặc thấp) và ít đòi hỏi các yếu tố dinh dưỡng.



Hình 6.3. Các hình thức sinh sản vô tính của nấm men (theo Kreger Vanrij, 1984)



Hình 6.4. Hình dạng tế bào và sợi của một số nấm men

Những đặc điểm không tốt:

Sản sinh H_2S , hình thành axit bay hơi, sản sinh SO_2 (sunphit), tạo bọt, sinh quá nhiều rượu cao và hình thành các hợp chất kết hợp với H_2S .

Một số điểm cần lưu ý khác:

Chống chịu được với SO_2 , các yếu tố huỷ diệt (Factor killer), phân giải axit malic.

Các loài nấm men thường được sử dụng trong lén men rượu:

1) *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen): còn gọi là men bánh mỳ hay nấm men bia rượu. Chúng có thể lên men 95% glucozơ theo con đường lên men khí khí; còn khi thiếu khí cũng bằng con đường đường phân, chúng chỉ sử dụng được 70% glucozơ. pH thích hợp 4,5 – 5. Có hai loại nấm men: Nấm men nổi làm bánh mỳ có khả năng lên men nhanh, nấm men chìm lên men chậm hơn nhưng không tạo bọt khí. *S. cerevisiae* có thể sử dụng được các loại đường glucozơ, galactozơ, maltozơ, saccarozơ, không đồng hoá trực tiếp được lactozơ và nitrat (M. Bugnicouk, 1995). Có thể tích luỹ 6–12% rượu trong môi trường lên men.

2) *S. ellipsoïdes*, đâm chồi liên tục, nên hình thành hệ sợi giả, nấm men của rượu vang nho, được coi là loài rất gần loài *S. cerevisiae*. Chúng có khả năng hình thành tới 17–18% rượu trong môi trường lên men.

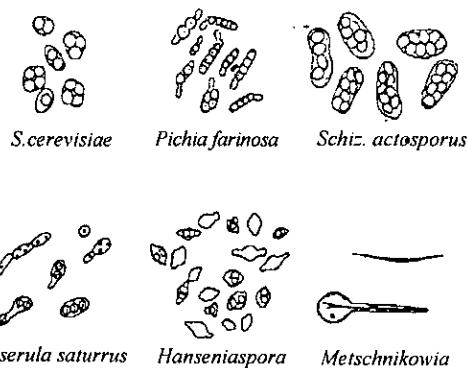
3) *S. carlsbergensis* (còn có tên *S. uvarum*) là loại nấm men chìm, thường dùng để sản xuất bia. Chúng chỉ lên men được 81% lượng đường của dịch, hình thành sinh khối ở đáy bình, lên men hoàn toàn raffinozơ.

b) Cơ chế hóa học của quá trình lên men rượu

Phương trình tổng quát của quá trình lên men rượu có thể viết như sau:



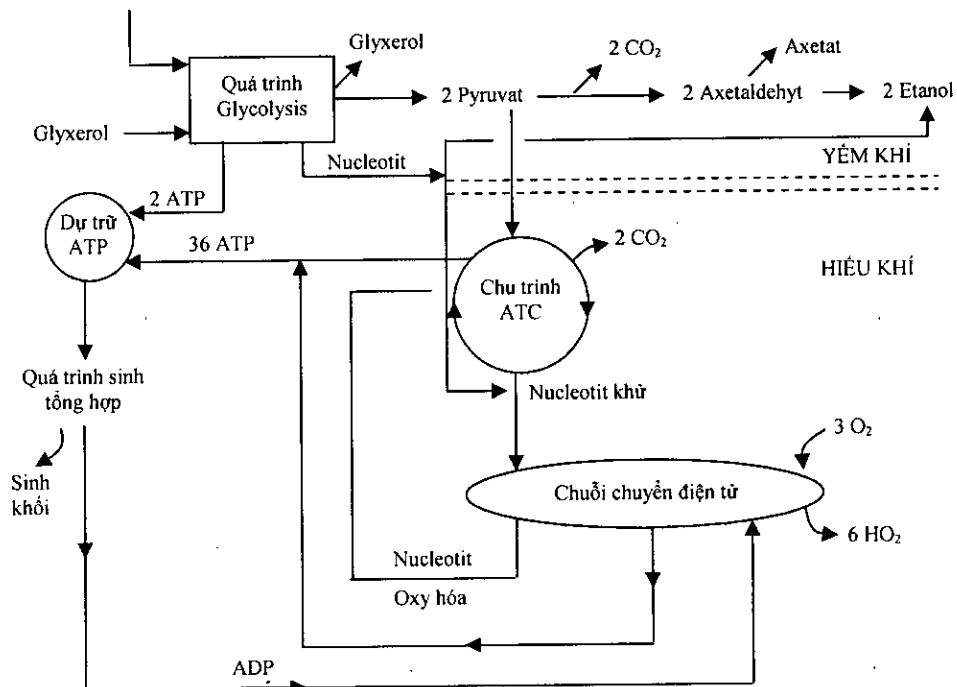
Theo C.H. Barthomenf (1986), nếu lấy 100 phần đường saccarozơ, khi thuỷ phân sẽ thu được 105,4 phần đường tự do và được phân ra sau quá trình lên men như sau: Rượu etylic trong dịch: 51,11 phần; cacbon dioxit sủi bọt: 49,32 phần; glyxerol: 3,16 phần; axit succinic: 0,7 phần và các hợp chất



Hình 6.5. Túi và bào tử túi ở một số nấm men
(theo Kreger Van Rij, 1984)

khác: 1 phần. Còn theo M. Larpent-Gourgaud và cộng sự (1992) thì các sản phẩm theo lý thuyết là: Rượu etylic – 48,4%; CO₂ – 46,6%; glycerol – 3,3%, axit succinic – 0,6%; sinh khối – 1,2% so với glucozơ được sử dụng.

ADP (từ quá trình sinh tổng hợp)



Hình 6.6. Mối quan hệ giữa hô hấp hiếu khí và hô hấp yếm khí trong quá trình lên men rượu

Các phản ứng của quá trình lên men rượu phức tạp, nó phải trải qua 10 phương trình phản ứng khác nhau với sự tham gia của nhiều hệ enzym xúc tác, kết quả cho ta rượu etylic, CO₂ và một số sản phẩm khác. Quá trình có thể tóm tắt theo sơ đồ trên hình 6.6.

Nấm men là cơ thể hiếu khí, chúng hô hấp như cơ thể bậc cao, khi trong môi trường hết oxy phân tử (oxy không khí hòa tan trong môi trường lên men), chúng mới tiến hành lên men, tức là chuyển sang hô hấp ky khí.

Trong điều kiện lên men rượu, các đường đơn như glucozơ, fructozơ sẽ được phân giải theo con đường EMP và chu trình axit tricacboxylic (ATC) lúc đầu được thực hiện, tiếp theo là chuỗi hô hấp hoạt động, nấm men thu nhiều năng lượng, sinh khối dịch lên men tăng. Môi trường sẽ dần chuyển sang ky khí, nấm men chuyển sang lên men, sau đó sản phẩm sẽ hình

thành etanol, CO₂, sinh khói, các axit hữu cơ và sản phẩm phụ như glyxerin.

Quá trình lên men rượu có 5 giai đoạn chủ yếu:

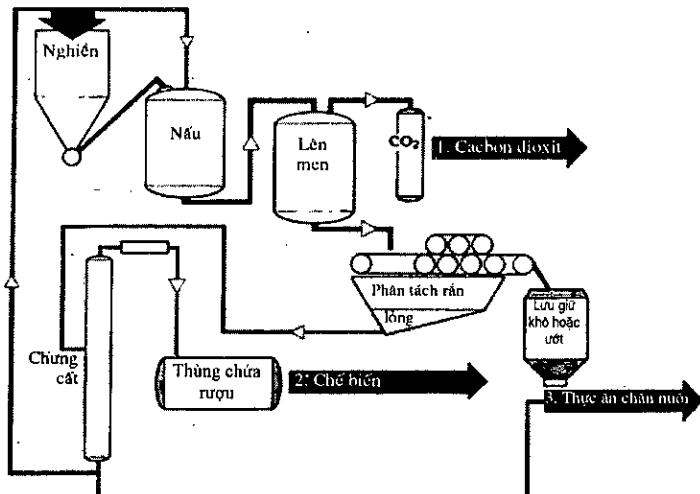
- 1) Biến đổi glucozơ thành fructozo-1,6-photphat.
- 2) Biến đổi fructoso - 6 - photphat thành 3 - photphoglyxeraldehyt và photphodioxy - axeton.
- 3) Biến đổi 3 - photphoglyxeraldehyt thành 2 photphoglyxerat, rồi thành axit pyruvic.
- 4) Axit pyruvic bị loại 1 phân tử CO₂ để thành axetaldehyt.
- 5) Hình thành etanol do axetaldehyt lấy hydro từ NADH.

6.2.2. Công nghệ lên men rượu etylic

Sơ đồ công nghệ lên men rượu có thể tóm tắt như sau: 1. Nghiền; 2. Nấu (nếu nguyên liệu các loại ngũ cốc phải thực hiện bằng quá trình đường hoá); 3. Lên men đường thành rượu; 4. Chung cất và tinh chế (nếu thu nhận cồn) và 5. Chế biến tạo thành phẩm (rượu liquer, rượu vang, bia,...). Quá trình lên men cồn công nghiệp được tóm tắt trên hình 6.7.

Thông thường nguyên liệu dùng cho sản xuất rượu là các loại ngũ cốc, sắn, khoai tây, rỉ đường, các loại quả,... Ngoài sản phẩm chủ yếu là etylic, trong quá trình lên men rượu còn tạo thành khí CO₂, glyxerin, một số cồn bậc cao, aldehyt, axit hữu cơ và sinh khói 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.



Hình 6.7. Lưu đồ quá trình sản xuất etanol công nghiệp
Sản xuất rượu bằng phương pháp lên men gồm 3 giai đoạn:

– Chưng cất và tinh chế cồn (etanol).

Các nguyên liệu lên men, trừ các loại đường như các loại chứa tinh bột, xenlulozo,... cần phải qua quá trình đường hoá. Các chất chứa xenlulozo như gỗ, rơm rạ, mùn cưa – thường dùng các loại axit như axit chlohydric, axit sunphuric hay các loại enzym xenlulaza để đường hoá. Các chất có tinh bột thường đường hoá bằng enzym amylaza của thóc mầm hoặc của nấm mốc. Nấm mốc dùng để đường hoá thường là các loài thuộc giống *Aspergillus* và gần đây có thể dùng các loài thuộc giống giả nấm men *Endomycopsis*. Chúng sản sinh glucoamylaza 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 các chủng nấm men có khả năng đường hoá tinh bột 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 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. Có như vậy, hệ enzym amylaza mới có thể tác dụng phân giải tinh bột được dễ dàng. Nguyên liệu thường được nấu chín ở $130 - 140^{\circ}\text{C}$ dưới áp lực, sau đó mới đường hoá.

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

+ Phương pháp đường hoá bằng axit: giai đoạn nấu và giai đoạn đường hoá xảy ra đồng thời. Axit dùng cho mục đích này là HCl với tỷ lệ 8–10% hoặc H_2SO_4 2–5%. Kết quả thu được dịch đường glucozo.

+ Phương pháp dùng men thuốc bắc: men thuốc bắc có từ lâu ở nước ta cũng như ở Trung Quốc. Đặc điểm là sử dụng các chủng nấm mốc hay nấm men trong men thuốc bắc để phân giải tinh bột và lên men rượu. Quá trình này có thể xảy ra đồng thời. Trong thuốc bắc thường có 20 vị, trong đó có 6 vị chính, được nghiền nhở trộn lẫn với bột gạo và cho nhiễm nấm mốc, nấm men từ không khí rơi vào, sau đó nặn từng bánh giữ ở nơi khô ráo hoặc gói kín để gác bếp dùng dần. Phương pháp nấu rượu thủ công hoặc làm rượu nếp vẫn dùng men thuốc bắc. Nguyên liệu tinh bột không nấu thành dịch mà nấu chín như xôi, rồi rắc men đã tán nhỏ, để một vài giờ để mốc phát triển và sinh hệ enzym thuỷ phân tinh bột, sau đó ủ và cho lên men. Rượu nấu bằng men thuốc bắc từ gạo nếp cho chất lượng cao, hương vị đậm đà. Tuy nhiên,

phương pháp lên men bằng men thuốc bắc cho hiệu suất thấp, nhiều khi chỉ đạt 50% so với lý thuyết.

+ Phương pháp maltaza: sử dụng malt (thóc đại mạch nảy mầm) hoặc các loại thóc nảy mầm để đường hoá. Trong các hạt thóc nảy mầm có hệ enzym α - và β -amylaza thuỷ phân tinh bột thành các dextrim và maltozơ. Sản phẩm thu được, chủ yếu là maltozơ.

+ Phương pháp Amylozơ (amylaza): Phương pháp này do một số nhà khoa học Pháp (Calmette, Colette và Boidin) đã nghiên cứu dùng nấm mốc để lên men rượu Lille ở Việt Nam (năm 1895) và Viện Pasteur Sài Gòn cho phép áp dụng ở Việt Nam. Kết quả là tìm được loài mốc có tên là *Amylomyces rouxii* có khả năng đường hoá tinh bột và phương pháp này được gọi tên là Amylozơ. Theo phương pháp này, mốc được cấy vào dịch cháo và nuôi theo phương pháp nuôi cấy chìm. Quá trình nuôi, mốc phát triển sinh ra hệ enzym amylaza và đường hoá tinh bột, sau đó cấy nấm men và cho lên men. Ưu điểm của phương pháp này là dễ cơ khí hoá, kỹ thuật nuôi gọn, nhưng nhược điểm là đòi hỏi vô trùng tuyệt đối, thời gian lên men dài.

+ Phương pháp myco-malt (có nghĩa nấm mốc): Nấm mốc được nuôi cấy theo phương pháp bể mặt hoặc phương pháp chìm sinh ra các enzym amylaza (có cả β -amylaza, glucoamylaza và dextrinaza) để đường hoá tinh bột và sản phẩm là hỗn hợp các dextrim, maltozơ và glucozơ (chủ yếu là glucozơ). Phương pháp này cho phép rút ngắn quá trình sản xuất, thời gian đường hoá ngắn chỉ 1–3 giờ. Chính nhờ amylaza của nấm mốc này, người ta có thể dùng các nguồn nguyên liệu tinh bột khác nhau để sản xuất rượu. Tuy nhiên, thông thường sản xuất mốc đường hoá bằng phương pháp bể mặt, nên khó cơ khí hoá, cần diện tích rộng và đòi hỏi nhiều nhân công.

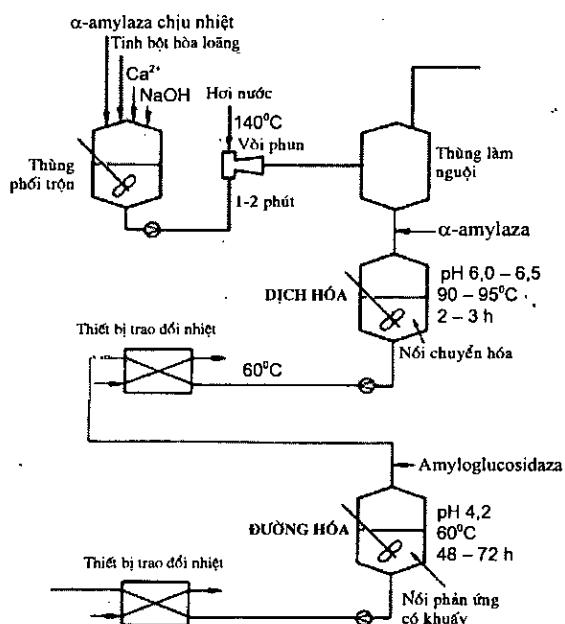
Sản xuất rượu từ rỉ đường hay các loại đường mía thì không cần khâu đường hoá. Tuy rỉ đường là loại phế liệu của quá trình sản xuất đường, giá rẻ, nhưng cần loại bỏ một số tạp chất và những vi sinh vật có sẵn trong rỉ đường. Nấm men dùng trong lên men rỉ đường thành rượu thường dùng các loài khác với lên men từ tinh bột. Để tăng cường dinh dưỡng cho nấm men, cần phải bổ sung vào môi trường rỉ đường các muối photphat và amoni sunphat hoặc dịch nấm men tự phân. Trong lên men, người ta thường bổ sung dịch chiết từ super-photphat hoặc axit photphoric làm nguồn photpho.

– Quá trình lên men sản xuất rượu cần được tóm tắt như sau:

Lên men: Dịch đường hoá không lọc bỏ bã từ tinh bột thuỷ phân bằng axit hoặc bằng chế phẩm enzym cám mốc (ngày nay người ta có thể sử dụng nhiều loại enzym bán sẵn trên thị trường để thuỷ phân tinh bột – xem hình 6.8) hoặc rỉ đường đã qua xử lý được thêm super-phosphate, amoni sunphat và fluxiticat natri (chất sát trùng), sau khi gia nhiệt và làm nguội tới 17–20°C rồi cho vào thùng lên men. Nhiều nhà máy không lớn ở châu Âu, người ta còn dùng thùng gỗ vào mục đích này. Có thể lên men trong thùng hở hoặc kín (thùng kim loại kín thì tốt hơn). Quá trình lên men sẽ tỏa nhiệt và nhiệt độ khói dịch có khi tới 35°C hoặc cao hơn. Vì vậy, cần phải làm mát toàn bộ thùng và dịch lên men bằng cách xối nước lạnh từ nắp thùng hay hệ thống làm lạnh khác.

Giống nấm men *S. cerevisiae*, nếu nuôi trong các nồi lên men lớn, 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, nếu chưa đủ số lượng thì nên sục khí khói dịch đã cấy giống trong vài giờ hoặc lên men sơ bộ trong thùng có chứa lượng dịch chỉ bằng 1/3 định mức. Khi giống phát triển mạnh (quan sát thấy sủi bọt đều và mạnh) thì bổ sung dịch lên men đến định mức. Lên men ở nhiệt độ 25 – 30°C khoảng 4 đến 5 ngày, lượng cồn tích tụ trong dịch tới 7 – 8%, có khi cao hơn thì dừng. Sau đó dịch đưa vào nồi chưng cất cồn.

Theo lý thuyết, từ 100kg tinh bột sẽ thu được 71,6 lít cồn. Tuy nhiên trên thực tế chỉ



Hình 6.8. Sơ đồ công nghệ hồ hóa và đường hóa tinh bột bằng enzym

thu được khoảng 63 lít, vì 0,5 – 1% tinh bột còn lại không bị nấu chín, 2 – 4% không lên men được và 6% tạo thành các 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 khói 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%. Bình thường, người ta lấy rượu có độ cồn 35, 40 và 45% (hay còn gọi là độ cồn).

Trong công nghiệp, người ta chưng cất cồn ở 2 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 hay cồn công nghiệp. Muốn có cồn thực phẩm phải qua cất tinh luyện để loại bỏ các tạp chất (dầu fusel, aldehyt, các loại rượu nặng, nhẹ và các tạp chất khác) và nâng cao độ cồn.

Rượu etylic là một dung môi rất phổ biến, trong công nghiệp, người ta dùng để chế biến cao su nhân tạo, ester. “Rượu lúa mới” của Việt Nam đã đạt huy chương vàng tại hội trợ quốc tế. Từ rượu cao độ, người ta pha thành các loại rượu mùi.

Ngày nay, người ta cũng đang quan tâm nghiên cứu phát triển etanol, vì etanol sẽ là nguồn năng lượng thay thế dần cho các sản phẩm dầu mỏ trong thế kỷ tới. Người ta bắt đầu sử dụng các nguồn rác thải giàu glucit (hydratcacbon) như rỉ đường, rác thải hay cây xanh giàu xenlulozơ,... làm nguyên liệu ban đầu cho sản xuất cồn công nghiệp.

6.2.3. Công nghệ lên men sản xuất rượu vang

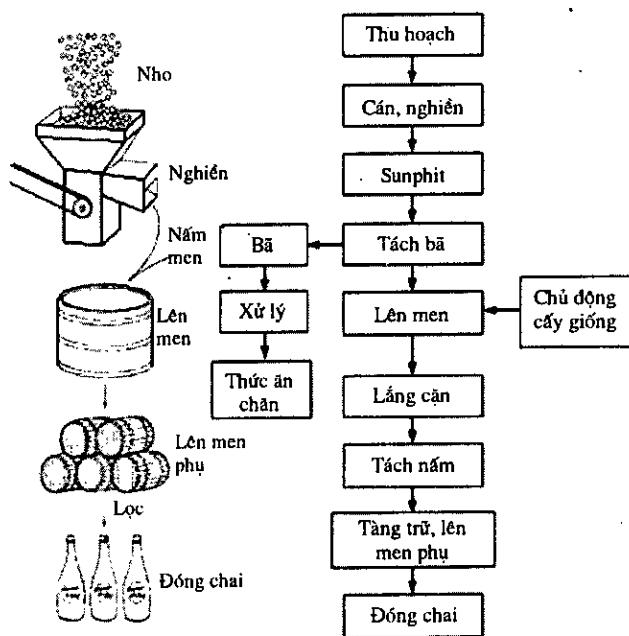
Rượu vang là loại rượu lên men dịch quả, không qua chưng cất. Rượu vang bắt đầu từ việc lên men etylic từ dịch quả nho, do đó thực chất chữ “vang” bắt nguồn từ chữ “nho”. Rượu không qua chưng cất có rất nhiều loại, nhiều loại được sản xuất từ các loại hạt rất nổi tiếng như rượu Sakê được sản xuất từ một loại lúa, rượu cẩm của Việt Nam cũng được sản xuất từ một loại gạo cẩm. Rõ ràng, khó phân biệt các loại rượu không qua chưng cất. Trong số các loại đồ uống, các loại rượu được sản xuất ở từng vùng cũng có những nét truyền thống văn hoá riêng. Tuy vậy, sản phẩm đó phải ngon, bổ dưỡng và điều quan trọng là phải tiêu thụ được trên thị trường. Rõ ràng, rượu nếp cẩm cũng là một loại rượu đặc sản của Việt Nam, là sản phẩm lên men truyền thống từ gạo nếp cẩm – một loại nguyên liệu có chất lượng cao và

được trồng phổ biến ở Việt Nam. Việc nghiên cứu nâng cao chất lượng của loại rượu này là cần thiết.

Lên men rượu vang nho là một nghề truyền thống tại nhiều nước, bao gồm 2 giai đoạn: Lên men chính (3–6 ngày) và lên men phụ (từ 3 tháng đến nhiều năm). Sơ đồ công nghệ sản xuất rượu vang nho trắng theo sơ đồ trên hình 6.9.

Rượu vang 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 ellipsoideus* lên men đường 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. Tuy nhiên ngày nay, khái niệm rượu nho trở nên rộng hơn, nó được dùng để chỉ loại rượu lên men từ dịch ép trái cây nói chung như táo, lê, nho, chuối, thơm, dâu, mơ,... có hương vị thơm ngon của trái cây tự nhiên và có độ rượu nhẹ thường khoảng 15 – 20%, là loại nước giải khát thơm ngon, bổ và giàu vitamin. Rượu vang có màu khác nhau tùy thuộc vào màu của trái cây lấy dịch ép lên men. Tác nhân lên men cũng là nấm men *Saccharomyces*. Châu Âu chủ yếu sản xuất rượu vang nho. Quy trình lên men rượu vang trắng và đỏ khác nhau (hình 6.10).

Rượu vang càng giữ lâu càng tốt, càng ngon, vì có hương vị đặc biệt. Lên men rượu vang theo phương pháp tự nhiên thường đạt độ rượu nhỏ, dễ bị nhiễm trùng do nhiều hệ vi sinh vật cùng tham gia chuyển hóa đường trái cây. Do vậy, sản phẩm tạo ra không tinh khiết, nhiều tạp chất có mặt cũng ảnh hưởng đến chất lượng thơm ngon của rượu vang thành phẩm, dễ bị chua



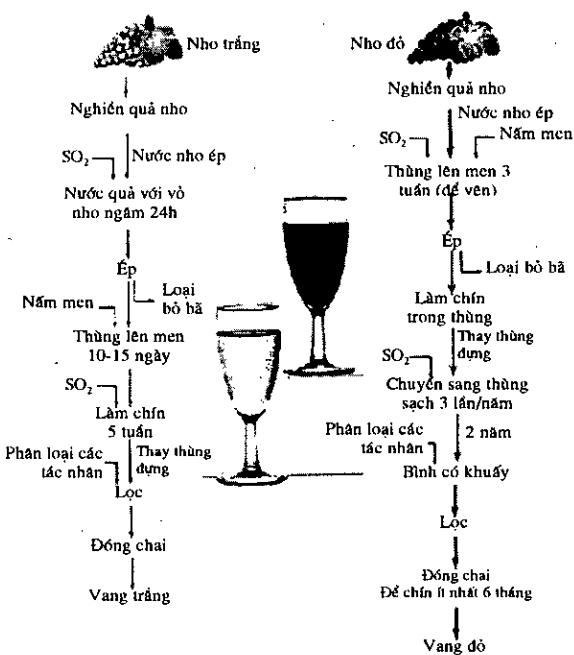
Hình 6.9. Sơ đồ công nghệ quá trình lên men rượu vang

do sự lên men tạo ra các axit hữu cơ. Để khắc phục nhược điểm trên, người ta phải sử dụng chủng nấm men thuần khiết, phù hợp cho lên men rượu vang, được sản xuất bằng phương pháp nhân giống với thể tích tăng dần. Dịch nấm men giống cần đạt $10^5 - 10^6$ tế bào/ml. Lượng nấm men giống thường chiếm tỷ lệ 2-3% so với nước ép quả nho.

Trong công nghiệp sản xuất rượu vang, người ta thường sử dụng các chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoideus*... có tốc độ lên men mạnh mẽ, tạo sản phẩm chứa 18 – 20% etanol. Đôi khi người ta còn sử dụng *S. beticus* và *S. boyanus*. Trên quả nho có nhiều loại nấm men có mặt một cách tự nhiên đều tham gia vào quá trình lên men rượu nho.

Quả nho ép được 85 – 95% dịch quả (hạt và vỏ chiếm khoảng 5 – 15%) chứa glucozơ, fructozơ, axit malic, axit xitic, axit tatic, 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 CO₂ hay bổ sung CO₂ (rượu champagne), có loại được bổ sung thêm rượu tạo rượu có độ rượu cao tới 21% có mùi thơm đặc trưng (rượu Vermouth, rượu Fortified).

Nhằm mục đích nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm lên men, người ta thường bổ sung thêm enzym pectinaza kỹ thuật vào công đoạn nghiền ép sinh khối trái cây nguyên liệu ban đầu để làm trong dịch lên men của quy trình công nghệ lên men rượu vang nói trên.



Hình 6.10. Quy trình lên men rượu vang trắng và vang đỏ

Trong công nghệ chế biến rượu vang ở một số dịch quả, thường có hiện tượng vẫn đục do hàm lượng pectin, tanin hoặc protein cao. Có thể làm trong rượu vang bằng nhiều phương pháp như dùng pectinaza, tananaza của vi sinh vật, lòng trắng trứng, chất lắng trong như bentonit,...

Trong quá trình chế biến, có thể sử dụng các loại enzym để thuỷ phân triệt để các chất gây đục cho rượu vang.

Bảo quản rượu vang cũng là yếu tố quan trọng, nếu bảo quản đúng cách, rượu vang có thể tàng trữ trong nhiều năm không bị hỏng và mất phẩm chất. Một yếu tố quan trọng trong việc bảo quản rượu vang là không để rượu tiếp xúc với không khí sẽ hạn chế các vi sinh vật có hại phát triển trên bề mặt, không làm vang mất mùi và màu do sự có mặt của oxy. Vang đã đóng chai, người ta thường bảo quản bằng cách để nằm ngang, tránh nút chai bị khô và ngăn cản không khí qua khe nứt của nút. Vang đã đóng chai có thể bảo quản hàng chục năm trong hầm chứa ở nhiệt độ thấp (khoảng 16°C).

6.2.4. Công nghệ lên men sản xuất 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 hơi CO₂, có hương vị thơm ngon và bổ vì bia chứa nhiều chất đạm, vitamin (đặc biệt là vitamin nhóm B), đường tan, dextrin, chất tạo hương vị và chất màu thực phẩm. Bia là loại nước giải khát có lẽ phổ biến nhất trên thế giới. Thành phần hoá học của nó gồm: Nước chiếm 80–89%; chất hoà tan: 5,5–10,7% (trong đó đường và dextrin chiếm khoảng 2,7–5%); CO₂: 0,3–0,45%; rượu: 3,5–6%; glyxerin: 0,1–0,3%; chất khoáng: 0,14–0,38%; axit hữu cơ: 0,15–0,4%; đạm: 0,3% (albumin, pepton, axit amin,...); vitamin B₁: 30 đơn vị; vitamin B₂: 70 đơn vị,... Độ pH của bia: 4,0–4,3. Người ta tính, một nửa lít bia tương đương 30g bơ hay 100g khoai tây. Một lít bia đem đến cho người uống từ 400 đến 600 calo.

Như vậy, bia là một loại nước giải khát lên men rượu nhẹ không chưng cất và là loại nước uống rất được ưa chuộng ở nhiều nước. Hiện nay, các nước trên thế giới sản xuất khoảng 100 tỷ lít bia/năm. Những nước sản xuất và tiêu thụ bia nhiều nhất là Đức và Australia, khoảng 145 lít/người/năm. 80–90% lượng bia bán trên thế giới là bia vàng, còn có loại bia đen, bia nâu. Màu sắc của bia phụ thuộc chủ yếu vào chất lượng của malt.

Bốn nguyên liệu cơ bản quyết định chất lượng của bia là lúa mạch mọc mầm (malt), hoa houblon, nấm men và nước. Quá trình sản xuất bia bao

gồm giai đoạn đường hoá (biến tinh bột thành đường) và rượu hoá (lên men dịch đường tạo rượu). Tác nhân lên men bia cũng là nấm men. So sánh quy trình sản xuất bia và rượu etanol thấy có những điểm giống nhau và khác nhau sau:

– Lên men bia thực chất cũng là lên men rượu nhờ nấm men *Saccharomyces*.

– Thành phần hoá học của rượu chủ yếu là etanol và H_2O . Trong bia, ngoài etanol, nước còn có chất đạm, đường, vitamin, chất khoáng, chất màu, chất thơm, chất tạo vị đặc trưng,...

– Quy trình sản xuất bia không có giai đoạn chưng cất. Do vậy cần chú ý giữ vệ sinh nghiêm ngặt.

– Lên men bia bao gồm 2 giai đoạn: giai đoạn lên men chính ở nhiệt độ 28–30°C và lên men phụ ở nhiệt độ lạnh 0–5°C. Trong khi lên men rượu chỉ có 1 giai đoạn.

– Trong sản xuất rượu cần triệt để thực hiện đường hoá tạo đường dễ lên men để tăng cao lượng rượu tạo thành. Còn trong lên men bia không cần triệt để quá trình đường hoá, cần thiết còn dư lại một lượng đường nhỏ dextrin để tạo cho bia có hương vị đặc trưng và tạo bọt.

Quá trình làm bia gồm 2 công đoạn chính: Nấu malt (đường hoá) và lên men, ủ chín. Bia là sự lên men lúa đại mạch và hoa houblon bằng nấm men. Tinh bột trong lúa đại mạch được phân giải đến glucozơ và sau đó được lên men đến etanol bằng nấm men. Sản phẩm cuối cùng đủ chín và sau đó được đóng chai để vận chuyển và tiêu thụ.

Quá trình lên men bia bao gồm 6 giai đoạn, được bắt đầu từ làm malt từ lúa đại mạch.

a) Malt

Malt là tên gọi hạt ngũ cốc nảy mầm (mầm của lúa đại mạch, tiểu mạch, thóc gạo, lúa mỳ 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 hoá tạo đường cho sự lên men rượu về sau. Trong quá trình nảy mầm, trong hạt sẽ tích lũy nhiều enzym, đặc biệt là amylaza, cần thiết cho quá trình đường hoá. Ngoài amylaza, còn có mặt proteaza, maltaza, photphataza, lipaza,... Quá trình làm hạt nảy mầm như sau: Ngâm hạt cho hút nước khoảng 36–38 giờ đạt độ ẩm 42–46% ở nhiệt độ 12–15°C. Vớt ra để ráo nước và rải thành luống dày 40cm trong những ngày đầu, sau đó giảm độ dày xuống còn khoảng 10 –15cm.

Khi trời nóng cần rải mỏng hơn. Nhiệt độ nảy mầm hạt mạch khoảng 15–22°C. Cần đảo hạt để hạ bớt nhiệt độ, vì khi nảy mầm khối hạt nóng lên. Thời gian để nảy mầm khoảng 5 đến 7 ngày. Lúc này hạt nảy mầm và sản sinh enzym amylaza, nó phân giải tinh bột thành glucozơ và proteaza phân giải protein. Các enzym này là bản chất của quá trình lên men bia.

Khi thấy rễ mầm dài bằng 1,5 lần hạt và mầm dài bằng khoảng 3/4 chiều dài hạt thì chuyển sang sấy. Nếu để mầm dài quá, hoạt độ của enzym sẽ giảm không có lợi cho quá trình đường hoá. Malt chưa sấy gọi là malt tươi có thể dùng ngay cho sản xuất. Để dự trữ cho sản xuất được liên tục, cũng như để vận chuyển đi nơi xa không làm hỏng malt, người ta phải sấy malt và bảo quản malt dạng khô để dùng dần trong sản xuất. Tuỳ theo nhiệt độ và thời gian sấy, người ta chia malt thành loại malt vàng và malt đen có chế độ và thời gian sấy khác nhau. Malt vàng sấy ở nhiệt độ tăng dần từ 50–78°C, thời gian sấy 12 giờ. Malt đen sấy ở nhiệt độ tăng dần đến 105°C, thời gian sấy 24 giờ. Sấy ở nhiệt độ cao cũng không làm mất hoạt tính enzym trong malt vì độ ẩm của sinh khối malt tương ứng với nhiệt độ sấy: độ ẩm cao tương ứng với nhiệt độ sấy thấp. Ví dụ về chế độ sấy malt đen: độ ẩm 20% tương ứng nhiệt độ sấy 47°C, độ ẩm 8–10% tương ứng 50–64°C, độ ẩm 5% tương ứng 64–87°C và độ ẩm 1,5–2% tương ứng 94–105°C.

b) *Hồ hoá (nấu cháo)*

Hồ hoá để hoà tan tinh bột và các hương vị trong hạt và chiết hương vị và bảo quản cho bia. Malt đã chuẩn bị được hoà vào trong nước, khuấy đều, được đun nóng (các loại hạt khác, cacbonhydrat và đường, mà nó cấp thêm nguồn tinh bột được chuyển hoá thành đường). Quá trình hồ hoá được ủ ở 65–70°C một thời gian ngắn cho phép enzym amylaza phân giải tinh bột thành glucozơ. Sau khi đã phân huỷ hết tinh bột, nhiệt độ được nâng lên 75°C để làm yếu enzym và sau đó để lắng. Các chất không hoà tan chìm xuống đáy và lọc lấy dịch (ngày nay gọi là nước nha, hèm) được lấy ra từ thùng chứa.

c) *Đun với hoa houblon*

Hoa houblon và nước nha được trộn lại với nhau và được đun sôi 2,5 giờ. Dịch lỏng này được chuyển đến thùng để chuẩn bị lên men. Đun sôi với hoa houblon nhằm thực hiện hàng loạt các mục đích:

- Cô đặc.

- Khử trùng, tiêu diệt các vi sinh vật có thể làm hỏng bia.
- Làm mất hoạt tính của enzym triệt để hơn trong quá trình hồ hoá.
- Hoà tan các chất quan trọng trong hoa houblon và hồ hoá. Một số chất bổ sung cho hương vị của bia, đặc biệt từ hoa, có chất lượng thanh trùng và tăng cường bảo quản bia.

d) Lên men

Lên men bắt đầu từ lúc cấy nấm men bia *Saccharomyces carlsbergensis* vào dịch malt. Giống men khởi đầu thường lấy từ mẻ lên men bia trước và được bổ sung ở nồng độ rất cao (500 gram cho 120 lít dịch malt). Lên men ở nhiệt độ thấp giữa 3,3 đến 14°C, kéo dài từ 8 đến 14 ngày. Ở giai đoạn này, glucozơ bị chuyển hóa thành etanol và CO₂. Các hợp chất khác trong nước malt cũng được lên men tạo ra hương vị đặc trưng của bia.

e) Ủ phự (làm già bia)

Dịch malt đã được lên men (hay còn gọi là bia nóng, bia xanh) được già hoá (ủ phự) ở 0°C kéo dài hàng tuần hay hàng tháng tùy thuộc vào nơi sản xuất. Trong thời gian này, nấm men lắng xuống đáy thùng, hương vị lắng dịu đi và các hợp chất khác được hình thành làm tăng hương vị của bia.

f) Kết thúc

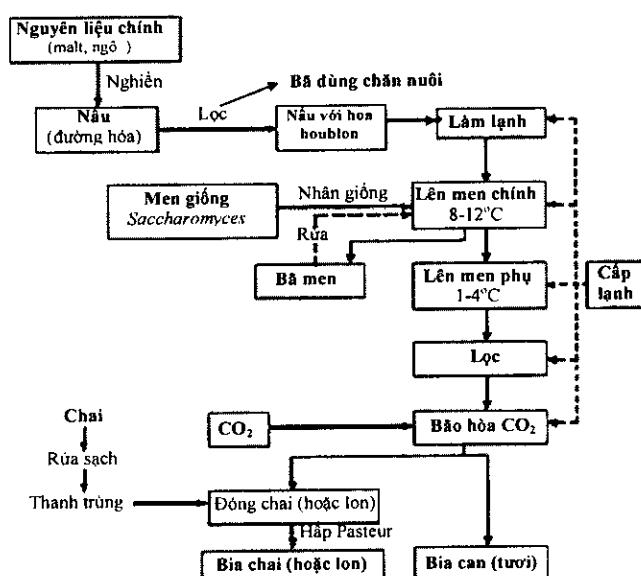
Bia được đóng chai. Bia có thể lọc, hấp thanh trùng kiểu Pasteur, nạp thêm gas từ 0,45 đến 0,52% CO₂ và lắng gần. Tất cả các quá trình này phụ thuộc vào bia được làm và mỗi một nhà máy bia sẽ đặc trưng lên men, ủ chín (ủ phự) và kết thúc quá trình theo bia của họ. Thường có nhiều ý tưởng quảng cáo khác nhau từ các hãng bia khác nhau.

Sau đó bia được đóng vào đồ chứa và phân phối đến người tiêu thụ. Bình thường, bia có đời sống riêng khoảng 6 tháng và sau đó nó có thể bắt đầu xuất hiện hương vị lạ ảnh hưởng đến chất lượng của bia. Sơ đồ quá trình sản xuất bia được trình bày trên các hình 6.11, 6.12 và 6.13.

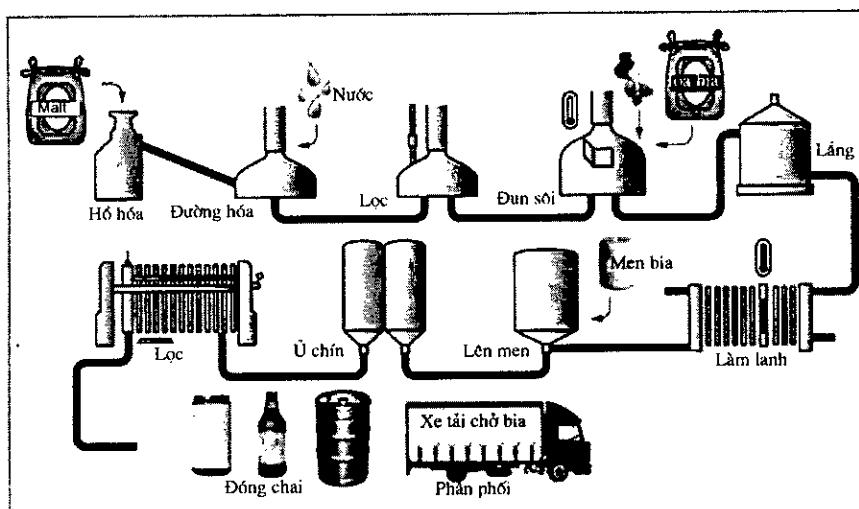
Nấm men tạo ra rất nhiều các hợp chất khác nhau trong quá trình lên men chính, các hợp chất này sẽ tham gia vào thành phần của dịch lên men bia do sự khuếch tán các chất này vào bia, hay do sự thuỷ phân tế bào nấm men, chúng ảnh hưởng đến chất lượng bia. Ví dụ, một chất trung gian axetolactat dễ bị dicacboxyl hoá do tác dụng của oxy hòa tan tạo ra hợp

chất diaxetyl, gây mùi hắc rất khó chịu, kích thích mạnh lên hệ thần kinh người uống.

Quá trình lên men chính các sản phẩm trong dịch lên men ngoài rượu etylic, cacbon dioxit, còn có nhiều sản phẩm phụ như glyxerin, diaxetyl, rượu bậc cao, aldehyt, axit hữu cơ, ester, keton. Các sản phẩm phụ này sẽ được chuyển hoá trong



Hình 6.11. Sơ đồ quá trình công nghệ sản xuất bia

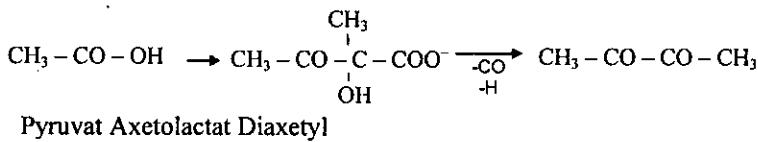


Hình 6.12. Sơ đồ tổng quát quá trình sản xuất bia truyền thống

giai đoạn ủ phụ. Hàm lượng đường giảm xuống còn 0,5%, nồng độ rượu bậc cao, aldehyt, dextrin giảm xuống, còn nồng độ ester tăng do diễn ra quá trình khử bậc cao, khử aldehyt tạo các ester do phản ứng giữa rượu và các axit hữu cơ. Diaxetyl được khử thành axetoin (axetyl– methyl–cacbinol) không độc. Diaxetyl cho phép có trong bia nhỏ hơn 0,2mg/lít.

Nấm men tạo ra rất nhiều các hợp chất khác nhau trong quá trình lên men chính, các hợp chất này sẽ tham gia vào thành phần của dịch lên men bia do sự khuếch tán các chất này vào bia, hay do sự thuỷ phân tế bào nấm men, chúng ảnh hưởng đến chất lượng bia. Ví dụ, một chất trung gian axetolactat dễ bị dicacboxyl hoá do tác dụng của oxy hoà tan tạo ra hợp chất diaxetyl, gây mùi hắc rất khó chịu, kích thích mạnh lên hệ thần kinh người uống.

Quá trình lên men chính các sản phẩm trong dịch lên men ngoài rượu etylic, cacbon dioxit, còn có nhiều sản phẩm phụ như glyxerin, diaxetyl, rượu bậc cao, aldehyt, axit hữu cơ, ester, keton,... Các sản phẩm phụ này sẽ được chuyển hoá trong giai đoạn ủ phụ. Hàm lượng đường giảm xuống còn 0,5%, nồng độ rượu bậc cao, aldehyt, dextrin giảm xuống, còn nồng độ ester tăng do diễn ra quá trình khử bậc cao, khử aldehyt tạo các ester do phản ứng giữa rượu và các axit hữu cơ. Diaxetyl được khử thành axetoin (axetyl – methyl – cacbinol) không độc. Diaxetyl cho phép có trong bia nhỏ hơn 0,2mg/lít.

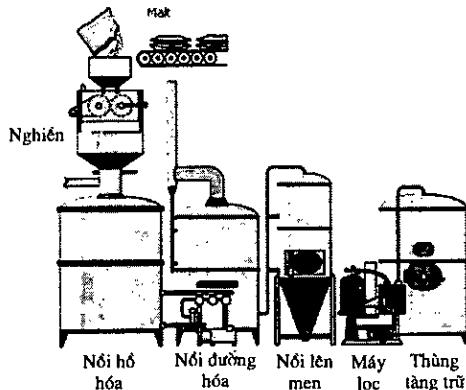


Các yếu tố chính quyết định chất lượng của bia, đó là:

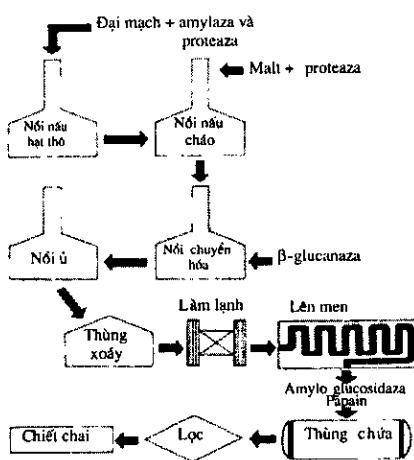
- Nấm men, ngoài tác dụng phân giải và tổng hợp các chất, nhờ hệ enzym khử reductaza khử diaxetyl ở nhiệt độ thấp.
- Nhiệt độ ủ phụ tốt nhất là 1–3°C.
- Thời gian ủ phụ càng dài càng tạo điều kiện chuyển hoá triệt để các sản phẩm, càng có lợi cho chất lượng của bia.
- Áp suất nên duy trì ở 2–4kg/cm² để tăng cường quá trình bao hoà khí CO₂.

Sản phẩm bia có nhiều loại với chất lượng khác nhau, tuy nhiên đối với bia hơi thông thường ở Việt Nam hiện nay thì tiêu chuẩn chất lượng sau ủ phụ là: Nồng độ rượu: 2,8 – 3,2%; nồng độ đường sót: 2,5 – 2,7%; hàm lượng diaxetyl: 0,2%; hàm lượng rượu bậc cao: 60 – 65 mg/lít; hàm lượng ester: 15 – 20mg/lít; hàm lượng CO₂: 0,3 – 0,35g/lít và độ chua chuẩn độ: 1,2 – 1,4ml NaOH 0,1M/10ml bia.

Trong sản xuất bia, đại mạch là nguyên liệu thích hợp cho sản xuất bia. Tuy nhiên ở nước ta chưa trồng được đại mạch, do vậy phải nhập malt từ nước ngoài làm giá thành sản xuất bia trong nước tăng vì giá malt khá đắt. Trong thực tế, người ta đã thay thế một phần đại mạch bằng nguyên liệu ngũ cốc có sẵn trong nước chứa nhiều bột, ít chất béo như bắp, lúa thường và lúa nếp nảy mầm hay chế phẩm nấm mốc cung cấp amylaza cho quá trình đường hoá. Việc thay thế nói trên đã được thực hành nhiều năm nay ở nhiều nước và đạt kết quả tốt. Thông thường, người ta thay thế khoảng 10 – 20% malt nguyên liệu bằng nguyên liệu không phải malt. Ở Pháp thay thế đến 45%, ở Liên Xô – 50%. Trong trường hợp thay thế nhiều malt như vậy phải bổ sung thêm nấm mốc khoảng 15 – 20% để bảo đảm độ đường cho giai đoạn lên men bia sau này. Tuy nhiên, chất lượng không thể bằng bia sản xuất 100% từ mầm đại mạch.



Hình 6.13. Sơ đồ thiết bị chung của quy trình công nghệ lên men sản xuất bia



Hình 6.14. Sơ đồ tổng quát quá trình công nghệ sản xuất bia có bổ sung enzym

Ngày nay, để giảm giá thành bia, người ta có xu hướng sử dụng các chế phẩm enzym trong sản xuất bia nồng độ cao và sử dụng lúa đại mạch hay các loại ngũ cốc thay malt với tỷ lệ cao hơn. Quá trình sản xuất bia có bổ sung enzym được thể hiện trên hình 6.14.

6.3. ỨNG DỤNG LÊN MEN LACTIC TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM

6.3.1. Khái niệm chung

a) Vi khuẩn lactic

Lên men lactic là quá trình chuyển hóa sinh học kỹ khí các hợp chất đường thành axit lactic và một số ít các sản phẩm khác nhờ vi khuẩn lactic. Vi khuẩn lactic ngoài việc dùng để bảo quản và lên men chế biến sữa thành các sản phẩm dùng trong thực phẩm, chế biến sữa thành các sản phẩm sữa lên men, bơ, phomat,... còn được dùng chế biến và bảo quản nhiều loại thực phẩm, đồ uống khác. Người ta còn dùng nhóm vi khuẩn này trong việc bảo quản thức ăn tươi cho đại gia súc, trong điều hoà môi trường ao nuôi tôm, cá,...

Các vi khuẩn lactic được xếp chung vào họ *Lactobacteriaceae*. Hầu hết tất cả chúng đều là những vi khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, không di động, không có enzym oxydaza, catalaza và enzym chuyển hoá nitrat thành nitrit (nitratreductaza âm tính). Tuy nhiên, mới đây, một nhóm các nhà khoa học Nhật Bản đã phát hiện vi khuẩn lactic có tên *SporoLactobacillus inxulinus* sinh bào tử. Chúng thu nhận năng lượng nhờ phân giải cacbonhydrat và sinh ra axit lactic. Axit lactic sinh ra có thể ở dạng D (-), L (+) hay DL, khác với một số vi khuẩn đường ruột khác cũng sinh axit lactic là tất cả vi khuẩn lactic đều là vi khuẩn lên men bắt buộc, chúng là các vi khuẩn sống từ kỹ khí đến vi hiếu khí.

Các loài vi khuẩn lactic bao gồm 4 giống sau đây: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* và *Lactobacillus*. Trong số các giống trên thì *Lactobacillus* là trực khuẩn, các vi khuẩn lactic khác thuộc các giống còn lại là cầu khuẩn.

Vi khuẩn lactic có thể sử dụng được rất nhiều loại cacbonhydrat, từ các đường đơn (glucosơ, fructosơ, mannosơ, galactosơ), các đường đôi (saccarosơ, lactosơ, maltozơ) cho đến các polysaccharit (tinh bột, dextrin). Tuy nhiên, khả năng sử dụng các nguồn carbon khác nhau còn tùy thuộc vào từng loài, chẳng hạn chỉ có *L. delbrueckii* là có thể đồng hoá được tinh bột. Một vài loại vi khuẩn lactic dị hình lại có thể sử dụng các axit gluconic và galacturonic tạo thành CO₂, axit axetic và axit lactic. Ngoài ra, trong quá trình lên men các cơ chất carbon, vi khuẩn lactic có thể sử dụng cả các axit amin như axit glutamic, arginin, tirozin làm nguồn cung cấp năng lượng. Khi đó xảy ra quá trình decacboxyl và tạo ra CO₂.

Hầu hết các vi khuẩn lactic đều không tự tổng hợp được các hợp chất nitơ hữu cơ phức tạp. Tuy nhiên, nitơ lại là nguồn dinh dưỡng rất quan trọng, nó đảm bảo cho sự phát triển bình thường của các vi khuẩn lactic

b) Quá trình trao đổi chất của vi khuẩn lactic

Tùy theo cách lên men đường mà các vi khuẩn lactic được chia làm hai nhóm: Vi khuẩn lactic lên men đồng hình và lên men dị hình.

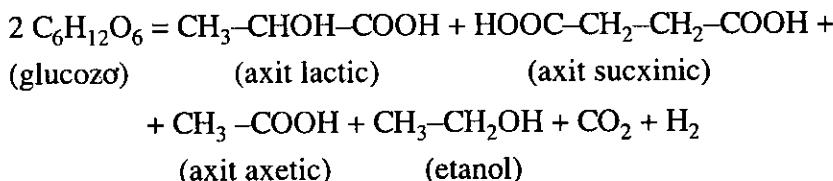
– Lên men lactic đồng hình (homofermentation) là quá trình lên men khi vi khuẩn chuyển hóa glucozơ hoàn toàn thành axit lactic qua con đường EMP nhờ sự xúc tác của lactat-dehydrogenaza (LDH), piruvat nhận electron và H^+ từ NADH tạo thành lactat.

Các vi khuẩn lên men lactic đồng hình: *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei*, *L. aciclophilus*, *L. plantarum*,... theo phương trình tổng quát của quá trình lên men như sau:



– Lên men lactic dị hình (heterofermentation), sản phẩm tạo ra ngoài axit lactic còn có một số sản phẩm phụ như axit axetic, axit succinic, rượu etylic, CO_2 và H_2 . Các vi khuẩn này không sử dụng con đường EMP do thiếu enzym fructozo-bisphotphat aldolaza và trio-P-isomeraza mà phân giải glucozơ qua con đường pentozo-photphtat oxy hoá (PPO).

Các vi khuẩn lên men lactic dị hình là: *Lactobacillus brevis*, *L. lycopersici*, *L. fermentum*, *L. kandleri*,... theo phương trình tổng quát quá trình lên men như sau:



Việc xác định các sản phẩm lên men cuối cùng của vi khuẩn lactic phụ thuộc rất nhiều vào các yếu tố như: pH, CO_2 , O_2 , trạng thái sinh lý của tế bào. Do đó, không thể dễ dàng xác định vi khuẩn lactic thuộc nhóm lên men đồng hình hay dị hình bằng cách xác định sản phẩm lên men cuối cùng.

Khả năng thuỷ phân protein của vi khuẩn lactic nhờ hệ enzym proteinaza và peptidaza nội bào và ngoại bào. Khả năng thuỷ phân protein biểu lộ ở nhóm vi khuẩn lactic hình cầu, nhóm trực khuẩn lactic ưa nhiệt cũng như chi phụ *Streptobacterium*. Trong quá trình thuỷ phân protein diễn

ra sự tích luỹ chủ yếu các axit amin (asparagin, glyxin, serin, axit glutamic, treonin, tyrozin, valin, phenylanalin, isoleuxin) và cả các peptit. Giống Lactobacillus có hoạt tính thuỷ phân protein lớn hơn cả so với các vi khuẩn lactic khác.

Quá trình thuỷ phân protein đặc biệt được thúc đẩy trong môi trường có mặt của một số ion kim loại, đặc biệt là Mg^{2+} , Mn^{2+} , và Co^{2+} khi có pH = 5,5–6. Người ta đã sử dụng các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính thuỷ phân protein cao để bổ sung vào thành phần “giống” dùng để áp dụng vào sản xuất hàng loạt loại sản phẩm từ sữa, cá, thịt,... Đặc biệt, người ta đã xác định rõ vai trò quan trọng của vi khuẩn lactic khi thuỷ phân protein trong quá trình làm chín phomat. Theo Ohmiya, Sato, 1972, trong một gam phomat có chứa 10^9 tế bào vi khuẩn lactic. Khi phomat tự phân trong quá trình làm chín sẽ sinh ra một lượng proteaza có hoạt tính 0,022 đơn vị hoạt độ (tính theo mật độ quang, OD₂₈₀), trong khi hoạt tính của rennin trong điều kiện chỉ là 0,018.

Kết quả quá trình thuỷ phân protein đã tạo ra các axit amin và các sản phẩm được tạo thành từ các axit amin góp phần tạo nên hương vị đặc trưng cho sản phẩm lên men.

Các vi khuẩn lactic thường không có hoạt tính thuỷ phân lipit. Số ít các vi khuẩn này thể hiện tính thuỷ phân lipit ở mức độ nào đó khi tác dụng với một số cơ chất. Ví dụ: người ta tìm thấy vai trò của một số vi khuẩn lactic trong quá trình phân huỷ mỡ cá. Nhiều vi khuẩn lactic như *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. thermophilus*, *Lacto-bacillus heveticus*, *L. casei*,... có thể sử dụng triglycerit như là nguồn cơ chất.

c) Một số yếu tố ảnh hưởng tới quá trình lên men lactic

– Oxy: Vi khuẩn lactic là loài hô hấp tuỳ tiện, nhưng chủ yếu là ky khí và vi hiếu khí. Chúng là nhóm vi khuẩn không có hệ enzym hô hấp xitocrom và catalaza. Tuy nhiên, chúng vẫn có khả năng oxy hoá rất nhiều chất nhờ sử dụng oxy phân tử. Điều này được thực hiện nhờ phức hệ FAD (flavin adenin dinucleotit). Trong quá trình lên men lactic, nếu lượng oxy lớn sẽ gây ngộ độc vi khuẩn lactic, enzym lactat-dehydrogenaza bị vô hoạt, do đó quá trình tạo axit lactic không xảy ra. Đồng thời, sự có mặt của oxy tạo điều kiện cho nấm mốc phát triển và axit lactic trong dịch lên men bị oxy hoá thành axit cacbonic.

– Các chất ức chế: Đường là nguồn cacbon chủ yếu cho vi khuẩn lactic. Nồng độ đường trong môi trường càng cao thì lượng axit lactic tạo ra càng nhiều. Tuy nhiên, nếu nồng độ đường quá cao sẽ ức chế sự phát triển của vi khuẩn lactic, do đó ảnh hưởng tới lượng axit lactic tạo ra. Khi nồng độ đường cao, áp suất thẩm thấu của môi trường cao, gây hiện tượng co nguyên sinh chất ở tế bào, làm giảm khả năng hoạt động và phát triển của vi khuẩn. Ảnh hưởng của nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy không như nhau đối với các chủng vi khuẩn lactic khác nhau. Sự phát triển của phần lớn các vi khuẩn lactic bị ức chế bởi nồng độ NaCl ($\geq 5\%$). Khi đó nồng độ ion trong tế bào tăng cao sẽ ức chế hoạt động các enzym và làm giảm hiệu suất quá trình lên men. Để đảm bảo cho quá trình lên men lactic bình thường, nồng độ muối cho vào nguyên liệu trước lúc muối chua chỉ dao động trong khoảng 3–3,5%. Trong môi trường lên men, nếu cung cấp các chất dinh dưỡng lớn hơn nhu cầu của vi khuẩn lactic thì có thể ức chế hoạt động của vi khuẩn lactic, dẫn đến ức chế quá trình lên men.

– Nhiệt độ: Nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt động của vi khuẩn lactic và hiệu suất quá trình lên men lactic. Khoảng nhiệt độ phát triển của vi khuẩn lactic khá rộng, từ $5 – 55^{\circ}\text{C}$. Nói chung, đa số vi khuẩn lactic có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ $15 – 45^{\circ}\text{C}$. Trong phạm vi nhiệt độ thích hợp, nếu nhiệt độ càng tăng thì sự lên men lactic càng mạnh, thời gian lên men càng ngắn. Các nghiên cứu cho thấy giới hạn nhiệt độ thích hợp cho sản sinh và lên men của vi khuẩn lactic cũng chính là giới hạn hoạt động của các enzym nội bào, từ $30 – 45^{\circ}\text{C}$.

– pH: pH có ảnh hưởng lớn tới sự phát triển của vi khuẩn lactic và hệ enzym của chúng. Mỗi enzym đều có vùng pH tối ưu mà tại đó hoạt lực của enzym là cao nhất. Giá trị pH tối ưu cho sinh trưởng, cũng như giá trị pH thấp nhất mà vi khuẩn có thể tồn tại là khác nhau đối với từng chủng vi khuẩn lactic khác nhau. Trong quá trình lên men lactic, sự tích tụ các axit lactic trong giai đoạn đầu có tác dụng ức chế các loại vi sinh vật khác. Sau đó, lượng axit lactic tăng lên làm pH môi trường giảm, ức chế vi khuẩn lactic và kìm hãm quá trình lên men. Như vậy, chính axit lactic là chất ức chế đặc biệt khi nó ở dạng không phân ly.

6.3.2. Ứng dụng của vi khuẩn lactic trong thực phẩm lên men

Các sản phẩm lên men chua đã được loài người biết đến từ xa xưa, đã có rất nhiều loại sản phẩm muối chua truyền thống như sữa chua, rau quả muối chua, thịt, cá, tôm chua,... Các quá trình ủ chua này chính là lên men lactic. Đây là quá trình lên men ky khí đường thành axit lactic trong môi trường và

được thực hiện bởi các vi khuẩn lactic. Nhờ lên men chua, các sản phẩm đều có hương vị thơm ngon, hấp dẫn, có tính chất kích thích tiêu hoá, nâng cao chất lượng dinh dưỡng, có lợi cho sức khoẻ con người và quá trình hư hỏng được làm chậm lại. Ngoài ra, người ta còn sử dụng vi khuẩn lactic làm chất chỉ thị vi sinh vật để xác định vitamin và axit amin.

Trong công nghiệp thực phẩm, việc sử dụng quá trình lên men lactic để chế biến các sản phẩm rau quả, thịt, cá, sữa không chỉ nhằm mục đích bảo quản mà còn nhằm tạo ra các sản phẩm có tính chất đặc trưng hương vị thơm ngon mong muốn. Đây là một trong những phương pháp chế biến bảo quản phổ biến nhất hiện nay. Trong khi lên men, lượng axit lactic được tạo ra làm giảm pH của môi trường đã gây ức chế, tiêu diệt các vi sinh vật tạp nhiễm gây hư hỏng và các vi khuẩn gây mùi khó chịu khác. Mặt khác, sự phân giải protein trong nguyên liệu thành các axit amin nhờ enzym proteaza của vi khuẩn lactic cũng làm tăng thêm giá trị dinh dưỡng và tạo cơ sở cho việc tạo các chất sinh hương cho sản phẩm. Hoạt lực các vitamin được tăng lên trong thực phẩm nhờ hoạt động tổng hợp của các vi khuẩn lactic tạo ra. Các axit hữu cơ, các axit bay hơi, ester, rượu etylic được tạo ra từ quá trình lên men dị hình và đồng hình vừa là chất có tác dụng sát khuẩn, vừa là chất tạo nên trạng thái, cấu trúc, hương vị thích hợp cho sản phẩm như sự có mặt của H_2O_2 trong sữa có tác dụng tăng cường hoạt động của enzym kháng khuẩn lactoperoxydaza của vi khuẩn lactic. Các thành phần phi dinh dưỡng và có thể gây độc của nguyên liệu như cyanozenic glucosit, axit phytic,... sẽ giảm đi sau quá trình lên men mà không phải xử lý bằng các biện pháp khác. Ngoài ra, từ một số loài vi khuẩn lactic, người ta còn thu nhận được bacteroxin, một loại kháng sinh có tác dụng tốt trong bảo quản thực phẩm và được ứng dụng rộng rãi. Loại kháng sinh này có tác dụng ức chế hầu hết các vi khuẩn gram (+), gram (-), ức chế sự hình thành bào tử ở các vi khuẩn trưởng thành.

Khả năng ức chế, tiêu diệt các loại vi khuẩn gây thối rữa của vi khuẩn lactic trong quá trình lên men là cơ sở cho việc duy trì chất lượng và độ an toàn cho thực phẩm.

a) Sử dụng vi khuẩn lactic trong muối chua rau quả và ủ chua thức ăn xanh cho gia súc

Muối chua rau quả thực chất là quá trình vừa chế biến, vừa bảo quản rau nguyên liệu, quá trình này bao gồm ba giai đoạn:

- *Giai đoạn I: Vi khuẩn lactic và vi khuẩn tạp cùng phát triển.*

– *Giai đoạn 2*: Vi khuẩn lactic phát triển mạnh mẽ và tích tụ nhiều axit lactic. Các loại tạp khuẩn bị ức chế và tiêu diệt.

– *Giai đoạn 3*: Vi khuẩn lactic cũng bị ức chế do nồng độ axit lactic quá cao. Sản phẩm đạt trạng thái chín sinh học.

Tuy nhiên nguyên liệu dùng để muối chua cần đạt các chỉ tiêu: Lượng đường tối thiểu phải đạt 4–6% so với chất khô, lên men trong điều kiện yếm khí, nồng độ muối 2,5–3,5 so với nguyên liệu. Trong công nghiệp, việc muối chua rau, củ, quả thường sử dụng các chủng thuần khiết, nhân giống rồi mới lên men nên đạt hiệu quả cao, chất lượng sản phẩm tốt. Quá trình lên men kết thúc ở trước hoặc đúng thời điểm lượng axit sinh ra đạt cực đại để đem đóng hộp (lọ), bảo quản. Ngày nay có nhiều loại sản phẩm muối chua rau, củ, quả như hành, măng, cải bắp, củ cải, đậu, trám, nấm rơm,... và ngày càng được nhiều người tiêu dùng ưa chuộng.

Thức ăn cho gia súc cũng được ứng dụng ủ chua ở trong nước cũng như ngoài nước, nguyên tắc cũng hoàn toàn giống việc muối chua rau, củ, quả. Nguyên liệu thường là ngô, khoai, một số cây họ đậu, cỏ, được nén chặt vào các thùng, hố, để vi khuẩn lactic phát triển tự nhiên. Khác với muối chua rau, củ, quả là muối không hoà vào nước mà rắc đều lên nguyên liệu, nếu ủ tốt có thể bảo quản được 4–5 tháng đến 1 năm. Loại thức ăn này rất có lợi cho gia súc nên đang được phát triển trong chăn nuôi bò sữa.

b) *Ứng dụng của vi khuẩn lactic trong sản xuất các loại đồ uống lên men*

Đồ uống lên men chua thực chất là sản phẩm của quá trình lên men lactic chưa kết thúc. Đây là loại nước lên men giàu bổ dưỡng, có hương vị độc đáo, hấp dẫn và nâng cao sức khoẻ cho người tiêu dùng. Có thể sản xuất các loại đồ uống lên men từ một số loại quả giàu đường (chuối, dứa, vải, xoài,...) hay từ các loại quả ít đường (xoài, nho, táo, ổi, dâu, măng cầu,...) hoặc từ nguyên liệu giàu tinh bột như lúa, mỳ, đại mạch, cao lương, ngô, gạo... Các loại đồ uống lên men chua từ nguyên liệu hạt thường có giá trị dinh dưỡng cao và được đánh giá bởi thành phần đường hoà tan, các axit amin và các vitamin nhóm B; có giá trị kích thích tiêu hoá nên thích hợp với thị hiếu người dùng. Ví dụ như sản phẩm Keffia được sản xuất từ hạt cao lương nảy mầm; sản phẩm Buza lên men từ lúa mỳ, Kvass làm từ malt đại mạch. Các sản phẩm này đều được lên men nhờ nấm men và vi khuẩn lactic.

BẢNG 6.1. CHỈ TIÊU CHẤT LƯỢNG CỦA MỘT SỐ SẢN PHẨM LÊN MEN LACTIC

Các chỉ tiêu	Nem chua	Sữa chua	Tôm chua
Hàm lượng chất khô	–	–	–
Đạm tổng số (%)	3,85	0,72	2,0
Đạm protein (%)	0,15	–	0,3
NaCl (%)	–	–	20–30
Axit lactic (%)	1,48	0,5–1,0	0,3–1,5
Đường tổng số (%)	không có	1–2	5
Vị sinh vật gây bệnh	không có	không có	không có

c) *Sử dụng vi khuẩn lactic trong quá trình bảo quản, lên men tôm, cá*

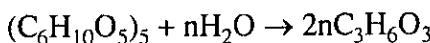
– Cá, tôm là loại thực phẩm rất dễ hư hỏng. Để bảo quản cá, từ trước tới nay chúng ta đã sử dụng rất nhiều phương pháp như muối cá, sấy khô, bảo quản lạnh đông, sử dụng hoá chất, chất kháng sinh hay trong các điều kiện đặc biệt. Tuy nhiên, các phương pháp này hầu hết đều có tính kinh tế không cao, nhất là mục đích bảo quản các phụ phẩm của tôm, cá làm thức ăn chăn nuôi.

Hiện tượng hư hỏng của cá, tôm là do vi sinh vật sống trong tôm, cá phân huỷ các hợp chất hữu cơ của cá thành các chất độc hại và có mùi khó chịu. Tuy nhiên, đã có nhiều công trình khoa học chứng minh rằng, không phải mọi vi sinh vật đều có ảnh hưởng xấu, ví dụ như việc cho thêm một lượng vi khuẩn lactic có thể ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh và gây thối do quan hệ kháng sinh giữa chúng, do đó giảm hoặc loại trừ nguy cơ hư hỏng của các sản phẩm lên men từ tôm, cá.

– Các biến đổi của tôm, cá trong quá trình ủ chua:

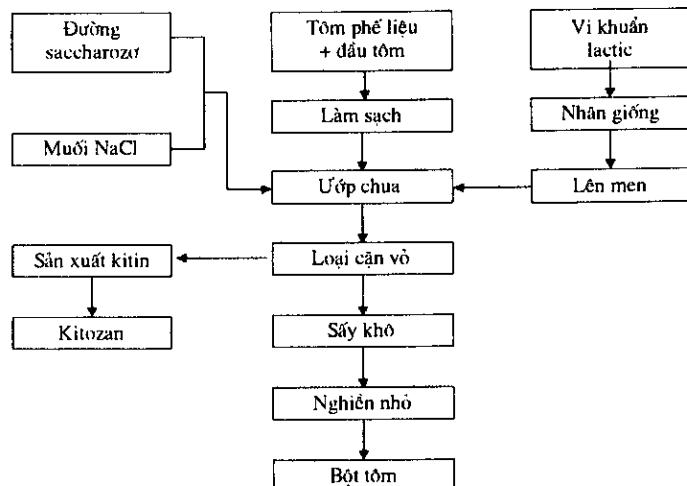
Sau khi chết, tôm và cá tuỳ thuộc vào số lượng vi sinh vật tồn tại trong cá và tôm cũng như ở môi trường xung quanh, cũng như các enzym nội tại chuyển hoá theo hai chiều hướng:

+ Tôm cá lên men thối: Hiện tượng lên men thối là do vi sinh vật gây ra. Vi sinh vật sống trong tôm, cá phân huỷ các chất hữu cơ của chúng thành các chất có mùi khó chịu và độc hại. Tuy nhiên không phải tất cả các vi sinh vật đều gây hiện tượng này. Về phương diện sinh hoá, quá trình này diễn ra như sau: Đối với động vật thuỷ sản nói chung và tôm cá nói riêng, sau khi chết thì glycogen trong cơ thể dần dần bị phân giải. Đây là quá trình yếm khí rất phức tạp xảy ra bằng con đường phosphoril hoá với sự tham gia của ATP. Có thể biểu thị một cách đơn giản như sau:



Glycogen phân giải sản sinh ra axit lactic làm pH của cơ thịt biến đổi. Sự axit hoá của môi trường này có tác dụng hạn chế phần nào sự phát triển của vi sinh vật gây thối rữa. Tuy nhiên lượng glycogen trong cá và tôm chỉ khoảng dưới 0,5%. Một số loài cá còn ít hơn, chỉ khoảng 0,1%, nên sau khi chết, pH của chúng chỉ xuống đến 6,0–6,5. Trong khi đó hàm lượng axit và trị số pH là chỉ tiêu quan trọng đặc trưng cho phẩm chất của động vật thuỷ sản sau khi chế biến, khả năng bảo quản của chúng phụ thuộc vào trị số pH. Khi pH của tổ chức cơ thịt hạ thấp tạo điều kiện thuận lợi cho men cathepsin hoạt động và thúc đẩy quá trình tự chín của cơ thịt. pH càng giảm xuống thì khả năng hút nước của tổ chức cơ thịt cá, tôm giảm. Khi pH bằng 7, lượng nước hút vào bằng dinh dưỡng của cơ thịt, khi pH = 6 khả năng hút nước dưới 50% và khi pH = 5 thì gần tới điểm đắng điện của protein dẫn đến lượng nước hút vào ít nhất chỉ khoảng 25%. Càng kéo dài được pH ở điểm đắng điện protein bao nhiêu thì cá, tôm càng kéo dài được thời gian tê cứng và nguyên liệu tươi tốt được lâu hơn. Nhưng nếu thời điểm tê cứng đến sớm và thời gian tê cứng cũng ngắn, pH trở lại trung tính và chuyển sang kiềm tính càng sớm thì cá càng chóng bị vi khuẩn phân giải thối rữa. Cá, tôm sau tê cứng dần trở lại mềm, đó là quá trình tự phân giải, nếu hiểu một cách máy móc thì quá trình tự phân giải là do men nội tại hoạt động còn thối rữa là do vi sinh vật ở bên ngoài xâm nhập vào hoạt động. Sản phẩm của quá trình tự phân giải là axit amin, các chất đậm hoà tan, còn quá trình thối rữa là những sản phẩm bị thối nát.

Quá trình tự phân giải của tôm, cá mạnh nhất ở pH = 4–5, trong phạm vi đó, lượng đậm hoà tan, đậm polypeptit và đậm axit amin cũng tăng lên cao nhất.

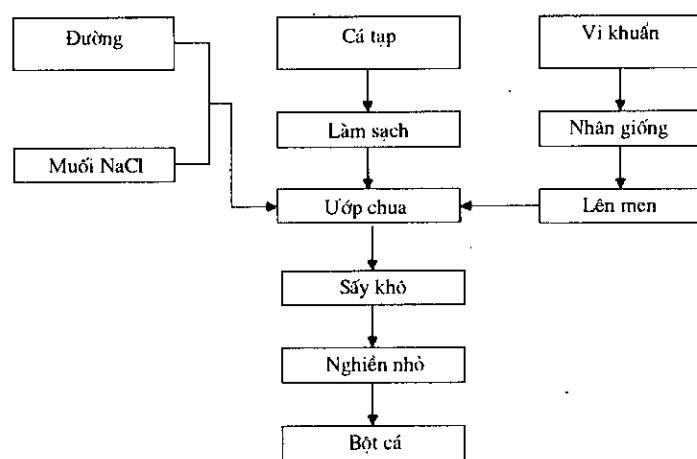


Hình 6.15. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất bột tôm bằng vi khuẩn lactic

Sau đó, các loại vi sinh vật chịu được môi trường axit nhẹ sẽ xâm nhập phát triển làm cho môi trường trở lên trung tính; kiềm tính nhẹ tạo điều kiện cho vi sinh vật gây thối hoạt động. Quá trình hoạt động của vi sinh vật gây thối sẽ thuỷ phân protein thành polypeptit, pepton, NH₃, H₂S, indol, scatol,... có mùi khó chịu.

+ Tôm, cá lén men chua: tạo ra mùi thơm hấp dẫn nhờ quá trình tự phân tạo ra các axit amin và quá trình tác động của các vi sinh vật có lợi như vi khuẩn lactic làm giảm nhanh pH của môi trường, ức chế vi sinh vật gây thối và tạo ra hương thơm đặc trưng cho sản phẩm nhờ quá trình lên men (axit lactic, rượu, axeton,...). Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất bột tôm và cá nhạt được trình bày trên hình 6.15 và 6.16.

Độ pH của môi trường có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của vi sinh vật, nói chung đa số vi sinh vật phát triển tốt nhất ở môi trường trung tính pH = 7, nếu hạ thấp pH thì chúng bị kiềm chế và cũng có thể bị tiêu diệt. Độ pH thích hợp nhất cho



Hình 6.16. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất bột cá từ cá tạp

tác dụng tự phân của men là khoảng 5, nhưng ở phạm vi này, vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn gây thối lại không phát triển được. Môi trường nghiêng về axit thì kiềm chế được quy trình thối rữa.

Nhiều kết quả nghiên cứu cũng chứng minh rằng, việc dùng axit lactic để bảo quản nguyên liệu thuỷ sản cũng thu được nhiều thành công. Theo nghiên cứu trước đây thì khả năng sát trùng của các loại axit thường hay dùng bảo quản thực phẩm thì axit lactic mạnh hơn axit xitic và axit axetic là yếu nhất. Có nhiều cách dùng axit bảo quản nhưng người ta cũng có thể dùng rơm, cỏ khô, mùn cưa,... được tẩm axit để bảo quản nguyên liệu thuỷ sản. Cũng có thể nuôi vi khuẩn lactic cho chúng sinh ra axit lactic rồi đem sử dụng. Qua nhiều nghiên cứu cho thấy rằng, nồng độ axit trong nguyên

liệu đạt đến độ pH < 6 có thể làm giảm khả năng phát triển của vi khuẩn, khi pH=5 thì khả năng kiềm chế tăng lên với các loại vi khuẩn gây thối, pH= 4.5 thì ngừng sinh nở và phát triển, pH = 4 thì có thể kiềm chế được hầu hết khả năng hoạt động của các loại vi khuẩn.

Như vậy, khi bảo quản và chế biến tôm cá cần phải ngăn cản quá trình làm mất tính axit của môi trường. Do đó cần tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động của hệ vi khuẩn lactic, là vi sinh vật chủ yếu tạo nên sự axit hoá môi trường, để ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây thối khác. Một trong những cách hiệu quả nhất là bổ sung trực tiếp vi khuẩn lactic vào tôm, cá và tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của chúng. Hiệu quả của chủng vi khuẩn lactic sử dụng phụ thuộc chủ yếu vào tốc độ sinh axit lactic từ nguồn đường bổ sung vào vì thực tế phần lớn các loài vi sinh vật không mong muốn cần ức chế có trong tôm, cá đều nhạy cảm với các điều kiện axit. Một số chủng vi khuẩn lactic có thể sinh ra các chất kháng khuẩn. Đó là các chất như H₂O₂, diaxetyl và nhiều loại bacterioxin. Đây là các chất có bản chất protein hoặc phức protein có hoạt tính diệt khuẩn đối với nhiều loại vi khuẩn Gram dương. Người ta cũng chứng minh được rằng, sự axit hoá môi trường nhanh chóng bởi *Lactobacillus plantarum* cho phép tiêu diệt hoàn toàn *Samonella typhimurium*, đồng thời rút ngắn thời gian sản xuất.

d) *Lên men chua tôm, cá, sản phẩm truyền thống của Việt Nam*

Nguyên liệu sản xuất tôm chua, cá muối chua gồm nguyên liệu tôm, cá đủ tiêu chuẩn, đường, muối, nguyên liệu phụ,... sau đó nhờ vi sinh vật trong tự nhiên lên men, chủ yếu là vi khuẩn lactic lên men chua làm giảm pH của môi trường, làm chín một cách tự nhiên các sản phẩm này

Hiện nay có thể nói, Huế là vùng nổi tiếng nhất về hai sản phẩm muối chua này. Tuy nhiên với sản phẩm lên men truyền thống, quá trình chế biến các sản phẩm này gặp rất nhiều khó khăn do phụ thuộc nhiều vào điều kiện thời tiết, nguyên liệu, môi trường xung quanh nên có rất nhiều mẻ lên men không đạt tiêu chuẩn.

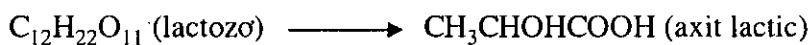
Chính vì vậy, để có thể tạo ra tính ổn định cho các sản phẩm này và có thể sản xuất rộng rãi ở quy mô công nghiệp thì việc đưa thêm vào quá trình lên men chua một lượng vi khuẩn lactic nhằm đẩy nhanh quá trình lên men (giảm nhanh pH của môi trường, ức chế quá trình gây thối làm hư hỏng thực phẩm và thúc đẩy quá trình chín sinh học của sản phẩm) là vấn đề thực sự cần thiết. Một vấn đề cần bàn tới ở đây là hiện nay, các sản phẩm lên men truyền thống ngày nay, bên cạnh các tiêu chuẩn về vệ sinh an toàn thực

phẩm còn phải đảm bảo thời gian bảo quản lâu dài hơn và hợp thị hiếu người tiêu dùng. Nhiều sản phẩm lên men lactic cổ truyền của Nhật Bản và Hàn Quốc đã được công nghiệp hóa và đạt nhiều thành công to lớn như “Sauerkaut”, “Kim chi”, “Izushi”. Sản phẩm lên men từ cá như “Titbit” và “Gaffelbitar” ở Thụy Sĩ, Na Uy được làm từ cá trích đã moi ruột, chặt miếng, ướp muối (15–17%), đường, gia vị, ủ chín trong 18 tháng. Các sản phẩm “Fessiekh”, “Terkin”, “Kejeik”, “Mindeshi”, “Mireira” là những sản phẩm lên men nhờ enzym và *Lactobacillus* cũng rất được ưa chuộng ở Sudan. Ngoài các sản phẩm lên men chua như tôm chua, cá lên men chua cũng có thể áp dụng quá trình này cho việc ủ chua phụ phẩm tôm, cá (cá tạp, đầu cá,...) nhờ vi khuẩn lactic làm thức ăn ủ chua cho gia súc, gia cầm thu hồi lượng đạm trong phế phẩm vỏ đầu tôm và lên men thu hồi kitin trong vỏ đầu tôm. Một khác, việc xử lý các vỏ đầu tôm có tác dụng lớn trong việc giảm nguy cơ ô nhiễm môi trường do các phế liệu trong sản xuất thuỷ sản gây ra.

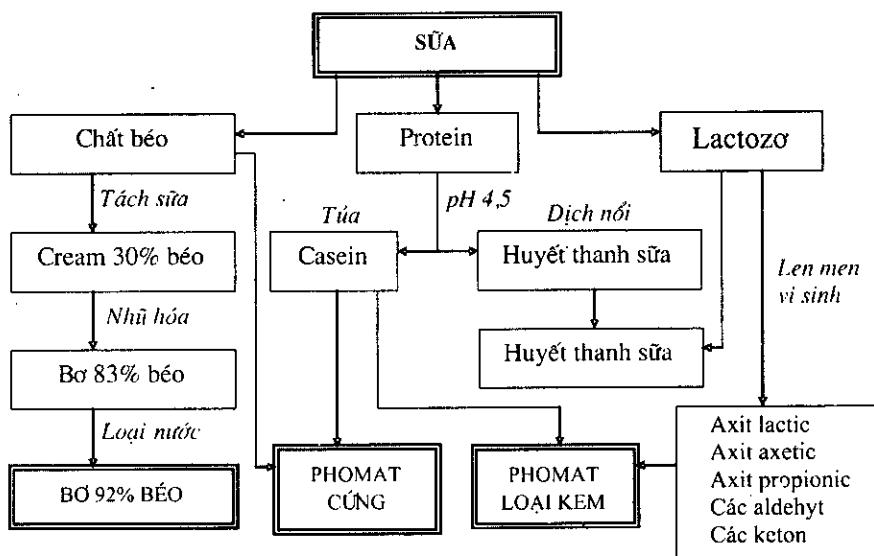
Như vậy, việc nghiên cứu vi khuẩn lactic nhằm sử dụng trong các sản phẩm lên men chua tôm, cá nói chung và các phụ phẩm tôm, cá nói riêng là một vấn đề rất đáng được quan tâm. Chúng là nguồn vi sinh vật dồi dào, dễ nuôi cấy và đặc biệt vi khuẩn lactic được xếp vào vi khuẩn an toàn không gây độc đối với người và gia súc, gia cầm. Có thể nói, việc nghiên cứu và sử dụng vi khuẩn lactic càng ngày càng cần thiết và cần được quan tâm nhiều hơn nữa.

6.3.3. Công nghệ lên men sản xuất các sản phẩm từ sữa

Lên men lactic được sử dụng rộng rãi trong việc chế biến sữa thành các sản phẩm như sữa chua, yaourt, phomat,... vừa tăng giá trị dinh dưỡng, vừa có tính chất chữa bệnh giúp ăn ngon miệng hơn, dễ tiêu hóa và có tác dụng bảo quản sữa lâu hơn. Lên men sữa chua có thể tiến hành theo kiểu dân gian, bằng lên men tự nhiên nhờ vi khuẩn lactic có sẵn trong sữa. Tuy nhiên kiểu lên men này chỉ thích hợp ở quy mô nhỏ kiểu gia đình, vì trong giai đoạn đầu có mặt vi khuẩn gây thối hoạt động làm giảm phẩm chất, đôi khi còn làm hỏng sản phẩm. Để ổn định sản xuất, trong công nghiệp, người ta phải thanh trùng sữa ở nhiệt độ 80–90°C, để người đến nhiệt độ thích hợp 20–30°C mới cấy giống vi khuẩn lactic. Biến đổi sinh hoá chính trong lên men sữa chua như sau:



Đôi khi một phần đường biến đổi thành etanol, CO₂,... Protein bị pepton hoá trở nên dễ tiêu hoá hơn. Các sản phẩm sữa tạo thành nhờ lên men lactic bao gồm sữa chua đặc, yaourt, phomat, bơ,... và nhờ lên men hỗn hợp giữa lên men lactic và lên men rượu là kephia, kumi,... Sơ đồ biểu thị mối tương tác giữa các phần chất rắn trong sữa được trình bày trên hình 6.17.



Hình 6.17. Sơ đồ biểu thị mối tương quan các phần chất rắn chính của sữa trong các sản phẩm chế biến từ sữa

a) Công nghệ lên men sản xuất sữa chua

Sữa chua đặc là sản phẩm sữa đặc hơi có vị chua, ngon, có tác dụng phòng chữa bệnh đường ruột, kích thích tiêu hoá do vi khuẩn *Lactobacterium bulgaricum*, *L. acidophilum*, *Streptococcus lactis*,... lên men ở 35–40°C trên nguyên liệu sữa tươi đã được thanh trùng ở 85–90°C. Bảo quản sản phẩm tốt nhất ở 7–10°C và sử dụng trong thời hạn 1 ngày đêm sau khi lên men. Sữa chua còn gọi là sữa đông Bulgaria, là sản phẩm hiện được sử dụng rất rộng rãi ở nước ta, vì nó bổ dưỡng, có lợi cho sức khỏe và đặc biệt dễ sản xuất. Nó được tạo thành nhờ vi khuẩn *Lactobacterium bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* lên men ở môi trường pH 4–5, trong khoảng 4–6 giờ ở nhiệt độ 25–30°C trên nguyên liệu khá đa dạng là

sữa bột, sữa tươi, sữa hộp, sữa đậu nành,... Sữa chua được sản xuất theo hai phương pháp thủ công đơn giản và quy mô công nghiệp.

Các giai đoạn chính trong quy trình sản xuất sữa chua:

– *Xử lý nguyên liệu*: Sữa dùng trong sản xuất sữa chua có thể gồm nhiều loại: Sữa tươi nguyên hay sữa đã tách chất béo, sữa bột nguyên hay sữa bột đã tách béo (còn gọi là sữa gầy), sữa đặc hay sữa đặc không đường. Các loại sữa này muốn đưa vào sử dụng trong lên men sản xuất sữa chua cần xử lý qua các khâu sau: Nếu là sữa bột phải phục hồi bằng cách hoà vào nước ấm ($45\text{--}65^{\circ}\text{C}$), sau đó lọc qua rây và làm lạnh đến $8\text{--}10^{\circ}\text{C}$. Bước tiếp theo, dung dịch sữa cân kiểm tra hàm lượng lipit thích hợp (3,2–6%), nếu thừa lipit thì bổ sung thêm sữa đã tách béo, nếu thiếu lipit thì bổ sung thêm váng sữa. Sau khi tiệt trùng để loại bỏ các vi sinh vật gây bệnh hoặc các vi sinh vật khác gây trở ngại cho quá trình lên men (sữa thường được khử trùng theo kiểu Pasteur ở nhiệt độ $85\text{--}90^{\circ}\text{C}$, kéo dài 15–20 phút), sữa được đồng thể hoá thành một thể thống nhất bằng cách dùng máy có áp lực cao đánh tan các hạt lipit có đường kính lớn ($3\mu\text{m}$) xuống đường kính còn khoảng $0,2\mu\text{m}$ để cho các hạt lipit không nổi lên trên bề mặt tạo váng sữa. Sau khi làm lạnh đến nhiệt độ cần thiết (khoảng 30°C) thì cấy giống vào.

– *Chuẩn bị giống*: Trong sản xuất sữa chua, người ta thường sử dụng các chủng *Lactobacillus* và *Streptococcus* đã được chọn lọc thích hợp cho lên men. Thường tỷ lệ các giống này được sử dụng cấy vào lên men với lượng tương đương nhau, nếu lượng *Streptococcus* nhiều hơn, sữa thu được sẽ quá chua và không mịn. Nếu muốn sữa chua có lên men rượu, người ta cấy thêm vào giống chủng vi khuẩn *Klebsiella*.

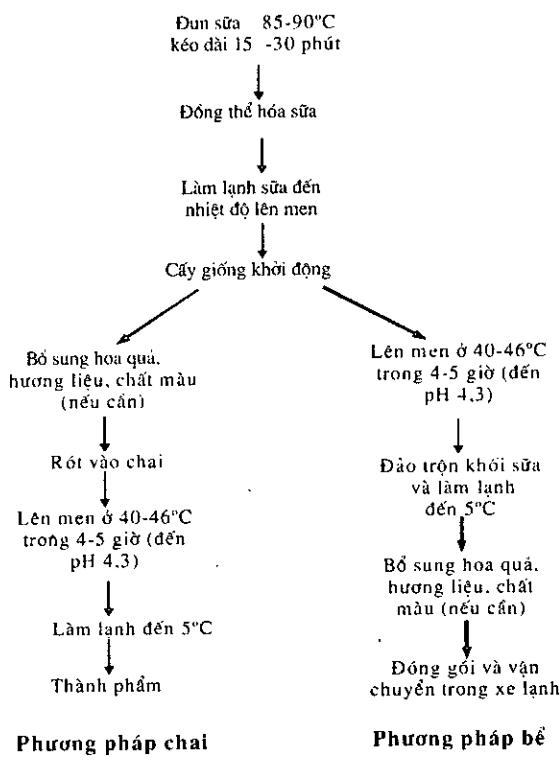
Đối với sản phẩm sữa chua làm ở quy mô gia đình, người ta không sử dụng phương pháp nhân giống các chủng thuần khiết mà thường dùng các sữa chua lên men lần trước hoặc men khô để làm giống (1 cốc sữa chua có thể gây giống cho 30–40 cốc khác).

Trong công nghiệp, giống sử dụng để cấy vào nồi lên men là giống vi khuẩn lactic thuần khiết và được tiến hành qua khâu nhân giống.

– *Lên men tạo sữa chua (giai đoạn làm đông tụ sữa)*: Sữa các loại đã tiệt trùng được cấy giống vi khuẩn lactic ở dạng thuần khiết. Sau khi cấy, sữa được khuấy trộn đều để phân tán giống đều trong sữa. Tuỳ theo vào phương

pháp lên men được sử dụng là phương pháp lên men chai hay phương pháp lên men bể (hình 6.18) mà quá trình lên men được tiếp tục theo hai hướng khác nhau.

Trong giai đoạn lên men này, tuỳ thuộc vào từng chủng giống được sử dụng mà sử dụng nhiệt độ lên men khác nhau. Thông thường quá trình lên men được thực hiện ở $29-30^{\circ}\text{C}$. Quá trình lên men lactic diễn ra mạnh, casein trong sữa bị kết tủa ở pH đẳng điện, sữa đông tụ, hình thành độ chua cần thiết. Thường người ta căn cứ vào sự vón cục và độ chua của sữa để kết thúc quá trình lên men: Cục đông phải đặc, đồng nhất, không có hiện tượng nước, sữa tách rời nhau và độ chua đạt $60-70\text{T}^{\circ}$ ($1\text{T}^{\circ} = 1\text{ml NaOH cần để trung hoà }100\text{ml sữa}$). Cũng tuỳ thuộc vào chủng giống sử dụng mà thời gian lên men cũng kéo dài khác nhau. Thông thường thời gian lên men kéo dài 6–8 giờ.



Hình 6.18. Sơ đồ quá trình sản xuất sữa chua công nghiệp

– *Giai đoạn sữa “chín”*: Sau khi kết thúc giai đoạn lên men chính, sữa được chuyển sang giữ ở nhiệt độ lạnh (4 đến 6°C). Trong điều kiện lạnh, quá trình lên men lactic chỉ xảy ra ở mức độ yếu, sữa tiếp tục đông tụ do lipit trở nên rắn hơn, nước tự do liên kết với protein làm sữa đông đặc thêm. Trong giai đoạn này cũng bắt đầu quá trình tạo hương sữa làm cho sữa có mùi đặc trưng.

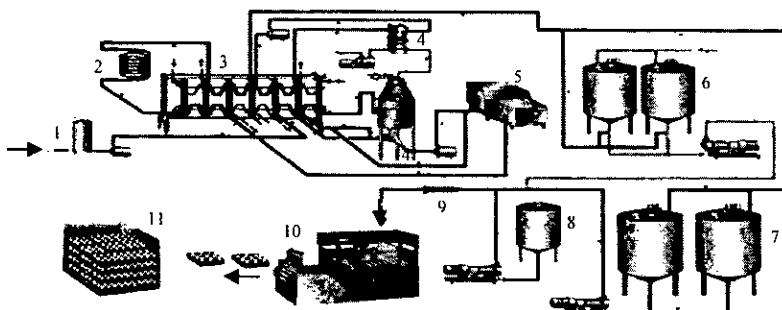
Để tăng thêm sự hấp dẫn của sữa chua, người ta có thể bổ sung thêm hương vị như vanillin, hương vị trái cây tự nhiên hay hương tổng hợp và màu thực phẩm. Tuỳ thuộc vào phương pháp lên men, thời điểm bổ sung các

hương vị và phẩm màu vào sữa khác nhau (hình 6.18). Thời gian “giữ chín” sữa thông thường khoảng 12–14 giờ.

Quá trình lên men sữa chua theo phương pháp thủ công hay công nghiệp về cơ bản giống nhau, có chăng khác nhau là ở lên men công nghiệp được thực hiện trong điều kiện vô trùng, giống sử dụng thường là giống thuần khiết đảm bảo cho quá trình lên men ổn định hơn, sản phẩm sữa nhận được có chất lượng cao hơn.

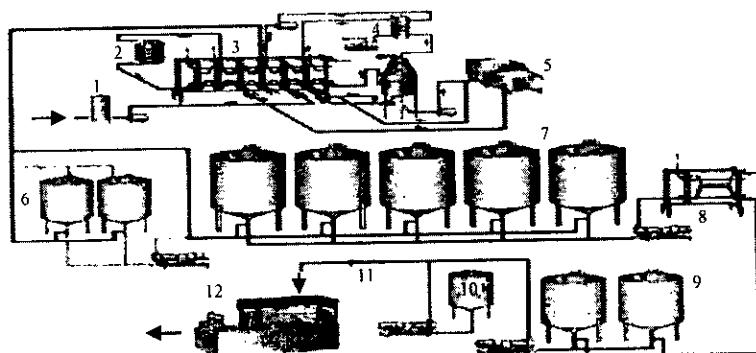
BẢNG 6.2. THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA SỮA VÀ HUYẾT THANH SỮA

Thành phần	Sữa (%)	Huyết thanh sữa (%)
Nước	87,6	93,7
Lipit	3,3–3,8	0,5
Protein	3,3	0,8–1,0
Cazein	2,6	–
Lactozơ	–	4,85
Canxi	0,12–0,15	0,05–0,09



Hình 6.19. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất sữa chua đóng chai

1. Téc chứa sữa; 2. Máy lạnh; 3. Nồi thanh trùng; 4. Máy làm lạnh; 5. Tủ ổn định; 6. Thùng giống khởi động; 7. Thùng ổn định; 8. Thùng hương liệu; 9. Máy trộn; 10. Đóng gói; 11. Ủ lên men (Theo *Dairy Processing Handbook*. Published by Tetra Pak Processing Systems AB, S-221 86 Lund, Sweden. pg. 252)



Hình 6.20. Sơ đồ các con đường sản xuất sữa chua theo phương pháp bể

1. Téc chứa sữa; 2. Máy lạnh; 3. Nồi thanh trùng; 4. Máy làm lạnh; 5. Tủ ổn định; 6. Thùng giống khởi động; 7. Thùng lên men; 8. Máy làm lạnh; 9. Thùng ổn định; 10. Bình hương liệu; 11. Máy trộn; 12. Đóng gói (Theo: *Dairy Processing Handbook*. Published by Tetra Pak Processing Systems AB, S-221 86 Lund, Sweden. pg. 249).

Như đã trình bày ở trên, sản xuất sữa chua trong công nghiệp thường sử dụng 2 phương pháp lên men: Lên men đóng chai và lên men bể. Phương pháp lên men bể người ta còn gọi là lên men có khuấy trộn, vì sau giai đoạn sữa đông, người ta đảo trộn sữa đều trước khi chuyển sang giai đoạn làm “chín” sữa ở nhiệt độ thấp, hơn nữa sản phẩm tạo thành người ta phân vào hộp hay vào thùng và sữa được vận chuyển trong thùng hay hộp lạnh.

Sơ đồ quá trình sản xuất sữa chua trong công nghiệp bằng phương pháp lên men chai được trình bày trên hình 6.19 và sản xuất bằng phương pháp lên men bể được trình bày trên hình 6.20.

b) Công nghệ lên men sản xuất phomat

Phomat là sản phẩm chế biến từ sữa nhờ lên men lactic, là sản phẩm giàu dinh dưỡng, bảo quản được lâu, rất phổ biến. Cơ sở sinh hoá và các giai đoạn sản xuất phomat như sau:

- Lên men sữa, đông tụ casein. Người ta dùng enzym rennin hoặc vi khuẩn lactic tạo pH môi trường axit để đông tụ sữa sau khi thanh trùng Pasteur thu phomat khối. Tác động chủ yếu của rennin là thủy phân một phần casein thành pepton và axit amin tự do,...

- Nén ép từ 20 đến 24 giờ ở nhiệt độ 35–50°C để tách huyết thanh từ phomat khối. Trong thời gian này, sự lên men lactic vẫn tiếp tục diễn ra mạnh mẽ. Huyết thanh sữa bị ép ra chứa lactozơ, lactalbumin, lacglobulin,...

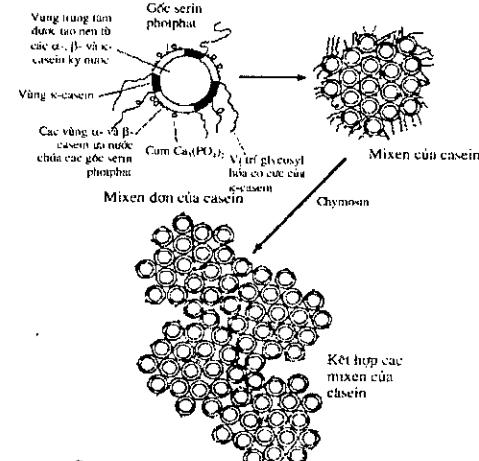
- Muối các khối phomat tạo thành sau khi nén ép tách huyết thanh trong bể muối nồng độ 24% trong vài ngày để nâng cao chất lượng mùi vị phomat và ngăn không cho vi sinh vật có hại phát triển.

– Ủ chín phomat được tiến hành sau khi kết thúc giai đoạn muối trong hầm ủ lên men ở 18–22°C, độ ẩm 80–90%. Quá trình lên men lactic lúc này xảy ra yếu ớt vì đường lactozơ đã bị tách hầu hết trong giai đoạn ép. *Streptococcus lactis* sẽ lên men lactic cho đến khi sử dụng hết đường lactozơ còn lại và chết dần, trước tiên là cầu khuẩn lactic, sau đó là trực khuẩn lactic. Lúc này trong khối phomat, vi khuẩn propionic hoạt động mạnh lên và lên men lactat thành axit propionic, axit axetic và CO₂. Hai axit này làm cho phomat có vị chua hăng đặc biệt, còn CO₂ thoát ra tạo các lỗ hổng trong khối phomat. Sự lên men propionic sẽ kết thúc trong vòng 2 tháng hay 2,5 tháng. Đến đây quá trình lên men chủ yếu đã kết thúc. Tuy vậy người ta còn tiếp tục ủ cho đến khi phomat hoàn toàn chín. Trong thời gian này, casein dưới tác dụng của rennin vẫn tiếp tục bị phân giải tiếp thành pepton, axit amin càng làm tăng chất lượng của phomat.

Thành phần chủ yếu của sữa là protein, lipit, lactozơ, khoáng, vitamin và một số khá lớn enzym khác nhau.

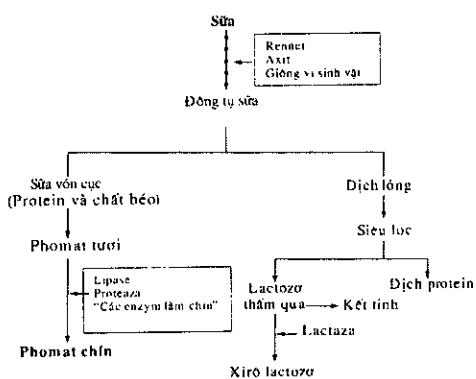
Như chúng ta đã biết, trong quá trình sản xuất phomat, quan trọng nhất là giai đoạn tủa protein sữa là casein bằng cách bổ sung ion Ca²⁺ và rennet. Rennet là dịch chiết từ ngăn dạ dày thứ 4 của bê non. Trong dịch rennet có mặt enzym chymosin (còn gọi là rennin) quyết định sự tủa sữa. Chymosin được tổng hợp ở dạng tiền enzym là prochymosin chứa 381 gốc axit amin. Tiền enzym này sau đó sẽ bị cắt tiếp thành tiền chymosin (prochymosin) chứa 365 gốc axit amin. Ở pH thấp, tiền chymosin biến đổi tiếp thành chymosin chứa 323 gốc axit amin (hình 6.21).

Trong 1 lít sữa trung bình có khoảng 25g casein. Casein là nhóm phân tử protein, ký hiệu là α₁, α₂, β- và κ-casein, chiếm tỷ lệ tương ứng khoảng 36, 12, 36 và 12% tổng protein trong casein. Khối lượng phân tử của α-casein và β-casein khoảng 24.000 Da, của κ-casein 19.000 Da. α-casein chứa 8 gốc photphoserin, β-casein

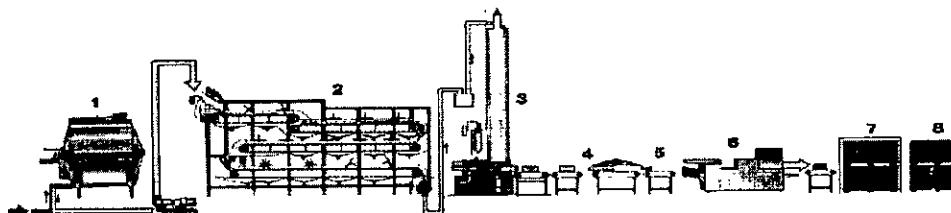


Hình 6.21. Cơ chế quá trình đông tụ sữa dưới tác động của enzym chymosin

chứa 5 gốc, còn κ -casein chỉ chứa 1 gốc. Các phân tử casein kết hợp với nhau tạo phức casein dưới sợi (casein submicelle). Trong sữa, các phức này liên kết với ion Ca^{2+} tạo ra tập hợp casein sợi (casein micell) với các phân tử nước nằm phía trong phức, còn phân tử nước hướng ra phía ngoài bề mặt mixen ngăn cản sự tập hợp của các casein sợi với nhau. κ -Casein chứa 169 gốc axit amin. Ở pH 6,6, chymosin cắt ở vị trí Phe-105 và Met-106 loại bỏ đoạn peptit có đuôi đường từ 106 đến 169 ra khỏi mixen. Nếu có mặt ion Ca^{2+} các mixen sẽ tập hợp thành cấu trúc khối lưới gọi là paracasein, chính là tủa sữa trong giai đoạn đầu tiên sản xuất phomat.



Hình 6.22. Sơ đồ công nghệ sản xuất phomat bằng enzym



Hình 6.23. Sơ đồ dây chuyền công nghệ quá trình sản xuất phomat dày

1. Bồn chứa phomat; 2. Máy làm dày phomat; 3. Tạo khối bơ và ép; 4. Ép chân không; 5. Cân; 6. Đóng hộp; 7. Palletizer (khay hoặc thùng đựng có thể vận chuyển dễ dàng); 8. Lưu giữ làm chín. (Theo: *Dairy Processing Handbook*. Published by Tetra Pak Processing Systems AB, S-221 86 Lund, Sweden. p 318)

Sau đó người ta tiến hành ép tủa protein sữa trong khuôn để loại nước và tạo dáng cho các bánh phomat và bảo quản các bánh phomat tươi này trong các kho mát để phomat “chín” từ từ, chất lượng và mùi vị phomat phụ thuộc rất nhiều vào giai đoạn này. Thường người ta xử lý tiếp bằng cách bổ sung proteaza và lipaza nhằm duy trì quá trình thủy phân một cách rất từ từ tạo mùi vị đặc trưng cho từng loại phomat do sự tạo thành các axit béo có số C chẵn từ C4 đến C10, các methyl keton có số C lẻ từ C5 đến C9 và α -keto axit. Về nguyên tắc, giai đoạn ủ chín càng kéo dài càng tốt. Tuy nhiên, tùy từng trường hợp, người ta xử lý sao cho thời gian ủ càng ngắn càng tốt để tiết

kiêm năng lượng và chi phí lưu kho. Hàng năm ở Mỹ sản xuất chừng 2 tỷ pao (pound) phomat cheddar. Mùi vị đặc trưng của phomat cheddar đạt được trong thời gian ủ chín kéo dài 3–9 tháng. Theo tính toán, chi phí để ủ chín 100 pao phomat trong 6 tháng là 2,50 USD, trong khi chi phí để ủ chín 100 pao trong 12 tháng tạo ra loại phomat cheddar ngon hơn là 10 USD.

Sữa chua keffia là sản phẩm phổ biến ở châu Âu. Quy trình sản xuất cũng đơn giản: sữa động vật sau khi được khử mõi, khử khuẩn ở 90–95°C được làm nguội đến 20–26°C rồi cho vào hạt keffia chứa sẵn *Lactobacillus caucasicus*, *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, nấm men và một số vi khuẩn khác như Aerobacter, Klebsiella,... để lên men sữa chua tạo ra sản phẩm độc đáo chứa 0,6–0,8% rượu, 0,6–0,9% axit lactic và 50% dung tích khí CO₂. Sản phẩm có tính bổ dưỡng cao, có tính chữa bệnh. Đây là sản phẩm tiêu biểu của kiều lên men hỗn hợp.

Bơ là sản phẩm chế biến từ chất béo của sữa nhờ lên men lactic. Chất béo được tách bằng ly tâm hay lắng sữa một cách đột ngột. Sau đó nó được tách axit, khử trùng và cấy khuẩn lactic thuần khiết cho lên men lactic. Sau lên men, nhận được kem chín có mùi thơm dễ chịu. Đánh nhuyễn kem chín, tách nước ra khỏi bơ thành phẩm và tùy theo khẩu vị, người ta bổ sung thêm muối ăn với các tỷ lệ khác nhau, tối đa là 10% (bơ mặn), hay không bổ sung thêm muối (bơ ngọt).

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 6

1. Lên men (fermentation) là quá trình nhường năng lượng mà ở đó các chất cho và nhận electron (điện tử) thuộc loại nào?
2. Một trong số các quá trình lên men quen thuộc là sự chuyển hóa glucozơ thành etanol nhờ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, nếu nồi lên men đang lên men được cấp khí (oxy) đầy đủ, thì khả năng tạo cồn tăng hay sinh khối nấm men tăng?
3. Lên men rượu là quá trình lên men hiếu khí, lên men kỵ khí, lên men thiếu khí hay lên men sinh tổng hợp?
4. Theo M. Larpent–Gourgaud và cộng sự (1992), nếu lấy 100 phần đường glucozơ sử dụng để lên men rượu, thì CO₂ tạo thành theo lý thuyết là bao nhiêu phần trăm (%)?
5. Trong điều kiện lên men rượu, trong môi trường đường đơn như glucozơ, fructozơ để thu nhận nhiều sinh khối, nấm men cần có oxy hòa tan trong môi trường. Để thu nhận nhiều năng lượng, sinh khối

trong dịch lên men tăng thì quá trình phân giải đường theo con đường và chu trình nào?

6. Rượu nấu bằng men thuốc bắc từ gạo nếp cho chất lượng cao, hương vị đậm đà. Tuy nhiên, vì sao trong sản xuất cồn, người ta không sử dụng phương pháp lên men bằng men thuốc bắc?
7. Trong điều kiện lên men rượu, các đường đơn như glucozơ được chuyển hóa thành rượu (etanol), quá trình lên men rượu có mấy giai đoạn chủ yếu?
8. Lên men rượu vang nho là một nghề truyền thống tại nhiều nước, bao gồm 2 giai đoạn: Lên men chính và lên men phụ, muốn rượu vang ngon thì người ta thường thực hiện hai quá trình lên men bao lâu?
9. Giai đoạn lên men phụ của rượu vang thường được kéo dài từ 3 tháng đến nhiều năm tạo độ hương vị đặc biệt, thông thường người ta không tàng trữ trong các thùng chứa nào sau đây: Thùng gỗ sồi kín; thùng kim loại kín; thùng gỗ sồi hở hay thùng kim loại hở?
10. Nhằm mục đích nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm lên men, người ta thường bổ sung thêm loại enzym kỹ thuật nào vào công đoạn nghiền ép sinh khối trái cây nguyên liệu ban đầu để làm trong dịch lên men của quy trình công nghệ lên men rượu vang?
11. Bia là sự lên men lúa đại mạch và hoa houblon bằng nấm men, tinh bột được phân giải đến glucozơ phải nhờ enzym amylaza, vậy trong quá trình đường hoá enzym này lấy từ đâu?
12. Quy trình lên men sản xuất bia và rượu vang là lên men rượu etylic nhờ nấm men *Saccharomyces*, nồng độ etanol trong bia thành phẩm thường bao nhiêu %?
13. Trong sản xuất bia, đại mạch là nguyên liệu thích hợp, vì giá malt khá đắt, người ta đã thay thế một phần đại mạch bằng nguyên liệu ngũ cốc có sẵn trong nước chứa nhiều bột, ít chất béo như ngô, gạo,... bằng cách bổ sung thêm chế phẩm enzym loại nào trong quá trình đường hoá?
14. Trong các loài vi khuẩn lactic: *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis* và *Lactobacillus fermentum*, loài nào thường được sử dụng để sản xuất sữa chua?
15. Để làm "chín" phomat, sử dụng các vi khuẩn gì để thực hiện loại lên men nào?

Chương 7

CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT PROTEIN ĐƠN BÀO

7.1. NGUỒN PROTEIN TỪ SINH KHỐI VI SINH VẬT

7.1.1. Protein đơn bào

Loài người đang gặp khó khăn về lương thực, thực phẩm, đặc biệt là sự thiếu hụt protein. Sự thiếu hụt này do tốc độ tăng sản lượng lương thực, thực phẩm như hiện nay không đáp ứng tốc độ tăng trưởng dân số.

Nguồn protein khá phong phú là thuỷ sản, tuy lớn nhưng không phải là vô tận, việc khai thác cũng gặp nhiều khó khăn, nhất là hiện nay vấn đề ô nhiễm môi trường biển cũng đang ở mức báo động.

Từ những thực tế trên, con người chú ý hơn đến việc khai thác nguồn protein từ vi sinh vật, vì việc khai thác này có những ưu việt đáng kể.

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 dùng 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, còn được gọi là men bánh mỳ; sinh khối vi khuẩn dùng làm phân bón cố định đạm; sinh khối vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* sử dụng làm thuốc trừ sâu vi sinh; hay sinh khối vi sinh vật có hệ enzym phân huỷ chất hữu cơ dùng trong xử lý nước thải, chất thải bảo vệ môi trường.

7.1.2. Ưu điểm của quá trình sản xuất protein đơn bào

Nguồn protein chủ yếu hiện nay được khai thác từ trồng trọt và chăn nuôi. Lượng protein thiếu hụt hàng năm lên đến trên 20 triệu tấn. Dân số ngày càng tăng thì nguy cơ đối protein ngày càng nghiêm trọng, ngành trồng trọt và chăn nuôi không thể đáp ứng đủ nhu cầu mặc dầu có nhiều tiến bộ về giống cây trồng, vật nuôi, về phân bón và thức ăn chăn nuôi, nhưng diện tích canh tác cũng chỉ là hữu hạn.

Do vậy, người ta quan tâm đến khai thác nguồn protein từ vi sinh vật, vì:

- 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 và hiệu suất cao.
- Diện tích để nuôi cấy vi sinh vật không lớn (để xây dựng xí nghiệp với hệ thống lén men).
- Tốc độ sinh sản của vi sinh vật cao, tương ứng với tốc độ sản sinh protein, có thể gấp 100 – 1.000 lần so với đại 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 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 thuỷ phân gỗ tạp, rơm rạ, bã mía,... góp phần khắc phục ô nhiễm môi trường.

Chế phẩm protein từ vi sinh vật ở đây được hiểu là toàn bộ sinh khối tế bào vi sinh vật. Sinh khối vi sinh vật chứa 40–60% phần chất khô của tế bào (như tế bào nấm nem, vi khuẩn lam).

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

7.2. VI SINH VẬT DÙNG TRONG SẢN XUẤT PROTEIN ĐƠN BÀO (SCP)

Protein của vi sinh vật chủ yếu được tổng hợp để hình thành các enzym, vì vậy phần lớn nằm trong tế bào, một số ít được tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy.

Những chủng vi sinh vật được sử dụng trong sản xuất SCP phải có các tiêu chuẩn sau: Thời gian sinh trưởng (nhân đôi) ngắn, có khả năng hình thành protein cao (40–70% so với sinh khối), có thể sử dụng tối đa các chất dinh dưỡng, không gây bệnh hoặc tiết độc tố vào môi trường nuôi cấy, chịu được ở điều kiện nuôi cấy không vô trùng, protein hay sinh khối vi sinh vật dễ dàng tách ra khỏi môi trường.

Tùy thuộc vào nguồn cacbon mà người ta lựa chọn các chủng vi sinh vật khác nhau trong sản xuất các protein đơn bào. Sau đây, sẽ giới thiệu một số loại vi sinh vật được sử dụng trong việc sản xuất SCP:

– Để thu nhận protein từ các dịch thuỷ phân nguyên liệu thực vật, người ta sử dụng các loại nấm men thuộc giống *Candida* như *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. maltosa*, *C. scotti*, *C. humicola*, *C. diddensi* hoặc ở mức độ ít hơn là các loài nấm men *Trichosporon cutaneum* và *Cryptococcus diffluens*.

– Để thu nhận SCP từ hydrocacbon lỏng người ta sử dụng nhiều chủng thuộc giống *Candida* như *C. tropicalis*, *C. maltosa*, *C. lypolytica*, *C. rubusta*, *C. puliculosa*, *C. scotti*, *C. rugosa*, *C. oleophila*, ngoài ra còn sử dụng một số chi khác có khả năng đồng hoá được hydrocacbon dầu mỏ như *Torulopsis*, *Rhodoturola*.

– Để sử dụng hydrocacbon dạng khí, người ta thường sử dụng vi khuẩn *Mycobacterium* và *Pseudomonas* có khả năng đồng hoá được dạng khí này.

– Nếu sử dụng nguồn cacbon có nguồn gốc thực vật như các loại đường từ cát mía, các loại rỉ mật, người ta thường sử dụng các loại nấm men thuộc chi *Saccharomyces* bằng phương pháp lên men sục khí.

– Người cũng sử dụng các loại tảo lam, tảo đơn bào và đa bào để sản xuất SCP thuộc các chi: *Spirulina*, *Chrorella*, *Scenedesmus*,...

Người ta ít sử dụng các loại nấm mốc để sản xuất SCP, vì sinh khối nấm mốc thường tích lũy lượng protein thấp.

7.3. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT SCP TỪ CÁC NHÓM VI SINH VẬT

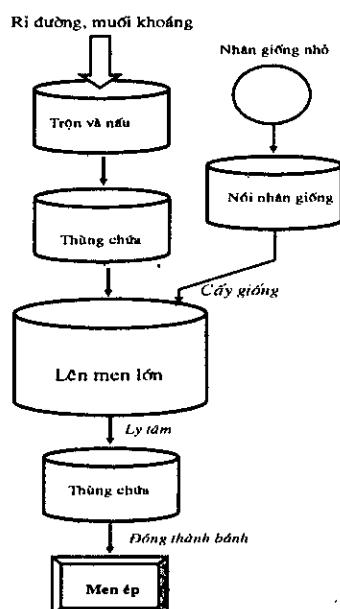
7.3.1. Sản xuất nấm men bánh mỳ

Bánh mỳ là một quá trình lên men đường thành rượu và cacbon dioxit (CO_2). Trước tiên người thợ làm bánh mỳ nhào trộn bột, đường, sữa và các thành phần khác với vi sinh vật, thông thường với một loại nấm men bánh mỳ như *Saccharomyces cerevisiae*, nhưng không phải lúc nào cũng vậy. Các thành phần sau khi đã trộn được ủ ở 27°C trong vài giờ. Trong thời gian ủ, nấm men chuyển hoá đường hiện có thành etanol và CO_2 . Thời gian ủ dưới 4 giờ không đủ thời gian cho nấm men tăng đủ số lượng. CO_2 sinh ra là nguyên nhân làm cho bánh mỳ nở ra và tạo độ xốp. Thành công của bột nở phụ thuộc vào tỷ lệ khí sinh ra. Nó có thể tăng lên khi bổ sung thêm nấm men, thêm đường hoặc chất điều hoà (nhiều loại muối mà nấm men cần). Các yếu tố làm tăng tốc độ sinh CO_2 cũng cần hạn chế, bởi vì bổ sung nhiều quá hoặc có thể giết chết nấm men hoặc làm cho bánh mỳ nở nhanh quá.

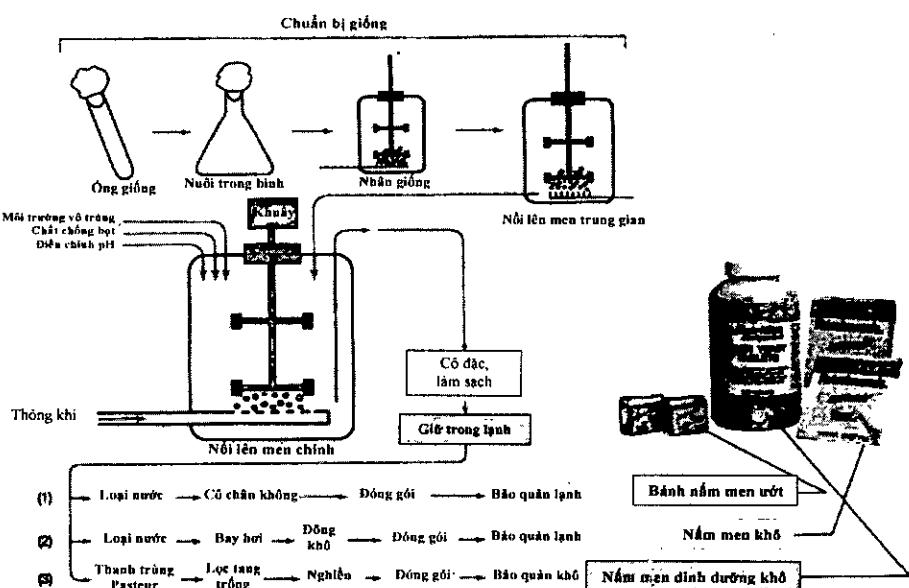
Quá trình sản xuất nấm men bánh mỳ được thực hiện các bước theo sơ đồ trên hình 7.1. Nguyên liệu để sản xuất thường người ta dùng là rỉ đường và một số muối khoáng. Sau khi nấu trộn và nấu thanh trùng, dịch được đưa vào thùng lên men và cấy giống đã nhân với tỷ lệ 1%. Sau đó thực hiện quá trình lên men 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 thành bột khô hay đóng thành bánh men ép. Ở nhiều nước, người ta thực hiện quá trình lên men trong các bình nuôi cấy liên tục.

7.3.2. Thu nhận protein từ nấm men

Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất sinh khối nấm men công nghiệp được trình bày trên hình 7.2.



Hình 7.1. Sơ đồ quá trình lên men sản xuất nấm men bánh mỳ



Hình 7.2. Sơ đồ công nghệ các công đoạn của quá trình lên men sản xuất công nghiệp sinh khối nấm men

Trong số các đối tượng vi sinh vật được sử dụng để thu nhận protein, nấm men là loại được nghiên cứu sớm nhất và đến nay đã được áp dụng rộng rãi ở nhiều nước. Nấm men là nhóm vi sinh vật có cấu tạo đơn bào và sinh sản theo lối nảy chồi. Nấm men có sức sống cao, sinh sôi nảy nở nhanh chóng, có thể phát triển trong điều kiện nuôi cấy bán vô trùng.

Về dinh dưỡng, nấm men giàu protein và vitamin, đặc biệt là vitamin nhóm B. Protein của nấm men gần giống protein có nguồn gốc động vật, chứa 20 loại axit amin, trong đó có đầy đủ các axit amin không thay thế. Thành phần các axit amin của nấm men cân đối hơn so với lúa mì, kém chút ít so với sữa, bột cá và các sản phẩm động vật nói chung.

7.3.3. Các chủng nấm men sử dụng trong sản xuất SCP

Nhiều loại nấm men được sử dụng trong sản xuất protein đơn bào như: *Endomyces fivubigera*, *Torulopsis utilis*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula capsulata*, *Monilia candida*, *Mycotorula japonica*,...

Trong số này, các chủng thuộc ba chi sau đây *Candida*, *Torulopsis* và *Saccharomyces* được sử dụng phổ biến hơn cả, vì chúng có khả năng chuyển hóa các chất rất cao, đa dạng các nguồn nguyên liệu và quy trình công nghệ sản xuất tương đối đơn giản. Trong đó, *Saccharomyces* ít được sử dụng để sản xuất protein hơn vì quy trình sản xuất đòi hỏi phức tạp hơn.

7.3.4. Sản xuất protein từ nấm men bằng các nguồn nguyên liệu khác nhau

a) Sử dụng các nguồn hydrat cacbon thông thường

Các chủng nấm men sử dụng theo hướng này phải có các đặc điểm sau: (1) Có khả năng đồng hóa nhiều nguồn hydratcacbon khác nhau, nhất là các loại pentozơ và axit hữu cơ; (2) Có khả năng phát triển nhanh; (3) Có sức đề kháng cao với CO₂ và (4) Có thể phát triển tốt trên môi trường có nồng độ chất khử cao.

b) Sử dụng nguồn rỉ đường

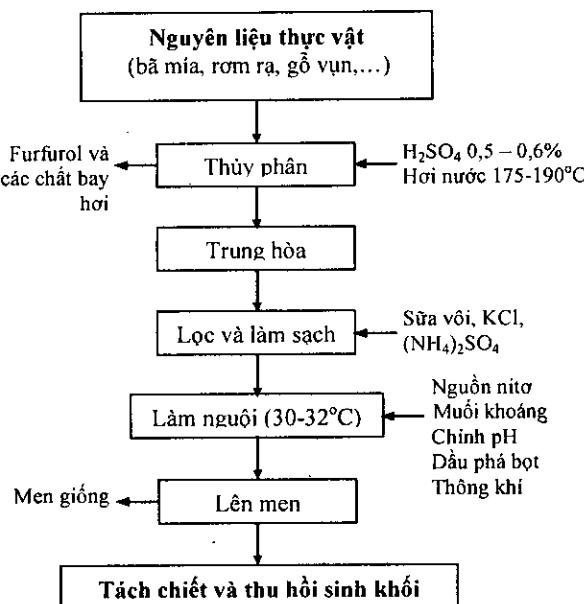
Hiện nay để sản xuất protein từ nấm men, chủ yếu vẫn sản xuất từ rỉ đường mía và rỉ đường củ cải. Thành phần chính của rỉ đường là đường saccarozơ 30–40%. Rỉ đường giàu các chất sinh trưởng. Trong 100g rỉ đường mía có 70–300γ biotin, 5,4mg axit pantothenic, 600mg inositol. Còn nhu cầu về các chất sinh trưởng của nấm men khi phát triển trên môi trường rỉ đường là: biotin 29γ%, axit pantothenic 5γ%, inozit 12mg%.

Khi dùng rỉ đường làm nguồn cacbon trong nuôi cấy nấm men làm giống, cần hoà loãng đến hàm lượng đường từ 4 – 6% và các chất dinh dưỡng cũng có nồng độ vừa phải như nhu cầu của nấm men. Cần bổ sung thêm các loại muối khoáng; cần thiết và hỗn hợp axit amin dưới dạng protein thuỷ phân nấm men, dịch thải từ nước chấm. pH môi trường thích hợp từ 3,5 đến 4,5. Nấm men được nuôi trong điều kiện hiếu khí (có sục khí liên tục) ở 25–30°C.

Dịch nuôi cấy nấm men được đem ly tâm thu sinh khối ở dạng bột nhão, ép loại bột nước, sấy khô đến độ ẩm 7%. Chế phẩm được đem nghiền thành bột hoặc ép thành viên.

c) Sử dụng các nguồn cacbon từ xylulozơ thực vật

Gỗ vụn, rơm rạ, bã mía,... được tận dụng làm nguyên liệu làm nguồn cacbon trong sản xuất protein từ nấm men. Những loại nguyên liệu này được nấm men sử dụng phải qua khâu đường hoá (hình 7.3). Có thể dùng enzym từ vi sinh vật để thuỷ phân các loại nguyên liệu trên hoặc bằng axit sunphuric.



Hình 7.3. Sơ đồ công nghệ sản xuất nấm men từ các nguyên liệu thực vật (thuỷ phân bằng H_2SO_4)

d) Sử dụng nguồn dầu mỏ và khí đốt

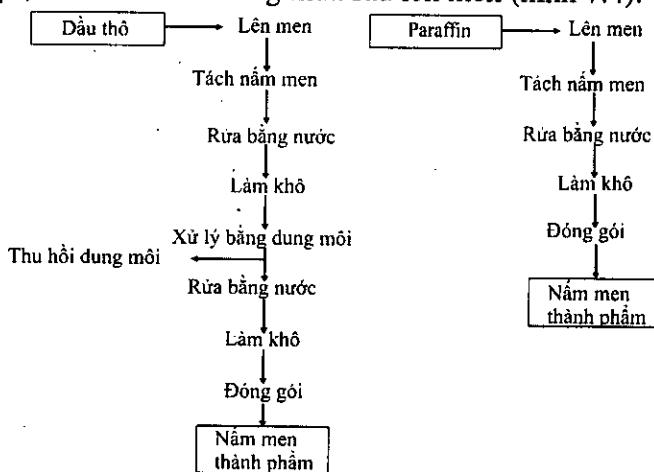
Vào năm 1968, lần đầu tiên trên thế giới, ở Liên Xô người ta đã xây dựng nhà máy sản xuất protein bằng nấm men từ paraffin với công suất

12.000 tấn/năm. Sau đó, đã có hàng loạt các nhà máy dùng nguyên liệu là hydrocacbon để sản xuất protein rất lớn: ở Nhật: 120.000 – 150.000 tấn men khô/ năm, ở Italia: 100.000 tấn/ năm. Những năm gần đây, thế giới chú ý đến việc sử dụng các sản phẩm dầu mỏ để lên men sản xuất protein.

Để sản xuất protein từ dầu mỏ và khí đốt, người ta thường sử dụng các chủng nấm men sau: Các loài thuộc giống *Candida* như *C. tropicalis*, *C. lipolitica*, *C. pelliculosa*; *Rhodotorula sp.* và *Torulopsis famata*.

Các chủng nấm men dùng sản xuất protein từ nguồn hydrocacbon phải có đặc điểm sau: (a) Sử dụng hydrocacbon làm nguồn cacbon duy nhất để trao đổi chất, tổng hợp và trao đổi năng lượng, (b) Phải bền vững với hydrocacbon ở nồng độ cao và (3) Phải có khả năng để hydrocacbon được hấp thu vào cơ thể tế bào.

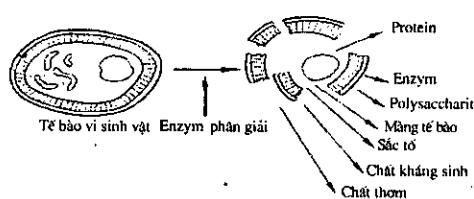
Quy trình công nghệ sản xuất nấm men từ các nguồn hydrocacbon về cơ bản cũng giống nguồn hydratcacbon, nhưng có thêm công đoạn là xử lý nguyên liệu, tách bỏ môi trường thừa sau lên men (hình 7.4).



Hình 7.4. Sơ đồ công nghệ sản xuất nấm men từ dầu thô và từ paraffin

7.3.5. Dịch thuỷ phân vi sinh vật

Tế bào vi sinh vật chứa nhiều chất có giá trị sử dụng rộng rãi. Nhiều chất trong số đó (kể cả những enzym kỹ thuật) được giải phóng ra môi trường nuôi cấy xung quanh. Trong khi cũng không ít các



Hình 7.5. Sản phẩm thuỷ giải từ tế bào nấm men

chất có giá trị vẫn còn nằm lại bên trong tế bào. Để thu nhận được các chất này, người ta phải phá (thuỷ phân) thành tế bào. Trong công nghiệp, thường người ta áp dụng phương pháp xử lý nhiệt và nghiền cơ học. Gần đây người ta bắt đầu sử dụng enzym để phá vách tế bào.

Để phá thành tế bào nấm men, người ta thường sử dụng các enzym phân giải: β -1,3-glucanaza, proteaza, β -1,6-glucanaza, mannaza và chitinaza. Các enzym này phối hợp thuỷ phân cắt cả 2 lớp vách tế bào nấm men giải phóng dịch chiết nấm men là nguyên liệu sản xuất cao nấm men, một sản phẩm rất có giá trị.

Hằng năm, một phần khá lớn sinh khối nấm men tạo thành trong các nhà máy lên men rượu, bia,... được sử dụng để sản xuất cao nấm men. Năm 1983, toàn thế giới sản xuất khoảng 25.000 tấn cao nấm men sử dụng làm phụ liệu tạo mùi trong công nghiệp thực phẩm, để sản xuất thực phẩm ăn kiêng cũng như là nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược. Quy trình công nghệ sản xuất cao nấm men gồm các công đoạn sau:

– Trước hết làm tế bào nấm men chết nhờ phá tế bào tương bằng cách ngâm chúng trong dịch muối và hữu cơ như isopropanol 0,5% trong 5 giờ. Sự thuỷ phân sau đó có thể thực hiện ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ phòng, kéo dài khoảng 48 giờ ở 58°C và pH 5,5. Tuy nhiên, phải điều chỉnh sao cho sự gia tăng nhiệt độ phản ứng không làm biến tính enzym.

– Tiếp theo là giai đoạn tự thuỷ phân, là sự tự phá vỡ vách tế bào bởi bản thân enzym của nấm men. Quá trình tự thuỷ phân xảy ra ở nhiệt độ $30\text{--}55^{\circ}\text{C}$ kéo dài khoảng 20 giờ. Đôi khi bổ sung papain ở pH 5,0 và $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ để tăng hiệu suất tự thuỷ phân.

– Tiếp theo là giai đoạn Pasteur hoá và làm trong dịch chiết bằng ly tâm hoặc bằng cách lọc. Sản phẩm dịch chiết nấm men thường có hàm lượng chất khô khoảng 70–75%.

Trong thực tiễn sản xuất, người ta thường sử dụng glucanaza từ *Arthrobacter* và proteaza kiềm để thuỷ giải dịch huyền phù ở $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$, chứa 20% tế bào nấm men đã được xử lý trước đó bằng dịch 3% NaCl trong khoảng 10–13 giờ. Ngoài phương pháp này, người ta còn áp dụng phương pháp gia nhiệt hỗn hợp huyền phù chứa tế bào nấm men đến 90°C khoảng 10 phút, trước khi xử lý bằng enzym. Cách xử lý nói trên cho phép giảm thời gian tự thuỷ phân từ 48 giờ xuống còn 16 giờ và gia tăng hiệu suất chiết xuất từ 55% lên 70%.

7.4. QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT PROTEIN ĐƠN BÀO (SCP) TỪ SINH KHỐI VI TẢO

7.4.1. Giá trị dinh dưỡng của sinh khối vi tảo

Sinh khối của vi khuẩn lam và vi tảo (sau đây gọi tắt 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 còn cao hơn, lên đến 60–70% khối lượng khô. Hơn nữa, hàm lượng axit amin của protein ở vi tảo khá cân đối, gần với quy định của protein tiêu chuẩn và hàm lượng các axit amin không thay thế trong protein rất cao, có thể lên tới 42%. Giá trị dinh dưỡng của sinh khối vi tảo cao là ở chỗ, chúng có chứa các vitamin khác nhau như vitamin A, vitamin nhóm B, vitamin K, một số loài còn chứa cả vitamin C. Ở vi khuẩn lam còn chứa cả vitamin B₁₂. Ngoài ra, chúng còn chứa nguồn 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.

Hiện nay, người ta còn được biết vi khuẩn lam còn có khả năng sinh nhiều chất kháng sinh, chất ức chế có giá trị sử dụng trong công tác chữa bệnh, bảo vệ sức khỏe con người.

Với lý do trên, vi khuẩn lam và vi tảo được coi là nguồn thức ăn cho người, gia súc, gia cầm, tôm, cá,... góp phần khắc phục nạn thiếu hụt protein hiện nay.

7.4.2. Chủng giống sử dụng trong nuôi trồng để thu nhận sinh khối

Chủng giống được lựa chọn để sử dụng sản xuất ở quy mô lớn cần có ưu điểm thích hợp cho việc nuôi trồng cũng như khả năng tạo sinh khối lớn. Những chủng vi tảo được sử dụng trong nuôi trồng cần có các đặc điểm sau: (a) Tốc độ sinh trưởng nhanh, năng suất quang hợp cao, có khả năng chống chịu được 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; (b) Sinh khối có thành phần hóa học thích hợp, không chứa độc tố và (c) 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 *Chrorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella* và vi khuẩn lam như *Spirulina*.

– Giống *Chrorella* đã được Beijerinski phát hiện từ năm 1890. Các loài *Chrorella* được nghiên cứu nuôi trồng đại trà từ những năm 1950 tại Mỹ và

châu Âu. Đây là tảo đơn bào, kích thước nhỏ (khoảng 1 μm), tự dưỡng, nghĩa là sử dụng ánh sáng mặt trời để sinh trưởng nhờ quang hợp. Tuy vậy, cũng có một số loài có thể sống không cần ánh sáng và sử dụng nguồn cacbon hữu cơ như glucozơ, axetat. Một số loài thường sử dụng trong nuôi trồng để thu nhận sinh khối là *Chlorella elipsoidea*, *C. vulgaris* và *C. pyrenoidosa*.

– Giống *Scenedesmus* có số lượng loài ít, các đặc điểm sinh lý, sinh hoá không có đặc trưng loài. Các loài *Scenedesmus* là sinh vật tự dưỡng, nhưng chúng cũng có khả năng phát triển không cần ánh sáng, trong bóng tối nó sử dụng các hợp chất hữu cơ như đường đơn, axetat và giải phóng CO₂ và H₂O. *Scenedesmus* có khả năng sản sinh các enzym proteaza và amylaza ngoại bào. Sinh khối của *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 cho chăn nuôi. Một số loài thường sử dụng trong nuôi trồng để thu nhận sinh khối là *Scenedesmus acuminatus*, *S. acutiformis* và *S. costulatus*.

– Giống *Spirulina* có các loài sau đây được sử dụng khá phổ biến để nuôi trồng thu sinh khối: *Spirulina platensis* và *S. maxima*. Ngày nay, *Spirulina* được sử dụng nhiều nhất trong các loài vi khuẩn lam và vi tảo trong nuôi trồng thu nhận sinh khối. Người ta quan tâm nhiều đến *Spirulina* vì chúng có những đặc điểm sau: Là cơ thể dạng sợi đa bào, có dạng xoắn lò xo, sống tự nhiên trong môi trường nước giàu NaHCO₃; Vòng đời ngắn, đơn giản, có thể thu hoạch quanh năm; hiệu suất sử dụng ánh sáng mặt trời cao, sử dụng khí CO₂ làm nguồn cacbon đạt 30% và năng suất (theo đơn vị diện tích nuôi trồng) rất cao. Hơn nữa, *Spirulina* có xu hướng nổi lên mặt nước và tụ tập thành khối, kích thước lớn (0,25–0,5mm), nên dễ dàng thu hoạch bằng cách vớt, lọc.

7.4.3. Quy trình công nghệ sản xuất SCP

a) Các phương pháp nuôi trồng

Vì tảo và vi khuẩn lam là cơ thể tự dưỡng sử dụng ánh sáng mặt trời làm nguồn năng lượng và CO₂ làm nguồn cacbon. Tuy các cơ thể này có khả năng phát triển trong điều kiện môi trường khắc nghiệt, nhưng cũng 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: Vì tảo được nuôi ở các ao tự nhiên hay các bể xây bằng xi măng hay các thùng gỗ, thùng nhựa. Trong

trường hợp này, thông thường người ta không thực hiện sục CO₂, không khuấy đảo.

– Nuôi trồng ở quy mô bán công nghiệp: Vì tảo được nuôi trong các bể xây hình đường ống, phía trên tiếp xúc ánh sáng mặt trời, cấp CO₂ 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°C.

– Nuôi trồng ở quy mô công nghiệp: Để nuôi vi tảo, người ta sử dụng hai hệ thống nuôi trồng cơ bản là hệ thống kín và hệ thống mở. Dù là hệ thống kín hay hệ thống mở, thì việc nuôi trồng cũng cần khay trộn, sục khí tạo điều kiện cho tế bào tiếp xúc với ánh sáng và khí CO₂ để chung giống thực hiện quá trình quang hợp.

+ Hệ thống kín: Vì tảo được nuôi trong các bể lén men chủ yếu sử dụng ánh sáng nhân tạo (ánh sáng đèn) có cường độ cao và hệ thống sục khí CO₂ với nồng độ tùy theo từng quy trình cụ thể. Phương pháp nuôi cấy này có ưu điểm là không phụ thuộc vào ánh sáng mặt trời, không phụ thuộc vào thời tiết khí hậu, kiểm soát được điều kiện nuôi cấy, cho nên cho năng suất tạo sinh khối cao. Nhưng với phương pháp này giá thành cao, nên ít được áp dụng rộng rãi.

+ Hệ thống mở: Hệ này có đặc điểm chủ yếu là quá trình quang hợp của vi tảo được gắn liền với việc sử dụng ánh sáng tự nhiên (ánh sáng mặt trời). Thông thường các bể nuôi có môi trường nước cao khoảng 15–20cm. Tuy vậy, môi trường nước cũng cần có đảo trộn để vi tảo có điều kiện tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời, đảm bảo cho vi tảo không bị lắng xuống đáy bể và môi trường dinh dưỡng phân phổi đều cho toàn bộ tế bào trong hệ thống nuôi.

b) Môi trường nuôi trồng và cung cấp CO₂

Nghiên cứu trong phòng thí nghiệm đối với từng loại vi tảo khá phức tạp. Từ các nghiên cứu đó người ta đưa ra môi trường nuôi cấy nhân tạo bằng các hóa chất tinh khiết. Tương tự như môi trường nuôi cấy vi sinh vật công nghiệp khác, người ta phải cải biến môi trường chuẩn, bằng cách thay thế bằng các nguyên liệu thô, rẻ tiền, dễ kiếm mà vẫn đảm bảo được khả năng thu được lượng sinh khối cao, chất lượng tốt.

Người ta thường sử dụng các nguyên liệu sau để tạo môi trường nuôi cấy đại trà:

- Nước mặn: 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 gia súc hoặc từ nhà máy xử lý nước thải.

Người ta cung cấp CO₂ bằng nhiều phương 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 cho quá trình nuôi trồng vi tảo, người ta 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.

c) Thu nhận sản phẩm

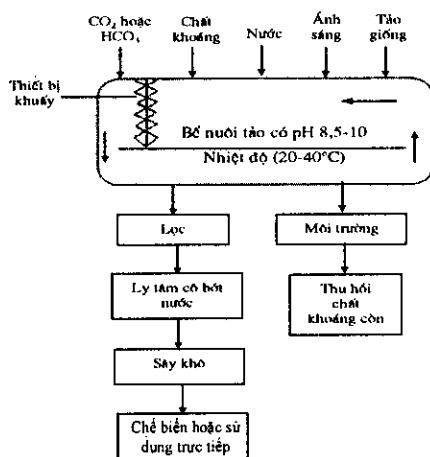
Người ta có thể sử dụng nhiều phương pháp khác nhau để thu hồi sinh khối như ly tâm, vớt, lắng kết hoá học, lắng kết điện trường, tự lắng kết. Các loại vi tảo có kích thước nhỏ, thì sinh khối thu nhận chủ yếu bằng phương pháp ly tâm.

Đối với *Spirulina* có kích lón 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 hay sấy quay. Cuối cùng ta có sản phẩm mang đi chế biến hay sử dụng trực tiếp.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 7

- Cụm từ "protein đơn bào" (SCP) được hiểu theo cách nào là đúng nhất?
- Chúng ta quan tâm đến việc sản xuất protein đơn bào do nguyên nhân nào?
- Nguyên liệu nào sau đây: Rỉ đường; Dịch thuỷ phân gỗ tạp; Các sản phẩm chế biến thuỷ sản; và Phế liệu nông nghiệp rơm rạ, bã mía...,



Hình 7.6. Sơ đồ công nghệ sản xuất đại trà sinh khối vi tảo

không phải là đối tượng quan tâm nghiên cứu sử dụng vào mục đích sản xuất protein đơn bào?

4. Người ta làm bánh mỳ, trong thời gian ủ, nấm men tăng đủ số lượng làm cho bánh mỳ nở ra và tạo độ xốp. Nguyên nhân chính làm tăng độ nở của bánh mỳ là các chất nào do nấm men tạo ra?
5. Thành công của bột nở bánh mỳ trong quá trình làm bánh mỳ phụ thuộc vào tỷ lệ khí sinh ra, nếu bổ sung thêm quá nhiều nấm men, đường hoặc chất điều hòa (nhiều loại muối mà nấm men cần) thì có thể gây ra hiện tượng gì?
6. Chế phẩm protein đơn bào được hiểu là toàn bộ sinh khối tế bào vi sinh vật, vây, sinh khối tế bào nấm men, vi khuẩn lam thường chứa khoảng bao nhiêu % chất khô?
7. Đa số protein sản xuất từ vi sinh vật hiện nay được sử dụng làm thức ăn bổ sung chủ yếu cho người, động vật nuôi, cây trồng hay vi sinh vật?
8. Protein đơn bào ít được con người sử dụng, muốn sử dụng cần nghiên cứu tiếp, đặc điểm nào sau đây: Loại bỏ tạp chất, tinh chế để nhận chế phẩm protein tinh khiết; tạo chế phẩm có thành phần phù hợp với dinh dưỡng của con người; tạo hương vị thơm ngon hợp khẩu vị hơn; hay bổ sung thêm các axit amin không thay thế?
9. Nếu sử dụng nguồn cacbon có nguồn gốc thực vật như các loại đường từ cây mía, các loại rỉ mít, người ta thường sử dụng các loại nấm men thuộc chi nào để sản xuất sinh khối giàu protein bằng phương pháp lên men sục khí?
10. Các chủng nấm men sử dụng để sản xuất protein đơn bào bằng các nguồn hydratcacbon thông thường cần có đặc điểm gì?
11. Quy trình công nghệ sản xuất nấm men từ các nguồn dầu mỏ, khí đốt về cơ bản cũng giống nguồn hydratcacbon khác, nhưng có thêm công đoạn nào?
12. Trong các enzym sau: β -1,3-glucanaza, β -1,6-glucanaza, proteaza, mannaza và amylaza, thì enzym nào không được sử dụng để phá thành tế bào nấm men?
13. Người ta còn áp dụng phương pháp gia nhiệt hỗn hợp huyền phù chia tế bào nấm men trước khi xử lý bằng enzym nhằm giảm thời gian thuỷ phân và tăng hiệu suất chiết xuất. Gia nhiệt đến bao nhiêu độ và khoảng thời gian bao phút?
14. Hàm lượng protein trong sinh khối của vi khuẩn lam là bao nhiêu so với khối lượng khô?
15. Các vi sinh vật sau đây: Chrorella; Scenedesmus; Dunaliella và Spirulina, loại nào là vi khuẩn lam?

Chương 8

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG ENZYM VI SINH VẬT

8.1. KHÁI NIỆM CƠ BẢN VỀ CÔNG NGHỆ ENZYM

8.1.1. Công nghệ enzym là gì?

a) Enzym là protein và chất xúc tác sinh học

Enzym, cũng giống như các protein khác, bao gồm các chuỗi axit amin dài được nối với nhau bằng liên kết peptit. Chúng có mặt trong tế bào sống, thực hiện chức năng điều hòa các quá trình trao đổi chất, chuyển hóa chất dinh dưỡng thành năng lượng và tế bào mới. Hơn nữa, enzym còn tham gia vào việc phân cắt thức ăn thành các hợp chất đơn giản hơn. Ví dụ, enzym được tìm thấy trong đường tiêu hoá như pepsin, trypsin và peptidaza phân cắt protein thành axit amin, lipaza tách mỡ thành glycerol và axit béo và amylaza phân cắt tinh bột thành đường đơn giản.

Enzym là chất xúc tác sinh học, với hàm lượng thấp, thúc đẩy quá trình phản ứng nếu không phản ứng sẽ diễn ra rất chậm. Sau khi phản ứng kết thúc, enzym lại được giải phóng, sẵn sàng xúc tác cho phản ứng khác. Về nguyên tắc, nó có thể thực hiện xúc tác mãi mãi, nhưng trong thực tế, hầu hết các chất xúc tác có sự bền vững giới hạn và qua thời kỳ đó hoạt tính bị mất và không có khả năng phục hồi lại được. Nói chung, hầu hết các enzym không chỉ sử dụng một lần và bị loại bỏ sau khi chúng đã hoàn thành nhiệm vụ.

b) Enzym là chất xúc tác đặc hiệu và thực hiện điều kiện thường

Enzym là xúc tác rất đặc hiệu so với các chất xúc tác vô cơ như các chất axit, bazơ, kim loại và oxit kim loại. Enzym có thể phân cắt các hợp chất riêng biệt. Trong một số trường hợp, tác động của chúng được giới hạn đối với các liên kết đặc hiệu trong hợp chất mà nó phản ứng. Một hay nhiều phân tử mà một enzym [E] tác động được hiểu là cơ chất [S], chúng được chuyển hóa thành một hay nhiều sản phẩm [P]. Một phân tử của phân tử enzym sẽ liên kết thuận nghịch với cơ chất và sau đó phân hoạt động của enzym sẽ xúc tác làm cho cơ chất thay đổi đặc hiệu thành sản phẩm mong muốn. Các nhóm enzym khác nhau xúc tác cho mỗi loại phản ứng trong tế bào và chúng

được chia thành 6 nhóm lớn: Thuỷ phân, oxy hoá khử, tổng hợp, chuyển hoá, phân giải và đồng hoá. Sử dụng enzym trong các quá trình sản xuất công nghiệp cho phép tạo năng suất chuyển hoá cao hơn và ít các sản phẩm phụ không mong muốn.

Enzym có thể hoạt động tốt ở áp suất và điều kiện thường, nhưng phải lưu tâm đến nhiệt độ và pH của phản ứng. Phân lớn enzym hoạt động tối thích ở 30–70°C và pH trung tính. Tuy nhiên, hiện nay người ta đã phát triển các enzym đặc biệt có khả năng hoạt động được ở nhiệt độ và pH cao hơn hoặc thấp hơn cho việc ứng dụng đặc hiệu trong sản xuất.

Ưu điểm của các phương pháp sản xuất bằng enzym là tiết kiệm năng lượng, hạn chế đầu tư các thiết bị chịu nhiệt, chịu áp suất và chống ăn mòn. Do enzym có hiệu quả cao, tác động đặc hiệu, điều kiện làm việc nhẹ nhàng và có khả năng bị phân huỷ sinh học cho nên chúng rất phù hợp cho việc ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp.

c) *Enzym là một phần của môi trường bền vững*

Như đã đề cập ở trên, enzym có mặt trong tất cả các hệ thống sinh học, chúng bắt nguồn từ các hệ thống sinh học trong tự nhiên và khi bị phân giải thành axit amin dễ dàng được các hệ thống sinh học hấp thụ lại. Nghĩa là, enzym chỉ hoạt động trên các nguyên liệu sinh khối thô và có thể phục hồi lại trong chu trình trao đổi chất trong tự nhiên. Một số lĩnh vực tiêu biểu trong sản xuất công nghiệp như chế biến hoa quả, ngũ cốc, sữa, các chất béo, thịt, bông, da và gỗ, có sử dụng các chế phẩm enzym trong quá trình sản xuất đã tạo ra các sản phẩm hữu dụng, còn chất thải của hầu hết các phản ứng enzym là không độc và dễ dàng bị phân giải. Tóm lại, enzym được ứng dụng trong sản xuất công nghiệp là phương thức sản xuất vừa an toàn, vừa bảo vệ được môi trường sinh thái.

d) *Enzym và ứng dụng công nghiệp*

Phân lớn các enzym công nghiệp được sản xuất từ vi sinh vật sống trong tự nhiên, chúng thường là các chủng vi khuẩn, nấm sợi hoặc nấm men, một vi sinh vật có thể có trên 1.000 enzym khác nhau. Một chủng vi sinh vật tốt phân lập từ tự nhiên, được sử dụng để sản xuất một loại enzym có thể dùng trong công nghiệp, phải trải qua một thời gian dài thử nghiệm trong các phòng thí nghiệm trước khi đưa vào sản xuất. Khi đã tìm thấy chủng vi sinh vật mong muốn, thì chủng đó phải được cải biến để có khả năng sản sinh enzym có hiệu suất cao. Sau đó vi sinh vật được cho lên men trên khay hoặc

trong các bình lén men lớn để sản xuất enzym mong muốn. Với sự tiến bộ của công nghệ sinh học, các chế phẩm enzym được sản xuất bảo đảm hiệu suất kinh tế cao và với số lượng hầu như không hạn chế.

Sản phẩm cuối của lén men sản xuất enzym là dịch nuôi từ đó tách chiết enzym. Sau đó, dịch lén men nhận được được ly tâm hoặc lọc để loại bỏ tất cả các chất rắn. Do sinh khối hay chất thải có chứa xác vi sinh vật và các nguyên liệu thô có thể là phân bón hữu cơ rất tốt. Sản phẩm enzym được ứng dụng vào nhiều lĩnh vực sản xuất công nghiệp.

8.1.2. Lịch sử phát triển công nghệ enzym

Lịch sử phát triển của công nghệ enzym hiện đại thực sự bắt đầu từ năm 1874, khi nhà hoá học Đan Mạch, Christian Hansen, người đầu tiên đã chiết xuất dịch dạ dày bò khô bằng dung dịch muối ăn, nó được xem là chế phẩm enzym đầu tiên có độ sạch tương đối cao sử dụng cho mục đích công nghiệp. Sự kiện có ý nghĩa này bắt nguồn từ sự tiến hoá lâu dài của tự nhiên mà enzym đã được con người sử dụng từ lâu trong muối rau quả bằng enzym hoặc sử dụng vi sinh vật cho nhiều mục đích khác nhau như trong quá trình lén men bia, làm bánh và lén men rượu. Do vậy, ta cũng nên hiểu, trong sản xuất phomat, từ xa xưa người ta cũng đã sử dụng enzym.

Mặc dù hoạt động của enzym đã được ghi nhận và các enzym đã được sử dụng thông qua lịch sử phát triển, gần đây người ta mới thật sự nhận ra được tầm quan trọng của chúng. Các quá trình enzym, cụ thể là lén men đã được tập trung nghiên cứu vào thế kỷ XIX và có nhiều phát minh có giá trị trong lĩnh vực này. Một thực nghiệm quan trọng của Payen và Persoz vào năm 1833 là tách chiết hỗn hợp enzym từ nước malt. Dịch chiết này cũng giống như chính dịch malt, chuyển hoá tinh bột thành đường maltozơ và trước kia có tên là “diastaza”.

Sự phát triển ngày càng mạnh mẽ ở những thập niên tiếp theo, cụ thể trong lĩnh vực lén men, những thành tựu của Schwann, Liebig, Pasteur và Kuhne là quan trọng nhất. Cuộc tranh luận giữa Liebig và Pasteur liên quan đến quá trình lén men đã gây nên cuộc tranh luận rất sôi nổi. Liebig quả quyết rằng, lén men là kết quả của quá trình hoá học và rằng nấm men là chất không tồn tại suốt trong quá trình phân giải. Ngược lại, Pasteur phản đối và cho rằng, việc lén men không thể thực hiện được trừ phi có cơ thể sống (nấm men) tồn tại trong đó. Cuộc tranh luận kết thúc vào năm 1897, khi anh em Buchner đã chứng minh rằng, dịch chiết của tế bào nấm men có thể chuyển hoá glucozơ thành etanol và cacbon dioxit cũng như tế bào nấm

men có trong đó. Nói cách khác, sự tranh cãi không chỉ khẳng định sự có mặt của tế bào nấm men mà chính là enzym có trong nấm men.

Năm 1876, William Kuhne đề xuất tên “enzym” như là một thuật ngữ mới bao hàm khái niệm hiểu trước đó là “men” (unorganised ferments) và cho rằng, men (enzym) được tách từ cơ thể sống mà ở đó hình thành chúng. Bản thân từ này cũng có nghĩa là “trong nấm men” (in yeast) mà theo tiếng Hy Lạp thì “en” có nghĩa “in” (bên trong), và “zyme” có nghĩa là “nấm men” (yeast hay leaven).

Ở Nhật cũng đã sớm phát triển công nghệ enzym: Trong những năm đầu của thế kỷ XX, công nghệ enzym phát triển chậm ở châu Âu, nhưng ở phía Đông, người ta đã sử dụng một loại nấm mốc có tên là koji (đến nay vẫn có tên như vậy) để sản xuất thực phẩm và gia vị dựa trên protein của đồ tương (shoyu, miso, tempeh) và đồ uống lên men (sakê, các loại rượu). Koji được làm từ gạo đồ xôi trộn với nấm mốc đem ủ, thành phần của hỗn hợp này được chuyển từ thế hệ này sang thế hệ khác. Cách làm này là cơ sở để nhà khoa học Nhật Bản, Okishi Takamine phát triển quá trình lên men sản xuất công nghiệp amylaza từ nấm mốc; quá trình này bao gồm việc nuôi nấm *Aspergillus oryzae* trên gạo ẩm (đồ xôi) và cám mỳ. Sản phẩm này có tên là “Takadiastaza” và hấy còn được sử dụng trợ giúp tiêu hoá. Phương pháp lên men do Takamine đề xuất là phương pháp “nuôi cấy bề mặt” hoặc “nuôi cấy bán rắn” hiện nay vẫn còn được sử dụng để sản xuất nhiều loại enzym.

Các chế phẩm enzym đã được ứng dụng vào nhiều lĩnh vực sản xuất công nghiệp:

– Công nghiệp dệt: Takamine đã phát triển kỹ thuật lên men mới để áp dụng cho lĩnh vực khác – tẩy hô vải. Trước đây, sợi vải được xử lý bằng axit, kiềm hoặc các tác nhân oxy hoá khác, hoặc ngâm trong nước nhiều ngày để các vi sinh vật có trong tự nhiên phân giải tinh bột. Tuy nhiên, tất cả các phương pháp trên khó kiểm soát được, đôi khi gây nguy hại hoặc làm bẩn nguyên liệu dệt. Vì vậy, nó được xem như là tiến bộ lớn khi sử dụng dịch chiết enzym thô từ malt và sau này từ tuy trong việc tạo nguyên liệu dệt. Ngay từ đầu năm 1917, lần đầu tiên Boidin và Effront đã tách chiết amylaza từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* để sử dụng cho mục đích này.

– Thuộc da: Trước chiến tranh Thế giới lần thứ nhất, điển hình là các nghiên cứu được thực hiện bởi nhà hoá học và công nghiệp người Đức Otto Rohm phát triển việc sử dụng enzym trong công nghiệp. Trong số các nghiên cứu của mình, ông đã nghiên cứu quá trình mà ông gọi là “ngâm làm

mềm” (bating), bước chuẩn bị da tươi hoặc bì trước khi đem đi thuộc. Theo truyền thống, ngâm mềm da đòi hỏi phải có phân chó và phân chim bồ câu, thực tế là nó không cải thiện hình ảnh thuộc da, vì nó tạo không dễ chịu. Lý luận của Rohm cho rằng, các loại phân này sử dụng có hiệu quả, vì chúng có một lượng dư thừa các enzym phân giải của động vật. Nếu như thế thì có thể sử dụng chất chiết xuất trực tiếp từ tuy để bổ sung vào quá trình ngâm và cho kết quả không như mong đợi. Tuy nhiên, Rohm cho rằng, lý thuyết của mình là đúng đắn, bởi thông qua thực nghiệm sau đó đã khẳng định, không phải enzym động vật có hoạt tính mà là do các enzym của vi sinh vật phát triển trong đường ruột của động vật có hoạt tính.

– Enzym bột giặt đầu tiên: Song song với các nghiên cứu của mình về vấn đề thuộc da, Rohm đã nghiên cứu các quá trình khác để chứng minh enzym có thể có giá trị hơn. Tuy nhiên, các nỗ lực của ông không đem lại thành công cho đến 50 năm sau đó. Rohm tích cực nghiên cứu phát triển phương pháp đầu tiên để loại bỏ protein bám trên vải trong bột giặt có chứa enzym và lần đầu tiên sản xuất các chế phẩm tẩy rửa có chứa enzym. Chế phẩm enzym được sử dụng là pancreatin (được chiết từ tuyến tuy) nó có chứa enzym trypsin phân giải. Việc phá vỡ các bế tắc này về enzym được thực hiện vào năm 1959, khi một nhà hoá học người Thuỵ Sĩ, TS Jaag đã phát triển một sản phẩm mới có tên Bio-40 có chứa enzym proteaza vi sinh vật thay thế trypsin.

– Sản xuất đường từ tinh bột: Một lĩnh vực rất quan trọng trong việc chứng minh enzym có giá trị to lớn trong suốt 15 đến 20 năm qua đó là công nghiệp tinh bột. Vào những năm 1950, amylaza nấm mốc đã sử dụng trong sản xuất một loại nước ngọt đặc biệt, nghĩa là nó có chứa các loại đường mà không phải sản xuất bằng phương pháp thuỷ phân bằng axit như thường thấy. Quan điểm này thực sự được lưu tâm vào đầu những năm 1960, khi lần đầu tiên người ta đưa ra một loại enzym glucoamylaza có thể phân giải hoàn toàn tinh bột thành glucozơ. Chỉ trong vài năm, hầu hết các cơ sở sản xuất glucozơ đã sử dụng enzym để thuỷ phân thay vì dùng axit, enzym có nhiều ưu điểm hơn như hiệu suất lớn hơn, độ tinh khiết cao hơn và kết tinh dễ hơn. Quá trình này được cải tiến tiếp bằng các kỹ thuật mới sử dụng để xử lý trước bằng enzym (hồ hoá) tinh bột bằng cách sử dụng α -amylaza chịu nhiệt.

Trải qua nhiều năm nghiên cứu sinh hoá học và công nghệ sinh học để sản xuất enzym công nghiệp, người ta cũng đã phát triển nhiều kỹ thuật mới để biến tính và nâng cao hiệu suất của enzym, các kỹ thuật tinh sạch enzym

cũng như những ứng dụng enzym trong y học, trong nghiên cứu khoa học và trong công nghiệp.

Tóm lại, enzym là protein xúc tác sinh học, do tế bào sống sản xuất ra, có tác dụng tăng tốc độ và hiệu suất phản ứng hoá sinh, mà sau phản ứng vẫn còn giữ nguyên khả năng xúc tác.

Mục tiêu của công nghệ enzym hiện đại tập trung vào một số hướng sau: (1) Sử dụng enzym kỹ thuật trong công nghệ bảo quản sau thu hoạch nông sản thực phẩm, đặc biệt là việc bảo quản không để các thành phần quý như vitamin bị phân huỷ; (2) Sử dụng có hiệu quả nguyên liệu và gia tăng chất lượng cũng như mùi vị thực phẩm nhờ công nghệ enzym; (3) Sử dụng enzym trong công nghệ chế biến thực phẩm nhằm mục đích giảm giá thành sản xuất, trong đó một phần đáng kể, là giảm năng lượng tiêu hao trong sản xuất; và (4) Sử dụng enzym kỹ thuật để mở rộng chủng loại thực phẩm phục vụ yêu cầu ngày càng đa dạng của cuộc sống.

Các phương pháp enzym, kể cả những công nghệ mới sử dụng enzym và thậm chí cả công nghệ sử dụng tế bào vi sinh vật cố định đang có xu thế thay thế một số phương pháp hoá học truyền thống. Trước mắt công nghệ enzym hiện đại sẽ tập trung phát triển các hướng ứng dụng sau: (1) Phản ứng tạo các polyme đặc hiệu; (2) Tổng hợp axit amin và kháng sinh; (3) Tái sử dụng phế thải thực phẩm trong xử lý phế thải; (4) Sản xuất các chất ngọt thay thế đường, ví dụ như aspartame; (5) Sử dụng enzym trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa; (6) Sản xuất các enzym tái tổ hợp bằng lêmen vi sinh vật chuyển gen (ví dụ enzym rennin tái tổ hợp).

8.1.3. Enzym-chất xúc tác sinh học

a) Tính đặc hiệu của enzym

Enzym là nhóm protein chuyên biệt hoá cao có vai trò và chức năng sinh học quan trọng bậc nhất đối với tế bào và cơ thể sống là chất xúc tác sinh học có khả năng xúc tác với độ đặc hiệu cơ chất tuyệt vời. Chúng xúc tác đặc hiệu các phản ứng hoá học ở điều kiện sống bình thường mà các chất xúc tác hoá học khác không thể thực hiện nổi. Enzym tham gia xúc tác tất cả các phản ứng biến đổi trong tế bào và cơ thể sống, trong đó khá nhiều enzym đóng vai trò điều hoà làm nhạc trưởng điều khiển sự phối hợp nhịp nhàng các phản ứng trong quá trình trao đổi chất.

Sự hiểu biết về enzym có ý nghĩa thực tiễn rất lớn. Rất nhiều dạng bệnh lý liên quan trực tiếp đến sự vắng mặt hoặc xáo trộn hoạt động của enzym.

Ngoài ra, càng ngày enzym càng được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán bệnh y học, trong công nghiệp hoá học, trong công nghiệp vi sinh vật, trong chế biến thực phẩm và sản xuất nông nghiệp.

Ngoài nhóm nhỏ phân tử ARN có hoạt tính xúc tác, tuyệt đại đa số enzym có bản chất là protein và sự thể hiện hoạt tính xúc tác phụ thuộc vào cấu trúc bậc 1, 2, 3 và 4 của phân tử và trạng thái tự nhiên của nó. Enzym có khối lượng phân tử thay đổi rất rộng từ 12.000 Da đến hàng vài trăm nghìn Da. Một số enzym thể hiện hoạt tính xúc tác không cần sự có mặt của các tác nhân khác ngoài phân tử protein. Số khác ngược lại, ngoài phân tử protein cần sự phối hợp tác động của ion kim loại như Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} hoặc Zn^{+2} đóng vai trò làm tác nhân đồng tác động (cofactor) hoặc cần sự có mặt và phối hợp hành động của các phức hữu cơ hoặc phức hữu cơ – kim loại làm tác nhân đồng enzym (coenzym). Nhóm enzym thứ ba lại cần sự có mặt cùng lúc của cả hai tác nhân trên để thể hiện hoạt tính xúc tác của mình. Người ta gọi riêng phần protein của enzym là apoenzym hay apoprotein, còn các đồng tác nhân gọi là nhóm prosthetic (prosthetic group) và phức chứa cả 2 đồng tác nhân được gọi là holoenzym. Cần lưu ý đặc biệt đến chức năng của coenzym vì nó chịu trách nhiệm vận chuyển các nhóm chức năng đặc hiệu và trong thực tế rất nhiều vitamin đóng vai trò này.

b) *Enzym được phân loại theo nhóm phản ứng xúc tác*

Rất nhiều enzym được đặt tên bằng cách thêm đuôi -aza vào tên gọi cơ chất hoặc tên gọi mô tả quá trình xúc tác của nó, ví dụ ureaza là enzym thuỷ giải urea. Một số enzym khác như pepsin, trypsin,... lại không gọi theo tên cơ chất, mà vẫn gọi theo tên truyền thống.

Trong thực tế cũng có một số enzym được gọi theo một số tên gọi khác nhau và ngược lại, hai enzym khác nhau lại có thể được gọi cùng một tên. Do có những trường hợp không nhất quán như trên, càng ngày số lượng enzym mới được phát hiện càng nhiều và để thống nhất tên gọi enzym, người ta đã xây dựng hệ thống phân loại enzym quốc tế. Trong hệ thống phân loại này, tất cả enzym được phân chia thành 6 lớp lớn (bảng 8.1), mỗi lớp lớn có những lớp phụ được phân biệt khác nhau theo kiểu phản ứng mà chúng xúc tác theo Hiệp hội các nhà sinh hoá quốc tế (IUB).

Theo nguyên tắc này, mỗi enzym có một số duy nhất. Hệ thống IUB cũng định rõ tên nguyên bản cho mỗi enzym. Tên enzym bao gồm tên cơ chất, tên sản phẩm và nhóm chức năng của enzym. Vì quá nhiều enzym, như alcohol dehydrogenaza, được hiểu theo nghĩa rộng trong cộng đồng các nhà

khoa học bởi các tên thông thường của chúng, sự thay đổi theo danh pháp IUB rất chậm. Chính vì vậy, sử dụng tên phân lớn các enzym vẫn được gọi theo tên thông thường của chúng.

Mỗi enzym trong hệ thống được phân loại và đặt tên theo mã 4 chữ số biểu thị phản ứng xúc tác. Ví dụ, enzym xúc tác phản ứng: ATP + D-Glucozơ → ADP + D-Glucozơ-6-phosphate có tên gọi là glucozơ-phosphate-transferaza, biểu thị phản ứng chuyển nhóm phosphate từ ATP tới glucozơ có mã số phân loại E.C number (enzym classification number) là 2.7.1.1. Trong đó mã số 2 biểu thị tên lớp enzym là transferaza, mã số 7 biểu thị lớp phụ phosphate-transferaza, mã số 1 biểu thị nhóm -OH, là nhóm nhận gốc phosphate và mã số 1 cuối cùng biểu thị D-glucozơ, là chất nhận gốc phosphate. Thường tên hệ thống dài và khó gọi, nên các tên gọi truyền thống vẫn được sử dụng phổ biến, ví dụ enzym xúc tác phản ứng trên có tên gọi ngắn gọn và dễ nhớ là hexokinase.

BẢNG 8.1. BẢNG PHÂN LOẠI CÁC NHÓM ENZYM VÀ TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA CHÚNG

Thứ tự	Các loại enzym	Tính chất sinh hoá
1	Oxidoreductaza (óxy hoá khử)	Tác động lên nhiều nhóm hoá học nhằm thêm vào hay bớt đi nguyên tử hydro. $A^- + B \leftrightarrow A + B^-$
2	Transferaza (chuyển hoá)	Chuyển hoá các nhóm chức năng giữa các phân tử cho và nhận. Kinaza là enzym transferaza đặc hiệu điều hoà quá trình trao đổi chất bằng cách chuyển phosphate từ ATP đến các phân tử khác. $A_B + C \leftrightarrow A + B_C$
3	Hydrolaza (thuỷ phân)	Gắn thêm phân tử nước vào một liên kết, thuỷ phân nó. $A_B + H_2O \leftrightarrow A_H + B_OH$
4	Lyaza	Gắn phân tử nước, amon hoặc dioxit cacbon vào đôi liên kết hoặc loại bỏ các nguyên tố này để sản sinh đôi liên kết. $AX-BY \leftrightarrow A = B + X-Y$
5	Isomeraza	Thực hiện nhiều loại đồng phân hoá; Đạng L sang dạng D, các phản ứng biến đổi (sự thay đổi vị trí các nhóm hoá học) và các thay đổi khác. $AX-BY \leftrightarrow AY-BX$
6	Ligaza	Xúc tác các phản ứng trong đó 2 nhóm hoá học được liên kết (nối lại) có sử dụng năng lượng từ ATP. Tạo liên kết C-C, C-S, C-O và C-N

Enzym cũng còn được phân loại dựa trên thành phần cấu tạo. Các enzym chỉ có phân protein được hiểu là enzym đơn thuần, ngược lại, với enzym phức hợp bao gồm phân protein cộng với một phân tử hữu cơ tương đối nhỏ. Enzym phức hợp được hiểu là holoenzym. Trong thuật ngữ này, thành phần protein được hiểu là apoenzym, trong khi đó phân còn lại không phải protein được hiểu là coenzym hoặc nhóm tiền chất mà nhóm này trong phức hợp enzym, các phân tử hữu cơ nhỏ liên kết với apoenzym bằng liên kết đồng hoá trị; còn khi liên kết giữa apoenzym và các thành phần không phải là protein không phải là liên kết đồng hoá trị thì các phân tử hữu cơ nhỏ này được gọi là coenzym.

Các thành phần không phải là protein của một enzym có thể đơn giản như ion kim loại hoặc phức tạp như một phân tử hữu cơ nhỏ không phải là protein. Các enzym đòi hỏi có ion kim loại trong thành phần của nó được hiểu là enzym kim loại (metallo-enzym) nếu chúng liên kết và giữ lại các nguyên tố kim loại ái lực rất cao. Còn đối với các enzym có ái lực thấp hơn đối với ion kim loại, nhưng vẫn đòi hỏi phải có ion kim loại mới hoạt động thì được gọi là enzym được hoạt hoá kim loại (metal-activated enzymes).

c) *Enzym xúc tác như thế nào?*

– Hoạt động của enzym liên quan tới cơ chất:

+ Mặc dù enzym có tính đặc hiệu cao cho loại phản ứng mà nó xúc tác, như vậy không phải lúc nào cũng đúng cơ chất mà nó tác động.

+ Enzym cũng có tính đặc hiệu với hình dạng không gian (đồng phân quang học) của cơ chất (các enzym tác động lên đường dạng D sẽ không tác động lên đồng phân quang học tương ứng dạng L).

+ Enzym có phổ tác động đặc hiệu cơ chất rộng hơn hoặc hẹp hơn, nghĩa là một cơ chất đã cho có thể được tác động bởi nhiều enzym khác nhau, mà mỗi loại sử dụng cùng một hay nhiều cơ chất và sản sinh cùng một hay nhiều sản phẩm.

– Sự tương quan giữa enzym và cơ chất ($E-S$):

Mô hình tương quan enzym–cơ chất là mô hình phù hợp nhất, vì sự tương tác ban đầu giữa enzym và cơ chất tương đối yếu, nhưng nhanh chóng cảm ứng là thay đổi cấu tạo trong enzym, tăng cường liên kết và mang các trung tâm xúc tác đến gần cơ chất làm cho liên kết bị thay đổi. Các cơ chế xúc tác có thể tồn tại như sau:

+ Xúc tác làm căng trạng thái liên kết: Trong dạng xúc tác này, sự sắp xếp lại cấu trúc gây nên, nó làm thay đổi liên kết cơ chất và enzym, cuối cùng các liên kết của cơ chất bị kéo giãn làm dễ dàng chuyển trạng thái. Hình thể mới thường tác động các nguyên tử của cơ chất và các nhóm xúc tác lớn, ví như aspartat và glutamat, thành hình thể mới, làm căng sự tồn tại của các liên kết của cơ chất.

+ Xúc tác nhờ sự gần gũi và định hướng: Liên kết enzym–cơ chất hướng các nhóm phản ứng và mang chúng đến gần các nhóm khác. Công thêm sức căng, các nhóm như aspartat thường xuyên phản ứng hoá học tốt, chúng tiến gần và hướng đến cơ chất, bằng cách đó kích thích sự tham gia của chúng vào quá trình xúc tác.

+ Xúc tác liên quan đến chất cho (axit) và chất nhận (base) proton: Các cơ chế khác cũng đóng góp có ý nghĩa đến sự hoàn thành của tác nhân xúc tác được khởi đầu bằng cơ chế kéo căng, ví dụ sử dụng glutamat như là chất xúc tác axit phổ biến (chất cho proton).

+ Xúc tác đồng hoá trị: Trong xúc tác mà nó thế chỗ bằng cơ chế đồng hoá trị, cơ chất được hướng đến vị trí hoạt động trên enzym như là cách mà một chất trung gian đồng hoá trị hình thành giữa enzym hoặc coenzym và cơ chất. Một ví dụ nổi tiếng nhất của cơ chế này là sự phân giải protein bằng enzym serin proteaza, bao gồm cả enzym tiêu hoá (trypsin, chymo-trypsin và elastaza) và hàng loạt enzym đồng máu (blood clotting cascade). Các enzym proteaza có một vị trí hoạt động serin mà ở đó nhóm R-hydroxyl hình thành một liên kết đồng hoá trị với nhóm hydroxyl cacbon của liên kết peptit, do đó gây nên sự thuỷ phân liên kết peptit.

Về mặt lý thuyết, tốc độ phản ứng hoá học được xác định bởi giá trị năng lượng hoạt hoá, tức là mức năng lượng các chất tham gia phản ứng phải đạt được để cắt đứt các liên kết cần thiết và hình thành các liên kết mới. Năng lượng hoạt hoá càng lớn thì tốc độ phản ứng càng chậm và ngược lại.

Chất có tác dụng thúc đẩy tốc độ phản ứng hoá học được gọi là chất xúc tác, nó làm giảm năng lượng hoạt hoá phản ứng. Ví dụ, bột platin là một xúc tác hoá học được sử dụng rộng rãi, các chất khi tham gia phản ứng trên bề mặt platin đều được chuyển sang trạng thái có khả năng phản ứng cao hơn. Do vậy năng lượng hoạt hoá sẽ nhỏ hơn và tốc độ phản ứng sẽ cao hơn.

Nói một cách khác, chất xúc tác làm giảm năng lượng hoạt hoá của phản ứng hoá học, nó chỉ tham gia vào các giai đoạn trung gian, mà không tham gia trực tiếp vào phản ứng. Sau phản ứng, chất xúc tác lại phục hồi về trạng thái ban đầu để tiếp tục vòng phản ứng xúc tác mới.

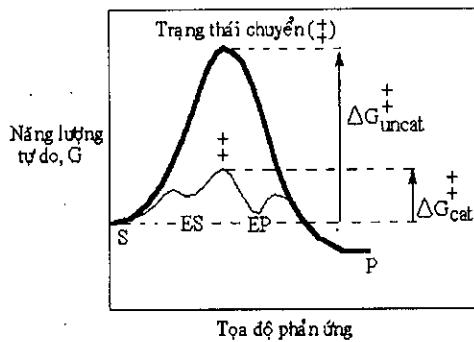
Hầu như tất cả các biến đổi sinh hoá trong tế bào và cơ thể sống đều được xúc tác bởi enzym ở pH trung tính, nhiệt độ và áp suất bình thường. Vậy, tại sao enzym lại có khả năng xúc tác ở điều kiện bình thường, trong khi các chất xúc tác hóa học khác lại chỉ xúc tác ở nhiệt độ và áp suất cao? Theo quan điểm chung, sở dĩ enzym có khả năng xúc tác tuyệt vời như trên vì tạo được thế năng đặc biệt có lợi nhất về mặt năng lượng để thực hiện phản ứng. Thế năng đặc biệt trên được tạo bởi tâm hoạt động (active site) liên kết với cơ chất mà nó xúc tác (substrate) tạo ra phức enzym – cơ chất. Trước khi đi sâu vào xem xét động học của quá trình xúc tác, cần làm quen với một số khái niệm chính của quá trình này.

* Enzym ảnh hưởng tới tốc độ phản ứng, không ảnh hưởng tới cân bằng phản ứng:

Bất kỳ enzym nào cũng xúc tác phản ứng theo trình tự như sau:



E– enzym, S– cơ chất, P– sản phẩm phản ứng (product), ES và EP là phức enzym với cơ chất và sản phẩm. Để hiểu được bản chất của sự xúc tác, cần phân biệt sự khác nhau giữa khái niệm cân bằng phản ứng và tốc độ phản ứng. Bất kỳ phản ứng biến đổi $S \leftrightarrow P$ này cũng có thể diễn đạt theo sự thay đổi năng lượng phản ứng, mà trong các hệ sinh học nó thường được diễn đạt theo thay đổi năng lượng tự do G. Trong sơ đồ biến đổi năng lượng phản ứng $S \leftrightarrow P$, trục tung biểu thị G, còn trục hoành– diễn tiến phản ứng. Bất kỳ chất nào, dù là S hay P đều có năng lượng tự do nền. Người ta sử dụng đại lượng thay đổi năng lượng tự do chuẩn ΔG° (standard free energy) để mô tả sự thay đổi năng lượng tự do của phản ứng ở nhiệt độ chuẩn 298°K với áp suất là 1atm hoặc 101,3kPa và nồng độ chất là 1M. Do phản ứng sinh học thường diễn ra giữa các chất có nồng độ nhỏ hơn rất nhiều so với 1M và ở pH 7,0, nên thay vì ΔG° người ta sử dụng $\Delta G'$ biểu thị thay đổi năng lượng tự do ở pH 7,0 để tính toán động học của các quá trình biến đổi sinh học.



Hình 8.1. So sánh tọa độ phản ứng của phản ứng được và không được xúc tác

Sự cân bằng giữa S và P phản ánh sự khác biệt mức năng lượng nền (ground state) của chúng. Trong trường hợp P có mức năng lượng nền tự do thấp hơn S có nghĩa ΔG° của phản ứng là (-) thì phản ứng có xu thế hướng về phía tạo P và không chịu ảnh hưởng bởi sự xúc tác. Sự cân bằng có lợi hướng về phía tạo P không có nghĩa là quá trình biến đổi S thành P dễ dàng xảy ra, vì tốc độ phản ứng còn phụ thuộc vào các thông số khác. Giữa cơ chất tham gia phản ứng và sản phẩm tạo ra tồn tại rào cản năng lượng gọi là trạng thái chuyển (transition state). Trạng thái này không biểu thị sản phẩm trung gian nào, mà chỉ là thời điểm xảy ra sự biến đổi cơ bản biến S thành P. Độ chênh lệch giữa mức năng lượng nền và trạng thái chuyển gọi là năng lượng hoạt hoá ΔG^* . Năng lượng hoạt hoá càng cao, tốc độ phản ứng càng thấp, và ngược lại. Do đó, tốc độ phản ứng gia tăng khi nhiệt độ, áp suất và nồng độ cơ chất tham gia phản ứng gia tăng,...

Vì các yếu tố này làm gia tăng chuyển động hỗn loạn của các chất tham gia phản ứng và số lượng các phân tử được kích thích vượt qua rào cản năng lượng, đồng nghĩa với sự gia tăng tốc độ phản ứng.

Mặt khác, có thể gia tăng tốc độ phản ứng bằng cách bổ sung chất xúc tác làm giảm mức năng lượng hoạt hoá, có nghĩa là chất xúc tác làm tăng tốc độ phản ứng bằng cách làm giảm mức năng lượng hoạt hoá. (Chú ý ES và EP là những trạng thái trung gian trong quá trình biến đổi S thành P). Do vậy, trong những trạng thái trung gian nói trên, trạng thái nào có mức năng lượng hoạt hoá cao nhất, thì nó sẽ là bước giới hạn tốc độ của phản ứng (rate-limiting step).

* Enzym có cường độ xúc tác đặc hiệu cao:

Enzym là chất xúc tác tuyệt vời có tốc độ xúc tác rất lớn cỡ 10^7 – 10^{14} với độ đặc hiệu rất cao. Vậy, những nguyên nhân nào cho phép nó có những đặc tính trên?

Thứ nhất, enzym có khả năng xúc tác rất cao là nhờ năng lượng tự do, còn gọi là năng lượng liên kết (binding energy) giải phóng trong quá trình hình thành các liên kết yếu trong tương tác qua lại giữa enzym và cơ chất. Enzym thường sử dụng năng lượng liên kết để làm giảm năng lượng hoạt hoá. Ngay từ thế kỷ thứ XIX (1894), Fisher đã đưa ra giả thuyết về sự hỗ trợ khăng khít như chìa và ổ khoá giữa enzym và cơ chất cho phép giải thích khả năng xúc tác tuyệt diệu của enzym. Tuy nhiên, không thể hoàn toàn dựa vào mô hình này để giải thích cơ chế hoạt động của enzym, vì trong thực tế,

nhiều khi sự bổ trợ quá khăng khít lại là nguyên nhân cản trở diễn tiến của phản ứng.

Thứ hai, enzym sử dụng năng lượng liên kết tạo phản ứng xúc tác đặc hiệu thông qua một số cơ chế sau:

- Làm giảm entropy, vì bản thân enzym và cơ chất luôn ở trạng thái chuyển động trong môi trường dịch lỏng. Do vậy, enzym rất khó định hướng tác động lên cơ chất nếu như không có năng lượng liên kết giúp giữ và định hướng phản ứng. Các nghiên cứu cho thấy năng lượng liên kết cho phép tăng tốc độ phản ứng đến mức tương đương tốc độ phản ứng khi nồng độ cơ chất đạt tới 10^8 M.

- Làm mất vỏ nước bao quanh cơ chất (desolvation), vì tương tác enzym – cơ chất có khả năng thay thế hầu như toàn bộ liên kết hydrogen tồn tại giữa cơ chất và nước bao quanh.

- Năng lượng liên kết do các tương tác yếu tạo ra ở trạng thái chuyển được sử dụng làm căng hoặc uốn gập khúc cơ chất, tạo điều kiện cho enzym xúc tác phản ứng dễ dàng.

- Năng lượng liên kết làm cấu hình không gian của phân tử enzym thay đổi phù hợp với hình dạng cơ chất tạo ra khớp cảm ứng (induced fit) cho phép phản ứng xảy ra dễ dàng. Cơ chế tạo khớp cảm ứng do Koshland đưa ra vào 1958.

– Xúc tác thông qua các nhóm xúc tác đặc hiệu:

Trong phân tích trình bày nguyên nhân dẫn đến sự hình thành phức ES có lợi nhất về mặt động học cho việc thực hiện phản ứng. Vậy bước tiếp theo sau khi phức ES được tạo thành sẽ xảy ra như thế nào? Theo quan điểm chung, lúc này các nhóm chức năng nằm ở những vị trí đặc biệt trong phức trên sẽ phát huy tác động của mình theo một số cơ chế. Phổ biến nhất là cơ chế xúc tác axit–bazo và cơ chế xúc tác hoá trị. Chúng khác cơ chế xúc tác dựa trên năng lượng liên kết, vì trong những cơ chế này có sự xuất hiện liên kết hoá trị của enzym với cơ chất và có sự chuyển nhóm chức năng qua lại giữa enzym và cơ chất.

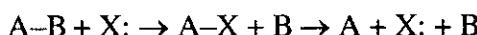
+ Cơ chế xúc tác axit–bazo:

Thông thường trong các phản ứng sinh hoá luôn có sự hình thành các chất trung gian mang điện không bền, dễ dàng bị phân rã trở lại trạng thái ban đầu. Tuy nhiên, chúng có thể được ổn định (chủ yếu khi được xúc tác) nhờ

sự trao đổi proton với sự tham gia của H^+ , H_3O^+ và OH^- trong môi trường nước. Trường hợp này gọi là xúc tác axit–bazơ riêng, khác với xúc tác axit–bazơ chung là trong môi trường phản ứng, ngoài nước còn có các chất cho và nhận proton khác. Một số axit amin tham gia tâm xúc tác enzym như Glu, Asp, Lys, Arg, Cys, His và Tyr đóng vai trò làm chất cho (ở dạng axit) hoặc nhận proton (ở dạng bazơ).

+ Xúc tác thông qua tạo liên kết hoá trị tạm thời :

Liên kết này tồn tại trong khoảng thời gian rất ngắn giữa cơ chất và enzym. Ví dụ, trong phản ứng thuỷ giải liên kết giữa A và B: $\text{A}-\text{B} \rightarrow \text{A} + \text{B}$, khi có một chất xúc tác tạo liên kết hoá trị (enzym chứa nhóm ưa nhâ – nucleophilic X), phản ứng xảy ra như sau:

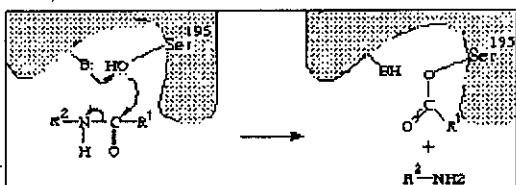


Sự hình thành liên kết hoá trị tạm thời giữa enzym và cơ chất sẽ hoạt hoá phản ứng rất mạnh. Nhiều gốc axit amin và cofactor của enzym đóng vai trò làm nhóm ưa nhâ.

+ Xúc tác thông qua ion kim loại:

Trong rất nhiều trường hợp giữa enzym chứa kim loại và cơ chất có tương tác giúp định hướng cơ chất vào tâm phản ứng hoặc giúp ổn định trạng thái chuyển.

Ngoài ra, ion kim loại còn tham gia phản ứng oxy hoá khử. Theo tính toán, có đến 1/3 số enzym cần sự trợ giúp của ion kim loại để thể hiện hoạt tính sinh học của mình. Tuy nhiên, trong thực tế hoạt tính xúc tác của enzym thường là sự kết hợp và bổ sung lẫn nhau của những cơ chế vừa trình bày. Ví dụ rõ nét nhất là enzym chymotrypsin xúc tác phản ứng thuỷ giải liên kết peptit thông qua cả cơ chế xúc tác tạo liên kết hoá trị giữa gốc Ser của enzym ở vị trí 195 (Ser^{195}) và tương tác này được khuếch đại theo cơ chế xúc tác axit–bazơ nhờ gốc His ở vị trí 57 (His^{157}).



Hình 8.2. Cơ chế xúc tác chymotrypsin

8.1.4. Phương trình động học Michaelis–Menten

Lần đầu tiên, vào năm 1913, Michaelis và Menten đã đưa ra mô hình động học giải thích phản ứng enzym và lập phương trình phản ánh mối quan

hệ giữa vận tốc phản ứng với nồng độ cơ chất (S) và enzym (E). Điểm quan trọng nhất của mô hình này là có sự tạo phức ES trước khi phản ứng xúc tác xảy ra giữa enzym và cơ chất. Phức này sau đó sẽ biến đổi tiếp tạo ra sản phẩm phản ứng và giải phóng enzym để tiếp tục vòng phản ứng xúc tác mới. Trong phản ứng bậc 1 (chỉ có một cơ chất) phản ứng có dạng thu gọn sau:



k_1 , k_2 và k_3 là các hằng số vận tốc các phản ứng tương ứng v_1 , v_2 và v_3 .

Ở đây, không tính k_4 là hằng số tốc độ phản ứng tạo phức ES từ P và E, vì nó không đáng kể. Do đó, vận tốc chuyển hóa phức ES thành sản phẩm P và enzym E là $V_o = k_3[ES]$ sẽ quyết định phản ứng chuyển đổi $S \rightarrow P$. Trong thực tế, vận tốc này phụ thuộc vào nồng độ ES, nồng độ ES càng cao, vận tốc phản ứng càng lớn. Ký hiệu $[E_o]$ là nồng độ enzym ban đầu, $[ES]$ – phức enzym–cơ chất, $[E]$ – nồng độ enzym tự do khi phản ứng đạt điểm cân bằng. Ta có: $[E] = [E_o] - [ES]$, coi $[S]$ là nồng độ cơ chất ban đầu và cũng được xem là nồng độ cơ chất ở trạng thái cân bằng của phản ứng. Vì trong thực tế, nồng độ cơ chất luôn lớn gấp nhiều lần so với enzym. Hơn nữa, trong nghiên cứu động học, người ta thường chỉ quan tâm xác định tốc độ ban đầu, khi lượng cơ chất bị chuyển hóa chưa đáng kể so với nồng độ ban đầu của nó. Từ phương trình phản ứng trên ta có:

- Vận tốc phản ứng tạo phức ES là: $k_1([E_o] - [ES])[S]$
- Vận tốc phân ly phức ES là tổng của 2 phản ứng: ES phân ly thành E và S với hằng số vận tốc k_2 và ES phân ly thành P và E với hằng số vận tốc k_3 . Do đó vận tốc phân ly phức ES là $(k_2 + k_3)[ES]$. Khi hệ thống phản ứng đạt cân bằng, nghĩa là vận tốc tạo thành ES bằng vận tốc phân ly của nó, ta có:

$$k_1([E_o] - [ES])[S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (8.2)$$

Thay $[ES]$ vào biểu thức $V_o = k_3[ES]$ ở trên, ta có $V_o = k_3[E_o][S]/K_m + [S]$ và thay hằng số $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ vào nhận được:

$$[ES] = [E_o][S]/[S] + K_m \quad (8.3)$$

Như trên đã đề cập, ES càng lớn thì vận tốc phản ứng càng lớn. Do vậy, khi nồng độ cơ chất đủ lớn để tất cả các phân tử enzym tham gia phản ứng đều tạo phức với S, ta có $[ES] = [E_o]$ thì theo lý thuyết, phản ứng sẽ đạt vận tốc cực đại $V_{max} = k_3[E_o]$ và có thể thiết lập tỷ lệ sau:

$$V_o = V_{max}[S]/K_m + [S] \quad (8.4)$$

Đây chính là phương trình Michaelis–Menten phản ánh tương quan định lượng giữa tốc độ ban đầu của phản ứng V_o , tốc độ V_{max} , nồng độ cơ chất $[S]$ và hằng số K_m (được gọi là hằng số Michealis). Dựa vào phương trình này người ta dựng được đồ thị hyperbol phản ánh ảnh hưởng nồng độ cơ chất đến vận tốc phản ứng.

Ý nghĩa của V_{max} và K_m

Khi $V_o = 1/2 V_{max}$ ta có: $V_{max}/2 = V_{max} [S]/K_m + [S]$, chia hai vế cho V_{max} ta có: $1/2 = [S]/K_m + [S]$, biến đổi tiếp ta được: $K_m + [S] = 2[S]$, hay $K_m = [S]$, khi $V_o = 1/2 V_{max}$. Do vậy, K_m có giá trị bằng nồng độ tính theo mol của cơ chất ở thời điểm tốc độ phản ứng ban đầu do enzym xúc tác V_o bằng $1/2 V_{max}$. Trong thực tế, để dễ dàng xác định K_m và V_{max} người ta lấy nghịch đảo cả 2 vế phương trình thành: $1/V_o = K_m + [S]/V_{max} [S]$, tách vế phải và đơn giản tiếp sẽ được phương trình Lineweaver–Burk:

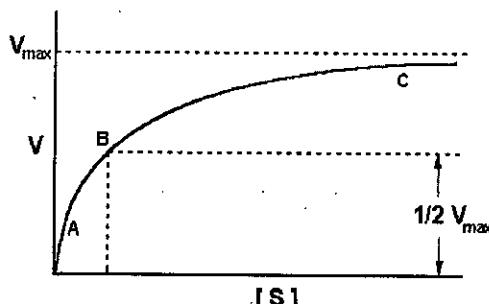
$$1/V_o = K_m/V_{max} 1/[S] + 1/V_{max} \quad (8.5)$$

Đây là phương trình tuyến tính có dạng $y = ax + b$ cắt trục tung ở $1/V_o$, cắt trục hoành ở $1/K_m$ và có độ

nghiêng bằng K_m/V_{max} . Phương trình này cho phép dễ dàng xác

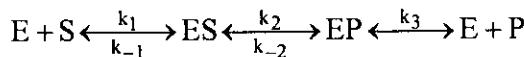
định giá trị V_{max} và K_m bằng cách xác định tốc độ phản ứng do enzym xúc tác với một số nồng độ cơ chất khác nhau. Điều

quan trọng là trong các thí nghiệm nghiên cứu động học enzym, khi cần phải xác định chính xác V_o bắt buộc phải sử dụng enzym tinh khiết và không sử dụng nồng



Hình 8.3. Ảnh hưởng nồng độ cơ chất đối với tốc độ xúc tác ban đầu V_o .

độ quá lớn cơ chất, vì điều này có thể làm giảm tốc độ phản ứng. Phương trình Michaelis–Menten không những chỉ đúng trong trường hợp phản ứng xúc tác một cơ chất tạo một sản phẩm, mà còn đúng với các trường hợp phức tạp hơn và đúng với phản ứng nhiều giai đoạn sau khi tạo phức ES. Trong trường hợp enzym xúc tác theo cơ chế Michaelis–Menten, thì V_{max} như ta đã biết, tương ứng với $k_2[ES]$, k_2 là giới hạn tốc độ phản ứng. Trong các phản ứng phức tạp hơn xúc tác 2 hay nhiều cơ chất, ví dụ như trong phản ứng sau:



Người ta thường sử dụng hằng số k_{cat} biểu thị tốc độ giới hạn phản ứng xúc tác khi enzym ở trạng thái bão hòa, nghĩa là trong phản ứng tuân thủ phương trình Michaelis–Menten $k_{cat} = k_2$, còn trong phản ứng này $k_{cat} = k_3$. Trong nhiều trường hợp k_{cat} còn được gọi là số vòng xúc tác (turnover number) của enzym phản ánh số phân tử cơ chất S được biến đổi thành sản phẩm P trong 1 đơn vị thời gian bởi 1 phân tử enzym khi được bão hòa bởi cơ chất.

Phương trình Michaelis–Menten không chỉ đúng trong trường hợp đơn giản, mà còn đúng cả với những trường hợp phức tạp khi có sự tham gia của 2 hay nhiều cơ chất. Trong những trường hợp này, quan hệ K_m và V_{max} phức tạp và liên quan đến nhiều thông số hơn nhiều. Ngoài ra còn có một số trường hợp ngoại lệ. Enzym dị lập thể (enzym allosteric) có đường biểu thị V_o phụ thuộc [S] không ở dạng hyperbol, mà ở dạng sigmoid (S). Điều này xảy ra khi phân tử cơ chất đầu tiên gắn vào tâm hoạt động enzym đã làm tăng nhanh sự gắn các phân tử cơ chất tiếp theo vào các tâm hoạt động khác của enzym.

Hemoglobin là trường hợp điển hình. Khi hemoglobin hấp thu oxy, phân tử oxy đầu tiên được hấp thu vào phân tử hemoglobin đã làm tăng nhanh sự hấp thu của các phân tử oxy tiếp theo. Đường biểu diễn sigmoid cho thấy, chỉ cần nồng độ cơ chất tăng lên rất ít cũng đủ làm tăng vận tốc xúc tác nhiều lần lớn hơn so với các enzym hoạt động tuân theo phương trình Michaelis–Menten. Ngoài ra, các chất điều hoà còn có ảnh hưởng khác nhau đến các thông số động học của enzym allosteric. Chúng làm tăng hay giảm K_m và V_{max} một cách riêng rẽ. Một số enzym allosteric khi kết hợp với chất điều hoà làm thay đổi giá trị K_m đối với cơ chất, nhưng không làm thay đổi giá trị V_{max} và ngược lại.

BẢNG 8.2. HẰNG SỐ k_{cat} CỦA MỘT SỐ ENZYM

Enzym	Cơ chất	k_{cat} (s ⁻¹)
Catalaza	H ₂ O ₂	40.000.000
Cacbonic anhydراza	HCO ₃ ⁻	400.000
Axetylcholinesteraza	Acetylcholin	140.000
β-Lactamaza	Benzylpenixilin	2.000
Fumaraza	Fumarat	800
RecA protein (ATPaza)	ATP	0,4

8.1.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và độ pH lên hoạt tính enzym

Giá trị k_{cat} của tuyệt đại số enzym gia tăng khi nhiệt độ của môi trường phản ứng gia tăng cho đến khi đạt giá trị xác định thì không tăng tiếp và sẽ giảm hoạt tính xúc tác khi nhiệt độ tiếp tục tăng. Nhiệt độ của môi trường phản ứng tương ứng khi enzym đạt giá trị hoạt tính xúc tác cực đại được gọi là nhiệt độ tối ưu của enzym (optimum temperature). Mỗi enzym đều có giá trị nhiệt độ tối ưu riêng biệt của mình. Giá trị k_{cat} của phần lớn enzym gia tăng khoảng 2 lần khi nhiệt độ môi trường phản ứng tăng 10°C.

Enzym cũng như các phân tử protein khác thường chỉ ổn định ở khoảng giá trị pH nhất định, các giá trị pH nằm bên ngoài khoảng giá trị này thường làm thay đổi cấu trúc không gian của phân tử protein, làm giảm hoạt tính xúc tác và làm biến tính nó. Ở giá trị pH ổn định cả k_{cat} và K_m đều phụ thuộc vào pH, vì pH ảnh hưởng lên giá trị pK_a của các nhóm ion chức năng trong phân tử enzym, cũng như cơ chất. Ví dụ, cơ chất chứa nhóm amin sẽ kết hợp với enzym tốt hơn khi ở dạng ion hoá và theo như quy luật, sự phụ thuộc pH của enzym phản ánh khả năng ion hoá các gốc axit amin tham gia tâm hoạt động cũng như các gốc axit amin có nhiệm vụ giữ ổn định cấu trúc không gian của phân tử enzym. Về tổng thể, pH tối ưu (optimum pH) ảnh hưởng đối với enzym mạnh hơn so với cơ chất. Tương tự, mỗi enzym cũng có pH tối ưu riêng của mình. Ví dụ, pH tối ưu của chymotrypsin là 8,0, trypsin – 2,0 và axetylcholin – esteraza – 7,0 hoặc cao hơn.

8.1.6. Úc chế hoạt tính enzym

Enzym xúc tác hầu như tất cả các phản ứng sinh hoá trong tế bào và cơ thể sống. Do vậy, song song với sự tồn tại của enzym cũng có mặt nhiều các chất úc chế chúng (viết tắt là I, từ inhibitor, có nghĩa là úc chế) nhằm mục đích điều hoà. Trong thực tế, rất nhiều chất úc chế đang được sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Ví dụ aspirin (axetyl salixilat) úc chế enzym xúc tác giai đoạn đầu tổng hợp prostaglandin là chất liên quan phản ứng gây cảm giác đau. Sự hiểu biết về các chất úc chế enzym cho biết những thông tin có giá trị về cơ chế hoạt động của enzym cũng như xác định các đường chuyển hoá trao đổi chất. Có hai nhóm chất úc chế enzym: úc chế thuận nghịch và úc chế không thuận nghịch.

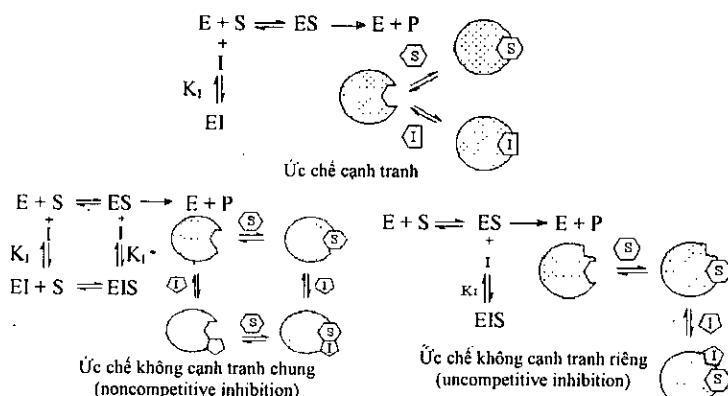
a) **Úc chế thuận nghịch.** Úc chế này phân thành 3 kiểu:

– Úc chế cạnh tranh (competitive inhibitor) tám xúc tác enzym với cơ chất. Chất úc chế cạnh tranh có hình dạng giống cơ chất, do vậy dễ dàng tạo phức EI ngăn cản tạo phức ES. Động học diễn tiến phản ứng úc chế cạnh tranh được mô tả trong hình 8.4. Do là úc chế thuận nghịch, nên có thể hạn chế ảnh hưởng của chất úc chế cạnh tranh bằng cách gia tăng nồng độ cơ chất, vì bằng cách này có thể làm giảm nồng độ chất úc chế I và xác suất I gắn lên E. Có nghĩa là, khi tăng nồng độ S đến giá trị đủ lớn sẽ vẫn đạt được V_{max} đặc trưng của enzym. Như vậy úc chế cạnh tranh không ảnh hưởng đến giá trị V_{max} . Tuy nhiên do $[S]$ ở thời điểm $V_o = 1/2 V_{max}$ gia tăng, nên K_m gia tăng khi có mặt I.

– Úc chế không cạnh tranh được chia làm 2 nhóm phụ: úc chế không cạnh tranh chung (noncompetitive inhibitor) gắn lên vị trí sát tâm hoạt động enzym, không ngăn cản cơ chất gắn lên tâm hoạt động (do vậy gọi là úc chế không cạnh tranh, đây là điểm phân biệt úc chế cạnh tranh và không cạnh tranh). Chất úc chế gắn lên enzym ở trạng thái tự do hay lên phức ES làm enzym giảm hoạt tính, làm giảm V_{max} , nhưng hầu như không ảnh hưởng đối với K_m . Trường hợp thứ hai là úc chế cạnh tranh riêng (uncompetitive inhibitor), chất úc chế gắn lên vị trí nằm cách tâm hoạt động của enzym trong phức ES tạo thành, mà không gắn lên enzym tự do.

b) Úc chế không thuận nghịch

Úc chế này xảy ra khi chất úc chế tạo liên kết hoá trị khá bền vững với enzym. Các chất này là phương tiện rất tốt để nghiên cứu cơ chế hoạt động enzym. Trong thực tế, các axit amin tham gia tâm hoạt động enzym được xác định nhờ các liên kết hoá trị tạo thành giữa enzym và chất úc chế không thuận nghịch. Ví dụ, nhờ chất úc chế không thuận nghịch DIFP (diisopropyl fluorophosphate) đặc hiệu đối với chymotrypsin đã xác định được gốc Ser¹⁹⁵ có mặt trong tâm hoạt động của enzym này.

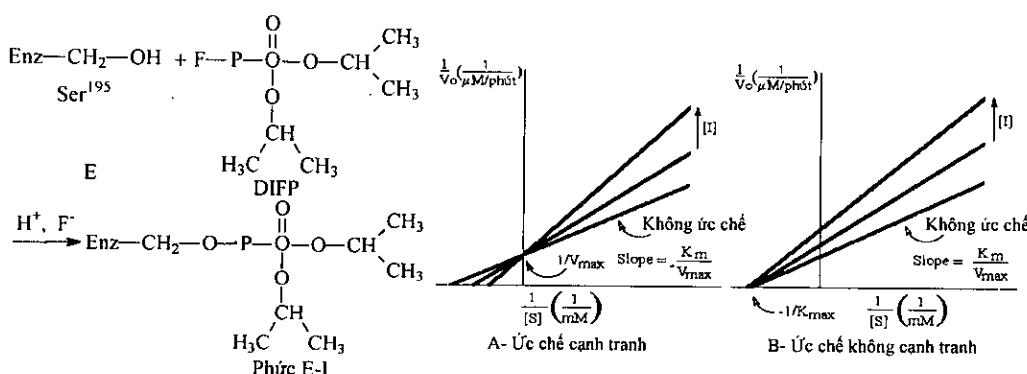


Hình 8.4. Ba trường hợp úc chế thuận nghịch

Úc chế cạnh tranh: chất úc chế cạnh tranh với cơ chất tâm hoạt động enzym;

Úc chế không cạnh tranh chung: chất úc chế gắn lên vị trí khác tâm enzym;

Úc chế không cạnh tranh riêng: chất úc chế chỉ gắn lên phức ES.



Hình 8.5. Xác định kiểu úc chế bằng phép thử động học

Trong nhóm chất úc chế không thuận nghịch còn có một số chất úc chế khá đặc biệt: bình thường chúng không hoạt động và chỉ bắt đầu hoạt động khi được gắn hoá trị với tâm hoạt động và làm mất hoàn toàn hoạt

tính của enzym, các chất ức chế này còn được gọi là chất ức chế tự sát (suicide inhibitor). Trong thực tế, một số thuốc chữa bệnh hoạt động theo cơ chế này và đạt được hiệu quả sử dụng cao trong việc chữa trị một số bệnh hiểm nghèo.

8.1.7. Đơn vị hoạt tính của enzym

Thông thường trước khi sử dụng bất kỳ loại enzym nào, dù đó là enzym ở dạng tinh khiết sử dụng cho mục đích thí nghiệm hoặc là enzym kỹ thuật ở dạng thô hơn sử dụng trong sản xuất, người ta phải biết được khả năng xúc tác của enzym thông qua việc xác định số đơn vị hoạt tính của nó. Tuy nhiên, do trong thực tế, người ta sử dụng các phương pháp khác nhau để xác định hoạt tính enzym. Do vậy, phải hết sức thận trọng khi so sánh hoạt tính của các chế phẩm cùng loại enzym có nguồn gốc khác nhau. Một số cách thể hiện đơn vị hoạt tính xúc tác thông dụng mang tính quốc tế đối với enzym kỹ thuật được trình bày sau đây.

a) Proteaza

– AU: Đơn vị Anson: 1 đơn vị Anson (AU) là số lượng enzym cần thiết để giải phóng từ cơ chất một lượng vật chất tương đương 1mg tyrosin ở điều kiện tiến hành phản ứng với chất chỉ thị Folin hoặc đo ở bước sóng 280nm.

Ví dụ, subtilisin ở dạng tinh thể chứa 25–30AU/g, trong khi chế phẩm subtilisin kỹ thuật thường chỉ chứa 2,5–3AU/g.

– BAPA: Đơn vị BAPA (Na-benzoyl-L-arginin-p-nitranilid) tương ứng số lượng enzym proteaza cần thiết để biến đổi 1 μ mol cơ chất (BAPA) trong 1 phút ở điều kiện tiến hành phản ứng.

b) Cacbohydraza

– DPO: Đơn vị DPO (diastatic power) là số lượng enzym trong 0,1ml dịch enzym 5% tạo ra số lượng đường khử trong 100ml dịch tinh bột 1% ở 20°C, trong 1 giờ đủ để khử 5ml dịch Fehling.

– DU: Đơn vị DU (dextransucrose unit) thường để xác định hoạt tính amylaza tương ứng số lượng enzym xúc tác biến đổi 1mg tinh bột thành dextransucrose ở điều kiện xác định. Ví dụ, hoạt tính amylaza của hãng Rohm được xác định như sau: 1,2% dịch tinh bột tan (amylose soluble, Merck AG), đệm axetat pH 5,7 với thời gian phản ứng 10 phút, ở 30°C. Đánh giá theo phương pháp này, tinh thể α-amylaza vi khuẩn chứa khoảng 30.000DU/mg protein, amylaza kỹ thuật dạng bột thường chứa khoảng 100–1.000DU/mg và amylaza kỹ thuật dạng dịch chứa khoảng 100–300DU/ml.

c) **Pectinaza**: Đơn vị PG (polygalacturonase unit) là hoạt độ enzym cần thiết để làm giảm độ nhớt của dịch pectin chuẩn một giá trị là $1/\eta_{\text{đặc hiệu}} = 0,000015$ ở điều kiện chuẩn.

d) **Xenulaza**: Đơn vị CU (cellulase unit) là số lượng enzym cần thiết để giải phóng $1 \mu\text{mol}$ glucozơ từ dịch CMC (cacboxymethylcelulozơ 1,5%) ở 30°C , pH 4,5.

e) **Lipaza**: LU là số lượng enzym cần thiết để tạo đủ lượng axit đo được bằng máy đo pH. Để xác định hoạt tính lipaza, người ta thường sử dụng 2 cơ chất là ester tan và dầu oliu nhũ hoá.

8.2. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYM

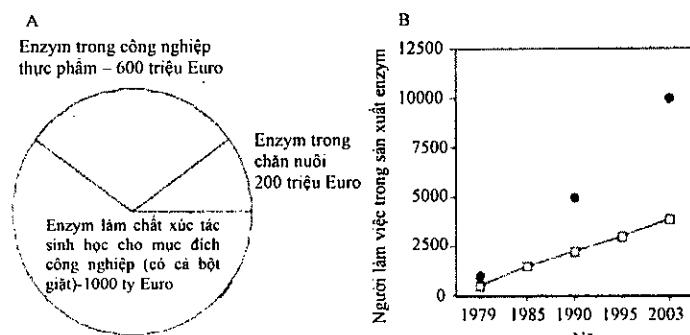
Giữa những năm 1950 và 1970, sự kết hợp kiến thức khoa học và kỹ thuật mới cũng nhu cầu của thị trường công nghệ sản xuất bột giặt, công nghệ tinh bột và nguyên liệu thô làm viên ngọt rẻ hơn và axit amin tinh khiết, đã kích thích sự phát triển của công nghệ enzym.

Trong số các enzym, thì penixilin amidaza (axylaza) được sử dụng để thuỷ phân penixilin được xác định lần đầu tiên vào năm 1950, một vài năm sau là glucozơ isomeraza dùng để đồng phân glucozơ thành phân tử ngọt hơn là fructozơ. Với kỹ thuật cố định enzym mới, enzym có thể tái sử dụng được và giá thành quá trình enzym hạ xuống. Thông qua việc thu nhận được sucrozơ từ cây mía hoặc cây củ cải đường về cơ bản độ ngọt cao hơn nó thay thế nguyên liệu thô trước đây là tinh bột mà nó được sản xuất khối lượng lớn từ cây ngô (chủ yếu ở Mỹ). Tinh bột được thuỷ phân thành glucozơ, nhưng độ ngọt của glucozơ thấp hơn đường kính hoặc sản phẩm thuỷ phân của đường là glucozơ và fructozơ. Còn glucozơ-isomeraza có thể đồng phân glucozơ thành fructozơ, tinh bột được thay đổi ngọt hơn. Quy trình này được đăng ký bản quyền năm 1960, những mãi 15 năm sau, quy trình chuyển hoá tinh bột thành xirô glucozơ-fructozơ mới sản xuất ở mức độ công nghiệp. Đó là một phần dẫn đến làm tăng giá đường kính và cũng giới thiệu glucozơ-isomeraza cố định như là chất xúc tác sinh học. Các kỹ sư và các nhà khoa học châu Âu đã nỗ lực góp phần phát triển công nghệ này.

Cố định enzym lần đầu tiên được giới thiệu có khả năng sử dụng lại enzym có giá trị. Một số thử nghiệm đầu tiên đã được mô tả từ những năm đầu của thế kỷ XX (Hedin, 1915), nhưng khi enzym hấp thụ trên than thì hoạt tính rất không bền. Trong khoảng thời gian những năm 1950, hàng loạt

nhóm bắt đầu nghiên cứu cố định enzym trên các chất mang khác (Michel và Evers, 1947; Grubhofer và Schleith, 1954; Manecke 1955, được trích dẫn trong Silman và Katchalski, 1966). Georg Manecke là một trong những người đầu tiên thành công trong việc chế tạo hệ thống cố định bền vững trên chất mang protein và do đó ông đã bảo hộ patent trên phương pháp này nhưng không thuyết phục công nghiệp tầm quan trọng việc phát triển hơn phát minh này. Dĩ nhiên, là nhóm hoá học làm việc với Ephraim Katchalski-Katzir ở Israel đã làm sáng mắt của các nhà công nghiệp đối với thế giới enzym cố định (trong các đồng nghiệp của Katzir là Klaus Mosbach và Malcolm Lilly sau này đóng góp vào việc thiết lập công nghệ enzym). Những ứng dụng đầu tiên các enzym cố định ngoài đồng phân hoá glucozơ thành fructozơ để sản xuất xirô fructozơ ngô cao (HFCS), là trong việc sản xuất axit amin tinh khiết (Tosa et al., 1969) và thuỷ phân penicillin G (Carleysmith and Lilly, 1979, cùng với các hãng Beecham Pharmaceuticals, UK, và G. Schmidt-Kastner, Bayer, Germany).

Trong những năm 1960, sản xuất enzym có tốc độ tăng với tỷ lệ khiêm tốn, như phản ánh bởi sự tăng trưởng việc bán amylaza và proteaza vi khuẩn. Ví dụ như hàng năm khu vực enzym của công nghiệp NOVO (bây giờ là Novozymes), sản



Hình 8.6 Thị trường enzym hiện nay (A) và sự tăng cường ứng dụng enzym được thể hiện số người làm việc công nghiệp sản xuất enzym (B)

xuất enzym hàng đầu lúc đó không vượt quá 1 triệu USD cho đến năm 1965. Tuy nhiên, với sự xuất hiện proteaza dùng trong bột giặt, việc sử dụng enzym tăng lên đột ngột và cuối những năm 1960

mọi người chỉ ứng Biotex chất tẩy rửa có chứa proteaza. Cũng thời điểm này, quá trình axit/enzym để sản xuất dextrose sử dụng glucoamylaza cũng tăng trong quy trình tinh bột. Kết quả, khoảng năm 1969, chỉ có 4 năm hãng Novozymes doanh thu vượt quá 50 triệu USD/năm và năm 2003 doanh số của hãng xấp xỉ 1 tỷ USD/năm. Thị trường thế giới hiện nay tiêu thụ khoảng

2 tỷ Euro (Novozymes, 2004) (hình 8.6A), và thực vậy, điều này nó phản ánh trong việc tăng việc làm trong công nghiệp sản xuất enzym (hình 8.6B).

Quy trình sản xuất enzym công nghiệp enzym tự do và cố định như là chất xúc tác sinh học được liệt kê trong bảng 8.3.

**BẢNG 8.3. CÁC CHẤT XÚC TÁC SINH HỌC CỦA CÁC CÔNG TY KHÁC NHAU
ĐƯỢC SẢN XUẤT VỚI KHỐI LƯỢNG LỚN HƠN 1.000 TẤN/NĂM**

Sản phẩm	Enzym	Loại enzym	Công ty
>10000000 tấn/năm			
HFCS	Amylaza Glucoamylaza	Tự do Tự do	Một loạt
Etanol	Glucosid-isomeraza Amylaza, Glucoamylaza	Cố định Tự do	Một loạt
>10.000 tấn/ năm			
Acrylamit Axit 6-aminopenicillanic (6-APA) Bơ cacao Isomaltulose Sữa không lactozơ hay huyết thanh sữa	Nitrilaza Penicillin amidaza Lipaza Saccaroz-mutaza β -galactosidaza	Tế bào cố định Cố định Cố định Tế bào cố định Tự do hoặc cố định	Nitto, DSM Nhiều Fuji Oil, Unilever Syxdzucker Nhiều
> 1.000 tấn/ năm			
Axit 7-amino-xephalosporanic (7-ACA) Axit 7-Aminodesaxetoxyccephalosporanic (7-ADCA) Axit (S)-aspartic Aspartame (S)-Methoxyisopropyl amin Axit (R)-pantothenic (R)-phenylglyxin Axit (S)-amin	(R)-amino oxidaza Glutaryl amidaza Glutaryl amidaza (cải tiến(?)) Aspartaza Thermolysisin Lipaza Aldolactonaza Hydantoinaza Cacbamoylaza Aminoacylaza	Cố định Cố định Cố định Cố định (?) Cố định Cố định Cố định Cố định Tự do	Nhiều DSM Tanabe Toso, DSM BASF Fuji chem. Ind. Nhiều Degussa, Tanabe
1.000 đến 10 tấn/ năm			
Amoxixillin Cephalexin (S)-DOPA Insulin người Cồn tinh khiết và amin Axit (R)-mandelic	Penicillin amidaza Penicillin amidaza β -tyrosinaza Cacboxypeptidaza A Lysyl endopeptidaza Trypsin Lipaza Nitrilaza	Cố định Cố định Cố định Tự do Tự do Tự do Cố định Cố định	DSM DSM Ajinomoto Aventis Nhiều BASF BASF BASF

Việc ra đời công nghệ gen trong những năm 1970 đã thúc đẩy mạnh mẽ cả về phương diện hoàn thiện, cả về giá thành các chất xúc tác sinh học và cũng mở rộng phạm vi ứng dụng. Hiệu suất enzym được cải tiến đột biến bởi các vi sinh vật tái tổ hợp cũng như sự bền vững của enzym và nó dẫn đến việc giảm giá thành đáng kể và cải thiện về mặt kinh tế của việc ứng dụng enzym. Ngày nay, hầu hết các chất xúc tác sinh học được sử dụng trong quá trình sản xuất bằng enzym là chủng tái tổ hợp ngoại trừ các quá trình sản xuất thực phẩm.

Với việc phát triển các kỹ thuật đột biến điểm trực tiếp, sắp xếp lại gen và tiến hóa trực tiếp (directed evolution) đã mở ra triển vọng làm thay đổi tính chọn lọc và tính đặc hiệu của enzym. Những tài liệu chi tiết hơn về sự phát triển khoa học và công nghệ có thể tìm trên các công trình của Sumner & Myrböck (1950), Sumner & Somers (1953), Ullmann (1914), Tauber (1949), Neidleman (1991), Turner (Roberts et al., 1995) và Buchholz & Poulsen (2000). Một tài liệu phân tích sâu sắc kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học và “thuật lên men” được thực hiện bởi Bud (1992, 1993).

8.2.1. Các quá trình công nghệ sinh học sử dụng enzym tinh khiết hoặc enzym ngoại bào làm chất xúc tác sinh học

Các quy trình công nghệ sinh học sử dụng một hoặc nhiều enzym có hoặc không có cofactor hoặc đồng cơ chất (cosubstrates) làm chất xúc tác sinh học (hình 8.7). Khi đòi hỏi phục hồi nhiều enzym và đồng cơ chất hơn thì sử dụng quy trình lên men với tế bào sống hiệu quả hơn các quy trình với enzym tách chiết.

Đối với các quy trình sử dụng một số enzym (≤ 3) không cần bất kỳ phục hồi đồng cơ chất nào (ATP, NADH), với enzym tách riêng hay enzym trong hoặc tế bào sống hoặc tế bào chết có những ưu điểm so với lên men như sau:

- Hiệu quả không gian thời gian cao hơn tế bào sống, nồng độ phản ứng cân sử dụng nhỏ hơn, giảm chi phí cho quá trình.
- Giảm rủi ro, có thể nhận được các sản phẩm khác trong tế bào trong quá trình chuyển hoá.
- Khả năng bền vững tăng và tái sử dụng chất xúc tác cố định cũng tăng cho phép xây dựng quy trình sản xuất liên tục trong một số tháng.

Các quy trình công nghệ sinh học sử dụng một hoặc nhiều enzym có hoặc không có cofactor hoặc đồng cơ chất (cosubstrate) làm chất xúc tác sinh học (hình 8.7). Khi đòi hỏi phục hồi nhiều enzym và đồng cơ chất hơn thì sử dụng quy trình lên men với tế bào sống hiệu quả hơn các quy trình với enzym tách chiết.

	Phản ứng xúc tác cần	Sản phẩm và hiệu suất tốt hơn	Sản phẩm
I	<ul style="list-style-type: none"> Tái sinh đồng cơ chất Một vài enzym Chất trung gian có thể chuyển hóa thành phụ phẩm không cần do enzym nội bào 	<ul style="list-style-type: none"> Thiết kế quá trình trao đổi chất để "loại bỏ" enzym mà nó xúc tác thành phụ phẩm Hàm lượng enzym mong muốn cao hơn 	<ul style="list-style-type: none"> Axit amin Chất kháng sinh Axit citric Enzym Etilenol Hormon steroid
II	<p>Như I không có</p> <ul style="list-style-type: none"> Hình thành phụ phẩm 	<ul style="list-style-type: none"> Hàm lượng enzym mong muốn cao hơn 	<ul style="list-style-type: none"> Chất đồng phân quang học tinh khiết Hormon steroid
III	<ul style="list-style-type: none"> Một enzym nội bào Không có đồng cơ chất 	<ul style="list-style-type: none"> Nhiều enzym hơn Enzym tốt hơn 	<ul style="list-style-type: none"> Chất kháng sinh Fructozo Chất đồng phân quang học tinh khiết
IV	<p>Như III nhưng có</p> <ul style="list-style-type: none"> Enzym ngoại bào 	<ul style="list-style-type: none"> Nhiều enzym hơn Enzym tốt hơn 	<ul style="list-style-type: none"> Chất kháng sinh Phomat Glucozơ từ tinh bột và xylulozo Chất đồng phân quang học tinh khiết

Hình 8.7. Phân loại các quá trình xúc tác sinh học với enzym như là chất xúc tác sinh học

I và II cần phải thực hiện với enzym trong tế bào sống; III có thể thực hiện với enzym trong tế bào chết hoặc như IV với enzym đã tách chiết. Quá trình I sẽ chỉ được xử lý liên quan đến xử lý nước thải và khí thải với tế bào cố định.

Đối với các quá trình enzym như vậy:

- Enzym nội bào hoặc ngoại bào cần thiết phải sản sinh đủ khối lượng và tinh sạch (giải phóng các enzym không cần thiết và các hợp chất khác).
- Tế bào không có enzym nội bào, nó có thể làm nhiều quá trình enzym cần được tuyển chọn.
- Chi phí cho enzym phải thấp hơn 5–10 % tổng giá trị của sản phẩm.

8.2.2. Ưu điểm và nhược điểm của các quá trình sản xuất dựa trên cơ sở enzym

Trong các hình 8.8 và 8.9, các quá trình enzym để thuỷ phân penixilin thành 6-APA và sản xuất xirô glucozơ-fructozơ được so sánh với các quá trình sử dụng trước kia có cùng một mục tiêu.

Trong trường hợp thuỷ phân penixilin bằng quy trình hoá học có sử dụng dung môi và các hợp chất độc hại ảnh hưởng đến môi trường và các chất thải độc hại khó có thể tái sử dụng được. Do đó, quy trình không chấp nhận được. Quy trình enzym được chấp nhận hơn so với các quy trình trước, giảm đáng kể chất thải, giảm chi phí cho sản xuất. Trong quy trình này, hiệu suất sản phẩm thu nhận được cũng tăng lên trên 95%.

Thuỷ phân tinh bột và đồng phân hoá glucozơ không thể thực hiện được bằng phương pháp hoá học với chi phí hợp lý, như hiệu suất thấp hơn, phế phẩm không cần thiết và sản sinh đáng kể axit bò đi. Các quy trình này minh họa một số nhược điểm của các quy trình sản xuất enzym so với các quy trình khác. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, việc sử dụng enzym như là chất xúc tác sinh học cũng nên hạn chế tiếp xúc trực tiếp bởi các tính chất sinh học và hoá học của chúng.

Enzym là protein cần thiết cho các hệ thống sống và đúng chỗ là chúng xúc tác tất cả các chuyển hoá hoá học cần thiết để duy trì và tái sinh hệ thống sống đó. Tuy vậy, nếu enzym đặt không đúng chỗ, chúng có thể sẽ gây hại cho cơ thể. Peptidaza từ tuyến tuy thường được tiết vào đường ruột, ở đó chúng cần thiết để tiêu hoá protein thành axit amin. Các axit amin được vận chuyển vào mạch máu và phân bố vào các tế bào khác nhau, chúng được sử dụng để tổng hợp các protein mới. Dưới trạng thái bị sốc hoặc thiếu tuyến tuy, các peptidaza này có thể vận chuyển trực tiếp từ tuy vào mạch máu, có thể gây nên hiện tượng nghẽn máu. Để ngăn chặn hiện tượng này có thể xảy ra, máu cần có chứa chất ức chế đối với peptidaza của tuyến tuy.

Enzym là thành phần bình thường của máu và cùng với tất cả các protein ăn vào qua đường tiêu hoá của người, chúng cũng được thuỷ phân trong dạ dày và đường ruột. Tuy nhiên, nếu enzym hoặc các protein khác bị hít phải bụi hoặc bụi sương vào trong phổi của người, chúng có thể được vận chuyển trực tiếp vào máu. Ở đó, chúng bị nhận biết là protein lạ và kích thích phản ứng miễn dịch – nghĩa là sản sinh ra kháng thể chống lại chúng. Nó cũng có

thể dẫn đến hiện tượng dị ứng với enzym hoặc protein. Những rủi ro này phải được xem xét trong sản xuất và sử dụng enzym, các protein khác và phương thức đơn giản hạn chế đến mức tối thiểu tiếp xúc với chúng. Ví dụ, enzym được sử dụng trong bột giặt được làm khô thành hạt lớn được phủ lớp keo; cho nên kích thước hạt phải lớn ($>100\mu\text{m}$) để chúng không bị hít vào phổi. Tương tự như vậy, khi các enzym được sử dụng ở dạng lỏng cũng phải tránh sự hình thành bụi sương.

Những ưu điểm và nhược điểm của tế bào và enzym làm xúc tác sinh học so với xúc tác hóa học được tóm tắt như sau:

Ưu điểm: Lựa chọn được hình dạng lập thể và trung tâm hoạt động của enzym; nhu cầu nhiệt độ thấp (0–110°C); tiêu thụ năng lượng thấp; dải pH hoạt động rộng (pH 2–12); phế thải ít hơn; không độc khi trực tiếp sử dụng; có thể tái sử dụng enzym (cố định); có thể phân huỷ sinh học và có thể được sản xuất số lượng không hạn chế.

Nhược điểm: Tế bào và enzym không bền ở nhiệt độ cao; không bền ở pH cực đoan; không bền trong dung môi không thích hợp; bị ức chế bởi một số ion kim loại và bị peptidaza phân giải. Một số enzym giá thành vẫn còn đắt và đòi hỏi cơ chất đắt tiền. Khi hít phải hay nuốt phải enzym dễ gây dị ứng vì là protein ngoại lai.

8.3. MỤC ĐÍCH VÀ CÁC YÊU CẦU CHỦ YẾU ĐỂ XÂY DỰNG MỚI HOẶC CẢI TIẾN CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYM

8.3.1. Mục đích kinh tế và môi trường

Những ưu điểm trong việc sản xuất các sản phẩm bằng công nghệ enzym được nêu ở trên, không chỉ sử dụng các quá trình enzym trong công nghiệp mà cả các quá trình công nghệ sản xuất enzym. Mục đích được chấp thuận xuất phát từ các tiêu chuẩn được tóm tắt trong bảng 8.4.

Quy trình công nghệ enzym đã trở nên cạnh tranh và đã được giới thiệu trong công nghiệp khi đạt được mục đích này tốt hơn các quy trình khác. Tuy nhiên, điều này cũng đòi hỏi được xác định số lượng sản phẩm và phế phẩm (hoặc chất thải) được sinh ra với một lượng enzym xác định trong khoảng thời gian xác định. Đối với mục tiêu này, các quá trình enzym như đối với tất cả các quá trình xúc tác hóa học – cần được chia thành hai tiêu chuẩn (hình 8.8).

8.2.2. Ưu điểm và nhược điểm của các quá trình sản xuất dựa trên cơ sở enzym

Trong các hình 8.8 và 8.9, các quá trình enzym để thuỷ phân penixilin thành 6-APA và sản xuất xirô glucozo-fructozơ được so sánh với các quá trình sử dụng trước kia có cùng một mục tiêu.

Trong trường hợp thuỷ phân penixilin bằng quy trình hoá học có sử dụng dung môi và các hợp chất độc hại ảnh hưởng đến môi trường và các chất thải độc hại khó có thể tái sử dụng được. Do đó, quy trình không chấp nhận được. Quy trình enzym được chấp nhận hơn so với các quy trình trước, giảm đáng kể chất thải, giảm chi phí cho sản xuất. Trong quy trình này, hiệu suất sản phẩm thu nhận được cũng tăng lên trên 95%.

Thuỷ phân tinh bột và đồng phân hoá glucozo không thể thực hiện được bằng phương pháp hoá học với chi phí hợp lý, như hiệu suất thấp hơn, phế phẩm không cần thiết và sản sinh đáng kể axit bò đi. Các quy trình này minh họa một số nhược điểm của các quy trình sản xuất enzym so với các quy trình khác. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, việc sử dụng enzym như là chất xúc tác sinh học cũng nên hạn chế tiếp xúc trực tiếp bởi các tính chất sinh học và hoá học của chúng.

Enzym là protein cần thiết cho các hệ thống sống và đúng chõ là chúng xúc tác tất cả các chuyển hoá hoá học cần thiết để duy trì và tái sinh hệ thống sống đó. Tuy vậy, nếu enzym đặt không đúng chõ, chúng có thể sẽ gây hại cho cơ thể. Peptidaza từ tuyến tuy thường được tiết vào đường ruột, ở đó chúng cần thiết để tiêu hoá protein thành axit amin. Các axit amin được vận chuyển vào mạch máu và phân bố vào các tế bào khác nhau, chúng được sử dụng để tổng hợp các protein mới. Dưới trạng thái bị sốc hoặc thiếu tuyến tuy, các peptidaza này có thể vận chuyển trực tiếp từ tuy vào mạch máu, có thể gây nên hiện tượng nghẽn máu. Để ngăn chặn hiện tượng này có thể xảy ra, máu cần có chứa chất ức chế đối với peptidaza của tuyến tuy.

Enzym là thành phần bình thường của máu và cùng với tất cả các protein ăn vào qua đường tiêu hoá của người, chúng cũng được thuỷ phân trong dạ dày và đường ruột. Tuy nhiên, nếu enzym hoặc các protein khác bị hít phải bụi hoặc bụi sương vào trong phổi của người, chúng có thể được vận chuyển trực tiếp vào máu. Ở đó, chúng bị nhận biết là protein lạ và kích thích phản ứng miễn dịch – nghĩa là sản sinh ra kháng thể chống lại chúng. Nó cũng có

thể dẫn đến hiện tượng dị ứng với enzym hoặc protein. Những rủi ro này phải được xem xét trong sản xuất và sử dụng enzym, các protein khác và phương thức đơn giản hạn chế đến mức tối thiểu tiếp xúc với chúng. Ví dụ, enzym được sử dụng trong bột giặt được làm khô thành hạt lớn được phủ lớp keo; cho nên kích thước hạt phải lớn ($>100\mu\text{m}$) để chúng không bị hít vào phổi. Tương tự như vậy, khi các enzym được sử dụng ở dạng lỏng cũng phải tránh sự hình thành bụi sương.

Những ưu điểm và nhược điểm của tế bào và enzym làm xúc tác sinh học so với xúc tác hoá học được tóm tắt như sau:

Ưu điểm: Lựa chọn được hình dạng lập thể và trung tâm hoạt động của enzym; nhu cầu nhiệt độ thấp (0 – 110°C); tiêu thụ năng lượng thấp; dải pH hoạt động rộng (pH 2–12); phế thải ít hơn; không độc khi trực tiếp sử dụng; có thể tái sử dụng enzym (cố định); có thể phân huỷ sinh học và có thể được sản xuất số lượng không hạn chế.

Nhược điểm: Tế bào và enzym không bền ở nhiệt độ cao; không bền ở pH cực đoan; không bền trong dung môi không thích hợp; bị ức chế bởi một số ion kim loại và bị peptidaza phân giải. Một số enzym giá thành vẫn còn đắt và đòi hỏi cơ chất đắt tiền. Khi hít phải hay nuốt phải enzym dễ gây dị ứng vì là protein ngoại lai.

8.3. MỤC ĐÍCH VÀ CÁC YÊU CẦU CHỦ YẾU ĐỂ XÂY DỰNG MỚI HOẶC CẢI TIẾN CÁC QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ENZYM

8.3.1. Mục đích kinh tế và môi trường

Những ưu điểm trong việc sản xuất các sản phẩm bằng công nghệ enzym được nêu ở trên, không chỉ sử dụng các quá trình enzym trong công nghiệp mà cả các quá trình công nghệ sản xuất enzym. Mục đích được chấp thuận xuất phát từ các tiêu chuẩn được tóm tắt trong bảng 8.4.

Quy trình công nghệ enzym đã trở nên cạnh tranh và đã được giới thiệu trong công nghiệp khi đạt được mục đích này tốt hơn các quy trình khác. Tuy nhiên, điều này cũng đòi hỏi được xác định số lượng sản phẩm và phế phẩm (hoặc chất thải) được sinh ra với một lượng enzym xác định trong khoảng thời gian xác định. Đối với mục tiêu này, các quá trình enzym như đối với tất cả các quá trình xúc tác hoá học – cần được chia thành hai tiêu chuẩn (hình 8.8).

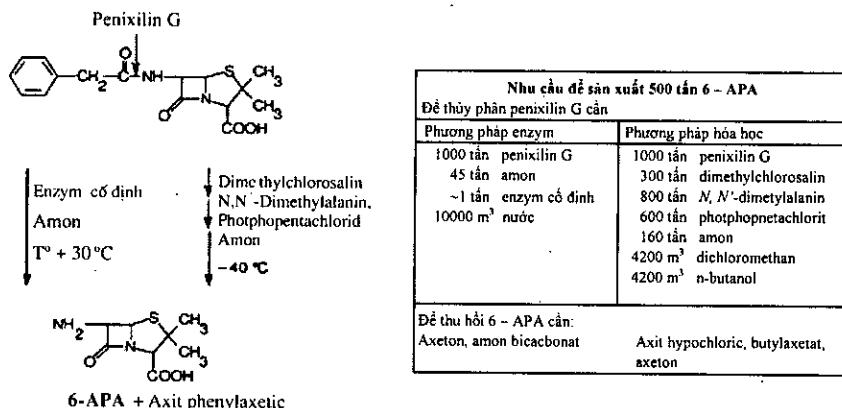
**BẢNG 8.4. MỤC ĐÍCH KINH TẾ VÀ MÔI TRƯỜNG CÓ THỂ THỰC HIỆN
TRONG QUY TRÌNH SẢN XUẤT ENZYM**
(được cải tiến từ from Uhlig, 1998).

Mục đích	Điều kiện đạt được mục đích	Sản phẩm/ quy trình
Hạ giá thành	Tăng hiệu suất Xephalosporin C Tái sử dụng chất xúc tác sinh học và năng suất tăng bằng phương pháp cố định Sử dụng nguyên liệu mới tốt hơn Giảm giá thành quy trình cho – Lọc – Năng lượng – Kéo sợi – Làm chín phomat – Hồ hoá malt trong sản xuất bia Giảm thời gian lưu trong quá trình chế biến tinh bột	Thuỷ phân Penixillin. Đồng phân hoá glucozơ. Sản xuất isomaltuloza Sản xuất nước hoa quả và rượu vang Lọc vô trùng dịch chiết từ thực vật Bột giặt chịu nhiệt độ cao Xử lý bằng enzym Tăng tốc độ quá trình bằng enzym Enzym
Hoàn thiện tính chất sinh học và chất lượng	Chỉ sản xuất các chất đồng phân có tính chất sinh học mong muốn Cải tiến bảo quản thực phẩm Hoàn thiện các tính chất kỹ thuật Hoàn thiện vị (độ ngọt)	Dung giải Dịch cô đặc Biến tính protein, hương liệu làm bánh, ester hoá dầu thực vật, dầu diezen sinh học Izome hoá glucozơ thành xirô glucozơ-fructozơ
Sử dụng tái sinh mới của các nguyên liệu thô	Sử dụng chất thải từ công nghiệp chế biến thực phẩm và gỗ (váng bơ, chất lọc có nhiều tinh bột và protein từ sản xuất dầu thực vật và xenlulozơ)	Đồ uống từ váng bơ, etanol, biodiezel Thức ăn cho động vật
Giảm thiểu tác động môi trường	Giảm thiểu chất thải không tái chế được Tái sinh chất thải	Thuỷ phân penixillin, cephalosporin C, thuộc da, tẩy trắng giấy Sử dụng váng sữa

– Quá trình cân bằng được kiểm soát: nồng độ và tính chất mong muốn của sản phẩm phải đạt giá trị cực đại ở vị trí cuối của quá trình (B trong hình 8.10); cân bằng hóa học được độc lập với các tính chất của chất xúc tác (enzym), nhưng phụ thuộc vào pH và nhiệt độ.

– Quá trình được kiểm soát động học: nồng độ và tính chất của sản phẩm mong muốn (như độ dài và độ nhẵn của sợi trong công nghiệp dệt và

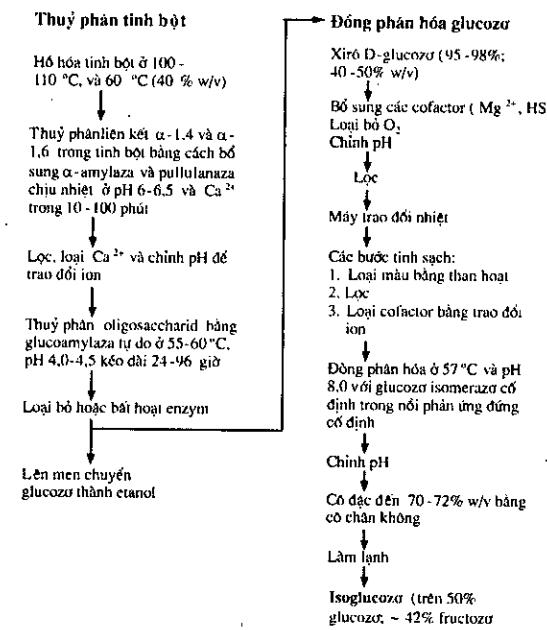
giấy) đạt cực đại (A trong hình 8.10), nồng độ và tính chất của chúng phụ thuộc vào tính chất của chất xúc tác, pH và nhiệt độ. Quá trình phải dừng lại khi đạt đến cực đại.



Hình 8.8. So sánh quy trình sản xuất cũ (hóa học) và mới (enzym) để thuỷ phân penicillin G

Sản phẩm, axit 6-aminopenixilanic (6-APA), được sử dụng để tổng hợp penixilin bán tổng hợp với mạch nhánh khác axit phenylaxetic của penixilin G. Trong quy trình enzym phế liệu là axit phenylaxetic có thể tái chế trong sản xuất penixilin bằng phương pháp lên men (từ Tischer, 1990).

Trong cả hai trường hợp, thời gian đạt cực đại, nồng độ và tính chất của sản phẩm phụ thuộc vào tính chất và số lượng enzym sử dụng và quá trình xúc tác (nội hay ngoại bào, pH và nhiệt độ của hằng số cân bằng, khả năng hòa tan và độ bền của cơ chất, sản phẩm,...). Điều đó phải được xem xét để thiết kế các quá trình enzym hợp lý. Sự khác nhau khác cần xem xét là trong các quá trình đó, enzym được sử dụng ở



Hình 8.9. Quá trình enzym để thuỷ phân tinh bột thành glucozơ và đóng phän hóa glucozơ thành fructozơ (w/v=khoi luong/don vi the tich).

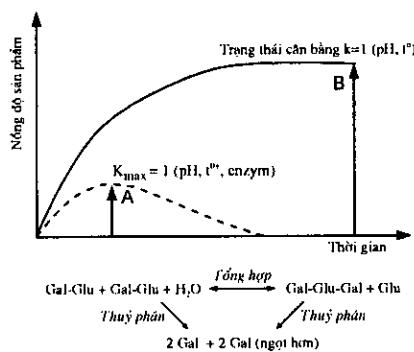
nồng độ cơ chất (đến 1 M) phải cao hơn trong các hệ thống sống ($\leq 0,01$ M). Ở nồng độ enzym được sử dụng trong công nghệ enzym, sự hình thành các phế phẩm không mong muốn cần được chú ý tới.

8.3.2. Đặc điểm chủ yếu để thiết kế hợp lý một quy trình enzym

Các bước được xem xét để thiết kế các quy trình enzym được dựa trên việc thuỷ phân có kiểm soát cân bằng cơ chất lactozơ thành sản phẩm glucozơ và galactozơ (hình 8.10) làm ví dụ. Tất cả các bước cần xem xét để thiết kế quá trình enzym sản xuất các sản phẩm hiện có và các sản phẩm mới được tóm tắt trong hình 8.11.

Theo nguyên tắc giảm dần chi phí enzym, sản xuất enzym cần được cải tiến hoặc enzym được sử dụng ở dạng tái sử dụng. Điều này chỉ thành công bằng việc cố định enzym vào các hạt có lỗ mà có thể dễ dàng lọc qua ở đầu của quá trình. Trong các hệ thống này, quá trình động học khác với hệ thống enzym tự do, như khối dịch được chuyển qua bên trong hạt với các chất xúc tác sinh học gây nên gradient nồng độ và pH ảnh hưởng đến tốc độ và hiệu suất phản ứng.

Trước kia, điều kiện và điểm cuối của quá trình được lựa chọn trong miền của quá trình (process window), giá thành cho một kg sản phẩm bị ảnh hưởng bởi kiểu nồi phản ứng (theo mẻ, hoặc thùng khuấy liên tục, hoặc nồi phản ứng cố định) được lựa chọn để thực hiện quá trình. Ở đó, một quy trình thiết kế quy trình enzym sẽ được biểu thị chi tiết hơn như trường hợp nghiên cứu thiết kế các quy trình enzym cổ điển (sản xuất HFCS production) và quy trình mới hơn (sản xuất 7-ACA).



Hình 8.10. Sự phụ thuộc thời gian (đường cong) của phương trình (đường liền) và động học (đường gãy) kiểm soát quá trình xúc tác nhờ enzym

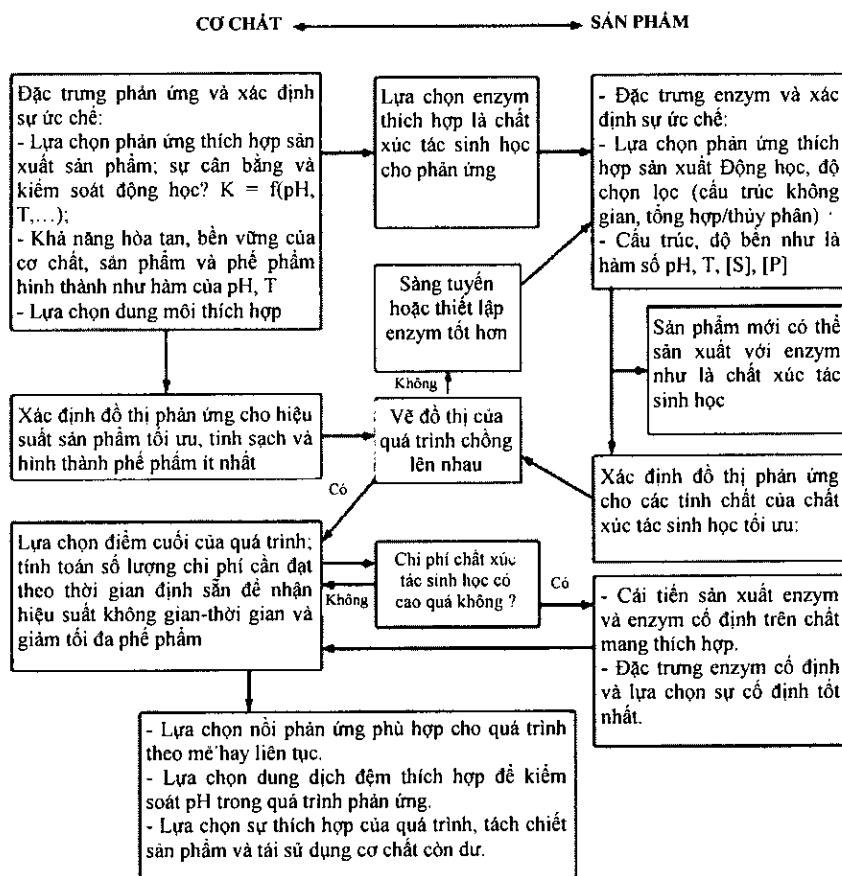
Điểm cuối thích hợp của quá trình này ở chỗ nồng độ sản phẩm cực đại hoặc tính chất đạt được là A cho động học và B cho phương trình được kiểm soát.

Sự phụ thuộc thời gian của phương trình và động học kiểm soát quá trình xúc tác nhờ enzym được trình bày trên hình 8.10. Điểm cuối thích hợp của quá trình này ở chỗ nồng độ sản phẩm cực đại hoặc tính chất đạt được là A cho động học và B cho quá trình phương trình tính toán được. Ví dụ như quá trình biểu thị sự thuỷ phân lactozơ trong sữa hoặc huyết thanh sữa. Huyết thanh sữa là sản phẩm phụ trong quá trình làm phomat, mà các protein và chất béo bị ngưng kết trong sữa bằng cách bổ sung enzym “đông kết” (chymosin hoặc rennin, carboxyl–axit-peptidaza, EC 3.4.23.4). Huyết thanh sữa chứa khoảng 5% đường (chủ yếu là lactozơ, đường đôi galactosyl–glucozơ), 1% protein, 1% axit amin và 1% các ion (Ca^{2+} , Na^+ , ion photphat,...). Trước đây, các cơ sở sản xuất thủ công, huyết thanh sữa được sử dụng làm thức ăn gia súc hoặc cô đặc thành nhiều sản phẩm ngọt của địa phương. Ngày nay, trong các cơ sở sữa sản xuất phomat lớn, đến 10^7 tấn huyết thanh sữa hình thành mỗi năm nó không sử dụng được như trước kia, nhưng khi nó được thuỷ phân thì độ ngọt tăng lên. Enzym β -glucosidaza xúc tác thuỷ phân lactozơ cũng xúc tác để tổng hợp bằng kiểm soát động học thành đường hai và đường ba. Khi tiêu thụ lactozơ các oligosaccharit này bị thuỷ phân. Điều này được minh hoạ bằng sự hình thành các sản phẩm phụ không mong muốn trong quá trình xúc tác enzym. Các oligosaccharit là sản phẩm phụ trong quá trình thuỷ phân lactozơ được kiểm soát phương trình cân bằng. Mặt khác, trong quá trình tổng hợp oligosaccharit được kiểm soát động học mà nó có thể được sử dụng như là chất trợ sinh (prebiotic), sự hình thành các sản phẩm phụ dẫn đến việc thuỷ phân thành đường đơn. Việc hình thành các sản phẩm phụ phải được giảm thiểu tối đa bằng cách lựa chọn điều kiện, quy trình và chất xúc tác sinh học thích hợp.

8.3.3. Ưu thế ứng dụng công nghệ enzym ngày nay

Số lượng các sản phẩm nhận được nhờ các quá trình công nghệ sinh học công nghiệp và các enzym hiện nay được liệt kê chi tiết trong bảng 8.3. Giá trị của các enzym được ứng dụng làm chất xúc tác sinh học cho các ứng dụng khác nhau. Ngoài việc sử dụng trong công nghiệp, nhiều enzym còn được sử dụng cho mục đích phân tích, chẩn đoán bệnh, mặc dù chỉ một lượng nhỏ hơn 1% tất cả các enzym sản xuất được được sử dụng cho mục đích này. Một số enzym được sản xuất với số lượng ngày càng tăng cho mục đích điều trị bệnh.

Số lượng lớn các quy trình enzym (>100) được giới thiệu trong 30 năm qua thì ngày nay đã xem xét lại chi tiết hơn (Liese et al., 2000). Các quá trình, các hợp chất và các enzym được sử dụng cho các quá trình này đã được phân tích kỹ (Straathof et al., 2002). Các số liệu này chỉ ra rằng, các enzym thuỷ phân, thay thế và các enzym oxy hoá khử được sử dụng trong 2/3 tất cả các quá trình đó, trong khi đó chỉ khoảng 1% của khoảng 3.000 enzym đã biết đã được sử dụng cho mục đích công nghệ enzym và chữa bệnh.



Hình 8.11. Các bước cần xem xét để thiết kế quá trình enzym sản xuất các sản phẩm hiện có và các sản phẩm mới. "Độ thi" của quá trình = dây mà ở đó phản ứng có thể thực hiện với hiệu suất và độ tinh sạch đã cho và ở đó các tính chất (hoạt tính, độ nhạy và độ bền) của chất xúc tác sinh học tối ưu.

Trong khoảng 10 năm qua, cấu trúc không gian ba chiều (lập thể) và các cơ chế chi tiết của phản ứng mà chúng xúc tác đã được xác định cho nhiều enzym được xem là quan trọng trong công nghệ enzym. Thông tin này cho phép cải tiến hợp lý hơn các đặc tính của chúng cần thiết cho việc ứng

dụng chúng. Dựa trên các thảo luận trên và các thông tin được chỉ ra trên hình 8.11, số lượng các quy trình enzym mới hy vọng tăng lên trong thời gian tới. Thiết kế hợp lý và thuận lợi các quá trình này – cải tiến các quá trình hiện có – đòi hỏi sự hợp tác của nhiều lĩnh vực khoa học khác nhau: Các nhà hoá sinh, các nhà vi sinh, các nhà sinh học phân tử và các kỹ sư công nghệ. Các nhà sinh hoá cần phải xác định cơ chế và tính chất của các quá trình xúc tác, động học của quá trình xúc tác enzym và các tính chất liên quan khác của cơ chất, sản phẩm, enzym tự do và cố định (độ bền, khả năng hoà tan, sự phụ thuộc pH và nhiệt độ của hằng số cân bằng, độ chọn lọc) và lựa chọn chất mang thích hợp cho việc cố định để cung cấp các thông tin về tính chất của enzym cần được cải tiến (tính đặc hiệu, độ chọn lọc, tối ưu pH, khả năng bền vững, nhu cầu ion kim loại, hiệu quả trong quá trình lên men). Nhiệm vụ cho các nhà vi sinh vật học và sinh học phân tử là sàng lọc các enzym tốt hơn trong tự nhiên hoặc cải biến phân tử bằng công nghệ sinh học trong phòng thí nghiệm. Cuối cùng, các nhà kỹ thuật phải sử dụng các kiến thức của mình để nâng cấp quy trình lên mức độ sản xuất. Tuy nhiên, trong việc cải tiến các quy trình sau đó, các nhà kỹ thuật cũng phải xác định các yêu cầu của các nhà vi sinh vật, các nhà sinh hoá và các nhà sinh học phân tử.

8.4. TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYM CAO

8.4.1. Tuyển chọn các chủng sinh enzym cao từ tự nhiên

Vi sinh vật sống khắp nơi trên Trái Đất, chúng có khả năng biến đổi nhanh để duy trì sự sống và tồn tại trong các điều kiện sống thay đổi. Vi sinh vật có hệ enzym đa dạng và phong phú. Tuy nhiên không phải tất cả các vi sinh vật có khả năng sinh enzym như nhau, ngay cả những chủng cùng một giống cũng không cùng hoạt tính sinh tổng hợp enzym. Vì vậy, khi tuyển chọn vi sinh vật để tìm kiếm, lựa chọn và phân lập chủng có hoạt lực cao trong việc tạo thành enzym mong muốn là cần thiết. Ví dụ, muốn lựa chọn các chủng vi sinh vật sinh enzym chịu nhiệt nên lựa chọn từ suối nước nóng hay bể rác thải; tuyển chọn các vi sinh vật sinh enzym chịu kiềm, chịu axit phải từ nơi có độ kiềm cao hay axit cao; lựa chọn chủng sinh amylaza thì lựa chọn nơi có nhiều tinh bột; lựa chọn chủng sinh enzym chịu mặn thì nên lựa chọn chủng từ nguồn nước biển. Người ta phân lập những chủng vi sinh vật có khả năng sinh pectinaza thường từ những quả bị mốc; lựa chọn chủng sinh xenluloza thường tìm thấy ở các mẫu đất có nhiều xác thực vật bị phân huỷ.

Nấm mốc (hay còn gọi là nấm sợi) đã trở thành nguồn vi sinh vật chủ yếu dùng trong việc sản xuất enzym (bảng 8.5). Hiện nay có 80 loại enzym khác nhau được sản xuất ở mức độ công nghiệp từ nấm mốc, trong đó 10 loại được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp. Qua bảng 8.5 cho thấy, nhưng enzym thuỷ phân chủ yếu được sản xuất bằng nấm *Aspergillus* và nhóm vi khuẩn *Bacillus*.

Như vậy, trong tự nhiên, nhiều loại vi sinh vật có khả năng sinh các loại enzym khác nhau. Để tuyển chọn các loại vi sinh vật có khả năng sử dụng trong sản xuất đòi hỏi các bước nghiên cứu công phu, mất nhiều công sức. Tuy hiện nay có nhiều chủng vi sinh vật đã đưa vào sản xuất, nhưng còn nhiều lĩnh vực đòi hỏi tiếp tục nghiên cứu tuyển chọn các chủng mới nhằm phục vụ cao nhất cho con người. Ví dụ, hiện nay người ta vẫn tiếp tục sàng tuyển các chủng sinh enzym phân huỷ lignoxellulozơ cao sử dụng trong sản xuất cồn nguyên liệu, tuyển chọn các chủng có khả năng sinh enzym kiềm chế tế bào ung thư, sự nhân lên của virut,...

BẢNG 8.5. CÁC VI SINH VẬT SINH ENZYME ĐƯỢC SỬ DỤNG TRONG SẢN XUẤT

Vi sinh vật	Các enzym chính	Vi sinh vật	Các enzym chính
<i>Aspergillus oryzae KC</i>	Amylaza và proteaza	<i>Bacillus mesentericus</i>	Proteinaza
<i>Aspergillus oryzae 1476</i>	Amylaza và proteaza	<i>Bacillus subtilis</i>	Amylaza + proteinaza
<i>Aspergillus awamori</i>	Glucoamylaza	<i>Bacillus diastaticus</i>	Amylaza chịu nhiệt
<i>Aspergillus awamori</i>	Pectinaza	<i>Trichoderma viside</i>	Xenlulaza
<i>Aspergillus terricola</i>	Proteinaza	<i>Trichoderma lignorum</i>	Xenlulaza
<i>Aspergillus flavus</i>	Proteinaza	<i>Aspergillus terreus</i>	Xenlulaza
<i>Trichothecium roseum</i>	Xylanaza	<i>Aspergillus niger</i>	Xylanaza
<i>Aspergillus oryzae 4 – 9 – 15</i>	α -amylaza	<i>Streptomyces fradiae</i>	Proteinaza + estraza
<i>Aspergillus awamori</i>	Proteinaza axit	<i>Dtreptomyces griseus</i>	Proteinaza + estraza
<i>Aspergillus candidus</i>	Proteinaza + rennin	<i>Fabospora flagilis</i>	β -galactosidaza

8.4.2. Thị trường enzym trên thế giới

Như trình bày ở trên, nhiều loại enzym đã được đưa vào sản xuất ở mức độ công nghiệp. Mức doanh thu từ các sản phẩm enzym lên đến hàng tỷ USD. Nhiều hãng sản xuất đã đầu tư để nâng cao năng suất chủng sản xuất nhằm hạ giá thành sản phẩm. Đứng đầu trong các nhà sản xuất vẫn là hãng NovoEnzymes. Sau đây xin đưa ra ví dụ về thị trường enzym proteaza trên thế giới.

Trong số chế phẩm proteaza thương mại thì thị phần proteaza vi sinh vật chiếm vị trí độc tôn. Giá trị thương mại của enzym proteaza năm 1987 là 254,6 triệu USD. Trong đó 75% toàn bộ số proteaza được sử dụng trong công nghiệp sản xuất bột giặt, 10% trong sản xuất phomat và ứng dụng khác là trong công nghiệp thuộc da và chế biến thực phẩm. Xin kể một số chế phẩm enzym của một số hãng sản xuất lớn trên bảng 8.6.

Trước đây trong ngành sản xuất phomat tăng trưởng kèm theo nhu cầu proteaza rennet gia tăng, mà nguồn enzym rennet từ dạ dày bê non, càng ngày càng trở nên hiếm và đắt. Từ những năm 1980, người ta bắt đầu nghiên cứu tìm nguồn proteaza thay thế rennet từ vi sinh vật, sau khi đã có những thử nghiệm dùng proteaza từ thực vật cho mục đích trên. Hiện nay, rennet vi sinh vật được sản xuất chủ yếu từ một số loại nấm *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* và *Endothia parasitica*.

BẢNG 8.6. ENZYME KỸ THUẬT TỪ VI SINH VẬT VÀ NHÀ SẢN XUẤT

Nguồn enzym	Tên thương mại và nhà sản xuất
Proteaza axit (carboxyl proteaza)	
<i>Rhizopus sp.</i>	Sumizyme RP [SN]; Newlase [AM]
<i>A. oryzae</i>	Corolase Ps [RM]; Veron PS [RM]
<i>A. niger</i>	Sumizyme LP [SN]; Sanzyme [SA]
<i>A. saitoi</i>	Sumizyme FP [SN]; Proctase [MJ]
<i>Mucor miehei</i>	Seishin Pharm, Co Noda, Japan [MJ]
<i>Mucor pusillus</i>	Rennilase [NO]; Fromase [GB]; Maryzyme [SOE]; Morcurd Plus [NO]; Meito rennet [MSJ]; Noury Lab [MSJ]
Proteaza kim loại	
<i>B. amyloliquefaciens</i> (<i>B. subtilis</i>)	Neutrerase [NO]; Corolase [GR]; Orientase [UA]; Veron P [RM]; Bioprase [NG]; Rhozyme [GR]
<i>B. thermoproteolyticus</i>	Thermoase [DA]
Serin proteaza	
<i>A. sojae</i>	Corolase PN [RM]
<i>A. melleus</i>	Sumizyme MP [SN], [AM]
<i>A. licheniformis</i>	Alkalase [NO]; Optimase [SO]; Maxatase P [GB]
<i>Bacillus sp.</i>	Esperase [NO]; Savinase [NO]
<i>B. griseus</i>	Pronase [KK]

Rennet từ *Mucor pusillus* có khối lượng phân tử 30.000 Da, chứa 2 cystein tạo nên một cầu disunphit, pH tối ưu trên cơ chất hemoglobin là 4,0,

ổn định trong khoảng pH 2,0–6,0. *Mucor miehei* có khối lượng phân tử 38.000 Da, hoạt động giống rennet từ *Mucor pusillus* nhưng mạnh hơn khoảng 50%. Rennet từ *Endothia parasitica* có khối lượng phân tử 34.000–39.000 Da, pH tối ưu trên cơ chất hemoglobin là 2,0, ổn định trong khoảng pH 4,0–4,5. Không những người ta dùng các loại nấm mốc để sản xuất, mà còn nghiên cứu chủng vi khuẩn (*E. coli*) tái tổ hợp sản xuất rennet công nghiệp (bảng 8.7).

Là một trong những enzym kỹ thuật đóng vai trò quan trọng trong công nghiệp sản xuất và chế biến tinh bột thành sirô fructozơ–nguồn cung cấp chất ngọt có giá trị hiện nay, glucozơ–isomeraza xúc tác phản ứng đồng phân hoá glucozơ thành fructozơ—một loại đường đơn có độ ngọt hơn đường ăn, nhưng lại chứa ít năng lượng hơn, do vậy có nhu cầu rất lớn sử dụng nó để thay đường ăn. Hiện chủ yếu người ta sản xuất hỗn hợp glucozơ (52%) và fructozơ (42%) từ tinh bột ngô với sản lượng hàng năm khoảng 5–6 triệu tấn sirô fructozơ HFCS (high-fructose corn syrup) từ ngô.

BẢNG 8.7. CHẾ PHẨM RENNET THƯƠNG MẠI

Tên thương mại	Hãng sản xuất	Nguồn gốc
CHY-MAX	Pfizer Inc. [PF]	<i>E.coli</i> K-12
EMPRORASE	Sanofi-Bio-Industries Inc. [SBI]	<i>M.pusillus lindt</i>
FROMASE	Gist Brocades N.V. [GB]	<i>M. miehei</i>
HANNILASE	Chr. Hansen's Lab. A/S [CH]	<i>M. miehei</i>
MARZYME	Solvay Enzym Inc. [SOE]	<i>M. miehei</i>
Meito- RENNET	Meito Sangyo Co.,Ltd [MSJ]	<i>M. pusillus lindt</i>
MORCURD PLUS	Novo Nordisk A/S [NO]	<i>M. miehei</i>
RENNILASE	Novo Nordisk A/S [NO]	<i>M. miehei</i>

BẢNG 8.8. CHẾ PHẨM GLUCOZƠ ISOMERAZA THƯƠNG MẠI

Tên thương mại	Nhà sản xuất	Nguồn gốc
GODO-GI	Godō Shusei Co.Ltd. [GO]	<i>Streptomyces griseofuscus</i>
Taka- Sweet	Solvey Enzyms Inc. [SOE]	<i>S. olivaceus</i>
Spezyme GI	Cultor Ltd.[CL]	<i>A. rubiginosus</i>
Optisweet	Solvey Enzyms GmbH [SO]	
G-zyme G 993	CPCInternational/Div Enzym Biosystems Ltd. [CPC]	<i>S.olivochromogenes</i>
	Roquette Freres S.A. [RF]	<i>S. violaceoniger</i>
Swetase	Nagase Co. Ltd.[NG]	<i>S. phaeochromogenes</i>
Sweetzyme	Novo Nordisk A/S [NO]	<i>Bacillus coagulans</i>
Glucozơ isomerase	ICI Biological Products [ICI]	<i>Arthrobacter sp.</i>

Chế phẩm glucozo-isomeraza chủ yếu được sản xuất từ vi khuẩn và ứng dụng enzym này trong sản xuất công nghiệp được bắt đầu từ khi áp dụng công nghệ sử dụng enzym glucozo-isomeraza cố định lên chất mang không tan. Nhiều chế phẩm thương mại cũng đã được sản xuất mức độ công nghiệp cho sản xuất phomat (bảng 8.8).

Trên đây chỉ lấy ví dụ về sản xuất các chế phẩm enzym được ứng dụng trong một số ngành công nghiệp chế biến. Trên thị trường thương mại, các chế phẩm enzym không ngừng được cải tiến bằng các tiến bộ khoa học nhằm hạ giá thành và đưa ra các chế phẩm enzym mới.

8.4.3. Công nghệ sản xuất enzym sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Cho đến cuối những năm 70 của thế kỷ XX, tất cả enzym được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau của đời sống con người: trong sản xuất nông nghiệp, trong công nghiệp và y tế đều được tổng hợp tự nhiên trong cơ thể động vật, thực vật và vi sinh vật. Tuy nhiên, không phải tất cả enzym đều luôn có mặt ở số lượng đủ cho phép thu nhận chúng. Ngược lại, rất nhiều enzym, đặc biệt những enzym có tính chất xúc tác đặc biệt lại thường luôn chỉ tồn tại ở số lượng ít ỏi rất khó có thể thu nhận chúng ở số lượng mong muốn với giá thành chấp nhận. Do vậy, sự xuất hiện của kỹ thuật ADN tái tổ hợp là một bước ngoặt có tính cách mạng cho phép, về nguyên tắc, thu nhận bất kỳ loại enzym nào ở số lượng cần thiết với giá thành thấp.

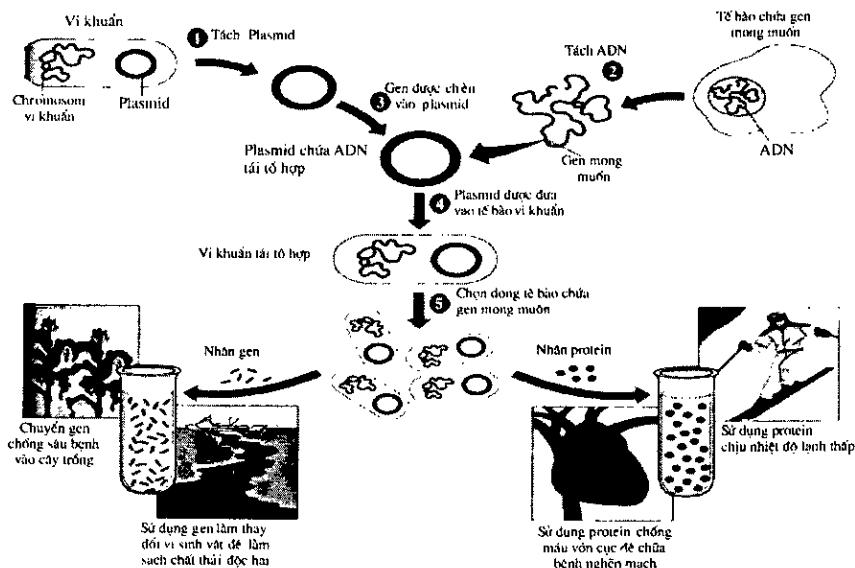
Bản chất của vấn đề trên là việc sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, đưa những gen mã hoá tổng hợp protein–enzym mong muốn vào tế bào sống (động vật, thực vật và đặc biệt là vi sinh vật), biến chúng thành nhà máy sản xuất phân tử protein – enzym nói trên. Hiện nay, người ta chủ yếu tập trung chuyển gen vào cơ thể vi sinh vật, phổ biến nhất là *E. coli* vì những lý do sau: *E. coli* đã được nghiên cứu rất kỹ, nuôi cấy dễ dàng với giá thành thấp, và đặc biệt, nó có vòng đời ngắn. Sinh khối *E. coli* nuôi cấy trên môi trường giàu chất dinh dưỡng tăng gấp đôi trong 20 phút. Hơn nữa, do tế bào *E. coli* rất bé, nên người ta có thể nuôi cấy hàng tỷ tế bào trong đĩa Petri đường kính 10cm cho phép dễ dàng cùng một lúc xử lý một số lượng rất lớn cá thể để tìm cá thể đột biến tái tổ hợp mang gen mong muốn. Sơ đồ sử dụng plasmid tái tổ hợp để sửa đổi vi khuẩn theo ý muốn nhằm tạo cá thể đột biến mang gen mã hoá tổng hợp protein–enzym mong muốn (xem chương 2).

Plasmid—một loại ADN vòng của vi khuẩn, hay của phage, có kích thước nhỏ hơn nhiều so với nhiễm sắc thể của vi khuẩn, có khả năng tồn tại và tự sao chép độc lập trong tế bào chủ—ví dụ như trong tế bào *E. coli*. Vì tính

chất trên nên plasmid có thể mang gen lạ và có thể tự nhân đôi ngay trong tế bào vi khuẩn. Plasmid là công cụ chính trong công nghệ tái tổ hợp ADN. Hình 8.12 giúp ta hiểu được một cách tổng quát tại sao có thể dùng plasmid để sửa chữa hoặc xây dựng mới một tế bào vi khuẩn.

Trước hết người ta phân lập plasmid từ vi khuẩn như *E. coli* chẳng hạn, đồng thời tiến hành tách đoạn ADN là gen mong muốn cần ghép vào plasmid. Tiếp theo tiến hành chuyển plasmid tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn tiếp nhận tạo ra vi khuẩn tái tổ hợp. Chọn vi khuẩn tái tổ hợp mang gen mong muốn và nhân bản tạo ra vô số phiên bản của nó. Cuối cùng là việc sử dụng các phiên bản nói trên vào các mục đích khác nhau. Ví dụ điển hình là việc tạo *E. coli* tái tổ hợp tổng hợp enzym chymosin.

Do thiếu nguồn cung cấp rennin (hay dịch rennet), người ta đã thử thay thế nó bằng proteaza từ nấm *Endothia parasitica* và *Mucor miehei*. Tuy nhiên theo đánh giá chung, chất lượng của những enzym này không bằng rennin từ dạ dày bê sữa. Hiện nay, nhu cầu về chymosin được đánh giá có giá trị khoảng 100 triệu USD và ngày càng gia tăng tạo sức ép thúc đẩy việc sản xuất chymosin tái tổ hợp. Tháng 3 năm 1990, cơ quan an toàn thuốc và thực phẩm của Mỹ đã chính thức cho phép sử dụng chymosin tái tổ hợp sản xuất trong *E. coli*.



Hình 8.12. Sơ đồ chuyển gen tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp

Bằng phương pháp tái tổ hợp ADN, người ta đã tạo được chủng siêu tổng hợp enzym cũng như tạo được điều kiện thu nhận enzym dễ dàng hơn. Ví dụ, một số enzym nội bào, bằng công nghệ tái tổ hợp người ta chuyển gen vào các chủng vi sinh vật sản sinh enzym ngoại bào để thu nhận và tinh chế enzym thuận lợi hơn.

8.5. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VI SINH VẬT ĐỂ SẢN XUẤT ENZYM

Hiện nay, công nghiệp sản xuất enzym trên thế giới thường áp dụng hai phương pháp: Nuôi cấy bề mặt và nuôi cấy chìm.

8.5.1. Phương pháp nuôi cấy bề mặt

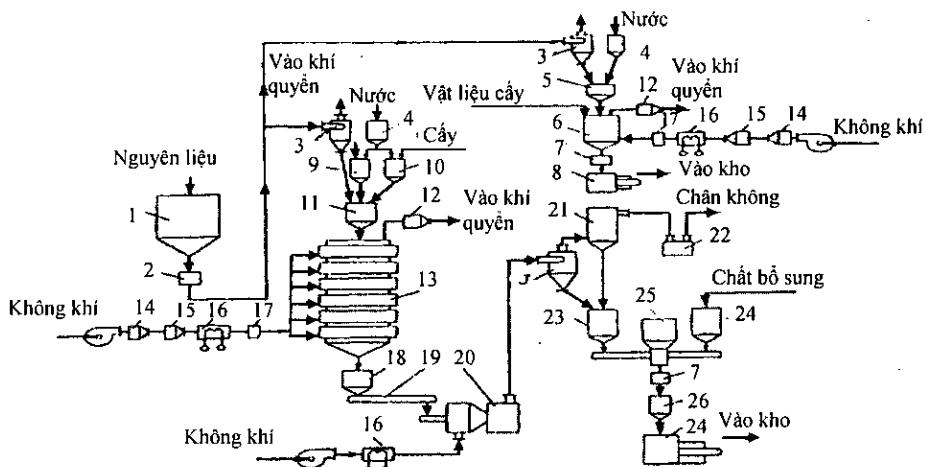
Trong phương pháp nuôi cấy bề mặt, vi sinh vật được phát triển trên bề mặt môi trường rắn hoặc lỏng. Các môi trường rắn trước khi nuôi cấy vi sinh vật cần được làm ẩm. Nguyên liệu thường dùng làm môi trường là cám gạo, đôi khi dùng gạo tấm, ngô, bã bia, bã củ cải đường, khoai tây, lõi ngô,... hoặc hỗn hợp các nguyên liệu này.

Nguyên liệu làm môi trường hay dùng nhất là cám, nhất là cám mỳ có tương đối đầy đủ chất dinh dưỡng và khi làm ẩm sẽ tạo ra môi trường rất thích hợp cho nấm mốc phát triển, sinh ra nhiều enzym. Để đảm bảo đầy đủ chất dinh dưỡng trong môi trường, người ta bổ sung thêm các nguồn nitơ, photpho, kali hoặc các chất kích thích sinh trưởng như mầm mạ, nước khoai tây, cao ngô,.... Độ ẩm môi trường nuôi cấy thích hợp nhất là 58–60%, nếu quá ướt, môi trường sẽ bết lại, dễ bị nhiễm khuẩn; nếu khô quá dưới 40%, nấm khó phát triển, dễ sinh bào tử và sản sinh ít enzym. Trong quá trình nuôi, môi trường dễ bị khô do hơi nước dễ thoát ra, cho nên cần giữ độ ẩm không khí phòng nuôi khoảng 90–100%.

Sau khi chuẩn bị xong, môi trường được hấp thanh trùng ở 1 đến 1,5 atm bằng hơi nóng trong 45–60 phút. Môi trường được đưa vào các khay nuôi với độ dày của môi trường khoảng 2,5 đến 3cm, sau đó cấy giống vào khay với tỷ lệ giống cấy khoảng 0,2–2%. Nhiệt độ phòng nuôi thích hợp từ 25–30°C tùy từng loại giống vi sinh vật. Có những loại vi sinh vật ưa nhiệt thì nhiệt độ nuôi cần phải cao hơn.

Sơ đồ quá trình công nghệ sản xuất enzym bằng phương pháp bề mặt trên môi trường xốp được trình bày trên hình 8.13.

Thời gian nuôi nấm mốc sinh enzym thường kéo dài 36–60 giờ. Nhiều loại *Aspergillus* tạo enzym cao nhất lúc bắt đầu sinh bào tử còn một số nấm mốc tích tụ enzym cao nhất vào lúc sinh nhiều bào tử.



Hình 8.13. Sơ đồ công nghệ sản xuất các chế phẩm enzym thô trên môi trường xốp

1. Thùng nhận nguyên liệu; 2. Định lượng; 3. Xyclon; 4. Nồi thanh trùng nước; 5. Nồi thanh trùng nguyên liệu; 6. Thiết bị nhân giống; 7. Nạp nguyên liệu; 8. Bộ phận tự động phân chia nguyên liệu; 9. Thiết bị chuẩn bị dung dịch muối khoáng; 10. Thiết bị phổi trộn; 11. Nồi thanh trùng môi trường; 12. Phin lọc không khí sạch; 13. Thiết bị tán nhỏ; 14. Lọc thô; 15. Lọc vi khuẩn; 16. Calorife; 17. Máy tạo ẩm không khí; 18. Thùng chứa môi trường nhân giống nấm; 19. Cơ cấu vận chuyển; 20. Thiết bị sấy và nghiền; 21. Lọc; 22. Bơm chân không; 23. Thùng chứa môi trường đã nuôi cấy; 24. Thùng chứa chất bổ sung; 25. Máy nghiền trộn; 26. Thùng chứa chế phẩm; 27. Máy đóng gói tự động.

Quá trình nuôi cấy nấm mốc sinh enzym bằng phương pháp lén men bề mặt trên môi trường xốp được chia làm 3 thời kỳ:

– Khoảng 10–14 giờ đầu, bào tử trương nở, bắt đầu nảy mầm. Thời kỳ này không hình thành enzym, không đòi hỏi nhiều không khí, cho nên chỉ cần làm thoáng khoảng 2–3 thể tích không khí/thể tích phòng nuôi/giờ.

– Thời kỳ giữa kéo dài khoảng 14–18 giờ: Mốc phát triển nhanh, hô hấp mạnh. Sợi nấm có thể quan sát bằng mắt thường, lúc đầu là lớp lông tơ màu trắng-xám, sau đó càng rõ, làm môi trường kết bánh lại. Môi trường có thể lật lên, bẻ nhỏ ra để sợi nấm mọc nhanh hơn. Thời kỳ này, chất dinh dưỡng tiêu hao mạnh, hô hấp mạnh và sinh nhiều nhiệt làm môi trường nóng lên, có thể lên tới $37\text{--}40^{\circ}\text{C}$. Thời kỳ này phải thông khí mạnh, tối 60 thể tích khí/thể tích phòng/giờ, vừa để cung cấp oxy, thải CO_2 , vừa làm giảm nhiệt độ phòng nuôi. Nhiệt độ phòng nuôi ở giai đoạn này cần giữ ở $28\text{--}29^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm trong phòng khoảng 100%.

– Thời kỳ thứ ba kéo dài từ 10–20 giờ: Trao đổi chất yếu dần, lượng nhiệt tạo ra giảm và tiếp tục sinh enzym. Thông khí không quá 20–25 thể tích không khí/thể tích phòng nuôi/giờ và giữ nhiệt độ phòng nuôi ở 30°C. Tuỳ thuộc vào đặc tính sinh lý của giống mốc mà thời gian nuôi cấy có thể kết thúc tại thời điểm mà hàm lượng enzym tạo thành tối đa. Hiện nay, quá trình sản xuất enzym bằng phương pháp lên men bề mặt đã được cơ khí hoá ở mức độ sản xuất công nghiệp.

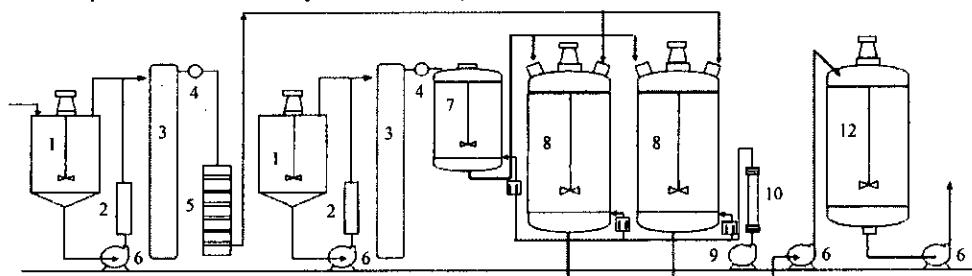
Những năm gần đây, phương pháp nuôi mốc bề mặt được cải tiến: Nuôi trong thùng quay, nuôi trong lớp dày môi trường có thổi khí, nuôi trong buồng nuôi được cơ khí hoá có những rãnh thẳng đứng. Tuy nhiên, phương pháp nuôi trên khay vẫn tiện lợi và đơn giản, được áp dụng phổ biến.

Môi trường sau khi nuôi cấy được sấy khô xuống độ ẩm dưới 12%, nghiền nhỏ, đựng trong các bao polyetylen hay giấy chống ẩm. Sản phẩm này có thể dùng trực tiếp để làm tương, làm nước chấm, đường hoá trong công nghiệp rượu bia hoặc dùng làm nguyên liệu để tách chiết enzym tinh khiết.

8.5.2. Phương pháp nuôi cấy chìm

Nuôi cấy vi sinh vật sinh enzym theo phương pháp nuôi cấy chìm ở quy mô công nghiệp được thực hiện trong các nồi lên men có khuấy và thổi khí liên tục. Quá trình này tương tự như quá trình lên men sản xuất axit amin hay các chất kháng sinh.

Không thể có môi trường nuôi cấy chung cho tất cả các chủng vi sinh vật, vì vậy phải lựa chọn môi trường, tỷ lệ các chất dinh dưỡng cho thích hợp với từng chủng, đặc biệt phải chú ý đến các chất cảm ứng cần thiết để cho vi sinh vật sản sinh ra enzym ở mức độ tối đa.



Hình 8.14. Sơ đồ sản xuất các chế phẩm enzym trong môi trường dinh dưỡng lỏng bằng phương pháp lên men chìm

1. Thùng trộn môi trường dinh dưỡng; 2. Nồi thanh trùng; 3. Thùng chứa; 4. Van xả; 5. Thiết bị trao đổi nhiệt; 6. Bơm ly tâm; 7. Thùng dịch lên men; 8. Thùng lên men; 9. Máy nén khí; 10. Phin lọc khí chung; 11. Phin lọc khí riêng; 12. Thùng chứa dịch lên men (chế phẩm enzym thô dạng lỏng)

Về nguyên lý, quy trình sản xuất enzym bằng phương pháp lên men chìm giống như quá trình sản xuất các chế phẩm sinh học khác. Quá trình lên men trải qua các khâu: Chuẩn bị môi trường, hoạt hoá giống, nhân giống trên máy lắc, nhân giống trong nồi lên men và lên men trên nồi lên men cấp độ lớn. Lượng nhân giống thường là 5–10% so với thể tích môi trường nuôi, thời gian lên men kéo dài từ 2–4 ngày tùy từng loại vi sinh vật. Đa số các loại enzym thuỷ phân do nấm mốc và xạ khuẩn tạo thành được tách vào môi trường, phần còn lại trong hệ sợi nấm sau 3 ngày nuôi cấy khoảng 10–15%. Sơ đồ quá trình công nghệ nuôi cấy vi sinh vật theo phương pháp lên men chìm trong sản xuất enzym được trình bày trên hình 8.14.

8.6. TÁCH CHIẾT VÀ TINH SẠCH CHẾ PHẨM ENZYME

Trong thực tế sản xuất, các chế phẩm enzym được sử dụng dưới các dạng khác nhau: Dạng nước, dạng sấy khô, dạng tinh khiết. Cũng tuỳ thuộc vào mục đích sử dụng mà người ta sử dụng các phương pháp tách chiết enzym khác nhau.

8.6.1. Từ môi trường nuôi cấy bể mặt

Để chiết rút enzym khỏi môi trường rắn, người ta có thể dùng nước, các dung môi trung tính, các dung môi hữu cơ như cồn hoặc axeton. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy, dùng nước vào mục đích này có kết quả tốt nhất và dễ được dùng rộng rãi trong sản xuất.

Phương pháp tách chiết và làm sạch enzym được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay là phương pháp kết tua bằng dung môi hữu cơ như etanol, isopropanol và axeton. Các dung môi hữu cơ này làm giảm hằng số điện môi của dung dịch enzym cho nên lực hút tĩnh điện tỷ lệ nghịch với hằng số điện môi làm các enzym có bản chất protein trong hệ dung dịch nước – dung môi hữu cơ sít tua và lắng xuống. Như vậy, độ hòa tan của enzym vào dung dịch cồn – nước phụ thuộc vào nồng độ cồn, nhiệt độ, pH, lực hút ion của dung dịch và tính chất của enzym. Thông thường người ta bổ sung 3 đến 4 thể tích cồn vào 1 thể tích dung dịch enzym. Để tránh làm mất hoạt tính của enzym, quá trình này phải được làm lạnh xuống 3–5°C, sau khi khuấy trộn, các enzym kết tua xuống cần tách enzym ngay. Enzym được rửa tiếp bằng cồn cao độ, sau đó cô trong bình hút ẩm hoặc trong máy đông khô, sản phẩm nhận được sẽ có dạng bột.

Phương pháp tách chiết enzym thứ hai thường được sử dụng là dùng muối trung tính để kết tủa. Bằng phương pháp này, hoạt tính của chế phẩm enzym thường cao hơn phương pháp dung môi. Muối trung tính thường dùng là sunphat amon với tỷ lệ 50–60% (hoặc cao hơn) so với dịch chiết enzym. Người ta có thể cho ngay dung dịch muối thẳng vào môi trường lên men hoặc dịch lên men đã được cô đặc sơ bộ, như vậy sẽ tiết kiệm được muối amon. Tùy theo từng loại chế phẩm có thể để lại muối sunphat trong chế phẩm, còn do yêu cầu không cần muối sunphat trong chế phẩm thì người ta phải loại muối bằng cách thẩm tích qua màng bán thẩm.

8.6.2. Từ môi trường nuôi cấy chìm

Dịch nuôi cấy chìm sau khi lọc sinh khối vi sinh vật và các tạp chất rắn không hòa tan thường còn lại 1–3% chất khô hòa tan trong dịch lọc, trong đó có enzym. Về nguyên tắc, tách chiết enzym từ dịch nuôi cấy chìm cũng tương tự như các phương pháp tách chiết từ dịch chiết môi trường nuôi cấy bể mặt. Do hàm lượng chất khô ít, cho nên người ta thường phải cô để giảm thể tích xuống từ 4–10 lần trong điều kiện cô châm không ở 25–30°C, rồi tiến hành tách enzym. Ngoài phương pháp cô châm không để giảm thể tích dịch chiết, người ta còn sử dụng phương pháp hấp phụ bằng nhựa trao đổi ion hoặc các chất có hoạt tính bề mặt, sau đó tiến hành giải hấp phụ bằng các loại dung môi. Để tăng thêm khả năng hấp phụ của các chất hấp phụ, người ta có thể bổ sung thêm một số hoá chất như sunphat amon.

Ngoài các phương pháp trên, người ta còn dùng một số phương pháp khác để tinh sạch enzym như phương pháp lọc gel, phương pháp điện di, phương pháp siêu ly tâm,...

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 8

1. Về nguyên tắc, enzym có thể thực hiện xúc tác mãi mãi, chỉ thực hiện xúc tác một lần sau đó mất hoạt tính, không có khả năng phục hồi sau một lần xúc tác hay chỉ xúc tác một vài lần?
2. Trên bể mặt của enzym thường có khe hở nhỏ mà chức năng của chúng như là điểm hoạt động hoặc điểm xúc tác mà ở đó một hay hai cơ chất có khả năng liên kết. Một enzym thường xúc tác cho bao nhiêu phản ứng?
3. Sự liên kết của cơ chất với enzym làm cho enzym linh hoạt, thay đổi hình dạng nhẹ nhàng thông qua quá trình điều chỉnh cảm ứng để hình thành các khuôn trung gian tạo thành tổ hợp. Tổ hợp này có tên là gì?

4. Các nhóm chất: (a) Các ion kim loại như Ca^{2+} , Mg^{2+} , và K^+ ; (b) Các phân tử hữu cơ gọi là coenzym; (c) Các loại đường đơn và (d) NAD^+ , NADP^+ , FAD và coenzym A (CoA), nhóm nào không phải là cofactor của enzym?
5. Các enzym khác nhau cho mỗi loại phản ứng trong tế bào và ngoài tế bào, chúng được phân loại thành mấy nhóm lớn?
6. Ai trong số các nhà khoa học phản đối ý tưởng cho rằng, lén men là kết quả của quá trình hoá học và rằng nấm men là chất không tồn tại suốt trong quá trình phân giải mà việc lén men không thể thực hiện được trừ phi cơ thể sống (nấm men) tồn tại trong đó?
7. Ai trong số các nhà khoa học đã chứng minh rằng, dịch chiết của tế bào nấm men có thể chuyển hóa glucozơ thành etanol và cacbon dioxit?
8. Người ta gọi riêng phần protein của enzym là gì?
9. Các loại enzym xúc tác phản ứng gắn thêm phân tử nước vào một liên kết, thuỷ phân nó thuộc nhóm enzym nào?
10. Các loại enzym xúc tác các phản ứng trong đó 2 nhóm hoá học được liên kết (nối lại) có sử dụng năng lượng từ ATP thuộc nhóm enzym nào?
11. Về mặt lý thuyết, tốc độ phản ứng hoá học được xác định bởi giá trị năng lượng hoạt hoá, tức là mức năng lượng các chất tham gia phản ứng phải đạt được để cắt đứt các liên kết cần thiết và hình thành các liên kết mới. Các enzym ảnh hưởng tới tốc độ phản ứng, nhưng có ảnh hưởng tới cân bằng phản ứng không?
12. Michaelis và Menten đã đưa ra mô hình động học giải thích phản ứng enzym và lập phương trình phản ánh mối quan hệ giữa vận tốc phản ứng với nồng độ cơ chất $[S]$ và enzym, vậy, nồng độ $[ES]$ càng lớn thì vận tốc phản ứng xảy ra như thế nào?
13. K_m có giá trị tính theo mol bằng nồng độ tính theo mol của cơ chất ở thời điểm tốc độ phản ứng ban đầu do enzym xúc tác V_0 bằng bao nhiêu phần của V_{max} ?
14. Trong quá trình nuôi cấy nấm mốc sinh enzym bằng phương pháp lén men bề mặt trên môi trường xốp, thời kỳ mà bào tử trưởng nở, bắt đầu nảy mầm và không hình thành enzym (thời kỳ đầu), đòi hỏi hay không đòi hỏi cấp nhiều không khí?
15. Để chiết rút enzym khỏi môi trường rắn, người ta sử dụng nước, các dung môi trung tính, các dung môi có cực hay dung dịch muối khoáng cho kết quả tốt nhất và dễ được dùng rộng rãi trong sản xuất?

Chương 9

CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM TRAO ĐỔI CHẤT SƠ CẤP (BẬC MỘT)

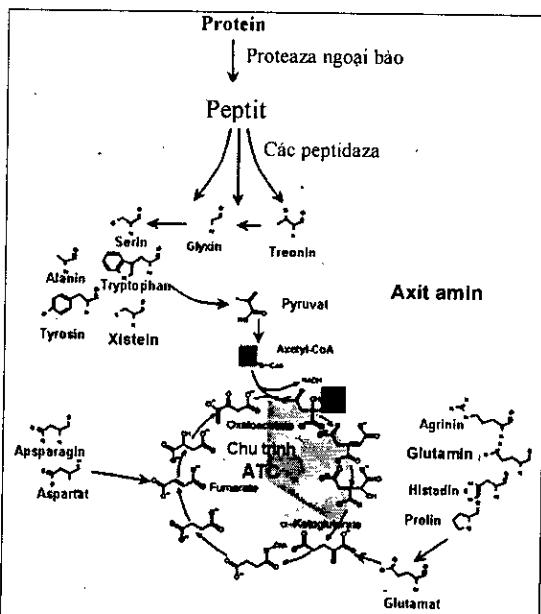
9.1. CÁC CHẤT TRAO ĐỔI SƠ CẤP

9.1.1. Các con đường trao đổi các chất sơ cấp

Protein là hợp chất hữu cơ cao phân tử có chứa 15–17,5% nitơ (tính theo khối lượng khô) và là thành phần quan trọng trong cơ thể động vật, thực vật và vi sinh vật. Tất cả các protein đều có cấu tạo từ axit amin. Các axit amin được tạo thành trong quá trình trao đổi chất trong tế bào. Việc tổng hợp axit amin thông qua nhiều phản ứng hoá học với sự xúc tác của các enzym khác nhau, nhưng có thể quy về hai loại phản ứng: Amin hoá và chuyển amin. Các axit amin có trong tế bào ở dạng tự do là nguyên liệu tổng hợp các phân tử protein.

Quá trình phân giải protein nhờ proteaza của cơ thể sinh vật thành các phân tử nhỏ hơn. Các chất này tiếp tục phân huỷ thành axit amin nhờ peptidaza, một phần xây dựng lên cấu trúc của tế bào và một phần phân giải thành NH_3 và N_2 (hình 9.1).

– Các vi sinh vật gây thối rữa tạo ra nhiều proteaza ngoại bào, các enzym này có thể được tiết ra môi trường đến 1g/lít. Người ta có thể tách chiết các enzym này ra và sử dụng trong công nghiệp. Các enzym proteaza



Hình 9.1. Giản đồ các con đường phân giải protein ở ngoài và trong tế bào của vi khuẩn và khả năng chuyển hóa của các axit amin trong tế bào

của nhiều nấm mốc được dùng trong công nghiệp làm nước chấm, tương, làm phomat. Ngoài ra cũng còn một số enzym proteaza nội bào, chúng chỉ hoạt động ở pha suy vong và là nguyên nhân của hiện tượng tự phân.

– Peptidaza phân giải các polypeptit thành axit amin. Ví dụ pepton là sản phẩm phân giải chưa hoàn toàn của protein. Trong công nghiệp, pepton được sản xuất nhờ enzym pepsin. Đây là hợp chất được dùng nhiều trong phòng thí nghiệm để nuôi cấy vi sinh vật. Pepton bao gồm khoảng 30% axit amin, phần còn lại là dipeptit, tripeptit và polypeptit, hòa tan trong nước và không bị kết tủa khi đun nóng.

Các enzym phân giải các axit amin: Các enzym này chịu trách nhiệm phân giải axit amin thường nằm trong hệ thống enzym có gen điều chỉnh với các điều kiện cần là:

+ pH của môi trường: Các decacboxylaza được tổng hợp ở môi trường axit, còn desaminaza được tổng hợp tốt nhất trong môi trường kiềm.

+ Thành phần của môi trường: Sự có mặt của nguồn đường làm tăng khả năng tổng hợp của decacboxylaza, nhưng vượt quá nhu cầu sẽ hạn chế.

+ Áp lực hơi oxy: Oxy phân tử cần thiết cho quá trình khử amin oxy hoá (lyzin desaminaza – LDA; tryptophan desaminaza – TDA), nhưng nó có thể ức chế quá trình khử amin không oxy hoá (ví dụ aspartaza).

Sự phân giải các axit amin thường được thực hiện bằng cách khử amin hoặc khử cacboxyl hay chuyển amin. Không như sự phân giải các hợp chất gluxit, các phản ứng phân giải axit amin không dẫn đến sự tăng trưởng lượng dưới dạng ATP, năng lượng của các dây nối peptit khi bị phân cắt sẽ mất đi dưới dạng nhiệt. Chỉ có sự phân giải “bộ xương” cacbon là có thể sinh ra năng lượng hữu ích cho sự tổng hợp của tế bào.

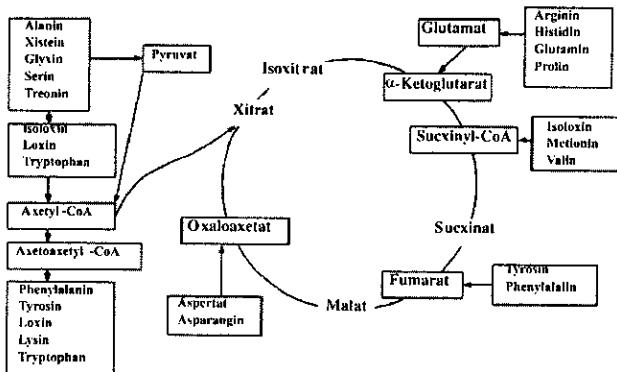
Quá trình amon hoá protein (vô cơ hoá protein) là sự phân giải protein kèm theo sự tạo thành amoniacy. Khi tiến hành hô hấp kỹ khí, axit amin bị khử amin, phần không chứa amin được chúng sử dụng để tạo năng lượng.

Người ta cho rằng, các vi sinh vật phản nitrat hoá sẽ kết thúc khâu cuối cùng của quá trình vô cơ hoá protein ở trong đất.

Trong công nghiệp làm nước mắm, làm tương, làm nước chấm từ động, thực vật, người ta chủ động cấy vi sinh vật có khả năng phân giải protein để thu nhận các sản phẩm phân giải dở dang mà người và động vật dễ đồng hoá. Quá trình làm tương gồm các khâu chính là làm mốc tương, ngâm nước đậu và ngả tương. Mốc tương tự nhiên có *Aspergillus oryzae* (mốc vàng hoa

cau). Trong thành phẩm của tương có 15–18% đường, 2g/lít axit amin, nên tương vừa ngon vừa bổ. Tương nổi tiếng như tương Cự Đà, tương Bần.

Nước chấm được chế biến từ các nguyên liệu giàu protein: Mazi từ động vật, xì dầu từ đậu nành, nước chấm từ đậu nành và khô lạc. Vi sinh vật sử dụng là mốc vàng hoa cau, sau khi mốc phát triển người ta chiết rút bằng nước muối. Nước chấm có nồng độ đậm đạt 15–20g/lít, nước chấm phải không có aflatoxin, nhìn bề ngoài có thể có một loại mốc giống như mốc vàng hoa cau là Aspergillus flavus có khả năng sinh aflatoxin. Nước mắm Phú Quốc nổi tiếng ngon là do trong quá trình chế tạo, người ta sử dụng vi sinh vật lên men kỵ khí, tuy lâu hơn, trong quá trình ngâm lâu đã hình thành các hương vị đặc biệt.



Hình 9.2. Mối liên hệ giữa chu trình Krebs (ATC)

Quá trình tổng hợp protein ở tế bào nhân nguyên thuỷ (nhân sơ) được trình bày trên hình 9.1. Phần lớn các vi sinh vật có khả năng tổng hợp mới tất cả 20 loại axit amin. Con đường sinh tổng hợp 20 loại axit amin ở vi sinh vật đã được nghiên cứu kỹ lưỡng. Nguyên liệu dùng cho quá trình tổng hợp đó là những chất trao đổi trung gian: như pyruvat, α -ketoglutarat, oxaloacetat và fumarat (hình 9.2).

9.1.2. Tình hình sản xuất các chất trao đổi sơ cấp

Các chất trao đổi sơ cấp (bậc một) là rất cần thiết cho sự sống của tế bào. Trong quá trình đồng hoá các chất dinh dưỡng, chúng được tạo thành như là “các viên gạch cấu trúc” để xây dựng tế bào. Chính vì vậy, chúng được gọi là các vật chất của tế bào. Bình thường chúng chỉ tạo thành vừa đủ để đáp ứng nhu cầu của tế bào.

Vi sinh vật trong tự nhiên không tổng hợp thừa các chất trao đổi sơ cấp, do tế bào của chúng có cơ chế điều hoà thích nghi với quá trình trao đổi chất. Nhưng do đột biến làm hỏng cơ chế này làm cho chúng tổng hợp thừa cao hơn nhiều nhu cầu của tế bào, cũng nhờ đột biến làm cho tính thấm của

màng tế bào thay đổi, các sản phẩm cuối cùng của quá trình trao đổi đó được tiết ra ngoài môi trường nuôi cấy và làm cho chúng giải tỏa sự kiềm chế bằng sản phẩm cuối cùng này.

Chính nhờ các đặc điểm trên của vi sinh vật mà người ta tạo được các chủng có khả năng sinh tổng hợp các sản phẩm sơ cấp cao để đưa vào sản xuất công nghiệp. Các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp là các axit amin, các nucleotit và vitamin, ngoài ra còn các chất trung gian của chu trình Krebs (hay còn gọi là chu trình ATC), trước hết là axit xitic.

Vì tính không ổn định và không bền vững của các thể đột biến, cho nên các chủng vi sinh vật này được sử dụng trong sản xuất công nghiệp thường thực hiện bằng phương pháp lên men theo mẻ là thích hợp.

Trong phần lớn các trường hợp, nhóm amin được đưa vào ở giai đoạn cuối cùng của sinh tổng hợp nhờ sự chuyển axit amin. Một số axit amin được hình thành nhờ hàng loạt biến đổi của các axit amin khác, trong trường hợp đó không cần chuyển amin. Nhiều loại axit amin được sinh tổng hợp bằng con đường lên men nhờ vi sinh vật. Bảng 9.1 dưới đây liệt kê các axit amin được sản xuất trên thế giới.

BẢNG 9.1. SẢN LƯỢNG MỘT SỐ AXIT AMIN TRÊN THẾ GIỚI

(theo M. Larpent-Gourgand, 1992)

Axit amin	Tấn/năm	Axit amin	Tấn/năm
DL-alanin	700	L-isolixin	150
L-alanin	130	L-lixin	150
L-arginin	1000	L-lyzin	70.000
L-axit aspartic	4000	DL-metionin	70.000
L-asparagin	50	L-metionin	50
L-xystein	700	L-omithin	30
L-axit glutamic	370.000	L-phenylalanin	5000
L-glutamin	500	L-prolin	100
Glyxin	6000	L-serin	50
L-histadin	200	L tryptophan	200
L-treonin	160	L-valin	150
L-tyrozin	100		

Người ta tính rằng, 66% tổng số axit amin được dùng làm thức ăn bổ sung cho người, như các glutamat, glyxin, xystein, alanin, 33% dùng làm

thức ăn cho động vật như metionin, lyzin và một phần treonin và tryptophan, chỉ có khoảng 1% sử dụng trong y tế, một số dẫn xuất của axit amin được dùng trong điều trị liệu như dihydroxy-phenylalanin (chữa Parkinson), N-axetyl-L-hydroxy-prolin (chống sưng khớp), captropil dẫn xuất của prolin (chữa tăng huyết áp).

9.2. CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT CÁC AXIT AMIN

Gần đây, sản xuất axit amin bằng phương pháp lên men ngày càng tăng nhanh, vì vi sinh vật có thể tổng hợp axit amin từ các hợp chất vô cơ, tốc độ và số lượng một số axit amin được tổng hợp vượt quá nhu cầu để tổng hợp protein của tế bào, do vậy axit amin được tiết ra môi trường.

Một số vi sinh vật có thể sản xuất số lượng đủ các axit amin thỏa mãn yêu cầu sản xuất công nghiệp các loại axit amin này. Axit amin cũng có thể thu nhận thông qua thuỷ phân protein hoặc bằng tổng hợp hoá học, nhưng quá trình vi sinh vật để sản xuất các axit amin vẫn kinh tế hơn và bằng phương pháp vi sinh vật, sản xuất chủ yếu là các L-axit amin tự nhiên.

Nhu cầu sử dụng axit amin chế biến thực phẩm, làm thức ăn bổ sung và trong công nghiệp dược ngày càng mở rộng. Khi giá thành sản xuất hạ, những ứng dụng mới đã được dự báo trước như làm nguyên liệu thô để tổng hợp các polyme axit amin.

Qua sự sản xuất các axit amin của vi sinh vật cho thấy hai đặc điểm mà thường không đựng chạm đến việc phát triển các quy trình vi sinh vật khác. Thứ nhất, nhờ tầm quan trọng của các vi sinh vật dị dưỡng và là công cụ hữu dụng trong việc phân tích con đường trao đổi chất và trong di truyền học và ngày nay, chúng đang được minh chứng là có giá trị lớn. Thứ hai, nhờ sự hiểu biết các cơ chế kiểm soát quá trình trao đổi chất mà nó được ứng dụng với mục tiêu tốt trong quá trình vi sinh vật công nghiệp hiện nay.

9.2.1. Những vi sinh vật có khả năng sản sinh axit amin

Các chủng vi sinh vật được sử dụng làm giống sản xuất các axit amin trong công nghiệp là các chủng có khả năng sản sinh axit amin không tích tụ vào trong tế bào mà lại tiết ra ngoài môi trường xung quanh. Quá trình lên men các axit amin phải được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Các axit amin được sản xuất nhiều nhất nhờ con đường vi sinh vật là axit glutamic, lyzin và tryptophan.

Các chủng có khả năng sản sinh axit glutamic thuộc các chi vi khuẩn: *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Aerobacterium*, *Sarcina*, *Achromobacter*. Nhiều loại trong các giống này được sử dụng trong công nghiệp sản xuất axit glutamic như: *Micrococcus glutamicus*, *Brevibacterium feravum*, *B. aminogenes*, *B. divaricatum*, *B. lactofermentum*, *B. saccharolyticum*, *B. kowasaki*, *B. ketoglutamicum*, *Corinebacterium petrophilum*, *C. lilium*, *C. callune*, *C. glutamicum*, *Bacillus megatherium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. curculans*, *B. pumilus*, *B. anthracis*, *Mycobacterium ammoniaphilum*, *M. salisinovorum*, *M. flavum*, *Pseudomonas fluorescens* và *P. crucigiae*. Trong số này có nhiều chủng có khả năng sinh axit glutamic tối 60–100g/l dịch nuôi cấy. Các chủng được dùng phổ biến trong sản xuất công nghiệp axit glutamic thuộc các loài sau: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* và *Micrococcus glutamicus*.

Nhiều loại vi sinh vật có khả năng sản sinh lysin: Vi khuẩn, xạ khuẩn, tảo lục, nhiều loại vi nấm. Trong công nghiệp, người ta thường lựa chọn các chủng đột biến dị dưỡng homoserin, chúng tích tụ lysin ngoại bào và thuộc các loài sau đây: *Brevibacterium flavum*, *B. amoniagenes*, *B. lactofermentum*, *B. ketoglutamicum*, *Corynebacterium hoogi*, *C. glutamicum*, *C. equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. ovalis*,... Các chủng vi sinh vật thường xuyên được sử dụng trong sản xuất lysin trong công nghiệp là *Micrococcus glutamicus*, *Corynebacterium glutamicum* (hiện nay, hai loài này người ta xếp vào một loài) và các loài thuộc chi *Brevibacterium*.

Các chủng được sử dụng trong sản xuất tryptophan có ý nghĩa công nghiệp thuộc các loài sau: *Micrococcus luteus*, *M. lysodeikticum*, *Candida utilis* và *Bacillus subtilis*.

Như trình bày trên bảng 9.1, có nhiều axit amin được sản xuất bằng công nghệ lên men nhờ các vi sinh vật dị dưỡng. Các axit amin khác nhau có những quy trình công nghệ cụ thể khác nhau, nhưng quy trình sản xuất chung thì tương đối giống nhau. Trong phạm vi giáo trình này, chúng ta chỉ xem xét công nghệ lên men sản xuất axit glutamic, một axit amin được sử dụng nhiều trong đời sống hằng ngày.

9.2.2. Công nghệ lên men sản xuất axit glutamic

Ngay từ những năm 50 của thế kỷ XX, người ta đã chú ý đến phương pháp lên men trực tiếp axit glutamic và từ đó đến nay sản phẩm này vẫn

dứng đầu trong công nghiệp sản xuất các loại axit amin. Nhu cầu về monosodium glutamat (còn gọi là mỳ chính) vào khoảng 300 nghìn tấn/năm và hàng năm nhu cầu này tăng khoảng 6–8%. Axit amin được sản xuất chủ yếu ở Nhật bằng phương pháp lên men (chiếm khoảng 50% tổng sản lượng của thế giới, riêng hàng Ajinomoto chiếm khoảng 40%). Sản phẩm monosodium glutamat có vị ngọt của nước xương và nước luộc gà nên được gọi chung là mỳ chính hay bột ngọt. Sản phẩm này hiện nay đang được sử dụng phổ biến ở nước ta.

a) *Chủng giống sản xuất axit glutamic*

Các chủng thuộc loài *Corynebacterium glutamicum* được dùng chủ yếu để làm giống để lên men sản xuất axit glutamic. Ngoài ra trong công nghiệp còn thấy dùng các chủng thuộc loài *Brevibacterium flavum* và *B. davaricatum*.

Sinh tổng hợp axit glutamic xảy ra theo con đường khử amin thông thường của axit α -ketoglutaric. Quá trình sinh tổng hợp thừa axit glutamic có nhiều đặc điểm. Tuy nhiên, tác dụng kết hợp của các yếu tố sau đây dẫn đến sự siêu tổng hợp và sản phẩm được tích lũy ở môi trường lên men:

– Thiếu enzym α -ketoglutarat-dehydrogenaza. Trong các chủng được sử dụng trong sản xuất không thấy xuất hiện hoặc chỉ phát hiện hoạt tính rất thấp của enzym này. Do vậy, α -ketoglutarat không tiếp tục chuyển hóa vào chu trình Krebs (ATC). Quá trình amin hóa và khử amin α -ketoglutarat nhờ hoạt tính cao của enzym glutamat-dehydrogenaza đặc hiệu với NADPH₂. Enzym này nhận được NADPH₂ từ một phản ứng của isohydration-dehydrogenaza cũng chuyển hóa với NADP. Trong quá trình amin hóa khử NADP cần thiết cho việc loại hydro của isoxitrat, sẽ tái tạo lại NADPH₂.

– Khép kín chu trình Krebs nhờ các phản ứng bổ sung là các phản ứng tạo thành oxalacetat cần thiết cho sự tổng hợp xitrat. Sự tổng hợp các axit C₄-dicarboxylic xảy ra nhờ quá trình cacboxyl hóa pyruvat hay photphoenolpyruvat. Người ta tìm thấy enzym photphoenol-pyruvat-cacboxylaza và enzym malat-synthetaza trong tế bào *Corynebacterium*. Ngoài ra, malat còn được tạo thành như chu trình glyoxylat.

– Tính thấm của màng tế bào bị thay đổi do thiếu biotin, do tác dụng của penixilin hay do dǎn xuất của axit béo. Nếu tính thấm thấu không bị thay đổi thì chỉ diễn ra sinh tổng hợp thừa ở trong tế bào mà không tiết ra ngoài môi trường. Nếu vậy, chính axit glutamic lại ức chế phản ứng xúc tác bởi glutamat-dehydrogenaza tạo thành axit glutamic. Do biến đổi tính

thẩm thấu, tế bào chỉ cho axit glutamic ra ngoài tế bào, còn nồng độ axit này trong tế bào thấp cho nên không ức chế ngược bởi sản phẩm cuối cùng. Có lẽ các axit béo nằm ở vùng giới hạn của tế bào đóng vai trò quan trọng, vì chính biotin cần cho sự tổng hợp axit béo. Sự thay đổi tính thẩm thấu là do nồng độ biotin thấp, tối ưu là $2-5\mu\text{g/l}$, còn nồng độ tối ưu cho sinh trưởng, phát triển của tế bào của chủng sản xuất ở $15\mu\text{g/l}$ và cũng có thể làm thay đổi tính thẩm thấu của màng bằng các chất hoạt hoá bề mặt như Tween 60–polyoxyethylensocbitanmonostearat, Tween 40–polyoxyethylensocbitanmonopalmitat hay penixilin. Các chất tác nhân bề mặt này được bổ sung vào giữa hay cuối pha sinh trưởng. Với việc bổ sung penixilin gây hư hại cho tính thẩm có ý nghĩa thực tiễn đặc biệt vì nhờ đó có thể sử dụng các nguyên liệu phức tạp như rỉ đường.

Các chủng sản xuất axit glutamic nói riêng và các axit amin nói chung hầu hết là các chủng đột biến, nếu cấy lại nhiều lần từ ống gốc sẽ gặp các thế hôi biến làm thay đổi hoạt lực và thoái hoá dân. Cho nên cần phải chọn lại giống từ các mẻ lên men có năng suất cao theo phương pháp pha loãng nhằm tách được các khuẩn lạc thuần khiết cho năng suất cao. Chú ý, không bao giờ sử dụng sinh khối của mẻ lên men trước làm giống cho mẻ lên men sau. Điều này không chỉ đối với lên men sản xuất axit glutamic mà đối với hầu hết các quá trình lên men các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp và thứ cấp khác.

b) Quá trình lên men sản xuất axit glutamic

Thành phần môi trường lên men sản xuất axit glutamic phụ thuộc vào đặc điểm của chủng sản xuất. Nguồn cacbon thường dùng là glucozo, saccarozơ, dịch thuỷ phân tinh bột, rỉ đường, dịch thuỷ phân xenlulozơ, etanol, axit hữu cơ như axit axetic, axit propionic, axit palmitic, axit ditearic,...). Nồng độ đường có trong môi trường tính theo saccarozơ là khoảng 8–25%. Nếu trong quá trình lên men có thể bổ sung đường làm nhiều lần thì tổng số đường bổ sung có thể tăng lên. Nếu điều khiển được quá trình lên men tốt thì hệ số chuyển hoá đường thành axit glutamic ổn định, năng suất sẽ rất cao.

Rỉ đường là một nguyên liệu quý cho sản xuất bằng phương pháp lên men, nhưng đối với lên men axit glutamic cần phải chú trọng đến hàm lượng biotin có trong đó, bởi nồng độ biotin thích hợp cho lên men này là nằm trong khoảng $2-5\mu\text{g/l}$ môi trường. Chính vì vậy, nếu nồng độ quá cao, thì chỉ bổ sung lượng rỉ đường thấp hơn, còn nếu vượt qua sẽ gây ra hiện tượng sinh khối phát triển mạnh, nhưng khả năng sinh tổng hợp axit glutamic kém. Nếu

hàm lượng biotin trong môi trường quá cao thì phải bổ sung thêm chất ức chế sự sinh tổng hợp lipogluycoproteit. Các chất được dùng cho mục đích này là Tween 60 với liều lượng 0,15% hoặc muối canxi của penixilin G khoảng 5 đơn vị/ml môi trường sẽ làm tăng khả năng sinh tổng hợp của chủng sản lên 15–45%. Trong khi sử dụng môi trường đường với hàm lượng biotin thích hợp thì nhận được axit glutamic 53–60 g/l, nhưng trên môi trường rỉ đường có bổ sung chất ức chế tạo thành hợp chất lipit của màng thì năng suất có thể đạt tới 70–90g/l axit glutamic.

Ở Việt Nam và nhiều nước trên thế giới hiện nay có nền công nghiệp sản xuất axit glutamic, nguồn thuỷ phân bột sắn và rỉ đường là hai nguyên liệu chủ yếu. Còn nguồn nitơ thường dùng với tỷ lệ 1,5–2%, người ta thường bổ sung nhiều lần urê với nồng độ không quá 0,8% và pH môi trường thường ở 6,7 – 7,8. Cũng có thể bổ sung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl với liều lượng 0,5% đối với mỗi chất. Ngoài ra, để chủng giống phát triển bình thường và sản sinh axit glutamic, cần bổ sung thêm nguồn muối khoáng vào môi trường lên men.

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 và phụ thuộc vào đặc tính sinh lý, sinh hoá của chủng sản xuất.

Lên men sản xuất axit glutamic là nuôi cấy theo mẻ và yêu cầu vô trùng. Giống sau khi được hoạt hoá thông qua bình tam giác nuôi trên máy lắc hay trong nồi lên men. Mỗi một cấp nuôi cấy thường kéo dài từ 18–24 giờ, giống cấy vào mỗi cấp khoảng 5–6% theo thể tích môi trường nuôi và thời gian lên men thường kéo dài 2–3 ngày.

Sơ đồ quá trình lên men sản xuất axit glutamic thường tuân thủ theo quá trình lên men chung: Nhân giống, chuẩn bị môi trường, thanh trùng, làm lạnh và tiếp giống, lên men, tách và tinh chế axit glutamic, chuyển sang mono-glutamat, sấy khô và đóng gói.

9.2.3. Tách chiết và kết tinh axit glutamic

Có nhiều phương pháp tách và kết tinh axit glutamic từ dịch lên men:

- Phương pháp sử dụng điểm đắng điện.
- Phương pháp tạo hydroclorit của axit glutamic.
- Phương pháp dùng dung môi hữu cơ để hòa tan axit glutamic rồi tách.
- Phương pháp trao đổi ion.
- Phương pháp chuyển axit glutamic thành các muối kim loại khó tan rồi tách.

– Phương pháp điện thẩm tích chuyển axit glutamic về phía cực dương.

Trong các phương pháp trên thì triển vọng nhất và có nhiều nơi ứng dụng là phương pháp hấp phụ qua nhựa trao đổi ion.

Để sản xuất mỳ chính, người ta hoà tan axit glutamic, rồi dùng Na_2CO_3 hoặc NaOH trung hoà đến pH 6,8–7,0, tẩy màu, khử sắt. Dịch glutamic thu được đem cô châm không đến khoảng 30,2–30,5°Bx được bổ sung thêm một ít mỳ chính vào làm mầm rồi cô đến 31–31,8°Bx, trong lúc này thỉnh thoảng cho thêm nước vào để phá tan các tinh thể mới xuất hiện, đồng thời để làm biến dạng tinh thể mầm làm cho mầm dần dần thành hình trụ, lúc cho nước vào, nồng độ có thể xuống 29,5°Bx và tiếp tục cô. Giai đoạn này gọi là giai đoạn nuôi mầm. Điều kiện quan trọng nhất để kết tinh mỳ chính là: áp suất chân không khoảng 600–620mmHg; nồng độ dịch glutamat khoảng 31,5–31,8°Bx, nhiệt độ cô khoảng 63–68°C. Sản phẩm thu được có nồng độ tinh khiết là 98% glutamat natri. Hiệu suất chuyển từ axit glutamic sang glutamat natri thường được 75–80% và cao nhất không quá 90%.

9.3. CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT AXIT XITRIC

Axit xitic là một axit hữu cơ có nhiều trong thực vật, như trong nước chanh, nước lựu, trong cam quýt, dứa, dâu tây,... Axit xitic được sử dụng nhiều trong chế biến thực phẩm (nước giải khát, bánh kẹo, đồ hộp, cá trong y dược, dệt, nhuộm, nghề ảnh, nghề in,...).

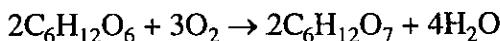
Trước kia, axit xitic được sản xuất từ quả chanh, nhưng giá thành cao và hiệu suất thu hồi thấp. Hiện nay, người ta sản xuất axit bằng cách oxy hoá gluxit nhờ nấm sợi. Trên 90% lượng axit xitic được sản xuất bằng phương pháp lên men.

9.3.1. Các loại vi sinh vật sản xuất axit xitic

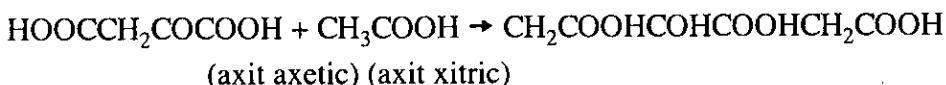
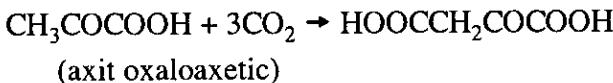
Nhiều loài nấm sợi có khả năng sản sinh axit xitic: *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum*, *P. citrinum*, *Mucor piriformis* và những loài nấm sợi thuộc chi *Mucor* khác. Những chủng thuộc loài *A. niger* cho kết quả cao nhất.

9.3.2. Cơ chế hình thành axit xitic

Phương trình chung của quá trình chuyển hoá hình thành axit xitic là:



Cơ chế của quá trình chuyển hóa này có thể được biểu diễn như sau: Đường glucozơ được thuỷ phân thành axit piruvic (CH_3COCOOH), bước tiếp theo axit piruvic kết hợp với CO_2 hình thành axit oxaloaxetic, chất này kết hợp với axit axetic sẽ chuyển thành axit xitric.



9.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất axit xitric

– Môi trường dinh dưỡng được làm từ các nguồn đường, các hợp chất hữu cơ, vô cơ. Để nhân giống cho quá trình lên men sản xuất axit xitric từ *A. niger*, người ta thường sử dụng môi trường có thành phần như sau: Saccarozơ 140g, NH_4NO_3 2,23g; KH_2PO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,23g và nước máy 1 lít.

– Môi trường lên men sản xuất axit xitric có thành phần như sau: Saccarozơ 150g, NH_4Cl 1,9g; và bổ sung thêm ZnSO_4 để làm tăng khả năng tích lũy axit xitric.

– Để nuôi cấy nấm nhằm phát triển sinh khối thì pH môi trường được giữ ở pH 6, còn quá trình lên men sản xuất axit xitric tốt thì môi trường giữ ở pH 3,4–3,5. Thông thường người ta sử dụng HCl để điều chỉnh pH trong quá trình lên men. Do điều kiện môi trường để nấm sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp axit xitric khác nhau cho nên trong sản xuất, việc chuẩn bị môi trường sao cho nấm phát triển đầy đủ, sau đó chỉnh đến pH thích hợp để lên men sản xuất xitric.

– Nấm sợi là vi sinh vật hiếu khí điển hình, do đó chúng rất cần oxy tự do. Vì vậy, trong quá trình nuôi, nếu lên men bằng phương pháp lên men bề mặt thì phải quạt không khí vô trùng vào phòng nuôi; còn trong sản xuất lên men chìm thì phải thổi không khí vô trùng vào dịch lên men và nồi lên men có cánh khuấy nhằm tăng cường oxy hòa tan.

– Nhiệt độ thích hợp để nuôi nấm thường từ 25–30°C, sinh khối nấm phát triển mạnh ở 30–32°C, để tăng cường cho quá trình sinh tổng hợp axit xitric cần duy trì ở 25–28°C để tăng cường khả năng tích lũy nhiều axit gluconic, nhiệt độ cao trên 37°C thì quá trình hình thành axit xitric sẽ bị kìm hãm.

– Thời gian lên men kéo dài từ 7 đến 10 ngày.

9.3.4. Quá trình công nghệ lên men sản xuất axit xitic

Axit xitic 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 phương pháp nuôi cấy chìm, sợi nấm nằm trong toàn bộ môi trường lên men lỏng. Phương pháp lên men chìm có nhiều ưu điểm hơn phương pháp lên men bề mặt. Phương pháp lên men chìm có thể lên men với lượng lớn hơn, hiệu suất lên men cao hơn, đảm bảo vô trùng quá trình nuôi, rút ngắn được thời gian lên men, dễ tự động hóa và giảm được lao động nặng nhọc. Do vậy hiện nay, người ta sản xuất axit xitic chủ yếu bằng phương pháp nuôi cấy chìm.

Quá trình lên men sản xuất axit xitic bao gồm các công đoạn sau:

a) Hoạt hoá giống và nhân giống sản xuất

Giống được hoạt hoá 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 cấp khí vô trùng và đảo trộn, duy trì áp suất trong nồi 0,1–0,2atm, nhiệt độ 34–35°C và thời gian nuôi từ 28 đến 36 giờ. Thời kỳ đầu có thể cấp khí với lượng 9–10m³/giờ và sau 24 giờ từ 90–100m³/giờ.

b) Chuẩn bị môi trường lên men

Trước hết sử dụng 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.

c) 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 có thể giữ ở nhiệt độ 33–34°C, sau khi tạo axit mạnh thì giữ ở nhiệt độ 31–32°C. Thời kỳ đầu cung cấp 100m³ không khí/giờ (theo thể tích thiết bị lên men 50m³), còn thời kỳ cuối cung cấp 800–1.000m³ không khí/giờ.

d) Tách nấm mốc

Trước khi kết thúc quá trình lên men cần, kiểm tra mẫu dịch lên men cách nhau 4–6 giờ. Nếu hàm lượng axit bằng nhau (không đổi) thì coi như kết thúc quá trình lên men. Sau khi kết thúc lên men, dịch lên men được đun nóng lên 60–65°C và chuyển vào thùng trung gian để tách sinh khối. Sinh khối nấm được tách trên máy lọc chân không.

e) Tạo muối canxi xitrat

Trong dung dịch đã lên men là hỗn hợp các chất: axit xitic, axit gluconic, axit oxalic, đường không lên men và các loại muối khoáng. Axit xitic được tách ra bằng cách cho chúng liên kết với Ca^{2+} để tạo thành muối axit xitrat ít tan.

Quá trình tạo muối được tiến hành như sau: Dịch lên men đã tách sinh khối được cho vào nồi trung hoà bằng sữa vôi (có khuấy) và đun sôi. Quá trình trung hoà kết thúc khi $\text{pH} = 6,8–7,5$. Sau đó dùng thiết bị lọc chân không để tách các chất kết tủa canxi xitrat và canxi oxalat, sau đó đem sấy khô.

f) Tách axit xitic

Sử dụng H_2SO_4 để tách axit xitic từ muối canxi xitrat. Đầu tiên cho 0,25–0,5m³ nước vào 1 tấn axit xitic chứa trong muối xitrat, khuấy trộn và cho axit sunphuric vào (để làm trong dịch axit xitic, dùng than hoạt tính với lượng 2% so với axit xitic trong xitrat), đun nóng lên 60°C và cho axit sunphuric có tỷ trọng 1,8–1,84 vào (0,425 lít H_2SO_4 /1kg axit xitic có trong xitrat). Khuấy đều rồi đun sôi khoảng 15–15 phút, khi đó $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 + 3\text{H}_2\text{SO}_4 = 2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 3\text{CaSO}_4$.

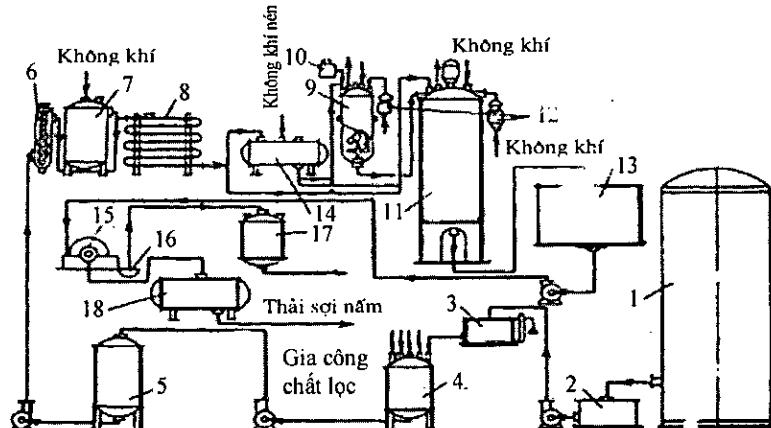
Để tách canxi oxalat có mặt trong axit xitic, sử dụng một lượng dư axit sunphuric, khi đó canxi oxalat sẽ kết tủa với thạch cao được tạo thành và trong dung dịch chỉ còn axit xitic. Lọc chân không để loại chất kết tủa có chứa thạch cao, canxi oxalat, than hoạt tính, các sunphua của các kim loại nặng.

Cô dung dịch axit xitic trong thiết bị cô chân không: Giai đoạn đầu cô đến tỷ trọng 1,24–1,26; giai đoạn hai cô đến tỷ trọng 1,32–1,36 tương ứng với nồng độ 80% axit xitic.

g) Kết tinh và sấy khô axit xitic

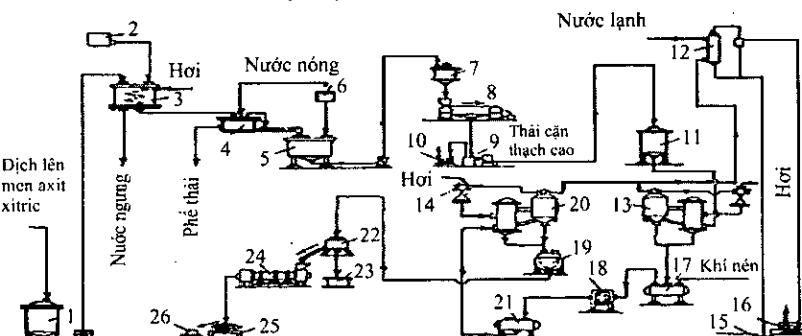
Khi nhiệt độ của dung dịch xuống còn 35–37°C thì cho mầm kết tinh (axit xitic) vào để kết tinh và tiếp tục làm lạnh đến 8–10°C và cho khuấy

liên tục trong 30 phút. Sau đó cho sang thiết bị ly tâm để tách tinh thể đưa đi sấy khô (dùng thiết bị sấy là băng tải và nhiệt độ không khí không quá 35°C). Sơ đồ quy trình công nghệ lên men và tách chiết axit xitic được trình bày trên các hình 9.3 và 9.4.



Hình 9.3. Sơ đồ thu nhận axit xitic bằng phương pháp lên men chìm trong môi trường rỉ đường

1. Thùng bảo quản rỉ đường; 2. Thùng chứa rỉ đường; 3. Cân ; 4. Nồi nấu; 5. Thùng chứa môi trường dinh dưỡng; 6. Tháp thanh trùng; 7. Bộ giữ nhiệt; 8. Bộ trao đổi nhiệt; 9. Thiết bị cấy giống; 10. Nồi nhân giống; 11. Nồi lên men; 12. Bộ lọc khí; 13. Thùng chứa dịch lên men; 14. Bơm dung dịch; 15. Lọc chân không tách và rửa sợi nấm bằng nước nóng; 16. Thùng chứa sợi nấm đã rửa; 17. Thùng chứa không chứa sợi nấm; 18. Thùng chứa dịch lọc để tách axit xitic



Hình 9.4. Sơ đồ tách axit xitic khỏi dung dịch lên men

1. Dung dịch axit xitic;
2. Sữa vôi;
3. Nồi trung hòa;
4. Bộ lọc tách cặn;
5. Nồi phản ứng tách axit xitic khỏi cặn;
6. Than hoạt tính;
7. Thùng trung gian;
8. Bộ lọc chân không kiểu băng tải;
9. Thùng chân không;
10. Bơm chân không;
11. Thùng đựng dung dịch axit xitic;
12. Bộ ngưng tụ của thiết bị cô đặc;
- 13, 20. Nồi cô chân không lần 1 và lần 2;
14. Máy nén của thiết bị cô;
15. Giỏ áp kế;
16. Hút chân không;
17. Bơm;
18. Lọc ép tách dung dịch khỏi thạch cao;
19. Nồi kết tinh;
21. Thùng trung gian;
22. Máy ly tâm;
23. Thùng chứa dung dịch;
24. Sấy thùng quay;
25. Sàng rung;
26. Máy đóng gói tự động.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 9

- Quá trình phân giải protein nhờ proteaza của cơ thể sinh vật thành các phân tử nào sau đây: Axit amin, peptit, NH₃ hay N₂?
- Trong số 20 axit amin được cơ thể tổng hợp thành các loại protein, phần lớn các vi sinh vật có khả năng tổng hợp mới bao nhiêu loại axit amin?
- Đặc điểm (a) rất cần thiết cho sự sống của tế bào, (b) không cần thiết cho sự sống của tế bào, (c) là "các viên gạch cấu trúc" để xây dựng tế bào và (d) chỉ tạo thành vừa đủ để đáp ứng nhu cầu của tế bào, không phải là đặc điểm của các chất trao đổi sơ cấp (bậc một)?
- Các cơ chế: (a) Do tác động của ngoại cảnh sống, (b) Do tác động của các chất trao đổi, (c) Do tế bào của chúng có cơ chế điều hòa thích nghi với quá trình trao đổi chất và (d) Do tác động của chính quá trình trao đổi chất, cơ chế nào làm cho vi sinh vật trong tự nhiên không tổng hợp thừa các chất trao đổi sơ cấp?
- Các sản phẩm trao đổi chất (a) các axit amin, (b) các chất kháng sinh, (c) các nucleotit và (d) axit xitric, sản phẩm nào không phải là chất trao đổi sơ cấp?
- Vì tính không ổn định và không bền vững của các thể đột biến dùng để sản xuất các axit amin, người ta thường sử dụng phương pháp lên men nào thích hợp nhất?
- Để sản xuất chủ yếu là các L–axit amin tự nhiên, người ta sử dụng phương pháp nào sau đây là kinh tế và thường được sử dụng: Phương pháp hoá học, phương pháp hoá lý, phương pháp lên men vi sinh vật hay phương pháp thuỷ phân protein bằng enzym?
- Trong số các vi sinh vật kể tên sau đây: *Corynebacterium glutamicum*; *Bravibacterium flavum*; *Bacillus subtilis*; và *Micrococcus glutamicus*, loại nào không được dùng phổ biến trong sản xuất công nghiệp axit glutamic?
- Chúng vi khuẩn sử dụng trong sản xuất axit glutamic, tính thấm của màng tế bào vi khuẩn phải bị thay đổi. Các yếu tố nào sau đây không làm thay đổi tính thấm thấu của màng vi khuẩn này: Do thiếu biotin; Do tác dụng của penixilin; Do tác động của axit malic hay Do tác động của dẫn xuất axit béo?
- Trong lên men sản xuất axit glutamic, nếu sử dụng rỉ đường làm một nguyên liệu cho sản xuất thì phải chú trọng đến hàm lượng chất nào ?

11. Lên men sản xuất axit glutamic là nuôi cấy theo mẻ, mỗi một cấp nuôi cấy thường kéo dài từ 18–24 giờ, giống cấy vào mỗi cấp khoảng 5–6% theo thể tích môi trường nuôi thì thời gian lên men thường kéo dài bao lâu?
12. Trong các phương pháp tách và kết tinh axit glutamic từ dịch lên men thì phương pháp nào có triển vọng và nhiều nơi ứng dụng nhất?
13. Dịch axit glutamic được trung hoà bằng Na_2CO_3 hoặc NaOH đến pH 6,8–7,0 được đem cô châm không đến khoảng 30,2–30,5°Bx được bổ sung thêm chất nào để làm mầm kết tinh axit glutamic?
14. Loài nấm sợi nào thường được sử dụng trong sản xuất axit xitric cho kết quả cao nhất?
15. Sản xuất axit xitric bằng phương pháp lên men chìm có nhiều ưu điểm hơn lên men bề mặt, nhận xét nào sau đây: (a) có thể lên men với lượng lớn hơn, (b) hiệu suất lên men cao hơn, (c) thiết bị đơn giản hơn và (d) đảm bảo vô trùng quá trình nuôi, không phải là ưu điểm của phương pháp này?

Chương 10

CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT CÁC CHẤT TRAO ĐỔI THỨ CẤP

10.1. CÁC CHẤT TRAO ĐỔI THỨ CẤP

10.1.1. Khái niệm

Các chất trao đổi thứ cấp (cấp hai) có cấu tạo hoá học đa dạng, tương đối phức tạp và có hoạt tính sinh học khá phong phú. Dựa theo tính chất sinh lý và ý nghĩa thực tiễn, người ta chia chúng thành các nhóm chất sau:

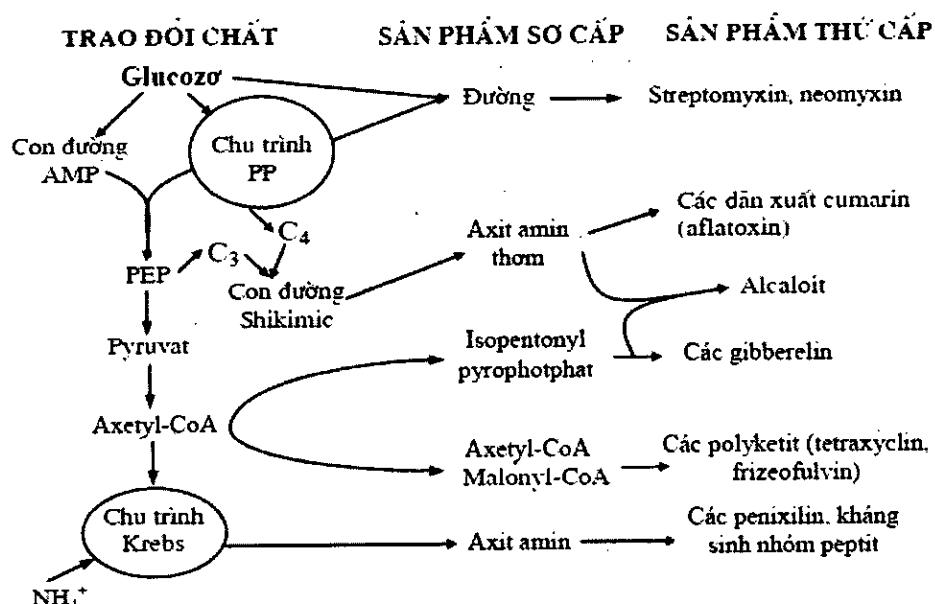
- Các chất kháng sinh là những chất do vi sinh vật sinh ra với lượng nhỏ cũng có tác dụng ức chế hoặc giết chết các vi sinh vật khác.
- Các alcaloit do nấm (trong đó có nấm cưa gà) tạo thành, được sử dụng trong điều trị một số bệnh như trợ sinh, bệnh mạch máu, bệnh nhức đầu,...
- Các chất kích thích sinh trưởng như gibberelin – chất kích thích sinh trưởng thực vật.
- Mycomyxin do nấm sinh ra, gây độc cho người và thực vật. Ví dụ như nấm *Aspergillus flavus* sinh độc tố aflatoxin.

Khác với các chất trao đổi sơ cấp, chất trao đổi thứ cấp không tìm thấy ở mọi vi sinh vật. Chúng không có chức năng rõ ràng trong trao đổi chất của tế bào, nghĩa là tế bào vẫn có thể tồn tại và phát triển bình thường khi không có các hợp chất này.

10.1.2. Các con đường trao đổi các chất thứ cấp

Trong điều kiện tự nhiên, sự tạo thành các chất trao đổi thứ cấp có thể có ý nghĩa với sự tồn tại và phát triển của vi sinh vật. Ở đây, chúng có chức năng khác nhau, như trong tự nhiên thường thiếu chất dinh dưỡng, để đấu tranh sinh tồn, chúng phải khắc phục sự mất cân đối đó hoặc sản sinh các chất nhằm đấu tranh với các cơ thể khác để tồn tại. Theo Pasteur, khả năng sinh chất kháng sinh là mức cao nhất của sự đối kháng trong đấu tranh sinh tồn của vi sinh vật.

Các chất trao đổi thứ cấp được xây dựng từ các chất trao đổi sơ cấp, như sơ đồ trên hình 10.1 chỉ rõ mối tương quan và sự cạnh tranh giữa các quá trình sinh trưởng và trao đổi chất thứ cấp về cùng một chất trung gian.



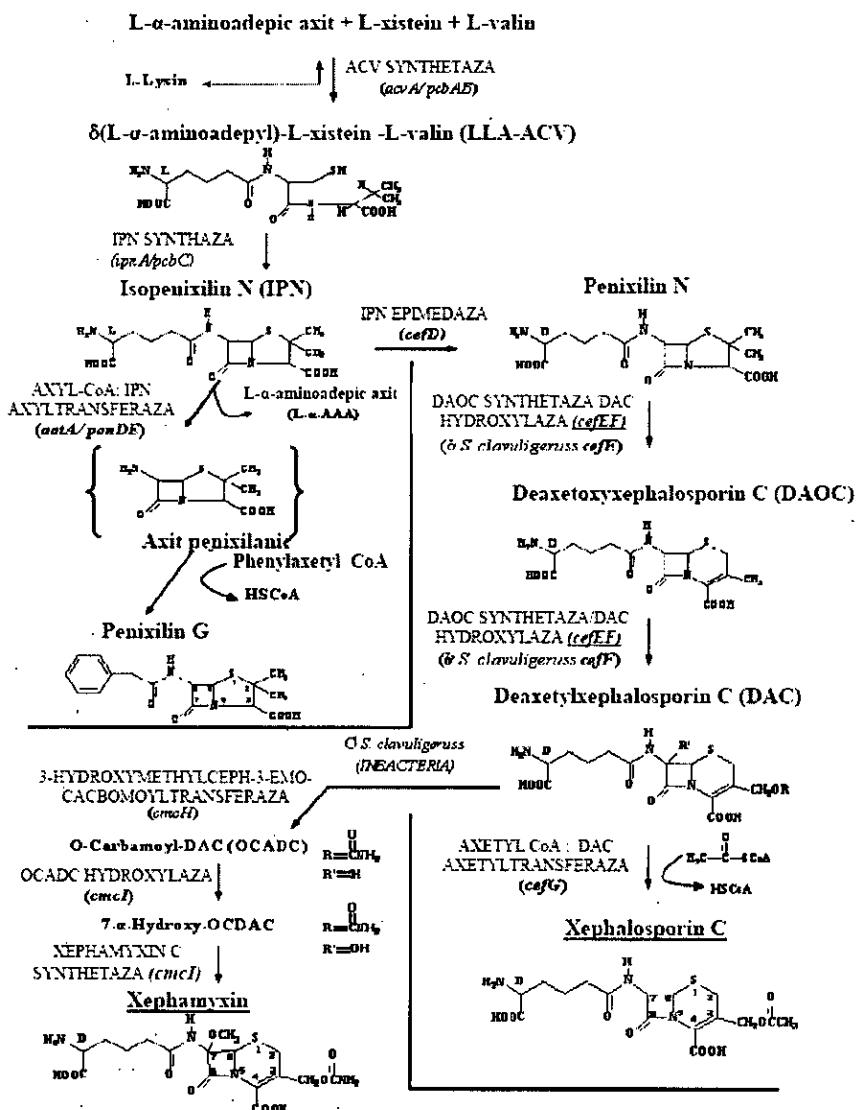
Hình 10.1. Sản phẩm trao đổi chất thứ cấp được sinh tổng hợp từ các chất trung gian trong quá trình trao đổi chất

Trước đây, các công trình nghiên cứu tạo chủng có hoạt tính cao chủ yếu bằng phương pháp thực nghiệm, trước hết là chọn các thể đột biến. Hiệu suất thường chỉ đạt tới mức 10–50g chất/lít môi trường lên men. Các chất trao đổi sơ cấp được tạo thành từ một con đường trao đổi chất, còn các chất trao đổi thứ cấp lại được sinh ra từ nhiều con đường trao đổi chất khác nhau với nhiều enzym cảm ứng tham gia. Do đó, các chất trao đổi thứ cấp khó tạo thành được một lượng lớn hay hiệu suất cao.

Hiện nay, chúng ta mới đang ở giai đoạn bắt đầu tìm hiểu sự điều hòa trao đổi chất thứ cấp, các nguyên nhân riêng lẻ gây ra trao đổi chất thứ cấp đã được biết rõ. Nhưng nhờ sự phát triển của sinh học phân tử, đặc biệt là công nghệ gen, đang làm rõ quá trình điều hòa này. Ví dụ, con đường trao đổi chất sinh tổng hợp các chất kháng sinh nhóm β -lactam như các penixilin, xephalosporin C và xepamycin C đã được tách dòng gen và điều hòa quá trình sinh tổng hợp bằng kỹ thuật di truyền (hình 10.2).

Từ những nghiên cứu sâu về genom của vi khuẩn, người ta đã lập được bản đồ gen giới hạn của nhiều loài vi sinh vật và cũng từ đó đã thiết lập được Ngân hàng gen của nhiều loài sinh vật. Với những nghiên cứu sâu sắc về genom của vi sinh vật đã góp phần phát triển mạnh mẽ ngành công nghệ

sinh học, ngược lại, cũng nhờ những thành công của công nghệ di truyền đã góp phần phát triển mạnh mẽ công nghệ vi sinh vật.



Hình 10.2. Con đường và các gen sinh tổng hợp penixilin, xephagosporin C và xephamyxin C

Một ví dụ, sản xuất penixilin và xephagosporin công nghiệp vẫn được lên men bằng các chủng của loài *P. chrysogenum* và *Acremonium chrysogenum* (tên khác *Cephalosporium acremonium*). Hầu hết các chủng sản xuất được tuyển chọn bằng đột biến có định hướng. Năm 1972, chủng *P. chrysogenum*

của hãng Panlabs chỉ đạt 20.000đv/ml sau 7 ngày lên men (tương đương 12mg penicillin G, Na/ml), năm 1990, chủng cải biến đã đạt 70.000đv/ml. Năm 1993, trong sản xuất công nghiệp hiệu suất penicillin đạt 100.000đv/ml tăng 500 lần so với chủng *P. chrysogenum* NRRL 1951, sản xuất ở mức độ công nghiệp đầu tiên năm 1951. Hiện nay, các chủng sản xuất penicillin công nghiệp có hiệu suất rất cao, khoảng 150.000đv/ml môi trường lên men. Do hiệu suất tăng, nên giá thành penicillin G trên thế giới ngày càng hạ: Năm 1999–2000, giá penicillin G-K là 36–40USD/kg; năm 2003 chỉ còn 25–30USD/kg.

Tuy nhiên, các chất trao đổi thứ cấp là đa dạng và phong phú. Trong các chất kháng sinh, ngoài nhóm β -lactam có khả năng tạo được chủng siêu tổng hợp có năng suất cao, thì các chất kháng sinh nhóm khác hiệu suất cũng còn hạn chế, vì các con đường trao đổi chất rất phong phú và đa dạng. Trong giáo trình này, chúng ta chỉ xem xét các kiến thức cơ bản về chất kháng sinh cũng như quá trình công nghệ lên men chất kháng sinh, còn các chất kích thích sinh trưởng gibberelin, alcaloit và độc tố chỉ giới thiệu sơ lược.

10.2. CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT KHÁNG SINH

10.2.1. Sơ lược về chất kháng sinh

a) Lịch sử phát triển 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 vi khuẩn tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) tình cờ nhiễm một loại nấm mà xung quanh khuẩn lạc của nó có một vùng trong, vi khuẩn không phát triển được. Ông cho rằng, nấm này tiết ra một chất nào đấy ức chế *S. aureus* và đã tìm cách phân lập nấm này, định tên và nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của nó. Nấm này thuộc chi *Penicillium*, do vậy ông gọi chất này là penicillin.

Cho đến Chiến tranh Thế giới II, khi mà có nhiều bệnh nhân quân đội bị thương cần điều trị bệnh nhiễm trùng thì penicillin của Fleming mới được quan tâm. Với sự hợp tác của nhiều nhà vi sinh vật Anh và Mỹ, chất kháng khuẩn của Fleming mới được bắt đầu sản xuất ở mức độ lớn hơn và trở thành một loại “thuốc thần kỳ” cứu sống nhiều người. Năm 1945, Fleming A., Chain E. và Florey H. cùng được nhận giải thưởng Nobel về công trình penicillin của họ.

NHỮNG MỐC QUAN TRỌNG TRONG LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN KHÁNG SINH

Năm	Sự kiện	Nước
1929	Phát minh penixilin	Anh
1932	Phát minh sulfonamid (protosil)	Đức
1939	Phát minh Gramixidin	Mỹ
1942	Giới thiệu sử dụng penixilin	Anh và Mỹ
1943	Phát minh streptomycin	Mỹ
1943	Phát minh baxitraxin	Mỹ
1945	Phát minh xephalosporin	Italia
1947	Phát minh cloramphenicol	Mỹ
1949	Phát minh neomyxin	Mỹ
1950	Phát minh oxytraxyclin	Mỹ
1952	Phát minh erythromycin	Mỹ
1956	Phát minh vancomyxin	Mỹ
1957	Phát minh kanamyxin	Nhật
1960	Giới thiệu sử dụng methixilin	Anh và Mỹ
1961	Giới thiệu sử dụng ampixilin	Anh
1961	Công bố streptinomyxin	Mỹ
1963	Phát minh gentamyxin	Mỹ
1964	Giới thiệu các xephalosporin	Anh
1966	Phát minh doxycyclin	Mỹ
1967	Công bố clindamyxin	Mỹ
1971	Phát minh torbamyxin	Mỹ
1972	Phát minh các xephamyxin (cefomycin)	Mỹ
1972	Giới thiệu sử dụng minoxyclin	Mỹ

b) *Sơ lược về chất kháng sinh*

Một số loài vi sinh vật có khả năng sinh ra các chất trao đổi tích luỹ trong môi trường dinh dưỡng và úc chế sinh trưởng các vi sinh vật khác – chất đó gọi là chất kháng sinh. Như vậy, “Chất kháng sinh là hợp chất do vi sinh vật sinh ra mà ngay với số lượng nhỏ cũng úc chế vi sinh vật khác”, bởi hầu hết các chất kháng sinh thường dùng có khối lượng sản xuất lớn vẫn bắt nguồn từ vi sinh vật.

Trong quá trình tìm kiếm các chất kháng sinh mới, người ta nhận thấy rằng, không chỉ có vi sinh vật (vi khuẩn, nấm mốc, xạ khuẩn) sinh ra chất kháng sinh, mà cả thực vật (như tảo, địa y, thực vật bậc cao) và động vật

(nguyên sinh động vật, giun đất, động vật có xương sống) cũng có khả năng sinh chất kháng sinh. Từ thực tế đó, Glasby (1976) đã đưa ra định nghĩa về chất kháng sinh: "Một chất kháng sinh là một hợp chất được tổng hợp ra từ cơ thể sống và ức chế quá trình sống của vi sinh vật ngay ở nồng độ thấp".

c) Các nhóm vi sinh vật tạo ra chất kháng sinh

Trước đây Fleming tình cờ phát hiện ra nấm *Penicillium*, sản sinh penixilin, nhưng ngày nay, các chủng vi sinh vật sinh chất kháng sinh được phân lập và lựa chọn theo một quy trình nhất định. Các bước thích hợp để tìm kiếm một chất kháng sinh mới như sau:

- 1) Thu thập các mẫu đất, nước, không khí hoặc các mẫu thực vật từ các môi trường sinh thái khác nhau. Tiến hành phân lập trên các môi trường đặc hiệu và thuần khiết các chủng vi sinh vật thu nhận được.
- 2) Thủ nghiệm khả năng kháng khuẩn của các chủng vi sinh vật đã thuần khiết để chọn chủng có hoạt tính ức chế hoặc tiêu diệt các vi sinh vật kiểm định.
- 3) Chọn các chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao để nghiên cứu tiếp. Lên men các chủng lựa chọn để thu nhận lượng kháng sinh cao hơn và tiến hành cô đặc, tách chiết và tinh chế các chất kháng sinh. Tiếp theo xác định loài của chủng sản xuất và hoạt tính kháng khuẩn bằng phổ tác dụng, các tính chất hóa lý bằng các phương pháp hóa lý như phổ hồng ngoại, tử ngoại, sắc ký khí, sắc ký lỏng cao áp, sắc ký giấy, hoặc các phản ứng hóa học đặc trưng,... xem có phải là kháng sinh mới không so với các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh và chất kháng sinh đã mô tả trước đó.
- 4) Thủ nghiệm độc tính và phổ kháng khuẩn của các chất kháng sinh.
- 5) Nếu chất kháng sinh có thể là chất kháng sinh mới thì lên men sản xuất kháng sinh ở mức độ cao hơn, thu nhận kháng sinh thô, tách chiết và tinh chế chất kháng sinh.
- 6) Xác định tính chất hóa học của các chất kháng sinh nhận được nếu đạt tiêu chuẩn làm thuốc chữa bệnh thì phải so sánh với các tiêu chuẩn đã liệt kê ở trên cho một loại thuốc được phép dùng trong điều trị bệnh hay không. Tuy nhiên, chất kháng sinh được phép sử dụng trong điều trị bệnh nhất thiết phải không độc cho người và động vật.

Chỉ có một số ít chất kháng sinh được sử dụng làm thuốc do vi khuẩn sinh ra như baxitraxin, gramixidin, tyroxidin..., còn đại đa số là do các loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* sản sinh ra như streptomycin, tetracyclin,

cloramphenicol, kanamycin,... Một số loài thuộc các chi *Micromonospora*, *Nocardia* và *Micropolyflora* cũng sản sinh một số chất kháng sinh hữu dụng. Một số ít chất kháng sinh được sản xuất từ các loài vi sinh vật thuộc các chi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* và được sử dụng rộng rãi trong công tác chữa bệnh. Các nhà nghiên cứu đang cố gắng tìm kiếm các chất kháng sinh mới từ những loài vi sinh vật thuộc "nhóm hiếm" hoặc các chủng vi sinh vật sống dưới nước, đặc biệt là các vi sinh vật sống ở biển, ví dụ như chất kháng sinh algixit, còn có tên là xyanobacterin do *Cyanobacterium* sản sinh ra và fungixit (kháng sinh diệt nấm) do *Altermonas* sp. sinh ra.

Khoa học phát triển, điều kiện trang thiết bị hiện đại, người ta đã nghiên cứu và phát hiện ra nhiều hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ vi sinh vật. Đến đầu những năm thập kỷ 90 của thế kỷ XX, người ta đã phát hiện và mô tả trên 50.000 loài vi sinh vật và tìm hiểu xem có bao nhiêu hợp chất tự nhiên do chúng sinh ra? Chỉ tính riêng ở xã khuẩn, người ta đã mô tả 660 loài và tìm ra trên 3.000 chất kháng sinh (Krumphanzl, 1984).

d) Các nhóm chất và cơ chế tác động của chất kháng sinh

Các chất kháng sinh có cấu tạo hóa học rất khác nhau. Một vài ý tưởng về tính đa dạng cấu trúc này có thể được xem xét theo các chất kháng sinh tiêu biểu được trình bày ở bảng 10.1. Người ta đã phân loại các chất kháng sinh vào một vài nhóm chính có liên quan đến nhau dựa trên cấu tạo hóa học của chúng.

BẢNG 10.1. CÁC NHÓM KHÁNG SINH VÀ CÁC CHẤT KHÁNG SINH ĐIỂN HÌNH

TT	Nhóm kháng sinh	Kháng sinh điển hình
1	β -lactam	Penixilin G
2	Polypeptit	Polymyxin B
3	Aminoglucozit	Streptomycin
4	Tetraxyclin	Clotetraxyclin
5	Erythromyxin	Erythromyxin A
6	Polyen	Nistatin
7	Các kháng sinh khác	Cloramphenicol

10.2.2. Nghiên cứu sản xuất kháng sinh

a) Nâng cao khả năng sinh kháng sinh của các chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh phân lập từ tự nhiên thường có hoạt tính thấp. Để đưa vào sản xuất có ý nghĩa kinh tế, người ta phải tiến hành chọn lọc chủng có hoạt tính cao (chi tiết xem mục 2.2.2, chương 2).

b) Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng sản sinh kháng sinh

Đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu suất sinh kháng sinh của các chủng sản xuất là điều kiện nuôi cấy: thành phần môi trường, thông khí, nhiệt độ,... Theo số liệu của Egorov, 1978, cho thấy, lựa chọn môi trường tối ưu cho chủng nhận được thông qua quá trình chọn lọc có thể nâng cao hiệu suất kháng sinh lên 3 lần. Thông thường, các chủng nhận được qua quá trình chọn lọc đều có sự thay đổi nhu cầu của chúng đối với điều kiện nuôi cấy. Biến chủng *Penicillium chrysogenum* Q-176 có hoạt tính đạt 3.050 đv/ml đòi hỏi nồng độ lưu huỳnh trong môi trường tăng.

Điều quan trọng cho quá trình tuyển chọn các biến chủng mới phải có hiệu quả kinh tế. Đôi khi hiệu suất kháng sinh của chủng có thể tăng hơn 10–20% so với chủng gốc nhưng lại không có ý nghĩa kinh tế, nếu như điều kiện nuôi cấy thay đổi quá lớn, ví như đòi hỏi môi trường dinh dưỡng đất hơn và điều kiện điều hòa cho quá trình quá phức tạp.

Tóm lại, nghiên cứu nâng cao hiệu suất kháng sinh thường liên quan chặt chẽ với các yếu tố như tuyển chọn các chủng có hoạt tính cao nhất và nghiên cứu điều kiện nuôi cấy các chủng đã tuyển chọn.

c) Bảo quản các chủng sinh kháng sinh trong trạng thái hoạt động

Bảo quản các chủng sinh kháng sinh giữ được hoạt tính cao có ý nghĩa quan trọng trong việc sản xuất kháng sinh ở mức độ công nghiệp cũng như nghiên cứu trong phòng thí nghiệm. Hoạt tính kháng sinh thường không phụ thuộc nhiều vào điều kiện nuôi cấy mà phụ thuộc nhiều vào việc bảo quản chúng. Trong quần thể, các khuẩn lạc của chủng khi phát triển, nhiều khuẩn lạc không có hoạt tính.

Ngày nay, người ta sử dụng nhiều phương pháp bảo quản giống, nhưng phương pháp thường dùng là những phương pháp sau: 1. Đông khô chủng giống; 2. Giữ bào tử trong đất, cát và các loại hạt vô trùng; 3. Giữ bào tử huyền phù trong nước trong ampul; 4. Bảo quản bào tử trong thạch anh vô trùng; 5. Giữ chủng cấy trong môi trường thạch có phủ dầu vô trùng; 6. Bảo quản ở nhiệt độ thấp ($4 - 5^{\circ}\text{C}$); 7. Bảo quản trong nitơ lỏng.

Ngoài các phương pháp trên, hiện nay có một phương pháp cũng dễ áp dụng và thuận tiện cho việc sử dụng là bảo quản tế bào sinh dưỡng hay bào tử huyền phù trong môi trường dịch thể có bổ sung thêm một lượng glyxerin vô trùng bằng lượng nước huyền phù và bảo quản trong lạnh.

Trong các phương pháp trên, thì phương pháp đông khô là phương pháp bảo quản được chúng không thay đổi tính chất sinh lý, sinh hoá cũng như khả năng sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học tốt nhất. Bằng phương pháp đông khô, vi khuẩn có thể bảo quản được 16–18 năm; bào tử nấm có thể bảo quản được 10 năm không bị thay đổi tính chất cơ bản của chúng.

d) Xác định hoạt tính kháng sinh của các chủng vi sinh vật

Có nhiều phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh dựa vào việc nuôi cấy các chủng vi sinh vật trên môi trường thạch hay trong môi trường lỏng.

– Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh của vi sinh vật nuôi cấy trên môi trường thạch:

Phần lớn các phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh của các chủng vi sinh vật nuôi cấy trên môi trường thạch mang tính chất sơ bộ xác định hoạt tính kháng sinh. Theo Egorov, 1965, có 4 phương pháp sử dụng rộng rãi nhất: Phương pháp cấy vuông góc; phương pháp cục thạch; phương pháp cấy nửa đĩa thạch với vi sinh vật đối kháng, nửa còn lại cấy vuông góc các vi sinh vật kiểm định và phương pháp cục thạch đặt ở trung tâm đĩa thạch. Các phương pháp này dựa trên khả năng khuếch tán của các chất kháng sinh vào môi trường thạch, dựa vào khả năng sinh kháng sinh của các chủng vi sinh vật khuếch tán vào môi trường thạch ức chế vi sinh vật kiểm định tạo ra vùng vô khuẩn xung quanh khuẩn lạc của chúng.

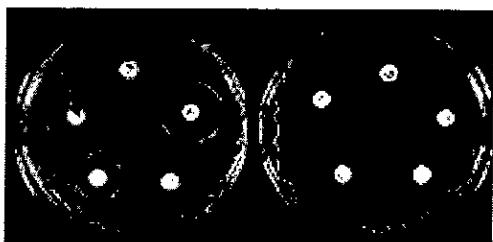
+ Phương pháp cấy vuông góc:

Cấy một vạch vi sinh vật sinh kháng sinh ngang đường kính của đĩa thạch, sau đó cấy các vi sinh vật kiểm định vuông góc với vạch cấy. Sau khi nuôi trong tủ ấm với nhiệt độ thích hợp, xác định hoạt tính kháng sinh bằng cách đo khoảng cách vô khuẩn từ khuẩn lạc của vi sinh vật kiểm tra đến vi sinh

vật kiểm định không bị tiêu diệt. Phương pháp này dùng cho vi sinh vật kiểm tra và vi sinh vật kiểm định đều phát triển trên cùng một môi trường. Phương pháp này ít được sử dụng trong thực tế.

+ Phương pháp cục thạch:

Vi sinh vật nghiên cứu được cấy lên trên mặt môi trường thạch trong hộp Petri, sau khi nuôi ở nhiệt độ thích hợp, khi vi sinh vật phát triển tốt, dùng



Hình 10.3. Sử dụng cục thạch có vi sinh vật phát triển để xác định tính kháng sinh của vi sinh vật

khoan nút chai đột cục thạch chuyển sang mặt môi trường thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định trong hộp Petri khác. Hộp Petri nên để vào tủ lạnh 1–2 giờ để kháng sinh khuếch tán vào thạch, sau đó đặt vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật kiểm định phát triển. Sau 24 giờ đối với vi khuẩn, 48–72 giờ đối với nấm, đo vòng vô khuẩn xung quanh cục thạch. Hoạt tính kháng sinh là độ lớn của đường kính vòng vô khuẩn (hình 10.3). Phụ thuộc vào hoạt tính kháng khuẩn của các loại kháng sinh và khả năng mẫn cảm của vi khuẩn kiểm định, nếu vòng phân giải lớn thì đặt ít cục thạch, nếu vòng phân giải nhỏ có thể đặt nhiều hơn, trung bình mỗi đĩa Petri chỉ nên đặt 5–7 cục thạch.

+ Phương pháp cấy nửa đĩa thạch:

Sau khi rót môi trường thạch thích hợp cho vi sinh vật nghiên cứu vào hộp Petri, thạch đông lại, cấy vi sinh vật nghiên cứu lên mặt thạch và dùng dao vô trùng lấy một nửa đĩa thạch bỏ đi. Sau đó hộp Petri được đặt vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp. Sau khi vi sinh vật phát triển, bổ sung môi trường thạch thích hợp cho vi sinh vật kiểm định và cấy vi sinh vật kiểm định vuông góc với nửa đĩa thạch có vi sinh vật đã phát triển. Hộp Petri cho vào tủ lạnh 1–2 giờ để kháng sinh khuếch tán vào thạch, sau đó đặt vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật kiểm định phát triển. Hoạt tính kháng sinh là độ lớn của khoảng cách giữa khuẩn lạc của vi khuẩn kiểm định còn sống đến vi sinh vật cần kiểm tra. Ưu điểm của phương pháp này là có thể sử dụng cho vi sinh vật kiểm tra và vi sinh vật kiểm định không phát triển trên môi trường.

+ Phương pháp cục thạch đặt ở trung tâm đĩa thạch:

Sau khi tạo cục thạch có vi sinh vật cần kiểm tra phát triển (như trình bày ở phương pháp cục thạch) được đặt vào giữa hộp Petri, sau đó đổ môi trường thạch thích hợp cho vi khuẩn kiểm định và cấy vi khuẩn kiểm định từ cục thạch ra thành đĩa. Hộp Petri cho vào tủ lạnh 1–2 giờ để kháng sinh khuếch tán vào thạch, sau đó đặt vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật kiểm định phát triển. Hoạt tính kháng sinh là độ lớn giữa vi khuẩn kiểm định còn sống đến cục thạch.

– Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh của vi sinh vật nuôi cấy trên môi trường dịch thể:

Để kiểm tra hoạt tính kháng sinh của các chủng nuôi cấy trong môi trường dịch thể, thường sử dụng 2 phương pháp: đục lỗ thạch và khoanh giấy lọc.

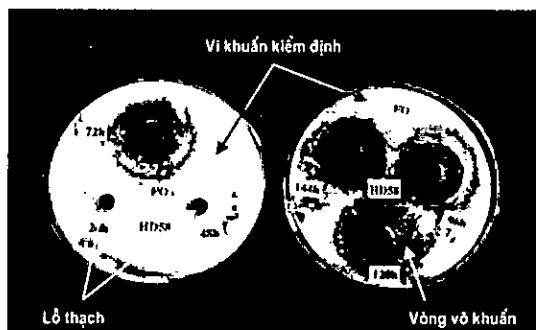
+ Phương pháp đục lỗ thạch:

Môi trường thạch thích hợp cho vi khuẩn kiểm định sau khi đun nóng chảy được rót vào hộp Petri với lớp thạch dày hơn phương pháp cục thạch. Sau khi cấy vi khuẩn kiểm định, trang đều, dùng khoan nút chai đột các lỗ thạch sao cho các lỗ thạch cách nhau 2–3cm. Dịch nuôi cấy chủng vi sinh vật cần kiểm tra trong môi trường dịch thể được lọc hay ly tâm loại sinh khối, dịch lọc hay dịch ly tâm được nhỏ vào các lỗ thạch (hình 10.4).

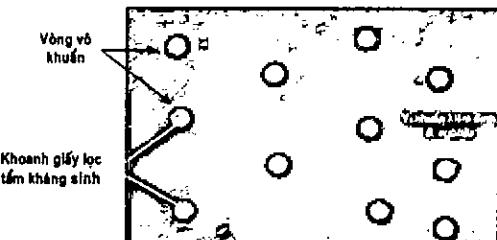
Hộp Petri cho vào tủ lạnh 1–2 giờ để kháng sinh khuếch tán vào môi trường thạch, sau đó đặt vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật kiểm định phát triển. Sau 24 giờ đối với vi khuẩn, 48 đến 72 giờ đối với nấm, lấy hộp Petri ra, đo vòng vô khuẩn xung quanh lỗ thạch. Hoạt tính kháng sinh là độ lớn của đường kính vòng vô khuẩn.

+ Phương pháp khoanh giấy lọc:

Trong thực tế, có loại kháng sinh không tiết vào môi trường mà nằm trong sinh khối vi sinh vật. Muốn kiểm tra hoạt tính kháng sinh của chúng, cần tách chiết bằng các loại dung môi như cồn etylic, hoặc cồn etylic đã axit hoá, axeton, butanol,... Nhưng các dung môi này lại ảnh hưởng đến sinh trưởng phát triển của vi khuẩn kiểm định. Do vậy, sau khi chiết bằng dung môi, dịch chiết kháng sinh được tẩm vào khoanh giấy lọc loại dày (thường loại Watman No 8) có đường kính 5–6mm với khối lượng bằng nhau bằng cách cho khoanh giấy lọc vào đĩa đồng hồ và nhỏ một lượng dịch chiết nhất định và sấy khô trong tủ sấy không quá 50°C. Khi khoanh giấy khô, chuyển sang đĩa thạch đã cấy vi khuẩn kiểm định. Các bước tiếp theo như phương pháp cục thạch. Hoạt tính kháng sinh là độ lớn của đường kính vòng vô khuẩn xung quanh khoanh giấy (hình 10.5). Phương pháp này



Hình 10.4. Xác định hoạt tính kháng sinh trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp đục lỗ thạch (vi khuẩn kiểm định: *Fusarium*)



Hình 10.5. Xác định hoạt tính kháng sinh trong dung môi bằng phương pháp khoanh giấy lọc

thường được sử dụng để xác định kháng sinh đồ trong điều trị (với khoanh giấy lọc thường được tầm 1 lượng kháng sinh tinh khiết theo quy định và vi khuẩn kiểm định là các bệnh phẩm).

– Phương pháp định lượng kháng sinh:

Định lượng kháng sinh trong môi trường nuôi cấy hay trong các chế phẩm được thực hiện bằng các phương pháp vi sinh vật, hoá học hay hoá lý. Trong thực tế, phương pháp vi sinh vật rất hay được dùng vì ngoài việc đánh giá hàm lượng kháng sinh còn đánh giá chính xác hoạt tính kháng sinh của chúng và không đòi hỏi thiết bị đắt tiền.

+ Phương pháp vi sinh vật:

Định lượng kháng sinh bằng phương pháp vi sinh vật dựa trên nguyên tắc: kháng sinh ức chế sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật kiểm định. Tuỳ thuộc từng loại kháng sinh có khả năng ức chế các loại vi sinh vật khác nhau mà lựa chọn các chủng vi sinh vật phù hợp. Ví dụ, kháng sinh có tác dụng lên vi khuẩn gram dương: người ta chọn các chủng vi khuẩn gram dương, có tác dụng lên nấm mốc: chọn các chủng nấm mốc,... dựa trên nguyên tắc các chủng đó mãn cảm với loại kháng sinh đó. Các chủng kiểm định này thường được định rõ tên và lưu giữ trong bộ sưu tập giống chuẩn, vì những chủng vi sinh vật thường có hiện tượng nhòn thuốc, kháng lại các chất kháng sinh làm cho việc định lượng không chính xác.

Muốn định lượng được các chất kháng sinh cần phải so sánh khả năng ức chế vi sinh vật kiểm định với kháng sinh chuẩn đã biết, từ đó tính toán được hàm lượng kháng sinh cần phân tích. Tuy nhiên, phương pháp này cũng có một số nhược điểm đòi hỏi quá trình xác định mẫu thí nghiệm với mẫu đối chứng phải chuẩn và phụ thuộc vào nhiều yếu tố bên ngoài như nhiệt độ, pH và thành phần môi trường nuôi cấy, vi sinh vật,... cho nên mức độ chính xác cho phép sai số $\pm 5\%$.

Có 2 phương pháp chính định lượng kháng sinh bằng phương pháp vi sinh vật: Pha loãng liên tục và khuếch tán trên thạch.

* Phương pháp pha loãng liên tục:

Phương pháp này sử dụng để định lượng kháng sinh trong dịch nuôi cấy hay dung dịch kháng sinh hòa tan dựa trên nguyên tắc pha loãng kháng sinh trong môi trường canh thang trong suốt trong các ống nghiệm đã tiệt trùng thành các nồng độ khác nhau. Thông thường người ta pha loãng dung dịch kháng sinh theo hệ số 2: Nếu nồng độ kháng sinh thấp: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16;

1:32...; nếu nồng độ kháng sinh cao hơn: 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320...; và nếu nồng độ kháng sinh cao hơn nữa: 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600,...

Tại mỗi nồng độ pha loãng trong các ống nghiệm, cấy một lượng vi sinh vật kiểm định bằng nhau. Sau đó, đặt các ống nghiệm kiểm tra vào tủ ấm với nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật kiểm định phát triển, sau 24 giờ đối với vi khuẩn, 48–72 giờ đối với xạ khuẩn và nấm đem ra đọc kết quả. Nếu ống nghiệm nào trong suốt là nồng độ kháng sinh đã giết chết vi sinh vật kiểm định. Song song với mẫu thí nghiệm, mẫu đối chứng với nồng độ kháng sinh đã biết, cũng được pha loãng đến nồng độ giết chết vi sinh vật kiểm định. Từ đó ta có thể định lượng được lượng kháng sinh có trong dịch nuôi cấy hay trong chế phẩm kháng sinh. Ví dụ, định lượng kháng sinh penicillin trong dịch nuôi cấy *P. chrysogenum* với dung dịch penicillin G chuẩn là 10đv/ml.

KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM ĐƯỢC TIẾN HÀNH THEO BẢNG SAU:

Số thứ tự ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Độ pha loãng	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:25600
Penicillin chuẩn (10 đv/ml)	–	–	–	–	+	+	+	+	+
Mẫu thí nghiệm	–	–	–	–	–	–	–	+	+

Ghi chú: (–): vi khuẩn không phát triển; (+): Vi khuẩn phát triển

Như vậy, ở ống nghiệm số 4 (với độ pha loãng 1: 80) của chất kháng sinh vi khuẩn kiểm định không phát triển được, còn ở ống nghiệm số 6 (với nồng độ pha loãng 1:320) của dịch cần định lượng, vi khuẩn kiểm định không phát triển được. Như vậy, nồng độ kháng sinh trong dịch nuôi cấy được xác định theo công thức sau: $X = A / B \times X_0$, trong đó, X là hàm lượng kháng sinh có trong dịch nuôi cấy (đv/ml hoặc mcg/ml); A – là nồng độ pha loãng của mẫu kháng sinh chuẩn; B – nồng độ pha loãng của mẫu thử; X_0 – nồng độ ban đầu của của kháng sinh chuẩn.

Từ ví dụ thí nghiệm trên ta có thể tính hàm lượng penicillin G trong dịch nuôi cấy chủng *P. chrysogenum* như sau: $X = 640/80 \times 10 = 80\text{đv/ml}$. Nồng độ kháng sinh ở đây có thể tính theo đơn vị kháng sinh/ml dung dịch hay mcg/ml dung dịch, từ đó có thể suy ra lượng kháng sinh (đv hay mcg) trong 1mg chế phẩm.

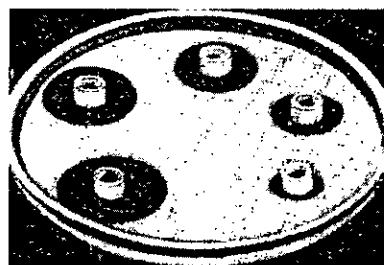
Để kết quả xác định chính xác bằng phương pháp này, cần lưu ý những điểm sau:

- 1) Dùng môi trường pha loãng có thành phần ổn định và phù hợp cho vi khuẩn kiểm định phát triển tốt.
- 2) Quá trình xác định phải đảm bảo vô trùng.
- 3) Số lượng vi khuẩn kiểm định cho vào các ống nghiệm phải bằng nhau.
- 4) Nhiệt độ và thời gian nuôi cấy phải phù hợp cho từng loại vi khuẩn kiểm định.

– Phương pháp khuếch tán trên thạch:

Nguyên tắc của phương pháp này là chất kháng sinh khuếch tán vào môi trường thạch có chứa vi khuẩn kiểm định tạo ra vòng vô khuẩn (như mục “Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh của vi sinh vật nuôi cấy trên môi trường dịch thể” ở trên). Độ lớn của vòng vô khuẩn là hoạt tính kháng sinh.

Để định lượng được chất kháng sinh trong dịch nuôi cấy hay trong chế phẩm, chất kháng sinh được pha loãng đến nồng độ cần thiết sao cho vòng vô khuẩn tương đương với lượng kháng sinh chuẩn xác định. Thường nồng độ pha loãng của các mẫu thí nghiệm theo hệ số 2. D'mitrieva, 1970 đã đưa ra phương pháp chuẩn và lập bảng xác định các số hiệu chỉnh cần thiết để loại bỏ sai số trong quá trình xác định, ở đây, đường kính vòng vô khuẩn chuẩn được đưa về 17mm đối với các kháng sinh chuẩn làm đối chứng và được xem tương đương với nồng độ kháng sinh tương ứng. Do mỗi loại kháng sinh có hoạt tính kháng sinh khác nhau, nên nếu quy về đường kính vòng vô khuẩn chuẩn là 17mm, thì hàm lượng các chất kháng sinh chuẩn khác nhau: Penicillin G là 0,6mcg/ml; tetracycline: 1mcg/ml, streptomycin: 1mcg/ml, baxitroxin: 10mcg/ml,... Do quá trình xác định, lớp thạch dày, mỏng khác nhau, do đó vòng vô khuẩn có thể cao hơn hoặc thấp hơn, sẽ trừ đi số 17 để làm số hiệu chỉnh để cộng vào hay trừ đi với mẫu thí nghiệm (chi tiết, xem Dược điển Việt Nam, 1971). Dung dịch thí nghiệm sau khi đã pha loãng được nhỏ vào ống thép không gỉ hình trụ (hình 10.6) hoặc vào lỗ thạch với một lượng nhất định như nhau và giống với dung



Hình 10.6. Xác định hoạt tính kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán sử dụng ống thép.

dịch kháng sinh chuẩn. Sau khi để vào tủ lạnh để kháng sinh khuếch tán vào trong thạch, được nuôi trong tủ ấm với nhiệt độ và thời gian thích hợp cho vi khuẩn kiểm định phát triển. Sau đó lấy ra so sánh vòng vô khuẩn của mẫu thí nghiệm ở các nồng độ pha loãng với vòng vô khuẩn của mẫu đối chứng (chuẩn) thường là 1dv/ml hay 1mcg/ml và nhân với số lần pha loãng ra hàm lượng kháng sinh cần tìm.

Để xác định kháng sinh trong các dung môi (trong quá trình tách chiết kháng sinh) người ta sử dụng phương pháp khoanh giấy lọc như sau: Dịch kháng sinh được pha loãng đến nồng độ cần thiết được tẩm một lượng dung môi nhất định vào khoanh giấy lọc. Sau khi sấy khô ở nhiệt độ dưới 50°C, khoanh giấy lọc được đặt lên mặt môi trường thạch đã cấy vi khuẩn kiểm định và nuôi trong tủ ấm với nhiệt độ thích hợp. So sánh với kháng sinh chuẩn để xác định hàm lượng kháng sinh có trong dịch chiết.

Những điểm cần chú ý khi sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch để định lượng kháng sinh: (1) Sử dụng thạch làm môi trường phải có chất lượng tốt, phải là loại thạch trung tính; (2) Độ dày của lớp thạch phải bằng nhau, khi đổ thạch vào hộp đựng thạch phải nằm trên một mặt phẳng (đặc biệt là khi dùng hộp kính có bề mặt rộng) hoặc đổ một lớp thạch trơ và trang đều trước khi đổ môi trường thạch để tạo mặt phẳng; (3) pH môi trường và nhiệt độ nuôi cấy vi sinh vật phải phù hợp với vi sinh vật kiểm định; (4) Lượng vi sinh vật cấy vào môi trường thạch phải bằng nhau; (5) Đảm bảo vô trùng trong quá trình xác định.

– Phương pháp hoá học và hoá lý:

Trong thực tế, một số kháng sinh được định lượng bằng phương pháp hoá học và hoá lý. Ưu điểm của phương pháp này là thực hiện nhanh và cho kết quả ngay, thuận tiện cho việc nghiên cứu động thái quá trình lên men sản xuất.

+ Phương pháp hoá học:

Để định lượng được bằng phương pháp hoá học, phải dựa vào các nhóm chức của kháng sinh và sử dụng các chất chỉ thị để định lượng bằng phương pháp chuẩn độ. Ví dụ, muốn định lượng được penicillin, người ta phá huỷ penicillin bằng kiềm, sau khi trung hoà, các sản phẩm được oxy hoá bằng iod. Định lượng iod thừa bằng natri thiosunphat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), từ đó tính được lượng iod đã bị tiêu thụ cho phản ứng oxy hoá và suy ra được hàm lượng penicillin.

+ Phương pháp hoá lý:

Phương pháp hoá lý dựa trên phản ứng tạo màu của chất kháng sinh hoặc sản phẩm phân huỷ của chúng bằng cách đo quang phổ tử ngoại hoặc máy so màu. So với kháng sinh chuẩn sẽ tính được hàm lượng kháng sinh trong chế phẩm hoặc trong dung dịch.

Ví dụ, định lượng kháng sinh nhóm tetracyclin bằng cách cho kháng sinh tạo phức với clorua sắt (FeCl_3), sau đó đo phổ tử ngoại để xác định sự biến mất của đỉnh hấp thụ cực đại của kháng sinh sau khi thuỷ phân bằng kiềm.

Tuy nhiên, mỗi loại kháng sinh được định lượng bằng phương pháp nào là chính xác và thuận tiện đã được quy định trong Dược điển của mỗi nước. Các chất kháng sinh chỉ khi được kiểm nghiệm theo các quy định của Dược điển mới có giá trị pháp lý.

10.2.3. Các giai đoạn chính của quá trình lên men sản xuất kháng sinh

a) *Đại cương về sản xuất kháng sinh*



Hình 10.7. Sản xuất penicillin bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt tại Trường Oxford, Anh (năm 1938)



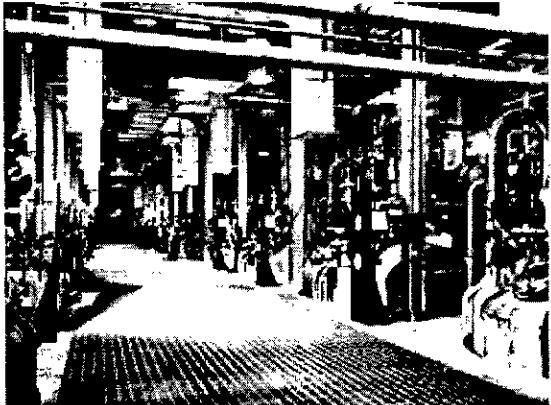
Hình 10.8. Thiết bị lên men lớn đầu tiên (1943) ở nhà máy Cherokee Plant, Danville, PA.

Sau khi phát hiện ra khả năng chữa bệnh của penicillin, đã xuất hiện nhiệm vụ tổ chức sản xuất lượng lớn kháng sinh này. Công nghiệp sản xuất kháng sinh được hình thành và phát triển từ những năm 40 của thế kỷ XX. Từ việc nghiên cứu sản xuất penicillin bằng phương pháp lên men bề mặt (hình 10.7), hiệu suất kháng sinh thấp nên chuyển sang nồi “lên men chìm” lớn bằng hệ thống cấp không khí sạch vào nồi lên men (các hình 10.8; 10.9 và 10.10) người ta đã điều chế lượng kháng sinh lớn hơn. Việc cải tiến môi

trường lên men bằng cách thay thế nguồn nitơ bằng nước ngâm ngô (corn steep liquor) – phê liệu của công nghiệp sản xuất glucozo– đã làm tăng hiệu suất kháng sinh lên 12–20 lần. Nhờ cải biến chủng sản xuất và tối ưu quá trình lên men mà hiệu suất kháng sinh ngày càng cao, giá thành sản phẩm ngày càng hạ.



**Hình 10.9. Phần xuống tách
chiết và làm sạch penicillin
năm 1945**



**Hình 10.10. Phần trên của phần xuống lén men
để sản xuất penicillin và vitamin B₁₂**

Theo Egorov, 1983, thì giá thành 1 triệu đơn vị penicillin năm 1943 là 18USD (tương đương khoảng 30.000USD/kg) thì năm 1960 chỉ còn 0,02 USD (tương đương 340USD/kg), trong vòng 17 năm giảm 900 lần. Ngày nay, với sự phát triển của kỹ thuật di truyền, công nghệ gen, người ta nắm được con đường sinh tổng hợp tạo được chủng có năng suất cao, cải tiến trang thiết bị của hệ thống lên men nên năng suất chủng giống ngày càng cao, hiệu suất lên men lớn nên giá thành chỉ còn 20–30USD/kg penicillin G-Na.

Những thành công của lĩnh vực sản xuất kháng sinh có thể khẳng định là năng suất phụ thuộc vào quá trình công nghệ, bao gồm các giai đoạn chính sau:

b) Giai đoạn sinh tổng hợp (tạo thành) kháng sinh

Đây là giai đoạn bao gồm các quá trình phức tạp để thu nhận kháng sinh. Nhiệm vụ chính của giai đoạn này là tối ưu điều kiện để phát triển sinh khối của chủng sản xuất và tổng hợp lượng kháng sinh cao nhất. Điều này phụ thuộc vào hoạt tính sinh tổng hợp của chủng, thời gian tích luỹ kháng sinh cao nhất, chất lượng môi trường nuôi cấy chủng sản xuất, loại tiền chất bổ sung, cũng như năng lượng tiêu hao liên quan đến sự phát triển của chủng sản sinh các chất kháng sinh.

c) Giai đoạn tiền xử lý dịch nuôi cấy (để tách sinh khối khỏi dịch nuôi cấy)

Giai đoạn này ảnh hưởng nhiều bởi thành phần môi trường nuôi cấy, khả năng sinh trưởng của chủng sản xuất và vị trí tích luỹ các chất kháng sinh (trong dịch nuôi cấy hay trong sinh khối).

d) Giai đoạn tách chiết và tinh sạch kháng sinh

Giai đoạn này phụ thuộc nhiều vào tính chất, cấu trúc của kháng sinh và vị trí mà kháng sinh tích tụ chính khi sử dụng các phương pháp tách chiết và tinh sạch khác nhau. Các phương pháp chính thường là: Chiết rút bằng dung môi, kết tủa, hấp thụ trên các vật liệu trao đổi ion, cô đặc và sấy khô.

e) Giai đoạn thu nhận thành phẩm và bào chế thành thuốc kháng sinh

Để đảm bảo thuốc có chất lượng tốt, trong giai đoạn này cần vệ sinh quá trình bào chế thuốc theo tiêu chuẩn an toàn thuốc (GMP).

Hiện nay, trong sản xuất kháng sinh hiện đại, cần thiết phải xác định giảm chi phí tối đa cho một đơn vị sản phẩm. Muốn đạt được điều đó cần phải:

- Sử dụng các chủng sản xuất có hiệu suất sinh kháng sinh cao nhất.
- Tạo điều kiện thuận lợi cho sinh trưởng, phát triển của chủng sản xuất, đặc biệt là môi trường nuôi cấy.
- Sử dụng các phương pháp lập quy hoạch thực nghiệm để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy (môi trường và điều kiện lên men) để thu nhận hiệu suất kháng sinh cao nhất.
- Sử dụng hệ thống thiết bị của toàn bộ quá trình được điều khiển tự động dựa trên các thông số chính cho sự phát triển của chủng sản xuất và sinh tổng hợp kháng sinh.

10.2.4. Các phương pháp nuôi cấy chủng sản sinh kháng sinh

Trong điều kiện hiện nay, ở mức độ sản xuất công nghiệp, phương pháp nuôi cấy các chủng sinh kháng sinh cũng như các chất có hoạt tính sinh học khác thường được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy chìm. Đó là phương pháp nuôi cấy chủng sản xuất trong môi trường dinh dưỡng dịch thể được cấp không khí vô trùng và đảo trộn liên tục. Từ đó có thể cải biến thành các phương thức lên men theo phương pháp nuôi cấy chìm các chủng vi sinh vật như sau:

a) Lên men theo mẻ

Cả quá trình phát triển của vi sinh vật diễn ra chỉ trong một nồi lên men, sau khi giải phóng dịch nuôi cấy của mẻ trước, rửa sạch cho môi trường lên men mới, sau thanh trùng lại tiếp tục lên men mẻ mới.

b) Lên men có bổ sung

Nuôi cấy vi sinh vật trong nồi lên men chỉ có 30–60% thể tích dịch lên men, sau một thời gian lên men nhất định, bổ sung thêm lượng môi trường mới cho đủ 100% thể tích môi trường lên men.

c) Lên men nhiều bình lên men

Vi sinh vật được phát triển trong các bình lên men liên tiếp. Dịch nuôi cấy của một giai đoạn phát triển nhất định của vi sinh vật sẽ được chuyển từ nồi lên men thứ nhất sang nồi thứ hai, sau đó từ nồi thứ hai sang nồi thứ ba,... Khi nồi lên men được giải phóng, nhanh chóng bổ sung môi trường và cấy giống mới. Với cách nuôi cấy vi sinh vật này có thể sử dụng dung tích nồi lên men hợp lý hơn.

d) Lên men liên tục

Giống như phương pháp lên men chiểu sâu, nhưng vi sinh vật phát triển trong điều kiện dòng chảy của môi trường dinh dưỡng và dịch nuôi cấy liên tục vào và ra khỏi nồi lên men, cho phép luôn giữ sự sinh trưởng của vi sinh vật ở một giai đoạn nhất định. Giai đoạn sinh trưởng đó được xác định là giai đoạn vi sinh vật sinh tổng hợp lượng kháng sinh cao nhất. Hiện nay, phương pháp lên men liên tục đang được nghiên cứu phát triển bằng cách các tế bào chủng sản xuất được cố định trên các chất mang khác nhau như alginat–Na, chitosan,... Ưu điểm của phương pháp này là kiểm soát được quá trình lên men, tiết kiệm được nguyên liệu sản xuất và không đòi hỏi dung tích nồi lên men lớn.

10.2.5. Quá trình lên men sản xuất kháng sinh

Trong sản xuất kháng sinh ở mức độ công nghiệp, đây là giai đoạn quan trọng nhất, bao gồm các quá trình phức tạp. Ngoài việc tạo được chủng sản xuất có hiệu suất cao, nhiệm vụ chính của giai đoạn này là tối ưu điều kiện lên men để phát triển sinh khối và tổng hợp kháng sinh cao nhất. Quá trình công nghệ lên men sản xuất kháng sinh từ các chủng vi sinh vật được Kohler, 1956, mô tả theo sơ đồ ở hình 5.3 (chương 5), bao gồm các bước: Chuẩn bị giống trong phòng thí nghiệm, nhân giống và lên men sinh tổng hợp kháng sinh.

a) Chuẩn bị môi trường

Khâu chuẩn bị môi trường nhân giống cũng như môi trường lên men là khâu quan trọng, vì phụ thuộc vào từng loại chủng sản xuất khác nhau được chuẩn bị khác nhau. Một môi trường chất lượng tốt phải đáp ứng các

yêu cầu sau: 1) Đảm bảo cho vi sinh vật phát triển và tạo nhiều kháng sinh nhất, 2) Thành phần dễ kiểm, 3) Dễ lọc và 4) Thuận tiện cho việc tách chiết và tinh sạch kháng sinh.

Điều quan trọng nhất của khâu chuẩn bị môi trường là thanh trùng, nếu môi trường có chất dễ bị phân huỷ ở nhiệt độ cao kéo dài thì phải có chế độ khử trùng riêng. Tuy nhiên, hầu hết các loại môi trường được thanh trùng trong nồi áp suất cao, thời gian thanh trùng rút ngắn, vừa đảm bảo chất lượng môi trường, vừa tiết kiệm năng lượng. Môi trường trong các bình nhỏ như bình tam giác hay bình thuỷ tinh được thanh trùng trong nồi áp suất riêng, còn môi trường lớn người ta thanh trùng ngay trong nồi lên men.

Có 2 phương pháp thanh trùng môi trường chính: gián đoạn và liên tục.

– Phương pháp gián đoạn thường sử dụng cho thanh trùng môi trường lên men không lớn bằng cách đun nóng môi trường lên nhiệt độ và áp suất nhất định, kéo dài 30 đến 60 phút, sau đó được làm lạnh đến 27–30°C. Đối với môi trường lên men sản xuất lớn, thường thời gian giữ nhiệt giảm hơn (bảng 10.2).

**BẢNG 10.2. THỜI GIAN THANH TRÙNG Ở NHIỆT ĐỘ CAO VỚI THỂ TÍCH
MÔI TRƯỜNG KHÁC NHAU**

(theo Egorov, 1970)

Kích thước nồi lên men (lit)	Thời gian khử trùng (phút)		Kích thước nồi lên men (lit)	Thời gian khử trùng (phút)	
	105°C	121°C		105°C	121°C
230	28,0	17,5	9800	41,3	11,3
980	33,7	12,5	98000	51,5	8,8

– Phương pháp liên tục sử dụng cho việc thanh trùng môi trường có thể tích lớn bằng cách như sau: Môi trường sau khi chuẩn bị chuyển vào thiết bị khử trùng dạng cột có hệ thống ống xoắn bằng máy bơm đặc biệt, cho hơi nước qua với áp suất khoảng 5 atm, nhiệt độ đạt 125–130°C kéo dài 5–10 phút. Sau đó được làm lạnh và chuyển vào nồi lên men. Phương pháp này có nhiều ưu điểm: có thể tự động hoá quá trình, thời gian nhanh, đồng đều và đảm bảo độ vô trùng cao hơn,...

b) Chuẩn bị vật liệu nhân giống

Chuẩn bị vật liệu nhân giống là bước quan trọng cho cả quá trình lên men sinh tổng hợp kháng sinh. Chủng sản sinh kháng sinh thường được nuôi trong môi trường giàu dinh dưỡng. Quá trình này bao gồm các bước: Giống

được hoạt hoá trên môi trường dinh dưỡng thạch trong ống nghiệm, sau đó cấy sang môi trường dinh dưỡng lỏng và nuôi trên máy lắc 2–3 ngày. Sau kiểm tra chất lượngm giống được cấy truyền 0,5–1% sang môi trường nhân giống cấp 1.

c) *Lên men chủng sản trong nồi lên men*

Quá trình phát triển của chủng sản sinh kháng sinh trong môi trường lên men phụ thuộc vào các giai đoạn phát triển của chúng. Ngoài thành phần môi trường dinh dưỡng (nguồn cacbon, nitơ, photphat,...) thì điều kiện tối ưu cho vi sinh vật như nhiệt độ, pH môi trường, mức độ cấp khí và oxy hòa tan cũng phải được kiểm soát. Điều này phụ thuộc rất lớn vào chất lượng của nồi lên men (fermentor).

Để nghiên cứu điều kiện hình thành kháng sinh cũng như các chất có hoạt tính sinh học khác ở mức độ công nghiệp thì cần thiết sử dụng nồi lên men để đánh giá khả năng lên men của các chủng sản xuất.

Nồi lên men là một thiết bị phức tạp, tạo điều kiện thuận lợi cho chủng sản phát triển và sinh tổng hợp kháng sinh trong điều kiện nuôi cấy chìm. Nồi lên men phải có các hệ thống phân phối khí, khuấy trộn môi trường, giữ được nhiệt độ cần thiết cũng như có thiết bị lấy mẫu và kiểm tra được các thông số cần thiết (hình 5.2, chương 5).

Cấp khí cho nồi lên men thông qua ống dẫn khí và được đảo trộn, làm không khí tan trong môi trường bằng cánh khuấy, muốn tăng lượng oxy hòa tan cần có hệ thống khuấy được cải tiến, ngoài việc sử dụng cánh khuấy đảo trộn môi trường, người ta còn đặt các hệ thống chắn sao cho không khí tan đều vào môi trường lên men.

Giữ nhiệt độ thích hợp cho chủng sản sinh kháng sinh cũng là làm tăng khả năng sinh trưởng và hoạt tính sinh lý sinh hoá của chủng. Do vậy, cần có hệ thống làm mát bằng cách cho nước đã làm lạnh qua hệ thống ruột gà hoặc qua lớp vỏ áo của nồi lên men, vì quá trình sinh trưởng của chủng sản xuất là quá trình oxy hoá, nhiệt sinh ra lớn làm cho môi trường nóng lên.

Để giữ cho quá trình lên men theo quy trình đã định, cần có hệ thống kiểm soát và điều khiển các thông số cần thiết như điều chỉnh nhiệt độ, điều chỉnh pH bằng hệ thống cung cấp dung dịch axit hay bazơ, điều chỉnh lượng oxy hòa tan và giữ áp suất nồi lên men,... đặc biệt quá trình lên men có sục khí, độ nhớt của môi trường tăng lên, tạo lượng bọt lớn, do vậy phải có hệ thống kiểm soát bọt và bổ sung dầu phá bọt, thường bổ sung dầu chống bọt từ từ, nếu cho nhiều sẽ ảnh hưởng đến quá trình lên men.

Phụ thuộc vào nhu cầu mà sử dụng các nồi lén men có dung tích khác nhau, trong phòng thí nghiệm thường sử dụng bình lén men bằng thuỷ tinh hoặc bằng thép không gỉ có dung tích không vượt quá 30 lít và thanh trùng rời. Còn sử dụng ở mức độ bán sản xuất (pillot) thường sử dụng nồi lén men bằng thuỷ tinh hay bằng thép không gỉ với dung tích nồi không quá 100 lít. Trong điều kiện sản xuất công nghiệp, dung tích nồi lén men khác nhau: từ 500 lít đến $50m^3$ và $100m^3$. Ở mức độ bán sản xuất và sản xuất công nghiệp, khử trùng môi trường thường kết hợp với thanh trùng nồi lén men theo một hệ thống hơi chung.

Không khí dùng để cấp vào môi trường lén men được thanh trùng bằng cách cho không khí qua phin lọc đặc biệt xếp đầy bông thuỷ tinh và than hoạt tính. Trong công nghiệp, phin lọc bông thuỷ tinh được sử dụng rộng rãi nhất. Tuy nhiên, tế bào vi khuẩn hoặc bào tử cũng thường lọt qua theo dòng khí, nếu áp suất và tốc độ dòng khí lớn. Thường tốc độ của dòng khí tối đa giới hạn $10 - 25cm/giây$ (phụ thuộc vào mật độ của các lớp bông thuỷ tinh trong phin lọc).

10.2.6. Xử lý dịch lén men, tách chiết và tinh sạch kháng sinh

Phần lớn các chủng vi sinh vật sản sinh kháng sinh tách ra khỏi sinh khối vào môi trường xung quanh, nhưng nhiều trường hợp chỉ một phần tiết vào môi trường lén men, phần còn lại vẫn nằm trong sinh khối. Ngược lại, cũng có chủng vi sinh vật sau quá trình lén men, kháng sinh lại chỉ tích tụ trong sinh khối.

Phụ thuộc vào bản chất hoá học của chất kháng sinh mà lựa chọn phương pháp tách chiết kháng sinh phù hợp. Nếu kháng sinh nằm trong dịch nuôi cấy thì lựa chọn các phương pháp chiết rút dung môi không hỗn hợp với nước, kết tủa thành dạng hợp chất không hòa tan hoặc hấp thụ bằng nhựa trao đổi ion, còn kháng sinh nằm trong tế bào vi sinh vật thì chọn phương pháp chiết rút dung môi hữu cơ. Trước khi tiến hành chiết rút kháng sinh từ dịch nuôi cấy, phải loại tế bào (sinh khối) của chủng sản xuất bằng phương pháp lọc hay ly tâm. Có hai loại máy lọc phổ biến: 1) lọc ép khung bản và 2) lọc tang trống.... Quá trình lọc ép khung bản thường được thực hiện bởi áp suất nén, còn lọc tang trống thực hiện bằng máy hút chân không. Một điều đáng lưu ý, pH của dịch nuôi cấy không những ảnh hưởng chất kháng sinh đi ra môi trường nhiều hay tích tụ trong sinh khối nhiều, ví dụ, nếu pH của dịch nuôi cấy *Streptomyces rimosus* thấp (axit), oxytetracyclin đi ra môi trường nhiều, ngược lại, nếu pH kiềm oxytetracyclin lại tích tụ trong sinh khối nhiều hơn; mà chúng còn ảnh hưởng đến quá trình lọc. Dịch lén men

của một số loại vi sinh vật có độ nhớt cao gây khó khăn cho quá trình lọc, do vậy người ta cũng thường bổ sung một số chất trợ lọc để quá trình lọc diễn ra tốt hơn. Để không những chỉ tách sinh khối mà còn loại bỏ các chất không có lợi trong dịch lên men, người ta sử dụng phương pháp ly tâm, thường tốc độ quay lớn 15.000 vòng/phút.

Mục đích làm sạch hoá học là sau khi kháng sinh tách khỏi dịch lọc hay khỏi sinh khối, được cô đặc và loại bỏ các tạp chất, cuối cùng nhận được chế phẩm sạch. Điểm đáng chú ý là các chất kháng sinh thường bị mất hoạt tính trong điều kiện nhiệt độ cao, axit và kiềm cao. Do vậy, khi tách chiết và làm sạch, sử dụng các điều kiện thích hợp sao cho kháng sinh giữ được hoạt tính.

Các phương pháp cơ bản tinh sạch các chất kháng sinh như sau:

a) Phương pháp chiết rút

Làm sạch kháng sinh nhiều lần bằng chiết rút dung môi, sau đó kết tủa và tinh chế.

b) Phương pháp hấp thụ trao đổi ion

Phương pháp này dựa trên bản chất hoá học của kháng sinh: axit, bazơ hay hợp chất vô định hình được hấp phụ trên nhựa trao đổi ion mang điện tích dương hay âm, dạng cationit hay anionit trong cột, sau đó sử dụng dung dịch để thải kháng sinh khỏi nhựa ion. Dung dịch nhận được kháng sinh sạch hơn.

c) Phương pháp kết tủa

Dựa trên bản chất hoá học của chất kháng sinh là chất hữu cơ hay vô cơ có thể kết tủa. Chất kết tủa nhận được được lọc hay ly tâm khỏi dịch lọc. Sau khi sấy khô nhận được chất kháng sinh ở dạng bột tinh sạch hơn.

Sau khi dịch kháng sinh nhận được ở dạng dung dịch đậm đặc, sử dụng máy đông khô hay máy sấy phun để nhận được chế phẩm ở dạng bột.

Phương pháp tách chiết và tinh sạch hoá học cũng như chất lượng của thiết bị và hoá chất có ý nghĩa to lớn đến chất lượng của chế phẩm kháng sinh nhận được.

10.3. CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT PENICILLIN

10.3.1. Vi sinh vật sản sinh penicillin

Các chủng vi sinh vật thuộc chi *Penicillium* và *Aspergillus* có khả năng sinh penicillin. Tuy nhiên, chỉ có các loài *Penicillium notatum* và *Penicillium*

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 10–15dv/ml môi trường lên men bề mặt. Hiện nay, trong công nghiệp sản xuất penixilin bằng phương pháp lên men chìm, người ta chỉ dùng các chủng của loài *P. chrysogenum* trong sản xuất công nghiệp.

P. chrysogenum được nuôi trên môi trường Raistrik thường có hai dạng khuẩn lạc. *Dạng 1*: khuẩn lạc tròn có các nếp nhăn rõ nét, khuẩn ty khí sinh mọc tốt và có màu xanh. Xung quanh khuẩn lạc có đường viền rộng khoảng 2–5mm của những khuẩn ty màu trắng, khuẩn ty cơ chất màu nâu, không có sắc tố hoà tan. *Dạng 2*: Trên bề mặt khuẩn lạc có khuẩn ty màu trắng phát triển, khuẩn ty cơ chất màu nâu. Khuẩn lạc dạng 1 thường có hoạt tính cao hơn dạng 2. Tuy vậy, ngày nay người ta chọn được các chủng sản xuất có hoạt tính cao và ổn định nhờ kỹ thuật di truyền.

Các chủng *P. chrysogenum* sử dụng trong sản xuất công nghiệp thường là các chủng dị dưỡng lyzin, chính vì vậy người ta thường sử dụng môi trường đầy đủ để sản xuất penixilin.

Quá trình lên men sản xuất penixilin nói riêng và các chất kháng sinh nói chung thường thực hiện quá trình lên men hai pha: Pha sinh trưởng và pha sinh tổng hợp.

pH môi trường thích hợp cho *P. chrysogenum* nằm trong khoảng 6 – 6,5. Môi trường kiềm và axit hơn đều làm cho nấm phát triển chậm. Trong quá trình lên men, pH môi trường thường phụ thuộc vào tốc độ sử dụng các nguồn cacbon và N–NH₃.

10.3.2. Phương pháp lên men sản xuất penixilin

Sản xuất penixilin cũng như các chế phẩm sinh học khác dựa vào cơ sở môi trường nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường rắn hay lỏng. Sản xuất penixilin được thực hiện bằng hai phương pháp lên men cơ bản: Lên men bề mặt và lên men chìm.

a) Lên men bề mặt

Phương pháp chỉ được sử dụng trong thời gian đầu trong công nghiệp sản xuất penixilin bằng chủng *P. notatum*.

Môi trường nuôi cấy bề mặt có thể sử dụng là môi trường xốp hoặc môi trường lỏng. Các chất rắn sử dụng cho mục đích này là các loại hạt hoặc cám gạo. Cám hay các loại hạt đã nghiền được làm ướt, độ ẩm thích hợp là 50–60%, sau khi thanh trùng để nguội đến 30°C thì cấy bào tử nấm vào. Thời

gian lên men 6–7 ngày ở 24–28°C trong buồng nuôi có điều chỉnh nhiệt độ, độ ẩm và thông gió. Nói chung, phương pháp lên men penixilin trên môi trường xốp giống như lên men sản xuất enzym bằng nấm mốc.

Ngày nay, lên men sản xuất penixilin bằng các phương pháp lên men bề mặt không được sử dụng, mà thay thế bằng phương pháp lên men chìm.

b) Lên men chìm

Thành phần môi trường nuôi nấm *Penicillium* theo phương pháp này thường gồm cao ngô, glucozơ, rỉ đường, lactozơ hoặc bán thành phẩm của các loại đường, các loại muối amon, phophat, kali hoặc natri, các loại muối sunphat mangan, magiê, kẽm, đồng. Để ổn định pH của môi trường người ta bổ sung CaCO_3 vào môi trường và điều chỉnh pH ban đầu bằng NaOH hoặc axit photphoric.

Sản xuất penixilin là quá trình lên men hai pha, cho nên môi trường cũng cần thích ứng cho từng pha. Ví dụ, ở pha sinh trưởng, người ta thường bổ sung nguồn cacbon là glucozơ, còn pha sinh tổng hợp, người ta bổ sung đường khó sử dụng hơn là lactozơ.

Sản xuất penixilin đòi hỏi bổ sung thêm tiền chất nhằm định hướng tổng hợp các kháng sinh tự nhiên mong muốn và kích thích khả năng sinh tổng hợp kháng sinh của nấm. Thông thường để sản xuất penixilin G, người ta bổ sung tiền chất là axit phenylaxetic. Sau đây là thành phần môi trường nhân giống và lên men sản xuất thường được sử dụng trong sản xuất penixilin bằng phương pháp lêm men chìm.

Môi trường nhân giống (%): Cao ngô 1; glucozơ 2; lactozơ 0,5; nitrat amon 0,125; sunphat magiê 0,025; sunphat natri 0,05; kali photphat manobasic 0,2; CaCO_3 0,5; Nước 100.

Một số môi trường lên men sản xuất penixilin từ nấm *P. chrysogenum* được trình bày trên bảng 10.3. Tuy nhiên, từ từng chủng nghiên cứu sản xuất, người ta phải tiếp tục lựa chọn cho phù hợp để đảm bảo vừa cho hiệu suất kháng sinh cao, vừa hạ giá thành sản phẩm.

Chủng giống sản xuất penixilin trong công nghiệp thường được bảo quản trong hạt kê đã thanh trùng và các phương pháp bảo quản khác. Trước khi sử dụng, giống được hoạt hoá trên môi trường Raistrik và lựa chọn khuẩn lạc có hoạt tính cao nhất. Nhân giống được nuôi trên môi trường lỏng trong nồi lên men có sục khí khoảng 30–50 giờ để hệ sợi sinh trưởng, phát triển tốt. Tuỳ theo khối lượng của nồi lên men mà có thể nhân giống cấp

một, cấp hai và sau đó chuyển sang môi trường lên men. Thông thường, lượng giống cây chuyên là 10% so với thể tích môi trường nuôi.

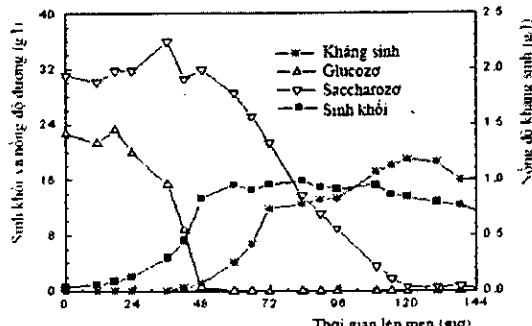
BẢNG 10.3. MÔI TRƯỜNG LÊN MEN SẢN XUẤT PENIXILIN

Thành phần	Hàm lượng (%)		
Cao ngô	2,0–3,0	—	2,0–3,0
Khô hạt có dầu (lạc, đậu tương,...)	—	2,0–4,0	—
Lactozơ	5,0	5,0	1,0
Glucozơ	1,5	1,5	1,5
Dầu thực vật	0,5–1,0	0,5–1,0	2,5–3,5
Nitrat amon	0,4	0,4	0,4
Sunphat natri	0,05	0,05	0,05
Kali photphat monobasic	0,4	0,4	0,4
Sunphat magiê	0,025	0,025	0,025
Natri hyposunphat	0,2	0,2	0,2
Canxi cacbonat	0,5–1,0	0,5–1,0	0,5–1,0
Tiền chất	0,3–0,4	0,3–0,4	0,3–0,4

Quá trình lên men sản xuất penixilin là quá trình hai pha. Pha đầu sinh khối phát triển mạnh, cường độ hô hấp cực đại ở pha này, do đó đòi hỏi nguồn cacbon dễ tiêu hoá và cấp oxy mạnh. Nhu cầu oxy trong quá trình lên men thường cao hơn các quá trình lên men khác, lượng không khí được cấp vào môi trường lên men với tỷ lệ 1,2–1,5 thể tích không khí/1 thể tích môi trường.

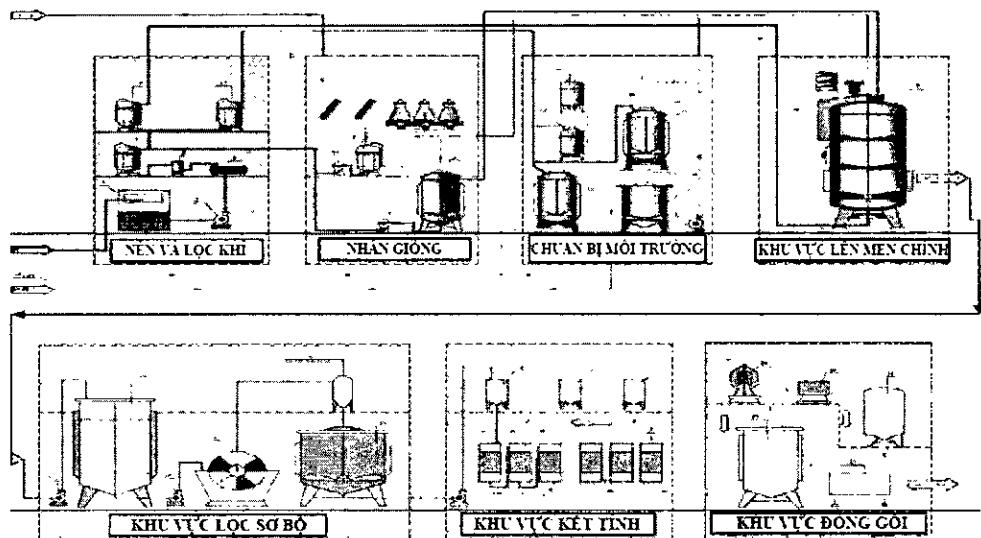
Pha sau là pha sinh tổng hợp khi nguồn dinh dưỡng đã cạn kiệt, sinh khối mốc bắt đầu tự phân, pH môi trường tăng cao, có thể lên đến 8 hoặc hơn, lượng penixilin tạo thành trong môi trường giảm dần. Thông thường trong pha sinh tổng hợp, lượng kháng sinh tích lũy cao nhất, thời điểm tích lũy cao thường diễn ra sau thời điểm tích lũy sinh khối cao.

Quá trình lên men sản xuất thường kéo dài từ 120 đến 144 giờ lên men, nghĩa là chất kháng sinh tích lũy cao nhất trong môi trường trong khoảng thời gian này (hình 10.11).



Hình 10.11. Quá trình lên men sinh tổng hợp penixilin

Sau khi kết thúc quá trình lên men, dịch nuôi cấy được chuyển sang thùng chứa dịch và hạ pH xuống 2 để chất kháng sinh từ sinh khối chuyển hết sang pha nước và lọc bỏ sinh khối. Thông thường, quá trình lọc thực hiện bằng lọc ép khung bản, do pH môi trường thấp, nên quá trình lọc cũng thuận lợi hơn. Có nhiều phương pháp tách chiết penixilin, tuy nhiên phương pháp được sử dụng nhiều nhất vẫn là phương pháp chiết suất bằng dung môi.

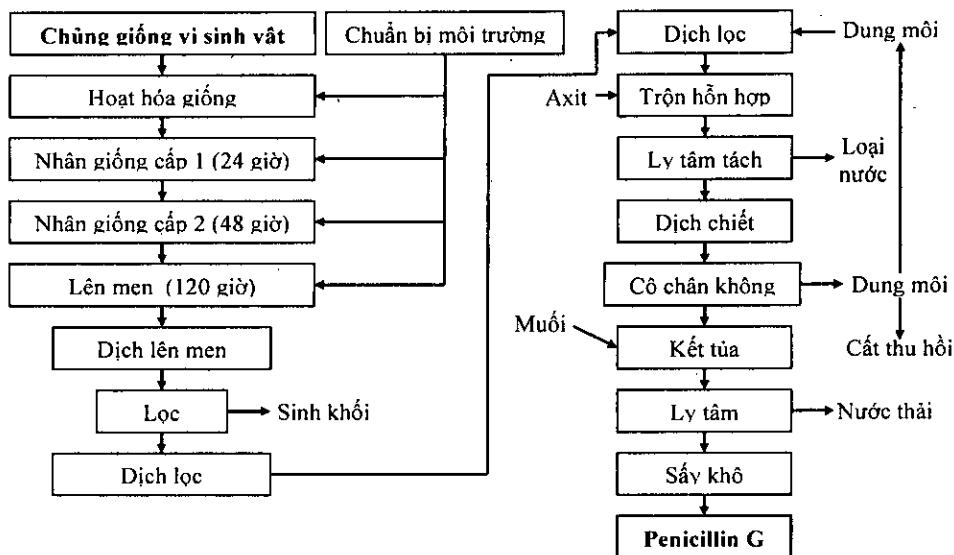


**Hình 10.12. Sơ đồ dây chuyền công nghệ lên men sản xuất penixilin G
(theo Dự án tiền khả thi Nhà máy kháng sinh ở Việt Nam)**

Người ta cho lượng dung môi có cục như butanol vào dịch lọc với lượng 3/4 so với dịch lọc, khuấy trộn mạnh, sau đó để cho 2 pha nước và dung môi tách ra và chiết lấy dung môi đem đi cô bằng phương pháp cô chân không ở nhiệt độ không quá 60°C cho đến khi còn lại khoảng 1/20–1/25 thể tích ban đầu, thì bổ sung muối natri hoặc kali và đưa vào nhiệt độ lạnh để kết tinh. Sau khi thu nhận được tinh thể, người ta tiếp tục tinh sạch bằng các dung môi như metanol một vài lần, tinh thể nhận được được sấy khô ở nhiệt độ thấp. Ngoài phương pháp trên, người ta cũng dùng các phương pháp khác để tách chiết và tinh chế penixilin như trao đổi ion, lọc gel phân đoạn, điện di.

Theo Kreutzpeldt R. (1967), để sản xuất ra 100kg penixilin G dạng muối Na cần 1.200kg đường, 60kg dầu mỡ (thực vật, động vật), 770kg cao ngô, 220kg muối vô cơ, 100kg tiền chất (axit phenylaxetic), 3.000kW giờ điện, 4 tấn hơi nước, 50.000m³ không khí và 900m³ nước.

Sơ đồ công nghệ phân xưởng sản xuất penixilin G được trình bày trên hình 10.12 và 10.13.



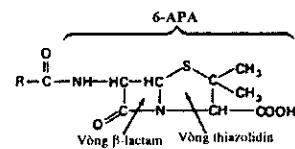
Hình 10.13. Sơ đồ công nghệ lên men sản xuất penicillin G

10.4. BÁN TỔNG HỢP CÁC CHẤT KHÁNG SINH TỪ PENICILIN

10.4.1. Sinh tổng hợp axit 6-aminopenixilanic (6-APA)

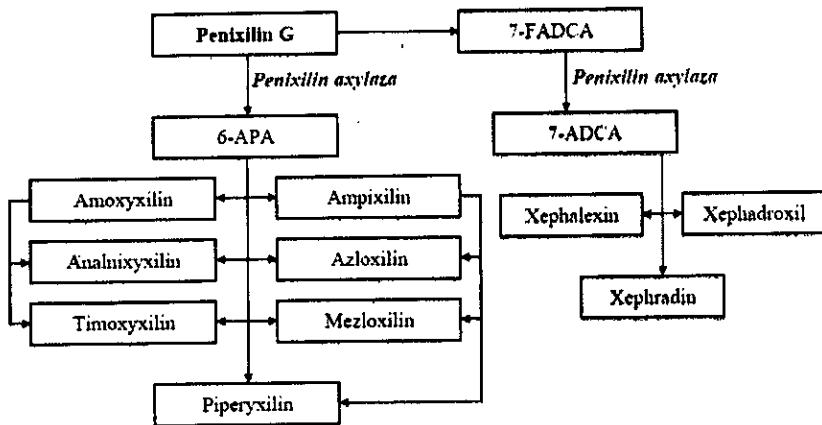
Năm 1959, Batchelor, Doyle, Nayler và Rhobinson đã tách từ môi trường nuôi cấy *Penicillium chrysogenum* một chất giống như penicillin G, có vòng lactam (4 cạnh) và thiazolidin (5 cạnh), nhưng không có gốc R (C_6H_5-), chất này gọi tên là axit 6-aminopenixilanic (viết tắt là 6-APA).

6-APA là “nhân” của penicillin, phân trung tâm của phân tử không có gốc axyl. 6-APA không có hoạt tính kháng khuẩn, cũng không bền vững với enzym penicilinaza như các penicillin tự nhiên. Tuy nhiên từ nhân này, người ta tổng hợp thành nhiều loài penicillin bán tổng hợp, hơn nữa từ đó có thể chuyển đổi thành 7-ADCA (axit 7-amino-deoxy xephalosporanic) để từ đó có thể bán tổng hợp bằng phương pháp hoá học thành nhiều loại xephalosporin bán tổng hợp có giá trị chữa bệnh cao và bền vững với enzym penicilinaza. Sơ đồ chuyển hoá từ penicillin G thành 6-APA và bán tổng hợp thành một số kháng sinh bán tổng hợp được trình bày trên hình 10.15.



Hình 10.14. Cấu trúc hóa học của penicillin

Penicillin G: $R = C_6H_5-CH_2-$
Penicillin V: $R = C_6H_5-OCH_2-$



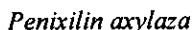
Hình 10.15. Sơ đồ quy trình tổng hợp các chất kháng sinh bán tổng hợp từ penicillin G bằng phương pháp lên men (theo Bartosevich, 1992)

Những chữ viết tắt: 6-APA là axit 6-aminopenixilan; 7-FADCA- axit 7-phenylaxetamido-deoxyxephalosporanic; 7-ADCA- axit 7-aminodesaxetoxoxyxephalos-poranic; 7-ACA-axit 7-aminoxephalosporanic; PA - penicillin acylaza.

10.4.2. Sản xuất penicillin acylaza (PA)

Trước đây, việc chuyển hóa penicillin thành 6-APA được thực hiện bằng phương pháp hóa học, đòi hỏi phản ứng xảy ra ở nhiệt độ thấp, hiệu suất không cao, thiết bị đắt tiền và thải ra ngoài môi trường các hóa chất độc hại. Ngày nay, việc sản xuất 6-ACA từ penicillin G cũng như 7-ACA từ xephalosporin C được thực hiện nhờ enzym acylaza (xem chương Công nghệ enzym). Enzym này cắt nhóm benzyl thành 6-APA, ưu điểm của phương pháp này là phản ứng thực hiện ở nhiệt độ thường, tính đặc hiệu cao, không sinh các chất độc hại ảnh hưởng môi trường.

Hiện nay, người ta dùng 2 phương pháp chuyển hóa nhờ enzym: phương pháp cố định tế bào sản sinh enzym và phương pháp cố định enzym penicillin acylaza. Cơ chế chung của quá trình chuyển hóa như sau:

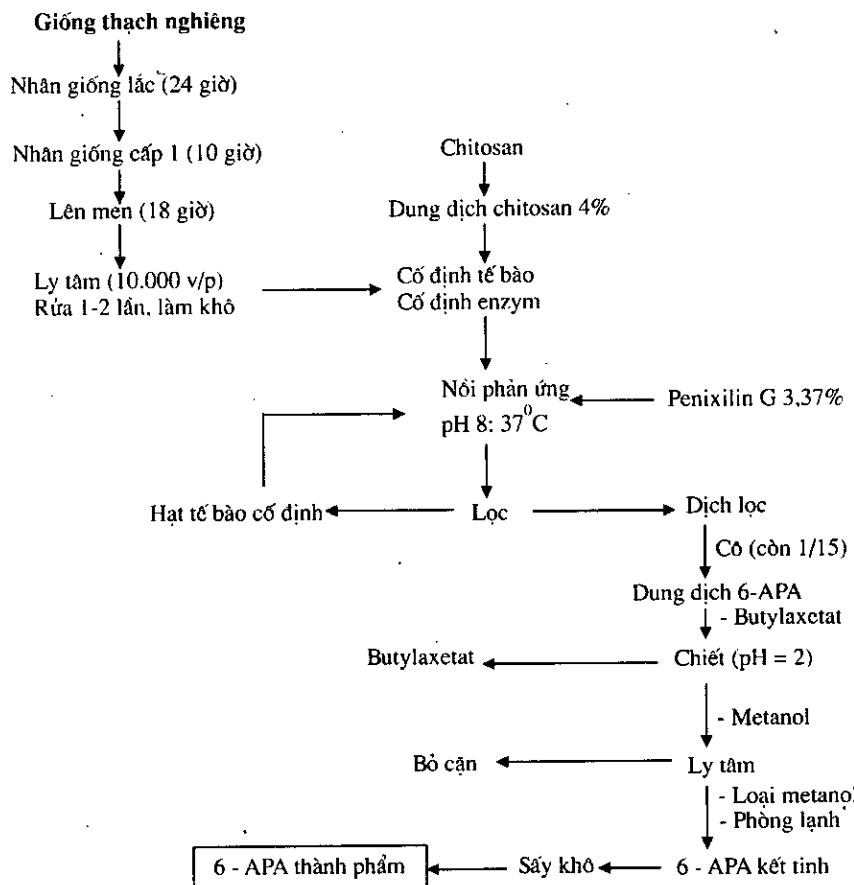


a) Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt tính penicillin acylaza

Các chủng *Escherichia coli* có hoạt tính penicillin acylaza cao được tuyển chọn nhanh bằng dung dịch chỉ thị 6-nitro-phenylaxetamido-benzoic axit (NIPAB) và xác định khả năng thuỷ phân penicillin G và 7-PADCA thành 6-APA và 7-ADCA bằng phương pháp Hydroxylamin của Cole M., Savidge T., and H. Vanderharghe (1975). Penicillin acylaza (Assay)

Để bảo đảm các chủng giống có năng suất cao phải luôn luôn tuyển chọn các chủng có hoạt tính cao, mặt khác muốn hạ giá thành sản xuất phải luôn tìm kiếm các chủng mới có hiệu suất cao hơn (bằng các kỹ thuật di truyền và công nghệ gen).

b) Phương pháp xác định hoạt tính enzym



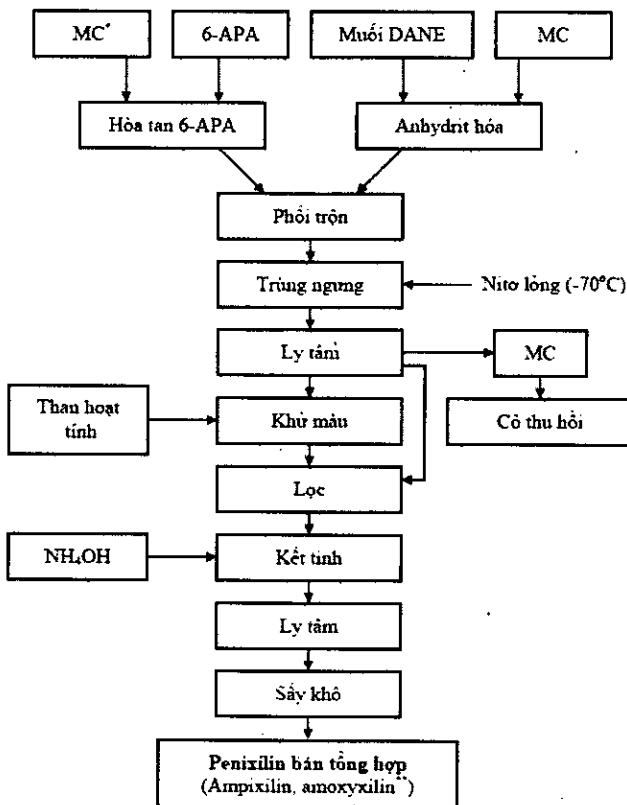
Hình 10.16. Sơ đồ quá trình chuyển hóa penicillin G thành 6-APA bằng phương pháp cố định tế bào hoặc cố định enzym penicillin axylaza

Cho 15ml nước vô trùng vào ống giống *E. coli* thạch nghiêng. Dùng que cấy đánh tan trên bề mặt thạch và hút 1ml cho vào bình tam giác có 30ml môi trường MPB, nuôi trên máy lắc 180–220 vòng/phút ở 28°C kéo dài 18 giờ. Lấy 5ml ly tâm ở 4.000 vòng/phút. Sau đó cho 5ml đệm photphat pH 7. Đánh tan và xác định hoạt tính enzym bằng NIPAB (1,8mg NIPAB/ 1ml làm tan hết bằng pH>8), giữ ở 40°C 10 phút, sau đó cho vi khuẩn vào để yên 10 phút, sau đó cho 0,5M Na₂CO₃ vào để dừng phản ứng, dung dịch có màu

vàng (do axit 3-amino-6-nitrobenzoic tạo thành), ly tâm ở 4.000 vòng/phút để loại tế bào vi khuẩn. Xác định OD ở $\lambda = 405\text{nm}$. $1\text{dv}=1\mu\text{M}$ axit 3-amino-6-nitrobenzoic hình thành trong 1 phút (có thể dùng penixilin G làm cơ chất). Sau đó xác định nồng độ tế bào trong phản ứng enzym (dùng đệm photphat pha loãng 10 lần). Xác định OD ở $\lambda = 600\text{nm}$.

b) Lựa chọn môi trường và điều kiện lên men thích hợp

Sơ đồ thu nhận penixilin axylaza từ chủng *E. coli* và công nghệ sản xuất 6-APA từ penixilin G bằng phương pháp cố định tế bào được trình bày ở hình 10.16.



Hình 10.17. Sơ đồ công nghệ sản xuất penixilin bán tổng hợp (ampixillin, amoxycillin).

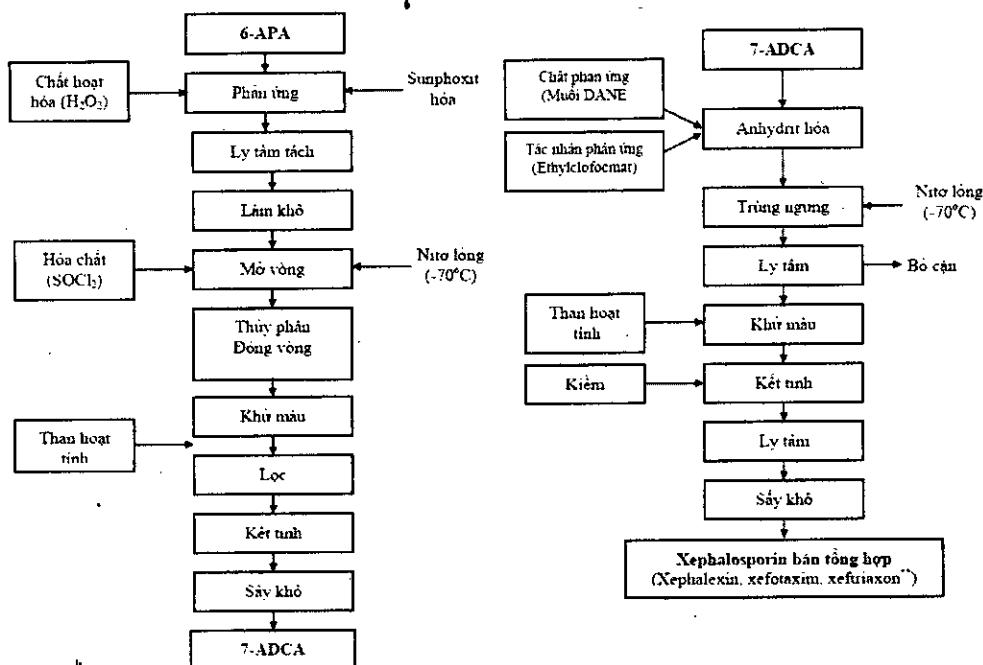
* Methylchloroformat ; ** Phân xưởng amoxilin đã có tại Việt Nam

Việc lựa chọn môi trường thích hợp để sản xuất cho từng chủng vi sinh vật rất quan trọng vừa đảm lên men có hiệu suất cao, nhưng giá thành rẻ và dễ kiểm.

Thành phần môi trường lên men chủng *E.coli* (g/l): KH₂PO₄ 1,36; (NH₄)₂SO₄ 0,228; CuCl₂. 2H₂O 0,008; FeSO₄.7H₂O 0,001; NaOH 0,3 (để chỉnh pH); MgSO₄.7H₂O 0,04; Axit phenylaxetic 0,1; Saccarozơ 10,0; Cao ngô 8,0; Nước cất đến 1.000 ml; pH 7,2.

Theo sơ đồ dây chuyền công nghệ sản xuất 6-APA bằng tế bào cố định, có thể chia thành 5 cụm thiết bị như sau: *Cụm 1*. Thu nhận sinh khối tế bào; *Cụm 2*. Cố định tế bào; *Cụm 3*. Chuyển hoá (nối phản ứng); *Cụm 4*. Tách chiết và thu hồi 6-APA và *Cụm 5*. Thiết bị thu hồi (thiết bị phụ trợ).

Từ 6-APA, bằng quá trình bán tổng hợp hoá học (hình 10.17) sẽ nhận được các kháng sinh penixilin bán tổng hợp như ampixilin, amoxilin.



Hình 10.18. Chuyển hoá 6-APA thành 7-ADCA và bán tổng hợp các xephalosporin

Tuy nhiên, số lượng các chất bán tổng hợp từ nhân 6-APA còn hạn chế, do vậy người ta có thể chuyển sang 7-ADCA để bán tổng hợp các kháng sinh xephalosporin bán tổng hợp (hình 10.18). Đặc biệt hiện nay người ta phát triển công nghệ sản xuất xephalosporin C, để từ đó cũng sử dụng enzym axylaza để chuyển hoá thành axit 7-amino-xephalosporanic (7-ACA) để bán tổng hợp thành các kháng sinh bán tổng hợp thế hệ mới.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 1

1. Các hợp chất: Các chất kháng sinh, các axit amin, các alcaloit và các chất kích thích sinh trưởng như gibberelin, hợp chất nào không phải là chất trao đổi thứ cấp?
2. Năm 1929, nhà khoa học nào phát hiện tượng kỳ lạ trên đĩa thạch mà ông đã cấy vi khuẩn tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) tình cờ nhiễm một loại nấm mà xung quanh khuẩn lạc của nó có một vùng trong, vi khuẩn không phát triển được?
3. Các đặc tính của một chất (a) là hợp chất do vi sinh vật sinh ra, (b) có khả năng ức chế vi sinh vật khác, (c) với lượng lớn mới ức chế và (d) ngay với lượng nhỏ cũng ức chế. Đặc tính nào không thuộc định nghĩa của chất kháng sinh?
4. Trước đây, người ta định nghĩa chất kháng sinh như thế nào là đúng nhất?
5. Để đánh giá một loại kháng sinh có khả năng ức chế được nhiều hay ít số loại vi sinh vật, thì người ta sử dụng khái niệm nào?
6. Vì mục đích nghiên cứu sử dụng điều trị bệnh, người ta phân loại theo cơ chế tác động. Như vậy, người ta thường phân loại chất kháng sinh theo bao nhiêu nhóm theo cơ chế tác động?
7. Các chất kháng sinh nhóm betalactam như các kháng sinh: penicillin, monobactam, carbapenam và xephosphorin thường có vòng lactam trong cấu trúc, vòng lactam ấy có mấy cạnh?
8. Ngày nay, trong công nghiệp sản xuất penicillin bằng phương pháp lên men chìm, người ta thường sử dụng chủng nấm nào?
9. Trong nhiều chất kháng sinh được phát hiện từ vi sinh vật, chỉ có một số ít chất kháng sinh được sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Đa số các chất kháng sinh này do nhóm vi sinh vật nào sản sinh ra?
10. Các nhà nghiên cứu đang cố gắng tìm kiếm các chất kháng sinh mới từ những loài vi sinh vật thuộc "nhóm hiếm" hoặc các chủng vi sinh vật sống ở đâu dưới đây: Đất canh tác, đất đồi, nước biển hay chất thải?
11. Khi sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch để định lượng kháng sinh, đặc điểm cần chú ý nào sau đây là không đúng: (a) Sử dụng thạch làm môi trường phải có chất lượng tốt, phải là loại thạch trung tính; (b) Độ dày của lớp thạch phải bằng nhau, khi đổ thạch vào môi trường hộp đựng thạch phải nằm trên một mặt phẳng; (c) pH môi trường và nhiệt độ nuôi cấy vi sinh vật phải phù hợp với vi sinh vật

- kiểm định và (d) Không cần đảm bảo vô trùng trong quá trình xác định?
12. Các phương pháp: Chiết rút dung môi, hấp thụ trao đổi ion, kết tủa và đông khô, phương pháp nào không phải là phương pháp dùng để tinh sạch các chất kháng sinh?
13. Quá trình lên men sản xuất penicillin thường kéo dài bao nhiêu giờ lên men?
14. Năm 1959, Batchelor, Doyle, Nayler và Rhobinson đã tách từ môi trường nuôi cấy *Penicillium chrysogenum* một chất giống như penicillin G, có vòng lactam (4 cạnh) và thiazolidin (5 cạnh), nhưng không có gốc R (C_6H_5-), chất này gọi tên là gì?
15. So với phương pháp hóa học, sử dụng enzym penicillin axylaza để chuyển hóa penicillin G thành 6-APA có ưu điểm nào sau đây: Không đòi hỏi phản ứng xảy ra ở nhiệt độ thấp, hiệu suất không cao, thiết bị đắt tiền; hoặc thảm ra ngoài môi trường các hóa chất độc hại?

Chương 11

CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT ỨNG DỤNG TRONG NÔNG NGHIỆP

11.1. SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH VẬT

Từ lâu, con người đã tìm cách ứng dụng các đặc tính quý của vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp như sử dụng vi sinh vật cố định đạm, phân giải lân để sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh, vi sinh vật đối kháng để sản xuất các chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh sinh học, vi sinh vật sản sinh các chất như gibberelin, auxin để sản xuất các chế phẩm kích thích sinh trưởng thực vật. Hơn nữa, người ta còn sử dụng các vi sinh vật sản xuất thức ăn bổ sung trong chăn nuôi, phòng chống bệnh cho vật nuôi. Ngoài ra, vi sinh vật còn được ứng dụng phân giải các chất hữu cơ khó phân giải như lignoxenlulozơ, xenlulozơ và hemixenlulozơ làm phân bón cho cây trồng.

Trong chương này, chúng ta chỉ đề cập đến hai lĩnh vực sản xuất công nghệ vi sinh trong việc sản xuất phân đạm sinh học và các chế phẩm vi sinh vật trong đấu tranh bảo vệ cây trồng.

11.1.1. Ý nghĩa của việc sử dụng phân vi sinh vật

Nhiều năm trước đây, việc sử dụng tràn lan phân bón và thuốc hoá 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 hoà trong đất trồng, gây nhiều bệnh nguy hiểm cho cây.

Trong thực tế, việc thu hoạch sinh khối thực vật hàng năm đã lấy đi của đất nhiều nitơ. Quy trình bổ sung nitơ xảy ra trong tự nhiên quá chậm, trong khi đó, do quay vòng thời vụ lớn, lại càng làm thiếu hụt nghiêm trọng các chất cần thiết cho cây trồng. Sự thiếu hụt đó bấy lâu nay được bù đắp bằng các phân bón vô cơ (phân hoá học). Việc làm này tuy làm tăng năng suất cho cây trồng tức thời, nhưng để lại hậu quả đáng buồn là đất bị chua dần, độ cứng cơ lý tăng dần,... làm cho đất bạc màu và điều nguy hiểm hơn là các chất dư thừa của phân hoá học tích tụ trong đất, hoặc thải vào các nguồn nước làm cho đất, nước bị ô nhiễm, ảnh hưởng xấu đến hệ sinh thái và môi trường sống.

Càng ngày người ta càng thấy vai trò to lớn của “đạm sinh học” trong nông nghiệp. Đạm là nguyên tố khoáng quan trọng nhất trong dinh dưỡng của cây trồng. Năng suất cây trồng phụ thuộc rất lớn vào lượng đạm cung cấp cho cây. Do vậy, nhu cầu sử dụng đạm ngày càng tăng.

Người ta ước tính rằng, muốn có thu hoạch hạt trung bình 1 tấn/ha thì cây trồng lấy đi khỏi đất 30kg đạm (tính theo lượng đạm nguyên chất). Tuy nhiên, hiệu suất dùng phân khoáng tốt nhất chỉ là 75%, như vậy cần phải cung cấp cho mỗi ha đất 37,5kg đạm. Như vậy, muốn có 5 tấn thóc phải cung cấp cho cây 187,5kg đạm (tương đương khoảng 900kg đạm sunphat). Hơn nữa, sử dụng đạm vô cơ còn gây ra ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến hệ sinh thái vi sinh vật làm đất chai cứng.

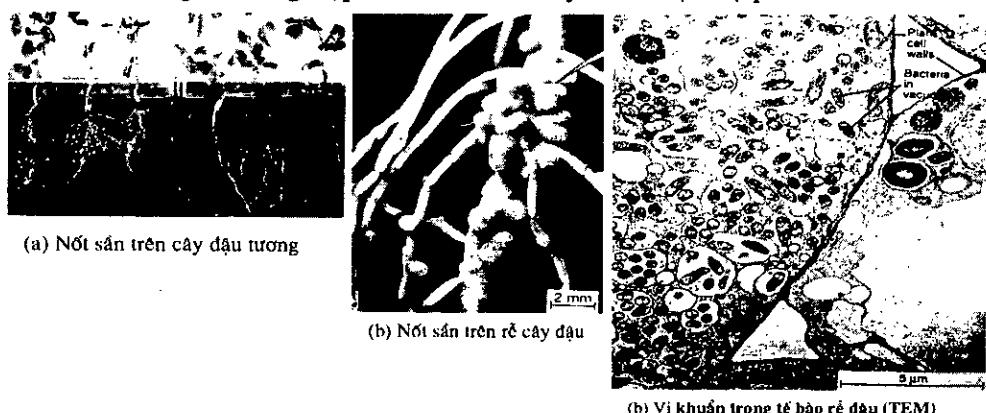
Hiện nay, người ta có xu hướng sử dụng các “nhà máy chế biến đạm” vi sinh vật để cung cấp đạm cho cây trồng, tránh được ảnh hưởng xấu của đạm hoá học.

Cố định nitơ là quá trình khử nitơ không khí (N_2) thành dạng đạm ammoni (NH_3). Chỉ có một số vi khuẩn (bacteria) và vi khuẩn lam (cyanobacteria) có khả năng thực hiện phản ứng phức tạp này. Tất cả các cơ thể sống khác trên Trái Đất phụ thuộc trực tiếp hoặc gián tiếp vào hoạt động của chúng. Cây xanh cần nitơ từ amon hoặc nitrat, để sản xuất axit amin cho protein của chúng (sau đó động vật ăn thực vật sử dụng axit amin này để xây dựng nên thành phần protein của chính mình). Hầu hết nitơ trên Trái Đất tồn tại ở dạng N_2 trong không khí, mà thực vật không sử dụng được. Cơ thể tiên nhân cố định nitơ liên quan đến sự cung cấp lượng N_2 vô tận từ không khí để cung cấp amoni cho thế giới sinh vật. Thực vật sử dụng trực tiếp amoni hoặc vi khuẩn nitrat hóa dị dưỡng đã chuyển thành nitrit, sau đó chuyển thành nitrat cho cây sử dụng.

Do phải mất nhiều năng lượng để bẻ gãy dây nối 3 liên kết đồng hoá trị rất vững chắc của phân tử N_2 , cho nên quá trình cố định nitơ phải sử dụng đến 12 ATP để cố định một phân tử N_2 . Enzym cố định nitơ quan trọng nitrogenaza dễ dàng bị bắt hoạt O_2 và không thể thực hiện chức năng trong tế bào khi không có O_2 trong quá trình quang hợp. Một số vi khuẩn lam dạng sợi cố định nitơ trong các tế bào chuyên dụng gọi là heterocyst. Tế bào này sử dụng hệ thống quang hợp I để cung cấp năng lượng để cố định nitơ nhưng không có hệ thống quang hợp II – mà nó tạo ra oxy.

Vi khuẩn lam quang hợp, cố định nitơ là trường hợp ngoại lệ riêng, chúng chỉ cần CO₂ và một số chất vô cơ ít cần cho trao đổi chất của chúng. Chúng có thể thay đổi điều kiện sống dễ dàng, như xuất hiện trên đá miệng của núi lửa mà không có sinh vật nào sống ở đó được.

Vi khuẩn cố định nitơ rất quan trọng cho nông nghiệp. Nhiều loài thuộc chi *Rhizobium* sống trong nốt sần trên rễ cây họ Đậu (hình 11.1). Vi khuẩn này sử dụng đường hình thành qua quá trình quang hợp của cây và cung cấp đạm cho cây. Sinh trưởng của cây họ Đậu như là một phần của vòng quay của mùa màng bổ sung hợp chất nitơ cho cây, cải thiện độ phì cho đất.



Hình 11.1. Nốt sần trong rễ cây họ Đậu

(a, b) Chỗ phình ra trên rễ cây đậu là nơi khu trú của vi khuẩn *Rhizobium* cố định nitơ; (c) Mặt cắt tế bào nốt sần rễ cây đậu tương bị nhiễm khuẩn (bên trái) và không nhiễm khuẩn (bên phải). Nguyên sinh chất của tế bào bị nhiễm khuẩn xuất hiện rất nhiều không bào có chứa nhiều vi khuẩn cố định nitơ (theo E.H. Newcomb và S.R. Tandon).

Những mùa không trồng cây họ Đậu, như trồng mía, cây kê và khoai tây, cũng nên cung cấp vi khuẩn cố định nitơ vào vùng rễ của chúng, mặc dù chúng không hình thành nốt sần. Hiện nay nhiều công ty giống cây trồng bán chế phẩm vi khuẩn dạng khô để gieo cùng với hạt, làm tăng năng suất cây trồng.

Các kỹ sư công nghệ sinh học đã nghiên cứu trồng cây trong nhà kính để nghiên cứu vi khuẩn cố định nitơ. Điều đó làm giảm nhu cầu phân đạm đắt tiền bằng cách cung cấp phân đạm thực vật chất lượng dinh dưỡng cao. Thậm chí tốt hơn nữa phát triển những lại vi khuẩn tạo nốt sần cả trên thân cây họ Đậu mà ở đó cố định nitơ không thực hiện quá trình quang hợp. Như vậy, chính vi khuẩn đã bảo vệ được năng lượng của cây chủ, làm tăng năng suất mùa màng.

Năng suất lúa tuy không trực tiếp tăng qua hạt lúa mà thông qua sự sinh trưởng của bèo hoa dâu (họ dương xỉ) cộng sinh với vi khuẩn lam cố định nitơ.

11.1.2. Các nhóm vi sinh vật cố định đạm

Cố định nitơ là quá trình khử nitơ không khí (N_2) thành dạng đạm ammoni (NH_3). Chỉ có một số vi khuẩn và vi khuẩn lam, cả hai loại tự dưỡng và dị dưỡng có khả năng thực hiện phản ứng phức tạp này. Tất cả các cơ thể sống khác trên Trái Đất phụ thuộc trực tiếp hoặc gián tiếp vào hoạt động của chúng. Do phải mất nhiều năng lượng để bẻ gãy dây nối 3 liên kết đồng hóa trị rất vững chắc của phân tử N_2 , cho nên quá trình cố định nitơ phải sử dụng đến 12 ATP cố định một phân tử N_2 . Enzym cố định nitơ quan trọng nitrogenaza dễ dàng bị bắt hoạt O_2 và không thể thực hiện chức năng trong tế bào khi không có O_2 trong quá trình quang hợp.

Cho đến nay, người ta biết nhiều loại vi sinh vật có khả năng cố định đạm. Có thể xếp chúng vào các loại sau đây.

a) Vi sinh vật tự do trong đất

– Vi sinh vật dị dưỡng hiếu khí: Vi khuẩn: *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azotomonas*, một số loài thuộc các giống: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Dexia*, *Achrotobacter*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Bacterium*, *Mycobacterium*; xạ khuẩn: Một số giống *Norcadia*, *Actinomyces*; xoắn黍: Loài *Treponema hyponeustonicum* và vi nấm: Một số loài trong giống *Torula*, *Rhodotrurola*, *Oidium*, *Aspergillus*, *Pullularia*.

– Vi sinh vật dị dưỡng kỵ khí: *Clostridium pasteurianum* và một số loài tương tự như nó (*Cl. butyricum*, *Cl. butylicum*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. acetobutylicum*,...) và một số vi khuẩn kỵ khí không bắt buộc trong các giống *Bacillus*, *Methanobacterium*.

– Vi khuẩn tự dưỡng: Một số loài thuộc giống *Chromatium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Chlorobium*, *Rhodomicrobium*.

– Thanh tảo: Khoảng 40 loài thuộc các chi *Chlorogloca*, *Amorphonostoc*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*,...

b) Vi sinh vật cộng sinh

– Vi khuẩn cộng sinh trong rễ cây họ Đậu: Các loài trong giống *Rhizobium*. Theo Atlen, người ta đã tìm hiểu được 1.200 loài trong số hơn 11.000 loài họ Đậu thì chỉ có 133 loài (khoảng 9%) không có khả năng

tạo nốt sần. Tỷ lệ tạo nốt sần ở các loài ở các họ phụ khác nhau là không giống nhau.

– Vì khuẩn cộng sinh ở các cây không thuộc họ Đậu, theo Nguyễn Lan Dũng, 1974, thì người ta đã tìm được trên 200 loài cây không thuộc họ Đậu có khả năng cố định nitơ nhờ vi sinh vật cộng sinh.

– Nấm căn (*Mycorrhizae*): có một số loại nấm có khả năng cố định đạm khi tạo thành nội khuẩn căn hoặc ngoại khuẩn căn ở thực vật.

– Thanh tảo *Anabaena azolla* cộng sinh trong bèo hoa dâu (*A. pinnata*, *A. carolina*, *A. imbrincata*, *A. filiculoides*).

Nhìn chung các vi sinh vật cố định đạm sống tự do có khả năng cố định đạm không lớn lắm. Khi sử dụng hết 1g thức ăn cacbon, Azotobacter chỉ cố định được khoảng 10–30mg đạm. Tuy nhiên, trên 1 ha đất trồng vi sinh vật cố định đạm sống tự do trong đất cũng có thể làm giàu thêm cho đất 10–15kg dinh dưỡng. Đất trồng rau hoặc có bón nhiều phân khoáng, khả năng cố định đạm của chúng cao hơn. Ảnh hưởng có lợi của *Azotobacter* thường được giải thích chủ yếu không phải khả năng cố định đạm mà ở chỗ tạo thành hàng loạt các chất hoạt động sinh học (vitamin, axit nicotinic, axit pantotenic, axit folic, biotin, heterauxin, gibberelin,...) và khả năng ức chế vi nấm của chúng. Nhóm thanh tảo khả năng cố định đạm cũng kém, chỉ khoảng 2 đến 5mg đạm. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy, việc bổ sung thanh tảo vào đồng ruộng làm tăng năng suất khoảng 15–30%. Khi bón phân lân thì hiệu quả của thanh tảo tăng lên, ngược lại khi bón đạm hay phân hữu cơ giàu đạm thì hiệu quả của thanh tảo giảm đi rất nhiều.

Như vậy, việc giải quyết cân bằng đạm bằng con đường sinh học, người ta quan tâm đến nhóm vi sinh vật cộng sinh. Đáng chú ý là vi sinh vật cộng sinh các cây họ Đậu và thanh tảo cộng sinh với thực vật thuỷ sinh (như bèo hoa dâu). Bèo hoa dâu đã được nghiên cứu về hiệu quả làm phân xanh phục vụ cho cây trồng, đặc biệt là lúa. Khả năng cố định đạm nhờ loại thanh tảo có cấu tạo hình chuỗi giống như tràng hạt trong lá bèo. Loài này có tên là *Anabaena azollae* thuộc bộ phụ *Symmetraceae*, bộ *Nostocales*, lớp *Hormogoneae*, ngành *Cyanophyta*. Cơ thể của chúng là một chuỗi tế bào hình trụ xếp liên tiếp nhau. Bên cạnh tế bào bình thường, thỉnh thoảng nổi lên dị tế bào có kích thước lớn hơn. Dị tế bào biến dần nội chất và sau đó là chia để sợi tảo tách ra và phát triển thành các sợi mới.

Bèo hoa dâu là loại quyết thực vật thuộc giống *Azollae*, họ *Azolaceae*, bộ *Hydropteridales*, lớp *Filicinaeae*, ngành *Pteropsida*. Giống *Azolla* có 7 loài,

nhưng ở Việt Nam, loài phổ biến nhất là *A. pinnuta*. Nhờ cộng sinh với thanh tảo mà bèo hoa đậu có thể phát triển hết sức mạnh mẽ mà không cần sử dụng tới thức ăn đậm của ruộng lúa. Ở Việt Nam, từ tháng 8 đến tháng 11, thời tiết thuận lợi cho bèo phát triển, cứ 5 đến 6 ngày, lượng bèo tăng lên gấp đôi. Các biện pháp bón phân (chủ yếu là P và K, nguyên tố vi lượng – Mo), chống nóng, trừ sâu, sục bùn, san bèo đúng lúc,... đều có tác dụng thúc đẩy mạnh mẽ sự phát triển và tăng cường khả năng cố định đạm của chúng.

Năm 1886, Hellriegel và Wilfath (Đức) đã phát hiện cây họ Đậu có khả năng cố định đạm từ không khí, hai năm sau, nhà khoa học Hà Lan đã phân lập được vi khuẩn cộng sinh trong nốt sần của cây họ Đậu và đặt tên là *Bacillus radicicola*, nhưng năm 1889, Frank đề nghị xếp vi khuẩn này vào chi riêng – chi *Rhizobium*.

Vi khuẩn nốt sần khi còn non dạng tế bào hình que, kích thước vào khoảng $0,5\text{--}0,9 \times 1,2\text{--}3,0\mu\text{m}$, bắt màu đồng đều, có khả năng di chuyển bằng tiêm mao. Có loại đơn mao, có loại chu mao và có loại tiêm mao mọc thành chùm ở đầu. Khi sống trong đất, vi khuẩn nốt sần nhiều lúc tạo thành dạng hình cầu, di động hoặc không di động. Trên môi trường nuôi cấy nhân tạo, người ta thường thấy tế bào ở dạng giả khuẩn thể (bacteroides) có kích thước lớn hơn, phân nhánh, chứa nhiều glucogen, volutin và lipoprotein hơn. Thường người ta phân biệt 2 loại vi khuẩn nốt sần: loại mọc nhanh (vi khuẩn nốt sần có 3 lá, đậu hoa lan, đậu vú phiến, đậu *Phaseolus*, mucus) và loại mọc chậm (vi khuẩn nốt sần đậu tương, lạc,...). Trên môi trường nuôi cấy đặc, vi khuẩn nốt sần thường có khuẩn lạc tròn bóng, nhày, vô màu. Chất này do vi khuẩn này sinh ra là một loại polysaccarit có cấu tạo bởi các hexozơ, pentozơ và axit uronic.

Vi khuẩn nốt sần có khả năng đồng hóa nhiều loại đường, trong đó có cả polysaccarit (dextrans, glycogen). Trên môi trường có chứa hydrat cacbon, phần lớn các loài vi khuẩn nốt sần hình thành axit, một số ít hình thành các chất kiềm. Khoảng 30% lượng đường do chúng đồng hóa được dùng để tạo thành chất nhày.

Vi khuẩn nốt sần có thể phát triển trên môi trường rất nghèo đạm. Tuy vậy, chưa có chứng minh nào vi khuẩn này có khả năng cố định đạm khi không cộng sinh với cây họ Đậu. Chúng có khả năng đồng hóa nhiều loại axit amin, một số loài đồng hóa cả pepton. Nói chung, amon hoá của vi khuẩn nốt sần rất yếu, chúng chỉ tạo thành một lượng rất nhỏ NH_3 khi nuôi cấy trên môi trường chứa đạm hữu cơ.

Vi khuẩn nốt sần có thể sử dụng photpho hữu cơ và vô cơ và tạo thành photphataza. Ngoài những nguyên tố đa lượng kali, canxi, vi khuẩn nốt sần còn cần một số nguyên tố vi lượng như sắt, titan, molipden và các vitamin và chất sinh trưởng axit β-indol axetic, gibberelin,...).

Vi khuẩn nốt sần là loại vi khuẩn hiếu khí, nhưng chúng có thể phát triển được trong môi trường có lượng oxy thấp.

Đa phần các nòi thuộc *Rhizobium* phát triển ở pH thích hợp từ 6,5 – 7, dưới pH 5 và trên pH 8, sự sinh trưởng của chúng bị cản trở. Nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn nốt sần nằm trong khoảng từ 24 – 26°C. Trên 37°C, sinh trưởng của chúng bị đình chỉ.

Vị trí phân loại của vi khuẩn nốt sần nói chung là phức tạp, theo Bergey thì chi *Rhizobium* bao gồm 6 loài: *Rh. leguminosarum*, *Rh. phaseoli*, *Rh. trifolii*, *Rh. lupini*, *Rh. japonium* và *Rh. meliloti*.

11.1.3. Cơ chế nghiên cứu lý thuyết và phương pháp nghiên cứu ứng dụng các tổ hợp cây – vi sinh vật cố định đạm

Nhiều vi khuẩn nốt sần chỉ xâm nhập nhiễm vào một nhóm cây họ Đậu nhất định. Đặc điểm này được gọi là tính chuyên hoá của vi khuẩn nốt sần, đó cũng là cơ sở thường dùng để phân loại vi khuẩn nốt sần. Có loại xâm nhiễm được vào nhiều giống họ Đậu khác nhau, nhưng cũng có loài chỉ xâm nhiễm vào một loài, thậm chí là một nòi nhất định. Nhân tố quyết định đến tính chuyên hoá của vi khuẩn nốt sần là ADN trong tế bào của chúng. Tính chuyên hoá của vi khuẩn nốt sần còn bị thay đổi do ảnh hưởng của nhiều nhân tố ngoại cảnh. Cũng có ý kiến cho rằng, bacterioxin do chúng sinh ra cũng mang ý nghĩa nhất định trong quá trình xâm nhiễm. Có thể nâng cao tính xâm nhiễm của vi khuẩn nốt sần bằng cách chuyển gen của những nòi đặc hiệu vào cây.

Vi khuẩn nốt sần thường xâm nhập vào rễ cây họ Đậu thông qua các lông hút, đôi khi qua vết thương của vỏ rễ. Mỗi loại cây họ Đậu thường tiết ra xung quanh rễ của mình những chất có tác dụng kích thích sự phát triển của vi khuẩn nốt sần tương ứng. Muốn xâm nhiễm tốt, số lượng vi khuẩn nốt sần cần đạt 10^4 tế bào/1g đất. Tuy nhiên, tuỳ thuộc vào từng loại cây họ Đậu, cây hạt nhỏ chỉ cần 500 – 1.000 tế bào, còn cây hạt lớn cần trên 70.000 tế bào trong 1g đất.

Dưới ảnh hưởng của vi khuẩn nốt sần, rễ cây họ Đậu thường tiết ra enzym polygalacturonaza để phá vỡ thành lông hút và giúp cho vi khuẩn nốt

sản có điều kiện xâm nhập vào rễ. Trong lồng hút, vi khuẩn sẽ tạo thành khối nhày chứa các vi khuẩn phát triển và chuyển dần vào bên trong với tốc độ 5–8 μ m mỗi giờ. Sự vận động của khối nhày này được thực hiện nhờ áp lực sinh ra do sự phát triển của tế bào vi khuẩn bên trong khối nhày.

Cơ chế của quá trình cố định nitơ: Từ phân tử N₂, hai nguyên tử N nối với nhau bằng dây nối (N≡N) rất bền vững, năng lượng của các dây nối này tới 225kcal/M, do đó N khó kết hợp với các nguyên tử khác. Chẳng hạn, trong công nghiệp sản xuất phân đạm, muốn cho N₂ kết hợp với H₂ để tạo thành NH₃ cần sử dụng nhiệt độ tới 500°C và áp suất khoảng 350atm. Từ NH₃, muốn tạo thành urê phải cho tác dụng với CO₂ ở 150–190°C và áp suất 150 – 200atm. Trong khi đó, các nhóm vi sinh vật cố định nitơ lại dễ dàng chuyển hoá N₂ thành nitơ hợp chất trong điều kiện nhiệt độ và áp suất bình thường.

Có nhiều giả thuyết khác nhau về cơ chế cố định nitơ. Các kết quả nghiên cứu ngày càng phong phú, cho đến nay đã hiểu biết nhiều sản phẩm trung gian của quá trình cố định đạm. Con đường cố định đạm theo hai con đường chính (oxy hoá và khử), thì con đường khử có cơ sở hơn, vì:

– Ở môi trường có vi sinh vật cố định đạm phát triển, thế oxy hoá khử rất thấp, nếu oxy vượt quá nồng độ nhất định thì ức chế quá trình cố định đạm. Mức độ này phụ thuộc vào nguồn cacbon có trong môi trường.

– Hiệu suất cố định đạm ở vi sinh vật ký khí cao hơn loại hiếu khí. Ví dụ, khi sử dụng hết 1g thức ăn cacbon, *Clostridium pasteurianum* chuyển hoá một lượng N₂ ít hơn *Azotobacter* khoảng 4 đến 7 lần và nhận năng lượng thấp hơn 45 lần. Như vậy, tính theo đơn vị năng lượng thì loại ký khí cố định đạm nhiều hơn loại hiếu khí từ 6 đến 10 lần.

– Phát hiện thấy những hợp chất loại khử trong dịch nuôi cấy và trong chế phẩm vô bào của nhiều loại vi sinh vật cố định đạm. Ví dụ, bằng phương pháp đánh dấu ¹⁵N, người ta phát hiện thấy NH₃ đánh dấu như các hợp chất hydroxylamin và hydrazin ở *Az. vinelandii*, các chất này có thể chuyển hoá thành NH₃ và cũng có thể kết hợp với ketoaxit để tạo thành axit amin. Như vậy, quá trình cố định đạm là một quá trình bao gồm một loạt các phản ứng xảy ra một cách tuần tự. Ở mỗi khâu đều có sự tham gia của một enzym hay một nhóm enzym nhất định. Trong quá trình cố định đạm, một số kim loại

(Mo^{6+} , Fe^{2+} , Co^{2+}) có ý nghĩa nhất định, chúng tham gia vào một số khâu của quá trình hấp thụ, chuyển hoá N_2 và chúng là yếu tố không thiếu được của hệ thống enzym.

Theo Ivanov (1966), quá trình cố định đạm cũng là kiểu hô hấp. Con đường hoạt hoá và khử N_2 trong hệ hydrogenaza-xytocrom.

Nitơ phân tử cũng giống như O_2 được hoạt hoá và bị khử nhờ xytocrom cuối cùng là chuỗi chuyển

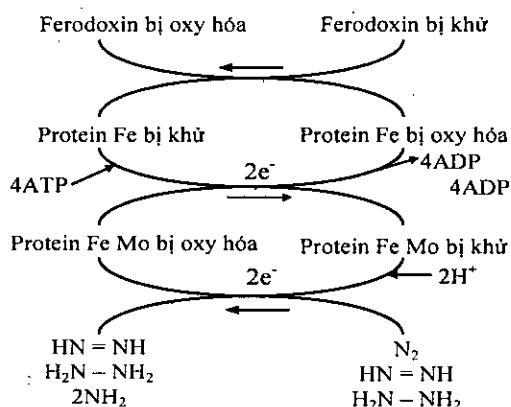
electron. Nitơ được hoạt hoá bởi enzym nitrogenaza đã tiếp nhận điện tử thông qua nguyên tố sắt, còn proton thông qua nguyên tử molipden. Như vậy, có thể ở vi khuẩn cố định đạm khí cũng có enzym nitrogenaza tương tự như ở vi khuẩn hiếu khí, nó sẽ liên kết với hệ thống cho H^+ thông qua ferodoxin (Fd). Quá trình cố định nitơ phân tử có thể tóm tắt theo sơ đồ trên hình 11.2.

11.1.4. Quy trình sản xuất chế phẩm cố định đạm (nitơ)

Trong thực tế sản xuất hiện nay, có hai chế phẩm cố định đạm được dùng rộng rãi là Azotobacterin và Nitragin.

a) Chế phẩm Azotobacterin

Azotobacterin là chế phẩm phân bón được làm từ vi khuẩn *Azotobacter* sống tự do trong đất và các vùng rễ các cây ngũ cốc (lúa, ngô, lúa mạch, cao nương,...), cây mía, cây hướng dương,... Một số chủng có hoạt tính cố định đạm cao thường được sử dụng sản xuất phân Azotobacterin thuộc giống *Azospirillum* và loài *Azotobacter chroococcum*. Môi trường nuôi cấy thích hợp cho vi khuẩn để sản xuất chế phẩm Azotobacterin như sau (g/l): (1) Đường (có thể thay bằng mannit): 1,5; (2) K_2HPO_4 : 0,2; (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2; (4) CaCl_2 : 0,02; (5) FeCl_2 : (pha thành dung dịch 10%): 0,05; (6) Muối molipden: Vết; (7) Nước cho đủ 1 lít; pH: 7,2.



Hình 11.2. Sơ đồ cố định nitơ phân tử nhờ vi sinh vật

Tóm tắt quy trình sản xuất như sau:

– Giống được cấy trong môi trường có thành phần như trên và nuôi trên máy lắc ở nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là 25–27°C cho đến khi đạt sinh khối phát triển ổn định (48h). Sau đó ly tâm loại bỏ dịch nuôi thu sinh khối.

– Sinh khối thu được đem trộn với đất hoặc than bùn đã xử lý và thanh trùng bằng cách sau: Chọn đất nhiều mùn hoặc đất phù sa, nếu sử dụng than bùn thì trước hết phải xử lý sơ bộ bằng HCl loãng rồi trung hoà NaOH về trung tính, nghiền và sàng loại bỏ chất thô và tạp chất lớn. Sau đó than bùn hoặc đất được bổ sung 1–2% vôi bột hoặc CaCO₃ và 1% superphosphate, trộn đều và chia vào các chai hoặc bình nửa lít đậy bằng nút bông. Đất và than bùn trong bình phải đạt độ ẩm 40–60% sau khi hấp thanh trùng.

– Sinh khối vi sinh vật được chế dịch huyền phù rồi dùng pipet vô trùng hút chuyển vào bình. Mỗi bình chỉ nhỏ vài giọt giống, lắc đều và nuôi trong tủ ấm.

– Để thu nhận sinh khối, có thể thực hiện bằng cách nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường (như đã giới thiệu trên) có bổ sung 2% thạch trong hộp Petri, nuôi 3–5 ngày trong tủ ấm. Sau đó dùng nước vô trùng thu sinh khối làm dịch huyền phù giống. Bước tiếp theo được thực hiện như đã nêu ở trên.

Sau khi nuôi, chế phẩm nhận được phải đạt trên 50 triệu tế bào/1g. Thời gian sử dụng trong khoảng 2–3 tháng. Sử dụng chế phẩm cho vào đất canh tác hoặc xử lý hạt giống bằng cách ngâm với dung dịch nước hoà với chế phẩm. Liều lượng bón cho đất là 3–6kg cho 1ha đất gieo trồng. Chế phẩm Azotobacterin thích hợp cho các loại cây ngũ cốc cho hạt, có thể tăng sản lượng lên 18–19%, chế phẩm cũng có hiệu quả với một số cây rau.

b) Chế phẩm Nitragin

Chế phẩm này được điều chế từ vi khuẩn nốt sần rễ cây họ Đậu và được sử dụng rộng rãi nhất trong trồng trọt. Vi khuẩn sử dụng trong sản xuất nitragin thuộc giống *Rhizobium*. Như trên đã giới thiệu, đây là loại trực khuẩn không lớn, hiếu khí, đôi khi chuyển động, Gram âm và không sinh bào tử. Chúng phát triển tốt trên môi trường có nước chiết đậu (nước luộc đậu) hoặc nước chiết các cây khác. Nhiệt độ thích hợp là 20–26°C và pH thích hợp là 7.

Vì các chủng *Rhizobium* chuyên biệt cho từng loại cây họ Đậu khác nhau, cho nên chế phẩm được sản xuất từ những chủng vi khuẩn tương ứng.

Các chủng này được lựa chọn từ nốt sần của cây chủ theo đặc tính cố định nitơ, cường độ thấm vào bộ rễ của cây trồng.

Quy trình sản xuất như sau:

Nước luộc đậu được bổ sung thêm 1% glucozơ và 1,5% thạch. Môi trường được chia vào các bình tam giác 500ml, đậy nút bông và hấp thanh trùng. Chờ khi thạch đông thì cấy giống.

Giống được tuyển chọn đem nhân giống trong môi trường nước luộc đậu (không có thạch), rồi dùng pipet vô trùng chuyển tiếp vào môi trường thạch. Nuôi ở 20–25°C trong vài ngày đến khi khuẩn lạc mọc trên mặt thạch thì chuyển thành dịch huyền phù rồi cấy chuyển tiếp sang than bùn hoặc đất mùn đã vô trùng (như phương pháp sản xuất Azotobacterin). Để sản xuất lớn, người ta có thể nhân giống trên môi trường dịch thể có rỉ đường cộng thêm muối khoáng trong bình tam giác nuôi trên máy lắc hoặc trong nồi lên men có sục khí. Sau đó ly tâm thu hồi sinh khối để cấy sang đất và than bùn vô trùng. Có thể đem đông khô để bảo quản lâu dài.

Khi sử dụng để xử lý hạt cần khoảng 2×10^5 tế bào vi khuẩn/g hạt. Như vậy, sử dụng để xử lý hạt trước khi trồng chỉ cần 500g cho 1 ha đất gieo trồng.

Nitragin có hiệu quả cho cây họ Đậu như đậu tương, lạc, đỗ,..., nhưng có hiệu quả nhất đối với cây đậu tương, đặc biệt là đất mới trồng đậu hoặc đất bị khô hạn, đất bị ngập nước. Chế phẩm này làm tăng năng suất rõ rệt.

11.1.5. Quy trình sản xuất phân photpho sinh học (phân lân)

Vi sinh vật có khả năng chuyển hóa các photphat khó tan như: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$, quặng photphorit 18%, quặng apatit 25%, quặng apatit 33%,... thành những loại dễ tan, cây trồng có thể sử dụng được. Nhờ đặc điểm này, người ta sử dụng nhiều loại vi khuẩn chế tạo chế phẩm phân giải lân.

Chế phẩm Photphobacterin là chế phẩm được điều chế từ vi khuẩn *Bacillus megaterium var. phosphoricum*. Vi khuẩn hình que nhỏ, có kích thước tế bào là $(1,8 - 2,0) \times (2,5 - 6\mu\text{m})$, hiếu khí, tạo thành bào tử và có khả năng khoáng hóa các hợp chất photpho khó tiêu thành những hợp chất photpho cây có thể tiêu hoá được.

Cách làm: Giống thuần chủng có hoạt tính phân giải các hợp chất photpho hữu cơ được nhân giống trên môi trường rỉ đường có thêm cao ngô và muối khoáng trên máy lắc hay nồi lên men có sục khí. Lên men trong

bình lắc hay nồi lên men sục khí đến giai đoạn tế bào vi khuẩn tạo thành bào tử. Thu nhận sinh khôi qua ly tâm, rồi sấy khô bằng máy sấy thăng hoa hoặc đông khô. Chế phẩm thu được có độ ẩm là 2–3%. Mỗi gam chế phẩm có ít nhất 200 triệu tế bào sống.

Sử dụng 250g Photphobacterin cho 1ha gieo trồng với phương pháp xử lý qua hạt giống. Với đất trồng khoai tây và rau quả, cần tăng số lượng sử dụng. Photphobacterin sử dụng trong trồng trọt có thể tăng năng suất được 10–12%.

11.1.6. Dùng cây cố định đạm phủ xanh đất trồng, đồi núi trọc, cải tạo đất

Cây có khả năng cố định đạm nhờ sự cộng sinh với một số loại vi sinh vật không những chỉ có cây hoa thảo mà còn có những cây thân gỗ. Bằng kỹ thuật di truyền, người ta có thể chuyển gen cố định đạm lên cây, tạo cho cây có khả năng cố định đạm. Những loại cây như vậy có khả năng sống trong những vùng đất nghèo chất hữu cơ. Do vậy, công tác lựa chọn cây trồng nhằm phủ xanh đất trồng, đồi núi trọc là cần thiết và có khả năng thực hiện được. Tuy nhiên, để bất kỳ loại cây sinh trưởng và phát triển được vẫn đòi hỏi phải canh tác phù hợp, nhất là những vùng đất trồng, đồi núi trọc, ngoài việc nghèo dinh dưỡng còn rất hạn chế về việc cấp nước. Hiện nay có nhiều đề tài nghiên cứu các chất giữ nước, bảo đảm cho cây phát triển được.

Rõ ràng đây là vấn đề có ý nghĩa kinh tế lớn, đòi hỏi phải có sự cộng tác của nhiều cơ quan, của nhiều nhà khoa học thì mới giải quyết được.

11.2. CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT SẢN XUẤT THUỐC SINH HỌC BẢO VỆ THỰC VẬT

11.2.1. Ý nghĩa của thuốc sinh học bảo vệ thực vật

Theo thống kê của Tổ chức Nông–Lương thế giới (FAO): Các loại cây trồng trên đồng ruộng hiện nay phải chống đỡ với khoảng 100.000 loại sâu hại, 10.000 loài nấm, 200 loài vi khuẩn, 600 loài tuyến trùng và 600 loài virut gây bệnh. Chính vì vậy, hàng năm, khoảng 20% sản lượng lương thực, thực phẩm trên thế giới bị mất trắng.

Để khắc phục tình trạng trên, con người đã tìm kiếm các biện pháp phòng, chống các tác nhân gây hại. Từ đó ra đời nền công nghiệp hoá học trừ sâu, diệt các mầm bệnh cho cây trồng. Cho đến nay, không ai phủ nhận vai trò tích cực của thuốc hoá học trừ sâu bệnh hại cây trồng. Nhưng biện pháp hoá học cũng có những mặt hạn chế của nó. Nhiều trường hợp ô nhiễm

môi trường khi dùng thuốc diệt cỏ hoặc thuốc trừ sâu hoá học làm cho người bị ngộ độc, súc vật bị chết và sinh vật đi kèm theo cây trồng cũng bị ảnh hưởng dẫn đến sự mất cân bằng sinh thái. Đáng ngại hơn, một số thuốc trừ sâu chậm bị phân huỷ và là mối nguy hại lâu dài trong đất (ví dụ DDT có thể kéo dài 25 năm). Các hợp chất này được tích luỹ trong đất và nồng độ của chúng tăng theo thời gian. Nghiêm trọng hơn là sự tuỳ tiện về liều dùng và thời gian phun thuốc hoá học chống sâu bệnh đã tạo nên dư lượng thuốc lớn trên các loại rau màu và cây lương thực, gây những vụ ngộ độc tai hại ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khoẻ con người.

Chính vì vậy, những cuộc tìm kiếm, thử nghiệm các biện pháp mới nhằm phòng, chống bệnh cho cây trồng đã được tiến hành và đã thu được kết quả khả quan. Từ đó các chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh cho cây trồng có nguồn gốc sinh học ra đời. Thoạt đầu, người ta chỉ chú ý đến các loài côn trùng có lợi trong đấu tranh sinh học như bọ rùa, bọ xít, ong ký sinh. Sau một thời gian tìm tòi nghiên cứu, người ta đã phát hiện được vai trò tích cực của vi sinh vật trong việc điều chỉnh cân bằng sinh học của sinh quần. Biện pháp đấu tranh sinh học được hoàn thiện thêm dần khi người ta sử dụng vi sinh vật để phòng, chống sâu bệnh cho cây trồng. Ở nhiều nước, chế phẩm vi sinh được sản xuất ở quy mô lớn và được sử dụng rộng rãi trong công tác phòng, trừ bệnh cho cây trồng và cây rừng. Có thể nói, biện pháp đấu tranh sinh học bằng vi sinh vật đã thực sự trở thành nội dung quan trọng của hệ thống phòng, trừ sâu bệnh tổng hợp.

Chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh có nguồn gốc sinh học nói chung và vi sinh vật nói riêng có nhiều điểm ưu việt như sau:

- Không gây độc hại cho người, động vật và cây trồng; có khả năng tiêu diệt chọn lọc các loại sâu bệnh. Không độc hại cho con người và không ảnh hưởng xấu đến khu hệ vi sinh vật trong đất, cho nên nó không phá vỡ cân bằng sinh thái, không gây ô nhiễm môi trường.

- Sử dụng các chế phẩm vi sinh vật không thấy hiện tượng "nhờn thuốc" ở các loại côn trùng.

- Sử dụng các chế phẩm vi sinh vật, một số loại mang ý nghĩa phòng bệnh lâu dài. Trong đấu tranh sinh học, việc sử dụng các loại vi sinh vật cũng cần cân nhắc kỹ lưỡng trước khi đưa vào áp dụng trong thực tế sản xuất.

Con người đã và đang nghiên cứu mở rộng tác dụng của chế phẩm thuốc trừ sâu bệnh có nguồn gốc vi sinh vật bằng nhiều biện pháp. Một trong

những biện pháp đó là thực hiện chuyển gen chi phối việc tạo tính độc cho nhiều loại sâu bệnh hại sang cho nhiều loại cây trồng, tạo nên cây trồng tự nó có khả năng kháng được sâu bệnh. Ở Việt Nam cũng đã có thành công trong việc chuyên gen kháng rầy nâu, kháng bệnh đạo ôn cho lúa, kháng sâu hà cho khoai lang. Trong tương lai chắc chắn sẽ mang lại hiệu quả to lớn cho ngành Trồng trọt.

– Các chế phẩm diệt côn trùng có nguồn gốc vi sinh vật khác với các hợp chất hoá học trừ sâu hại bởi bản chất của nó chứa các nhân tố gây bệnh làm chết côn trùng là những sinh vật sống. Khi phun ra ngoài thiên nhiên, các loại vi sinh vật này có khả năng thích nghi cao, hội nhập với tự nhiên thuận lợi, có thể tham gia vào các hoạt động đấu tranh sinh học tích cực. Cụ thể, khi phun chế phẩm lên cây nào đó, các vi sinh vật trong chế phẩm đều có khả năng là thành viên trong quần thể nơi đó và sẽ sinh sôi nảy nở tăng lên về số lượng.

– Các vi sinh vật nhiễm lên côn trùng bằng nhiều cách khác nhau: qua con đường tiêu hoá, qua da, qua tầng cuticun (ví dụ, nấm gây bệnh côn trùng), cho phép tăng cường khả năng nhiễm thành công của vi sinh vật vào côn trùng.

– Các vi sinh vật có khả năng tồn tại trong điều kiện không thuận lợi ở nhiều dạng khác nhau: tạo thành dạng bào tử (vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*) dạng hạch nấm hay giả nấm (các loại nấm *Beauveria*, *Metarrhizium*).

– Khi phân tán trong tự nhiên, các giống vi sinh vật có ý nghĩa lớn trong việc tăng cường lây lan tạo thành dịch ở côn trùng.

Với những đặc điểm sinh học như trên, các vi sinh vật diệt côn trùng, sâu bệnh có thể xuất hiện bất ngờ, với một tốc độ nhanh, mang tính chất một ổ dịch lớn, dẫn đến làm chết sâu bệnh trên một địa bàn rộng. Do đó giúp bảo vệ cây trồng có hiệu quả đáng kể.

Do những đặc điểm ưu việt trên của các chế phẩm vi sinh vật, nên các chế phẩm này được ứng dụng ngày một rộng rãi. Hiện nay trên thị trường có chế phẩm phòng và diệt sâu bệnh được tiêu thụ ngày một nhiều.

11.2.2. Dùng vi sinh vật diệt côn trùng có hại

Hiện nay người ta thống kê được 1.500 loại vi sinh vật hoặc các sản phẩm của chúng có khả năng tham gia vào phòng, trừ sâu bệnh. Tham gia vào phòng, trừ côn trùng có hại, phải kể đến một số nhóm vi sinh vật sau đây:



Hình 11.3. Cấu tạo của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (x 18.000)

TC- Tinh thể độc; ES- Bào tử.

đứng riêng rẽ hay tạo thành chuỗi, khi trưởng thành thường xuất hiện một bào tử hình trứng và một tinh thể độc hình quả trám có bản chất protein (hình 11.3).

Trong loài *B. thuringiensis*, căn cứ vào các đặc điểm khác nhau về khả năng hình thành Leucitinaza, cấu trúc tinh thể, khả năng gây bệnh cho các loại côn trùng và đặc tính huyết thanh học mà người ta chia thành nhiều nòi (variety) khác nhau.

Có khoảng hai trăm loài côn trùng có thể bị vi khuẩn Bt gây chết, trong số đó đa số là các loài sâu hại cây trồng và cây rừng. Danh sách các loài sâu bị chết bởi các chế phẩm thuốc trừ sâu ngày càng dài thêm, bởi các nhà khoa học không ngừng tìm kiếm và tạo giống bằng kỹ thuật di truyền các loại vi sinh vật có khả năng diệt côn trùng và tác dụng lên các loài sâu khác nhau.

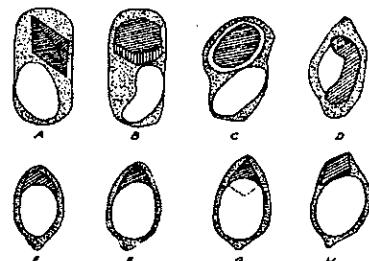
Cơ chế tác động của chế phẩm vi khuẩn Bt lên các loại côn trùng là do tác động của 4 loại độc tố khác nhau do vi khuẩn sinh ra: (1) Nội độc tố δ (delta-endotoxin) hay còn gọi là tinh thể độc (hình 10.4); (2) Ngoại độc tố β (beta-exotoxin) hay còn gọi là ngoại độc tố bền nhiệt; (3) Ngoại độc tố α (alpha-exotoxin) hay còn gọi là Loxitinaza-C; và (4) Độc tố tan trong nước.

Ngày nay người ta cũng đã làm sáng tỏ cơ chế diệt côn trùng của các nòi *B. thuringiensis* khác nhau.

Nghiên cứu trên kính hiển vi điện tử, Haney C. L. đã chứng minh, tinh thể độc của *B. thuringiensis* có hình hai kim tự tháp úp vào nhau, trên bề

a) Vi khuẩn

Có nhiều loại vi khuẩn sử dụng để diệt côn trùng gây hại, nhưng tiêu biểu phải kể đến *Bacillus thuringiensis* (hay thường viết tắt là Bt). Cho đến nay, người ta đã thống kê có tới trên 300 chủng *B. thuringiensis* khác nhau đã được xác định. Tế bào của *B. thuringiensis* điển hình dạng hình que, kích thước tương đối lớn so với những loại vi khuẩn khác ($3-6 \times 0,8-1,3\mu\text{m}$), Gram dương, có tiền mao mọc khắp cơ thể, thường



Hình 11.4. Các dạng tinh thể độc của một số loài *Bacillus*.

A,B: *Bacillus thuringiensis*; C: *B. medusa*; D: *B. laterosporus*; E, F, G, H: *B. popilliae*

mặt có những luống nổi lên, luống nọ cách luống kia khoảng 28nm. Sau đó bằng nhiều xạ tia X, người ta đã xây dựng mô hình cấu tạo mặt ngoài của tinh thể này. Đến năm 1959, người ta đã biết được cấu trúc siêu phân tử bên trong tinh thể này có dạng hình que, kích thước khoảng $4,7 \times 11,8\text{nm}$.

Bản chất hoá học của tinh thể độc: Tinh thể độc có bản chất protein, trong đó 2 loại axit amin chiếm tỷ lệ cao nhất là axit glutamic và axit asparaginic, kế tiếp là agrinin và loxin.

Hoạt tính của tinh thể độc: Có thể coi tinh thể độc như là tiền độc tố (protoxin), nó được hoạt hoá trong ruột một số loại côn trùng với pH thích hợp và hình thành những phân tử độc có phân tử lượng lớn (~ 5.000Da).

Độc tố dạng tinh thể bền nhiệt độ hơn so với dạng hoà tan. Ví dụ, tinh thể độc của *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* ở 65°C sau 1 giờ, ở 80°C sau 20 phút vẫn giữ được tính độc, trong khi đó độc tố ở dạng vô định hình thì mất hoàn toàn độc tính. Các loại dung môi hữu cơ như clorofoc, metanol,... làm mất độc tính của tinh thể ở dạng hoà tan nhưng không ảnh hưởng đến độc tính của độc tố dạng tinh thể.

Tuy vậy, pH môi trường quá cao (trên 12) hay quá thấp (thấp hơn 3,3) sẽ làm cho tinh thể độc mất độc tính, một số hoá chất gây tủa protein như HgCl_2 , axit trichloro-axetic cũng làm mất độc tính của tinh thể độc.

Cơ chế tác động của tinh thể độc:

Côn trùng ăn phải tinh thể độc trong vòng từ 1–7 giờ, pH của máu – bạch huyết của sâu sẽ tăng lên làm tê liệt đường ruột, khoang miệng và có khi toàn thân của sâu, làm thay đổi tính thấm của thành ruột, gây tổn thương hệ thống điều hoà trao đổi chất và sâu bị chết. Người ta cho rằng, có hai yếu tố thúc đẩy tinh thể độc gây độc là pH đường ruột của côn trùng và khả năng sản sinh enzym phân giải protein trong đường ruột của sâu. Tinh thể độc sẽ bị phân giải trong đường ruột của côn trùng khi pH tăng lên trên 8,9 và khi tinh thể độc bị phân giải nó sẽ thể hiện tính độc. Tuy nhiên, không phải lúc nào pH lên cao trên 8,9 cũng gây độc cho sâu mà do nhân tố thứ hai, đó là khả năng sinh enzym proteaza trong đường ruột của côn trùng, chuyển hoá tiền độc tố thành dạng độc tố đối với cơ thể côn trùng.

Đa số các thứ dưới loài vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, thành tế bào vi khuẩn bị phân giải khi hình thành bào tử và tinh thể độc trong tế bào. Khi đó, bào tử và tinh thể độc sẽ phóng thích vào môi trường riêng rẽ. Riêng ở thứ *B. thuringiensis* var. *finitimus* (typ huyết thanh H₂), bào tử và tinh thể, sau khi giải phóng ra khỏi tế bào vẫn dính liền nhau.

b) Nấm sợi

– Nấm *Beauveria bassiana* (nấm bạch cương):

Người ta phát hiện được nấm *Beauveria bassiana* trong trường hợp nấm này gây bệnh làm chết hàng loạt tằm của nghề nuôi tằm. Sau đó người ta tìm cách phân lập và nuôi cây chúng trên môi trường nhân tạo.

Nấm bạch cương cấu tạo dạng sợi, phân nhánh, có vách ngang, mảnh (đường kính 2–5 μm), màu trắng. Hệ sợi nấm phát triển nhanh, tạo thành khối xốp màu trắng, do vậy người ta gọi nấm này là nấm bạch cương hay còn gọi là nấm vôi. Trên cơ thể côn trùng, sợi nấm khi khô chuyển sang màu kem hay đôi khi có pha một ít màu đỏ, da cam.

Nấm *Beauveria bassiana* sinh sản bằng bào tử trần, đơn bào, không màu, có dạng hình cầu hay hình trứng ($1,5\text{--}5,5 \times 1,3\mu\text{m}$).

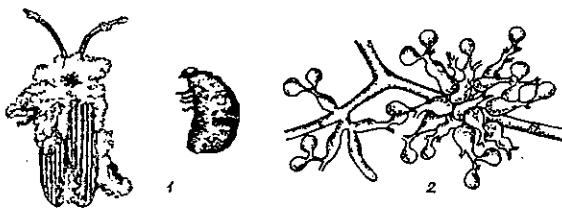
Nấm *Beauveria bassiana* diệt được côn trùng nhờ độc tố beauverixin. Độc tố này có công thức chung là $C_{45}H_{57}O_9N_3$. Đó là một loại depsipeptit vòng, có điểm sôi vào khoảng $93\text{--}94^\circ\text{C}$.

Từ một lít dịch nuôi cây *Beauveria bassiana*, người ta đã tách được 1,5g độc tố beauverixin, hay từ 1kg môi trường lên men đặc đã tách được 3,8g beauverixin.

Quá trình tác động của nấm lên côn trùng như sau: Khi phun chế phẩm nấm, những bào tử của nấm sẽ phát tán trong không khí hay bám trên thân, lá cây. Khi gặp cơ thể sâu, bào tử sẽ nảy mầm mọc thành sợi nấm đâm xuyên qua tầng vỏ kitin của sâu và phát triển trong cơ thể của chúng. Sợi nấm mọc rất nhanh trên cơ thể côn trùng và nhanh chóng phủ kín bề mặt cơ thể côn trùng (hình 11.5).

Khi nấm xâm nhập vào côn trùng, côn trùng huy động các tế bào bạch huyết (lymphocyte) đến để chiến đấu chống lại độc tố beauverixin của nấm. Độc tính của độc tố này mạnh, cho nên khi nấm diệt hầu hết các tế bào bạch huyết cũng là lúc côn trùng bị chết.

Cho đến nay, người ta đã xác định được loài nấm này có khả năng ký sinh và gây chết đối với khoảng 100 loài côn trùng.



Hình 11.5. Nấm *Beauveria bassiana*
(nấm bạch cương)

1. Sợi nấm mọc trên cơ thể côn trùng;
2. Bào tử trần và cuống sinh bào tử.

– Nấm *Metarrhizium anisopliae* (nấm lục cương):

Nấm *Metarrhizium anisopliae* có dạng sợi phân nhánh, có vách ngăn ngang, có kích thước $\phi = 3-4\mu\text{m}$. Sợi có màu từ trắng tới hồng. Bào tử của nấm là bào tử trần, dạng hình que, có kích thước $3,5 \times 7,2\mu\text{m}$, có màu từ xám đến oliu – lục. Bào tử xếp thành chuỗi khá chật chẽ và nhìn bằng mắt thường thấy bào tử tạo ra trên bề mặt côn trùng một lớp phấn khá rõ.

Nấm *M. anisopliae* phát triển trong giới hạn pH 6,9–7,4, nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của nấm là 24–25°C. Nếu nhiệt độ tăng lên trên 28°C, sợi nấm sẽ không sinh ra bào tử trần. Ngoài ra, muốn nấm sinh bào tử nhiều, cần độ ẩm của không khí khá cao.

Người ta nghiên cứu khá nhiều về độc tố của nấm *M. anisopliae*. Độc tố diệt sâu bao gồm nhiều ngoại độc tố có tên Destruxin A, B, C và D. Destruxin A và B có thể tách từ dịch nuôi cấy nấm *M. anisopliae*. Destruxin A có công thức nguyên là $C_{29}H_{47}O_7N_5$, điểm sôi: 188°C. Destruxin B có công thức nguyên là $C_{30}H_{51}O_7N_5$, điểm sôi: 1.234°C. Đó là những depsipeptit vòng.

Cơ chế tác động của các độc tố này lên côn trùng như sau: Tương tự như ở nấm bạch cương, các bào tử khi rơi vào bề mặt côn trùng sau 24 giờ sẽ nảy mầm, tạo ống chui qua vỏ côn trùng, sau đó tiếp tục phân nhánh tạo sợi nấm chằng chịt trên khắp bề mặt của cơ thể côn trùng. Ngoại độc tố tiết ra sẽ tác động lên côn trùng, làm côn trùng chết.

Cho đến nay, người ta đã biết có 70 loại côn trùng bị nấm này tiêu diệt.

c) Virut

Virut cũng là đối tượng được sử dụng để tiêu diệt côn trùng có hại với vai trò là những cơ thể có khả năng ký sinh trên các vi sinh vật gây bệnh và các côn trùng có hại cho cây trồng.

Chúng thuộc 3 loại sau: (1) Virut đa diện dạng nhân (nuclear polyhedrois virut); (2) Virut thể hạt (granulosis virut) và (3) Virut đa diện dạng tế bào chất (cytoplasmic polyhedrois).

Đến nay, người ta đã tìm được rất nhiều loài virut tiêu diệt được sâu hại.

11.3. DÙNG VI SINH VẬT DIỆT VI SINH VẬT CÓ HẠI

11.3.1. Sử dụng các vi sinh vật đối kháng trong bảo vệ thực vật

a) Các loại bệnh do nấm gây ra

Hàng năm trên thế giới, bệnh cây đã gây ra những thiệt hại to lớn cho sản xuất nông nghiệp. Chúng phá huỷ đến 537,3 triệu tấn các loại nông sản

chủ yếu, chiếm 11,6% tổng sản lượng nông nghiệp thế giới. Riêng lúa chiếm khoảng 9%, ngô 10%, cây rau 12% và cây ăn quả 16,5%. Trong các loại bệnh cây, bệnh do nấm gây ra chiếm khoảng 83%.

Theo Ou (1972), trong số 45 bệnh lúa đã mô tả có tới 60% do nấm gây ra, cũng theo kết quả nghiên cứu khoa học bảo vệ thực vật 1971–1976 của Viện Bảo vệ thực vật, trong số 24 bệnh hại lúa ở Việt Nam có tới 13 bệnh do nấm gây ra, 34 bệnh ngô có 26 bệnh do nấm gây ra và 21 bệnh khoai tây có 8 bệnh do nấm. Những bệnh nấm chủ yếu và có tầm quan trọng nhất là các bệnh: đạo ôn, khô vằn, tiêm hạch, đốm nâu, thối rễ, mốc sương,... Sau đây chỉ đề cập một số bệnh nấm tiêu biểu gây hại cho cây trồng được quan tâm nhiều nhất.

– Bệnh thối thân, thối rễ: Bệnh thối thân, rễ ở thực vật do nhiều loài nấm ký sinh gây ra *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Botrytis cinerea*, *Diplodia* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* Kuln, *Sclerotium bataticola* Faud nhưng chủ yếu là *F. oxysporum*. Chỉ riêng tính ở khoai tây thiệt hại do *Fusarium* sp. gây bệnh thối củ trên đồng ruộng và trong bao quản lên tới 20% số củ thu hoạch được. Ngoài ra, chúng còn gây một số bệnh khác như bệnh mốc hồng và thối thân ở ngô. Nấm *F. oxysporum* còn gây ra bệnh héo mạch dẫn và nhiều bệnh thối thân thối rễ ở nhiều loại cây rau quả và cây lương thực như lạc, cà chua,... Bệnh héo thân cây còn do *Pseudomonas solanacearum* là loài vi khuẩn Gram (-) ký sinh đa thực vật, bao gồm nhiều chủng gây bệnh héo rũ trên 35 họ cây trồng khác nhau, rất phổ biến ở nước ta và nhiều nước trên thế giới. Bệnh héo rũ vi khuẩn là loại bệnh gây tắc ống dẫn, sau mấy ngày toàn cây héo rũ, chết khô dần. Tỷ lệ cây bị bệnh tăng rõ rệt vào thời kỳ ra hoa – quả (củ) non, có thể làm giảm từ 10 – 30% năng suất, khối lượng ; với khoai tây bệnh làm giảm năng suất từ 10 – 25% tổng số củ.

– Bệnh đạo ôn: Bệnh thường gặp nhất trên cây lúa và là bệnh có sự phát triển lâu đời nhất trong các bệnh hại lúa. Bệnh phân bố rộng rãi nhất và thường gặp ở 70 nước trên thế giới. Tuy có nhiều tranh cãi về việc đặt tên cho nấm này nhưng về sau theo quy định quốc tế, tên chính thức của loài nấm này gây bệnh đạo ôn đã được đặt là *Pyricularia oryzae*.

Quá trình gây bệnh do sự nảy mầm của bào tử hình thành vòi bám, sản sinh ống lên gây bệnh từ vòi bám và xâm nhập qua cutin và biểu bì, sợi nấm cũng có thể xâm nhập qua khí khổng.... *P. oryzae* gây ra các đốm hoặc bệnh trên lá, đốt và các phần của bông và hạt. Vùng ngoài vết bệnh hình thành do

sự xâm nhập các chất độc từ nấm tiết ra (pyricularin) bao gồm các vùng nhạt hoà trộn vào các mô khoẻ. Vùng gây chết mô thường là một sọc màu nâu, hép nấm trải dài theo phía trong vùng ngoài. Nhiều vết bệnh có thể phát sinh trên lá và làm lá bị chết nhanh chóng, hiện tượng đó xảy ra liên tiếp sau khi bẹ lá bị khô hắc và lúa đang đẻ nhánh bị nhiễm bệnh sẽ chết hoàn toàn. Các vùng gần gốc bông thường hay bị bệnh và hiện tượng này thường được gọi là thối (đao ôn cổ bông) làm gãy hoàn toàn, các nhánh bông và gốc cũng bị bệnh. Bệnh đao ôn phát triển phụ thuộc vào khí hậu từng vùng và bệnh xảy ra do các nòi khác nhau ở vùng khác nhau. Ở vùng ôn đới, thường mưa phùn kéo dài hoặc mưa nhẹ, bệnh đao ôn trên lá và lúa đẻ nhánh thường gây chết cây hoàn toàn. Ở vùng nhiệt đới, mạ thường hay bị bệnh nhưng sau khi cấy hiếm thấy lúa bị bệnh nặng. Sau đây là một số bệnh nấm tiêu biểu gây hại cho cây trồng được quan tâm nhiều nhất.

– **Bệnh khô vằn:** Bệnh do nấm *Corticium sasaki* (Shirai), Matsumoto (còn gọi là *Pillularia sasaki*) hoặc *Rhizoctonia solani* gây ra. Bệnh khô vằn thường gặp ở các nước ôn đới như Nhật Bản, Trung Quốc,... Nhưng bệnh này cũng gây cho lúa, ngô với diện rộng ở nước ta trên 10 năm lại đây. Theo Kazaza, 1970, nấm gây bệnh khô vằn thường xâm nhập vào cây lúa thời kỳ đâm chồi, gây ra các đốm xám hơi xanh có hình ôvan hoặc dạng trứng dài khoảng 10mm trên bẹ lá. Cuối cùng toàn bộ bẹ lá và lá ở phần trên bị tàn lụi.

c) *Biện pháp đấu tranh sinh học trong bảo vệ thực vật*

“Biện pháp đấu tranh sinh học” (biocontrol) trong bảo vệ thực vật là sử dụng một hay nhiều loại vi sinh vật để kiềm chế bệnh thực vật sinh ra từ đất. Biện pháp này là cơ sở của hệ thống quản lý thống nhất các tai họa do tổ chức FAO để xương. Qua thực tế cho thấy, các loại vi sinh vật đối kháng trong đất phát triển và xâm nhập vào bên trong và trên cây tạo khả năng chống chịu cho cây chủ. Biện pháp này nhằm giải phóng đất khỏi các vi sinh vật gây bệnh.

Ngay từ năm 1935, các nhà khoa học Liên Xô đã dùng một số loại vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* bám vào đất để chống nấm *Sclerotinia* và *Botrytis* bảo vệ nhiều loại cây. Nhiều công trình nghiên cứu dùng nấm đối kháng như *Trichoderma* chống bệnh cho bông, khoai tây và cây trồng khác.

Ngay từ những năm 1930, ở Trung Quốc đã sử dụng xạ khuẩn và các chất trao đổi của chúng để nghiên cứu hạn chế các bệnh thực vật. Từ năm 1950, họ đã chọn được chủng 5406 trong số 400 chủng xạ khuẩn phân lập

được từ đất vùng rễ cây bông và cỏ đinh lăng ức chế *Rhizoctonia solani* và *Verticillium alboatrum* gây bệnh thối rễ cây bông non và ứng dụng trong phòng, chống bệnh cho 6 triệu ha bông. Trong 30 năm qua, Trung Quốc cũng đã dùng phân vi sinh (Yield-increasing bacteria) để phòng, chống bệnh và tăng năng suất cây trồng và từ năm 1979 bắt đầu nghiên cứu thử nghiệm trên 50 vụ với diện tích lớn. Kết quả cho thấy, năng suất tăng từ 5–10% và hơn. Chế phẩm phân vi sinh có thể dạng ướt hoặc nước, chúng có thể dùng để ngâm hạt, phun trên lá trộn vào hạt hoặc bón vào rễ cây. Qua thực tế, phân vi sinh làm giảm nhiều loại bệnh như đạo ôn ở lúa do *Rhizoctonia solani* gây ra ; bệnh thối củ cải đường do *Gaeotome nomyces*, *Gramynus var* ; *nititiae*, bệnh ghẻ ở củ cải đường do *Rhizoctonia cerealis* ; bệnh đốm lá đen ở khoai lang do *Ceratocytis fibriato*,...

Hệ vi sinh vật trong phân vi sinh tạo ra chất kháng sinh ức chế vi sinh vật gây bệnh, sinh ra các chất bay hơi có hoạt tính kháng nấm, sinh ra enzym và thúc đẩy hoạt tính enzym trong cây.

d) Xạ khuẩn chống nấm gây bệnh thực vật

Trong tự nhiên có nhiều loại vi sinh vật có thể kháng lại các vi sinh vật gây bệnh cho cây, nhất là đất được canh tác tốt, đúng kỹ thuật sẽ tạo điều kiện cho vi sinh vật có lợi phát triển cạnh tranh với các vi sinh vật có hại gây bệnh cho cây. Trong số các nhóm vi sinh vật có khả năng đối kháng với nấm thì xạ khuẩn có tỷ lệ đối kháng cao, có tới 40 – 60% các chủng xạ khuẩn sống trong đất có khả năng kháng lại các loại nấm gây bệnh cho cây trồng như nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối rễ, nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn ở lúa, nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh khô vắn ở lúa, ngô,...

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, các nhà khoa học ở nhiều nước đã nghiên cứu tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm gây bệnh thực vật. Theo Kamada, 1974, khi điều tra xạ khuẩn trong đất ở Nhật Bản cho thấy, ở nơi có nhiều xạ khuẩn đối kháng thì ở đó có các dòng *Fusarium* bị biến mất rất nhanh ; ở Bungari, những chủng xạ khuẩn chống nấm thường thuộc nhóm màu xám và các loài *S. griseus*, *S. albus*, *S. candidus*... Thông thường một loại xạ khuẩn đối kháng có thể ức chế một vài loại nấm gây bệnh, nhưng cũng có loài có hoạt phổ kháng khuẩn rộng. Ví dụ, loài *S. laveudulae var. huinensis* có hoạt tính ức chế mạnh cả vi khuẩn Gram dương, Gram âm và nấm gây bệnh. Những chủng như vậy có ưu thế làm tác nhân chống bệnh cây bằng biện pháp sinh học. Tuy nhiên, khi sử dụng những chủng này phải thận trọng để tránh xạ khuẩn ức chế luôn cả khu

hệ vi sinh vật có lợi trong vùng rễ, không phải tất cả các chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm in vitro đều thể hiện trong đất (thường từ khoảng 4–5%) nhưng chúng có vai trò quan trọng trong việc làm sạch đất khỏi nấm gây bệnh và ngăn ngừa khả năng nhiễm bệnh cho cây. Xạ khuẩn chống nấm ngoài sự tiết ra chất kháng sinh, chúng còn tác động lên khu hệ vi sinh vật thông qua enzym dung giải. Đây là phức hệ bao gồm nhiều enzym. Ngoài ra xạ khuẩn còn tiết ra các chất kích thích sinh trưởng của thực vật cũng như khu hệ vi sinh vật có lợi trong vùng rễ.

Hơn nữa, xạ khuẩn là vi sinh vật sống hoại sinh, hầu hết các loài không gây bệnh cho người, động vật và cây trồng. Vì vậy, việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có hoạt tính đối kháng cao và tạo chế phẩm kháng sinh kháng nấm áp dụng vào công tác bảo vệ thực vật có tầm quan trọng đặc biệt.

Thực tế cho thấy hiện nay, con người ngày một sử dụng rộng rãi nhiều chế phẩm kháng sinh và các chủng vi sinh vật đối kháng làm phân bón vi sinh vật trong sản xuất nông, lâm nghiệp mang lại hiệu quả kinh tế cao và khắc phục được các yếu tố bất lợi của thuốc hoá học.

e) **Sử dụng các chất kháng sinh trong lĩnh vực bảo vệ thực vật**

Chất kháng sinh sử dụng để phòng, chống bệnh cho cây tỏ ra có nhiều ưu việt như có tác dụng nhanh, dễ bị phân huỷ và có tác dụng chọn lọc.

Ở Trung Quốc, người ta đã tìm kiếm tuyển chọn nhiều chủng xạ khuẩn từ đất và nghiên cứu nhiều chất kháng sinh, phòng chống bệnh cây có hiệu quả cao: CKS "20" chống nấm gây bệnh cho các loại cây ngũ cốc, cây rau ; polyoxin chống bệnh đạo ôn ; jangagmixin chống bệnh khô vằn, wuiyixinbo-10,... Cho đến năm 1991, CKS "120" từ chủng *S. hygroscopycus var. beijingensis* phòng, chống cho 330 triệu ha cây trồng và chỉ số bệnh giảm 50 – 98,9% tùy theo từng loại bệnh. Ở Nhật Bản, việc sử dụng xạ khuẩn sinh kháng sinh trong bảo vệ thực vật đã được biết đến từ lâu như Blastisidin S sản xuất từ *S. griserchromogenes*, Kausugamixin từ *S. kasugaensis*, Validamycin từ *S. hygroscopycus* chống bệnh khô vằn rất có hiệu quả. Ở Liên Xô đã nghiên cứu sản xuất và áp dụng nhiều chất kháng sinh phòng, chống bảo vệ cây trồng, trong 37 chất kháng sinh để phòng, trừ nấm *Vertillium dehiae* gây bệnh héo rũ bông, một loại bệnh nguy hiểm, kết quả cho thấy Levorin và Trichotexin có hiệu quả cao nhất. Kết quả cho thấy, kháng sinh nhóm polyen 18–45 và 18–80 cũng làm giảm tới 70–80% bệnh này.

Khi nấm đã chui vào hạt thì dùng thuốc hoá học diệt nấm thường không có kết quả. Do vậy, việc xử lý hạt giống trước khi gieo hoặc rễ cây giống trước khi trồng bằng chất kháng sinh đem lại hiệu quả phòng, chống bệnh cho cây con đạt kết quả cao.

11.3.2. Nghiên cứu lựa chọn chủng xạ khuẩn đối kháng tạo chế phẩm chống nấm

Các bước tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ để sản xuất một chế phẩm kháng sinh chống nấm từ xạ khuẩn:

a) Lựa chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm cao

Dùng để nuôi cấy xạ khuẩn, người ta thường sử dụng các môi trường sau:

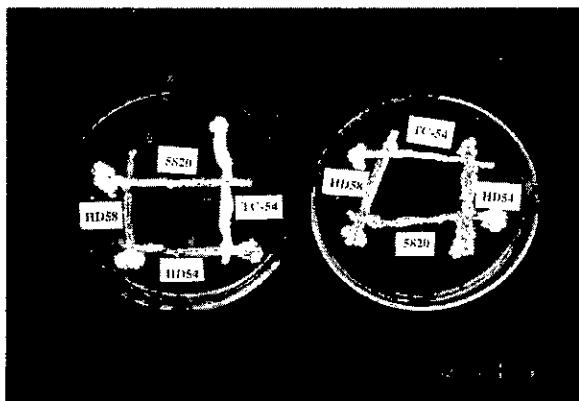
- Môi trường Gauze 1 (g/l): Tinh bột tan 2; K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 0,5; NaCl 0,5; $FeSO_4$ 0,1; thạch 2; nước 1 lít; pH 7,2–7,4.
- Môi trường ISP-4 (g/l): Tinh bột tan 10; K_2HPO_4 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1; NaCl 1; $(NH_4)_2SO_4$ 2; $CaCO_3$ 2; nước cất 1 lít; dung dịch khoáng A 1ml; thạch 20; pH 7,0–7,2.

Các phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn theo các phương pháp thường dùng là: Phương pháp thỏi thạch, phương pháp đục lỗ thạch và phương pháp khoanh giấy lọc (xem mục 10.2.2, chương 10).

Để xác định tính đối kháng của các chủng xạ khuẩn đã chọn bằng phương pháp cấy bắt chéo (hình 11.6) dùng để xác định sơ bộ tính đối kháng của các chủng được lựa chọn nghiên cứu.

b) Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp cho các chủng lựa chọn

Các chủng xạ khuẩn được phân lập và thuần khiết từ các mẫu đất bằng phương pháp pha loãng tới hạn, được nghiên cứu lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp dựa trên các môi trường nuôi cấy xạ khuẩn theo Bergey's Manual và chương trình xạ khuẩn quốc tế (ISP).



Hình 11.6. Phương pháp cấy bắt chéo để xác định tính đối kháng của các chủng xạ khuẩn

c) Lựa chọn môi trường nhân giống thích hợp

Môi trường nhân giống thích hợp cho xạ khuẩn là môi trường dịch thể và được lựa chọn dựa trên các môi trường: Gauze 1, Gauze 2, ISP-1, ISP-2, ISP-3, ISP-4, 73 và 79, bằng cách nuôi ở 28–30°C trên máy lắc 220 vòng/phút, sau 5–7 ngày lấy ra, cân sinh khối và thử hoạt tính kháng sinh. Hoạt tính kháng sinh được xác định bằng phương pháp đục lỗ thạch (hình 11.7)



Hình 11.7. Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn nhân giống trên môi trường ISP-3 sau 24 giờ

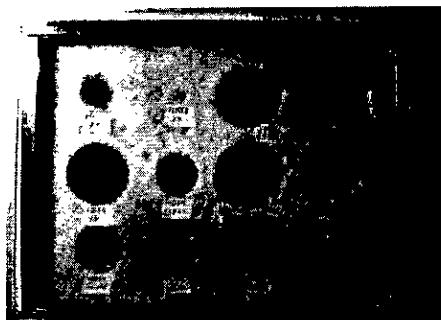
d) Lựa chọn môi trường và điều kiện lên men thích hợp

Môi trường lên men thích hợp cho các chủng xạ khuẩn được lựa chọn dựa trên các môi trường nuôi cấy xạ khuẩn sinh các chất kháng sinh: A-4, A-4H, A-9 và A-12. Giống được lên men trên máy lắc tròn 220 vòng/ phút ở 28–30 °C và sau 120 giờ nuôi cấy, được lấy ra xác định hoạt tính kháng sinh và các thông số lên men nhằm chọn chủng và môi trường cơ bản thích hợp.

Dựa trên môi trường lên men đã lựa chọn, lựa chọn nhiệt độ lên men, pH môi trường nuôi cấy, khả năng cấp khí,... tạo điều kiện lên men thích hợp.

e) Xây dựng quy trình công nghệ lên men sản xuất chế phẩm

Từ môi trường và điều kiện lên men tối ưu, nghiên cứu động thái quá trình lên men nhằm xác định thời gian thu hồi sản phẩm thích hợp. Trong sản xuất chế phẩm xạ khuẩn sinh kháng sinh, quá trình lên men được tiến hành trên môi trường xốp. Từ đó phác thảo quy trình công nghệ lên men sản xuất chế phẩm xạ khuẩn đối kháng hay chế phẩm kháng sinh.

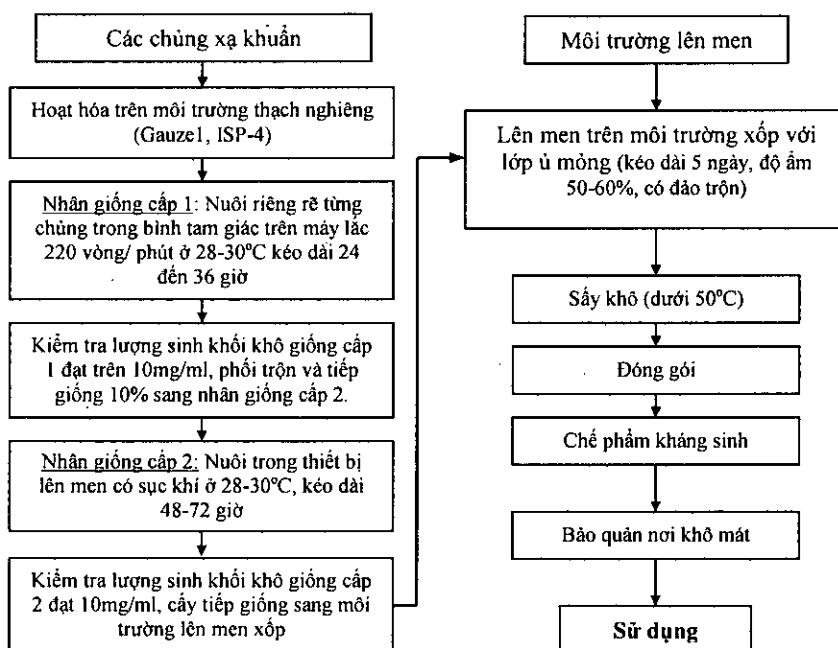


Hình 11.8. Khả năng diệt nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cỏ rẽ của một số chủng xạ khuẩn

f) Thủ khả năng chống bệnh cho cây

Dịch nuôi cấy xạ khuẩn đã kiểm tra hoạt tính kháng sinh được pha loãng đến các nồng độ 1%, 50% và 100%, sau đó ngâm hạt giống của một số cây vào dịch pha loãng, sau 24 giờ vớt ra đặt vào đĩa Petri có lót giấy lọc và bổ sung thêm nước thẩm ướt (mỗi đĩa đặt 100 hạt). Sau đó đặt đĩa vào tủ ấm và theo dõi khả năng nảy mầm của hạt 3–6 ngày. Đối chứng ngâm trong nước lã. Tính tỷ lệ nảy mầm của hạt.

11.3.3. Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm chống nấm thối cổ rễ



Hình 11.9. Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm kháng sinh chống nấm

Từ kết quả nghiên cứu lựa chọn chủng xạ khuẩn đối kháng tạo chế phẩm chống nấm có thể thiết kế quá trình công nghệ sản xuất cho từng chủng phù hợp. Có nhiều cách để sản xuất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật: Lên men chìm, lên men bè mặt, lên men trên môi trường xốp. Ở đây giới thiệu một quy trình tiêu biểu được trình bày trên hình 11.9.

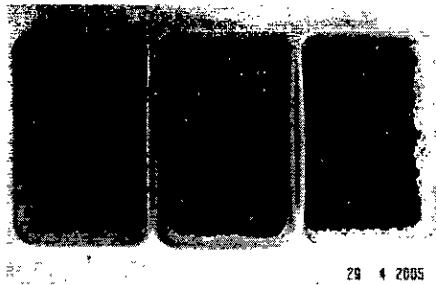
Các bước của quy trình sản xuất được tiến hành như sau:

1) Giống vi sinh vật: các chủng xạ khuẩn được hoạt hóa trên môi trường thạch nghiêng Gause 1 và kiểm tra hoạt tính chống nấm *F. oxysporum*.

2) Hoạt hoá chủng giống vi sinh vật: Hoạt lực kháng sinh của các chủng vi sinh vật thường bị giảm trong quá trình sản xuất, do các vi sinh vật thường hay bị thoái hoá trong quá trình bảo quản (hình 11.8). Để đảm bảo chủng giống luôn có hiệu suất cao, ngoài việc đảm bảo tốt chủng giống bằng các phương pháp giữ giống, người ta còn thường xuyên tuyển chọn nâng cao hiệu suất bằng các kỹ thuật di truyền.

3) Nhân giống trong bình tam giác (giống cấp I): Chủng giống vi sinh vật được bảo quản trong môi trường thạch nghiêng, trước khi cấy vào bình tam giác, các chủng vi sinh vật được cấy mới lại trên môi trường giàu dinh dưỡng, lắc trên máy lắc tròn 220 vòng/phút, kéo dài 24 giờ.

4) Nhân giống trên bình lén men nhỏ (giống cấp II): Sau khi các chủng giống phát triển tốt trong bình tam giác, xạ khuẩn được tiếp giống vào một bình lén men, tỷ lệ giống bổ sung là 5–10% thể tích, các bình lén men được sục khí vô trùng và nuôi ở 30°C. Thời gian nhân giống kéo dài 48 đến 72 giờ.



Hình 11.10. Lén men các chủng xạ khuẩn trên môi trường xốp



Hình 11.11. Chế phẩm xạ khuẩn

5) Nhân giống trên môi trường xốp: Khi giống trên bình lén men mọc tốt 5–10% (V/W) hỗn hợp giống vào môi trường nhân giống xốp với chất mang là than bùn, đắp đống cao từ 10–20cm, giữ nhiệt độ đống ủ 30°C. Đống ủ được đảo trộn hàng ngày và bổ sung thêm nước sao cho độ ẩm đạt 50–60%. Lấy mẫu định kỳ để đánh giá sự phát triển của các nhóm vi sinh vật trong quá trình nhân giống. Thời gian lên men trong môi trường xốp thường kéo dài từ 120 giờ. Xạ khuẩn phát triển tốt trên môi trường xốp thì dừng lên men, kiểm tra hoạt tính kháng sinh (hình 11.10)

Như vậy sau khi phân tích, số lượng xạ khuẩn trên 10^4 CFU/g chế phẩm thì chế phẩm đủ tiêu chuẩn để bổ sung vào đất phong, chống bệnh cho cây. Bổ sung những phụ gia cần thiết và đóng túi PE (hình 11.11).

6) Bảo quản chế phẩm: Chế phẩm KS—4 được đóng gói bằng túi polyme hàn kín và đem đi sử dụng. Nếu không sử dụng ngay, đem bảo quản ở nhiệt độ 4—6°C, kéo dài được 2 tháng, tránh ánh sáng trực tiếp.

11.3.4. Kiểm tra ảnh hưởng của chế phẩm đến cây trồng

Một chất kháng sinh muốn sử dụng trong nông lâm nghiệp, thì ngoài có hoạt tính mạnh chống lại tác nhân gây bệnh còn phải là chất không độc với cây, không làm thay đổi đặc tính của đất, không ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt và quá trình phát triển của cây.

a) Ảnh hưởng của chế phẩm lên sự nảy mầm của hạt

Cách làm: Dịch nuôi cấy các chủng xạ khuẩn được pha loãng: 100%, 90%,...10% trong nước vô trùng, sau đó ngâm các loại hạt như đỗ xanh, đỗ đen, hạt lúa 24 giờ trong tủ ấm, sau đó cho 100 hạt vào đĩa Petri được lót giấy lọc thẩm nước và để tiếp ở tủ ấm 25°C. Cứ sau 24 giờ kiểm tra số lượng hạt nảy mầm và hạt không nảy mầm.

Đánh giá kết quả: Kết quả nhận được so sánh với đĩa Petri đối chứng được làm tương tự như trên, nhưng nước ngâm là nước vô trùng. Từ đó xác định được liều dùng, chế phẩm xạ khuẩn có ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt hay không và với nồng độ là bao nhiêu %.

b) Ảnh hưởng của chế phẩm lên khả năng phát triển của cây mầm.

Cách làm: Các loại hạt (tốt nhất dùng hạt lúa) được ngâm trong nước vô trùng, sau khi hạt nảy mầm, mầm được chuyển vào các ống nghiệm có chứa 1—3ml dung dịch chế phẩm như trên. Kiểm tra độ dài của cây và rễ hàng ngày. Đối chứng sử dụng nước vô trùng.

Đánh giá kết quả: Kết quả trung bình độ dài của cây mầm và rễ của cây thí nghiệm với cây đối chứng. Tuy nhiên, số lượng cây thử nghiệm phải bảo đảm tính thống kê.

c) Ảnh hưởng của chế phẩm lên khả năng phát triển của cây

Cách làm: Mầm cây lúa (mạ và cũng có thể sử dụng các loại cây khác) được trồng vào chậu chứa đất mùn sạch (tốt nhất là đất phù sa) làm đối chứng, còn các chậu thí nghiệm được bổ sung chế phẩm có bổ sung 5, 10, 20, 30,...% chế phẩm xạ khuẩn. Kiểm tra khả năng phát triển của cây hàng ngày.

Đánh giá: So sánh khả năng phát triển của cây trồng trong các chậu thí nghiệm với chậu đối chứng.

d) Đánh giá khả năng phòng, chống bệnh cây của chế phẩm xạ khuẩn

Cách làm: Để đánh giá tác động của chế phẩm đến khả năng phòng, chống bệnh cho cây trong phòng thí nghiệm, cây được trồng trong chậu vại như trình bày ở trên, sau đó cho nhiễm các loại bệnh cần kiểm tra lên cây. Kiểm tra hàng ngày số cây bị nhiễm bệnh.

Đánh giá: So sánh số cây, số lá hoặc các vết bệnh trên cây thí nghiệm so với cây đối chứng. Tính tỷ lệ %.

Còn thí nghiệm ở mức độ nhà lưới hay vườn ươm, thì phân theo luống rồi bón phân, hoặc hoà chế phẩm thành dạng dung dịch rồi phun lên luống thí nghiệm, còn luống đối chứng phun nước máy. Kết thúc thí nghiệm có thể đánh giá số lượng cây chết ở các lô và năng suất cây thí nghiệm.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 11

1. Người ta tính rằng, nếu thu hoạch 12 tạ hạt trên 1 ha đất, thì cây trồng lấy đi khỏi đất khoảng bao nhiêu kg nitơ?
2. Trong quá trình chuyển hóa các hợp chất amon thành nitrat, sau đó thành nitơ phân tử, thì oxy phân tử (oxy không khí) tham gia vào quá trình đó như thế nào?
3. Nitơ phân tử (N_2) trong không khí rất lớn, nhưng nitơ phân tử là chất rất khó tham gia vào thành phần của các hợp chất đệm, vì phân tử nitơ có nối 3 ($N=N$) rất khó phân giải. Các loại cơ thể: Cây xanh, động vật thân mềm, vi khuẩn và tảo, loại nào có khả năng cố định được nitơ từ không khí?
4. Hiện nay, trong các nhà máy phân đạm, để nitơ liên kết được với Ca thành xianamit canxi ($CaCN_2$), người ta thường phải tiến hành ở nhiệt độ và áp suất bao nhiêu?
5. Cố định nitơ nhờ vi sinh vật là quá trình khử nitơ không khí (N_2) thành loại đạm nào?
6. Trong các chi vi sinh vật: *Bacillus*, *Aspergillus*, *Rhizobium* và *Escherichia*, chi nào có khả năng cố định nitơ phân tử thành đạm amoni?
7. Do phải mất nhiều năng lượng để bẻ gãy dây nối 3 liên kết đồng hóa trị rất vững chắc của phân tử N_2 , cho nên quá trình cố định nitơ phải sử dụng đến 12 ATP để cố định một phân tử nitơ. Enzym nào là enzym quan trọng trong cố định nitơ?

8. Trong số các vi khuẩn có khả năng cố định nitơ, loại nào là vi sinh vật cộng sinh trong rễ cây họ Đậu?
9. Vì sao, trong quá trình cố định đạm, một số kim loại (Mo^{6+} , Fe^{2+} , Co^{2+}) có ý nghĩa nhất định, chúng tham gia vào một số khâu của quá trình hấp thụ, chuyển hóa N_2 và chúng là yếu tố không thiếu được của hệ thống enzym?
10. Hằng năm, cây cối đã lấy đi của đất nhiều nitơ, tuy vậy, quy trình bổ sung nitơ xảy ra trong tự nhiên quá chậm, trong khi đó do quay vòng thời vụ lớn, lại càng làm thiếu hụt nghiêm trọng các chất cần thiết cho cây trồng. Sự thiếu hụt đó bấy lâu nay được bù đắp bằng các phân bón vô cơ (phân hoá học). Nếu sử dụng phân bón vi sinh cố định nitơ để khắc phục sự thiếu hụt nitơ thì có lợi gì?
11. Chế phẩm nitragin được điều chế từ vi khuẩn nốt sần rễ cây họ Đậu và được sử dụng rộng rãi nhất trong trồng trọt. Vi khuẩn sử dụng trong sản xuất nitragin thuộc giống nào?
12. Dưới ảnh hưởng của vi khuẩn nốt sần, rễ cây họ Đậu thường tiết ra enzym gì để phá vỡ thành lông hút và giúp cho vi khuẩn nốt sần có điều kiện xâm nhập vào rễ?
13. Vi sinh vật có khả năng chuyển hóa các photphat khó tan như: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$, quặng photphorit 18%, quặng apatit 25%, quặng apatit 33%,... thành những loại dễ tan, cây trồng có thể sử dụng được. Chủng vi khuẩn thường được sử dụng để chế tạo chế phẩm phân giải lân photphobacterin là loại nào sau đây: *Escherichia coli*; *Bacillus megaterium*; *Lactobacillus lactis* hay *Azotobacter chroococcum*?
14. Vi sinh vật nào sau đây: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus anthrasis*, được sử dụng để sản xuất các chế phẩm vi sinh vật diệt côn trùng gây hại cho cây trồng?
15. Một loại vi sinh vật gây bệnh làm chết hàng loạt tằm trong nghề nuôi tằm, được phân lập và nuôi cấy chúng trên môi trường nhân tạo để tạo chế phẩm diệt côn trùng bằng cách bào tử sê nảy mầm mọc thành sợi đâm xuyên qua tầng vỏ kitin và phát triển trong cơ thể của chúng làm cho côn trùng chết. Vi sinh vật này là loại nào?

Chương 12

CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG

12.1. CƠ SỞ SINH HỌC – SINH THÁI HỌC TRONG XỬ LÝ CHẤT THẢI BẢO VỆ MÔI TRƯỜNG

12.1.1. Cơ sở sinh học

Tính đặc trưng của các quá trình trao đổi chất ở vi sinh vật đã được ứng dụng từ lâu vào sản xuất các loại thực phẩm lên men trước khi có sự hiểu biết về sự tồn tại của chúng. Khả năng phân huỷ vật chất của quần thể vi sinh vật đã được sử dụng để quay vòng các chất thải có trong tự nhiên. Bởi vì, nếu chất thải tích tụ quá nhiều tại một vùng sinh thái sẽ cản trở khả năng tự làm sạch của vi sinh vật trong môi trường và làm ô nhiễm môi trường sống.

Trong phần này chỉ trình bày tóm lược các quá trình xử lý nước thải, chất thải bằng biện pháp sinh học mà vai trò chính là sự đóng góp của các loại vi sinh vật nhằm bảo vệ các giá trị sinh học của thiên nhiên môi trường. Đó là các nguyên lý sinh học – sinh thái học – cơ sở chung cho việc loại bỏ các chất phế thải và bảo vệ môi trường; nước thải và các đặc tính của nước thải; các quá trình xử lý nước thải truyền thống như xử lý bằng bùn hoạt tính, bằng phương pháp màng lọc; bằng ao hồ ổn định sinh học; ủ khí (sinh metan) và trình bày một vài mô hình xử lý nước thải điển hình. Công nghệ sinh học xử lý chất thải là khái niệm mới liên quan đến việc bảo vệ môi trường mà ở đây sử dụng các biện pháp sinh học để loại bỏ các chất gây ô nhiễm.

a) Phân huỷ vi sinh vật – cơ sở của sinh thái học và quá trình trao đổi chất trong sinh giới

Công nghệ phân huỷ các chất bằng vi sinh vật dựa trên cơ sở loại bỏ hỗn hợp nhiều chất có trong chất thải và tái sử dụng chúng. Nồng độ của các chất hòa tan thường là thấp, các chất không hòa tan là hợp chất cao phân tử và phân huỷ kém. Do vậy, xử lý môi trường hỗn hợp nhiều chất ô nhiễm bằng cách sử dụng nhiều chủng vi sinh sẽ tăng cường khả năng phân huỷ các chất, giảm thời gian cần thiết dẫn đến giảm giá thành sản phẩm.

Mỗi hệ sinh thái được quy định bởi các điều kiện lý học, hoá học, vị trí địa lý và thực tế địa chất của nó. Các loại sinh vật tồn tại, phát triển và tái sinh trong môi trường sống (mỗi hệ sinh thái) phụ thuộc vào các yếu tố thiết yếu là nước (hay độ ẩm), nhiệt độ, ánh sáng, khả năng cung cấp oxy, các chất dinh dưỡng, pH và khả năng khuấy trộn cơ học. Do vậy, chính sinh vật sống trong hệ sinh thái sẽ làm thay đổi các điều kiện của sinh cảnh.

b) Tăng cường bằng các biện pháp kỹ thuật

Ngày nay, người ta kiểm tra tỷ lệ cacbon: nitơ : photpho : kali có trong chất thải cũng như tỷ lệ này trong sinh khối vi sinh vật để tăng cường quá trình xử lý nước thải. Tỷ lệ các chất trong sinh khối vi sinh vật C : N : P : K = 50 : 10 : 4 : 1. Trong xử lý hiệu khí thì một nửa nguồn cacbon đồng hóa vào sinh khối còn một nửa qua hô hấp thành CO₂. Do vậy trong chất thải cần xử lý phải có tỷ lệ các chất là C : N : P : K = 100 : 10 : 4 : 1. Trong xử lý khí, khoảng 90% nguồn cacbon phân huỷ được dùng vào trao đổi năng lượng. Do vậy, tỷ lệ các nguồn là C : N : P : K = 500 : 10 : 4 : 1, đủ để cung cấp chất khoáng cần thiết.

c) Tăng cường bằng biện pháp sinh học

Xử lý chất thải bằng biện pháp sinh học thực chất là ứng dụng và phát triển các quy trình phân huỷ trong tự nhiên và phụ thuộc các mức độ xử lý khác nhau mà con người cố gắng tìm kiếm các phương pháp xử lý tối thiểu lực và giá thành thấp nhất.

- Mức độ thấp nhất là quá trình tự làm sạch tự nhiên trong điều kiện hở.
- Mức độ thứ hai là tái thực hiện việc tự làm sạch trong tự nhiên trong một vùng xác định mà nó được kiểm soát đầy đủ.
- Mức độ thứ ba được đặc trưng bằng việc áp dụng các biện pháp kỹ thuật để các quá trình phân giải chiếm vị trí và thật sự là mang tính chất áp dụng các tiến bộ của công nghệ sinh học.
- Mức độ cao nhất là áp dụng các kiến thức của công nghệ sinh học áp dụng cho khu vực rộng lớn có bổ sung bằng các công cụ kỹ thuật.

Trong các quá trình sinh học xử lý chất thải, hầu như phương pháp nào cũng có áp dụng các phương pháp hoá – lý.

12.1.2. Chất thải rắn và phân loại chất thải

a) Chất thải là gì?

Chất thải là các chất do hoạt động của con người tạo ra và không có giá trị sử dụng vào mục đích phục vụ cuộc sống của con người.

b) Phân loại chất thải

Có nhiều loại chất thải khác nhau, song thường người ta chia thành các loại chất thải sau: Chất thải sinh hoạt (thường được gọi là rác thải), chất thải công nghiệp, chất thải nông nghiệp, chất thải xây dựng, chất thải bệnh viện và chất thải độc hại. Chất thải công nghiệp và nông nghiệp thường đồng nhất, bởi lẽ phế liệu được thải ra từ nguồn nguyên liệu nhất định khi đưa vào sản xuất. Những nguồn rác thải sinh hoạt không kiểm soát được các nguồn nguyên liệu ban đầu, do đó thường không đồng nhất và thay đổi hằng ngày. Chúng liên quan đến các hoạt động của con người ở khu vực dân cư, thương mại, du lịch, dịch vụ và các hệ thống xây dựng hạ tầng khác như giao thông, cấp thoát nước. Dựa vào phân loại chất thải để tìm biện pháp xử lý thích hợp.

c) Thành phần của chất thải

Thành phần của chất thải liên quan đến nguồn gốc phát sinh của chúng, nếu chỉ ra được nguồn gốc chất thải sẽ hiểu rõ bản chất và xác định được thành phần của chúng cả về số lượng và chất lượng. Thành phần của chất thải thay đổi rất lớn như chất thải công nghiệp phụ thuộc vào nguyên liệu đầu vào, quy trình công nghệ, còn chất thải sinh hoạt phụ thuộc vào cách sống của cộng đồng, thời gian trong tuần và trong ngày (Schonborn, 1996). Nhiều loại chất thải có thể quay vòng sử dụng như rỉ đường, nước ngâm ngô, cặn sữa,... cũng có loại thu gom chỉ tái sử dụng một phần như thủy tinh, giấy thải, kim loại,... từ đó làm thay đổi thành phần của rác thải. Phần lớn các chất thải công nghiệp, nông nghiệp thường đồng nhất hơn rác thải sinh hoạt.

Tuy vậy, việc phân loại rác thải sinh hoạt của một thành phố cũng gặp nhiều khó khăn. Người ta thường chia ra các loại rác thải sinh hoạt theo khu vực khác nhau: Khu vực dân cư, khu vực thương mại, khu vực du lịch, khu vực chế biến nhỏ, khu vực làng nghề,...

Khác với rác thải của các nước phát triển, rác thải sinh hoạt ở các thành phố lớn ở nước ta có thành phần các chất hữu cơ chiếm một tỷ lệ rất lớn (bảng 12.1 và 12.2). Thành phần này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc chế biến sản xuất phân bón phục vụ cho sản xuất nông, lâm nghiệp.

BẢNG 12.1. THÀNH PHẦN RÁC THẢI Ở MỘT SỐ NƯỚC TRÊN THẾ GIỚI (1990)

Thành phần (%)	Nhật	Pháp	Singapore	Mỹ
Các chất dễ bị cháy	28,2	0	0	0
Giấy	12,1	30	20–25	30–40
Thực phẩm	8,1	34	25–45	9,4
Vải	5,1	2	0	2,0
Gỗ, cỏ	1,9	4	25–26	0,5
Chất dẻo	19,8	0	0	7,0
Cao su	1,4	10	1–2	0,5
Da	0,8	7	2–4	0,5
Kim loại	20	0	3–7	6,5
Thuỷ tinh	22,7	13	5–9	7,9
Đất cát	3,9	0	0	0
Những thứ khác	3,2	0	5–10	3,2

BẢNG 12.2. THÀNH PHẦN RÁC THẢI SINH HOẠT Ở HÀ NỘI, HẢI PHÒNG VÀ THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH (1994)

Thành phần (%)	Hà Nội	Hải Phòng	Tp Hồ Chí Minh
Thức ăn, cỏ, lá cây,...	50,27	50,7	62,24
Giấy vụn	2,72	2,82	0,59
Giẻ rách, gỗ vụn	6,27	2,72	4,25
Cao su, nhựa	0,71	2,02	0,46
Vỏ ốc, xương	1,06	3,68	0,50
Thuỷ tinh	0,31	0,72	0,02
Gạch đá, đất sỏi, sành sứ	7,43	8,45	16,04
Kim loại	1,02	0,14	0,27
Rác vụn dưới 10mm	30,21	13,9	15,27
	100	100	100

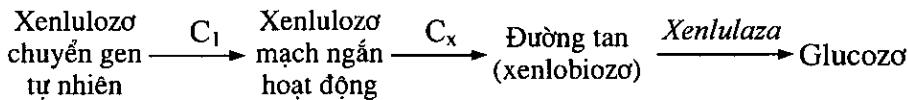
BẢNG 12.3. THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CÓ TRONG RÁC THẢI

Các loại chất thải	Thành phần các nguyên tố (%)					
	C	H	O	N	S	Tro
Thực phẩm	48,0	6,4	37,6	2,6	0,4	5,0
Giấy vụn	43,5	6,0	44,0	0,3	0,2	6,0
Bìa cacton	44,0	5,9	44,6	0,3	0,2	5,0
Chất dẻo	60,0	7,2	22,8	0	0	10,0
Vải	55,0	6,6	31,2	1,6	0,15	0
Cao su	78,0	10,0	0	2,0	0	10,0
Da	60,0	8,0	11,6	10,0	0,4	10,0
Rác vườn	47,8	6,0	38,0	3,4	0,3	4,5
Gỗ vụn	49,5	6,0	642,7	0,2	0,1	1,5

Các chất hữu cơ có trong rác thải được quan tâm để tái sử dụng làm phân bón hữu cơ là thành phần của các chất thực phẩm, các loại động, thực vật bị loại bỏ, trong đó chúng cũng chứa các thành phần hoá học như trong cơ thể vi sinh vật. Trong số các hydratcacbon, protein và lipit thì xenlulozơ, hemixenlulozơ và lignin là các chất khó phân giải và có nhiều trong thực vật. Trong phân huỷ sinh học, các enzym tương ứng tham gia để phân huỷ chúng là: xenlulaza, hemixenlulaza, lignoxenlulaza, pectinaza và amylaza.

– *Xenlulozơ*: là một trong những thành phần chủ yếu của các tổ chức thực vật. Hàm lượng xenlulozơ trong xác thực vật thường thay đổi trong khoảng 50–80% (tính theo khối lượng khô), trong sợi bông, hàm lượng này thường vượt quá 90%. Xenlulozơ là hợp chất polysaccarit cao phân tử rất bền vững, cấu tạo bởi rất nhiều gốc anhydroglucozơ, liên kết với nhau nhờ dây nối β 1,4-glucosit. Sự phân giải xenlulozơ tự nhiên là một quá trình phức tạp có sự tham gia phối hợp của nhiều enzym khác nhau.

Năm 1950, Reese và ctv lần đầu tiên đã đưa ra cơ chế chuyển hoá xenlulozơ tự nhiên thành đường hoà tan nhờ phức hệ enzym $C_1 - C_x$ như sau:



Trong đó C_1 là “nhân tố tiền thuỷ phân” hay enzym không đặc hiệu có tác dụng làm trương xenlulozơ tự nhiên (bông, giấy lọc) tạo thành các chuỗi xenlulozơ mạch ngắn, các chuỗi này tiếp tục bị tấn công bởi C_x . Các

vi sinh vật sinh trưởng trên xenlulozơ hoà tan chỉ tổng hợp thành phân C_x, trong khi các vi sinh vật sinh trưởng trên xenlulozơ có trật tự cao thì tổng hợp cả C₁ và C_x.

– *Hemixenlulozơ*: Trong tế bào thực vật, hemixenlulozơ đứng thứ hai về khối lượng. Trong thành phần của hemixenlulozơ có nhiều loại đường khác nhau. Chính vì vậy, tên của chúng thường được gọi theo tên của một loại đường chủ yếu nào đó có trong thành phần của chúng. Khối lượng phân tử của hemixenlulozơ nhỏ hơn xenlulozơ rất nhiều, chúng chỉ có khoảng 150 gốc đường đơn. Các gốc đường này được nối với nhau bằng các liên kết β 1–4, β 1–3 và β 1–6 glucozit. Các hemixenlulozơ thường tạo mạch ngắn và phân nhánh, so với xenlulozơ thì hemixenlulozơ có cấu trúc không chặt chẽ, dễ bị phân giải bởi kiềm yếu và axit yếu, đôi khi còn bị phân giải trong nước nóng. Trong số các loại hemixenlulozơ thì xylan có nhiều trong thiên nhiên: trong rơm rạ chiếm khoảng 30%, cây lá rộng 30%, cây lá kim 20–25% khối lượng khô.

Khi nghiên cứu hemixenlulozơ, người ta thấy chúng rất giống với xenlulozơ cả các gốc cấu tạo, liên kết hoá học và cấu trúc đại phân tử của chúng. Cho nên, nhiều tác giả cho rằng, hemixenlulozơ cũng có tính chất tương đồng với xenlulozơ cả cơ chế tác động cũng như tính chất cảm ứng tổng hợp. So với hemixenlulozơ có khối lượng phân tử nhỏ hơn, cấu trúc đơn giản và kém bền vững hơn. Trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật thì hemixenlulozơ thường được tạo thành sớm hơn, do hemixenlulozơ là cơ chất dễ đồng hoá hơn. Trong tự nhiên, quá trình phân huỷ hemixenlulozơ thường xảy ra song song với quá trình phân huỷ xenlulozơ.

– *Lignin là hợp chất cao phân tử được tạo thành từ 3 loại rượu chủ yếu*: rượu trans-P-cumarilic, trans-coniferilic và trans-sinapilic, nhưng tùy theo từng loại thực vật mà tỷ lượng ba thành phần này khác nhau. Trong lignin, các đơn phân tử này liên kết với nhau bằng các liên kết C–C và C–O, trong đó các kiểu liên kết aryl-glyxerol; aryl-aryl hoặc diaryl-ete là phổ biến. Lignin của cây gỗ thường bao gồm 80% coniferilic, 14% cumarilic và 6% sinapilic. Đối với gỗ mềm thì coniferilic chiếm tỷ lệ nhiều hơn, còn trong gỗ cứng thì sinapilic chiếm nhiều hơn. Trong thực vật, lignin thường tập trung ở các mô hoá gỗ và đóng vai trò như chất liên kết các tế bào làm tăng sức bền cơ học, khả năng chống thấm, ngăn chặn được các chất độc cũng như các loại vi sinh vật gây bệnh và các tác động khác từ bên ngoài.

Lignin không hòa tan trong nước, trong dung môi hữu cơ thông thường cũng như trong các axit đậm đặc. Chỉ có tác dụng của kiềm, bisunphit natri hoặc axit sunphuro, lignin mới bị phân giải từng phần và chuyển vào dung dịch. Lignin rất bền vững với tác động của các enzym. Do đó trong cây, lignin chỉ được tạo ra mà không tham gia vào trao đổi chất.

– *Pectin* là hợp chất polyme dạng keo bao gồm các đơn vị galactoronic gắn với nhau bằng liên kết 1,4- α glucozit. Khối lượng phân tử của chúng nằm trong khoảng $2,5 \cdot 10^3 \div 4 \cdot 10^5$. Bản chất của pectin là các chất heterosaccharit có trong các mô của thực vật bậc cao, bao gồm các hợp chất: Axit pectinic, axit pectic, pectat, pectanat và protopectin. Tuy vậy chỉ có protopectin là không hòa tan trong nước, chính chúng gây lên đục và tạo độ nhớt cao trong dịch quả.

Pectin có mặt trong tất cả các mô của thực vật bậc cao. Tuy hàm lượng chỉ chiếm khoảng 5% trong thành tế bào, nhưng chúng là một trong thành phần cơ bản của tế bào thực vật. Cùng với lignin-xenlulozơ, pectin tham gia vào việc hình thành "bộ xương" của thực vật, điều chỉnh độ ẩm và trạng thái của tế bào thực vật.

– *Tinh bột* là hợp chất hydratcacbon cao phân tử có nhiều trong ngũ cốc: Gạo, ngô, khoai tây, khoai lang,... Tinh bột cấu tạo từ 2 thành phần chính: Amylozơ (khoảng 25%) và amylopectin (khoảng 70%). Amylozơ tan được trong nước nóng, còn amylopectin tạo thành dạng keo. Một phân tử của tinh bột có cấu tạo từ các đơn vị glucozơ và fructozơ bằng liên kết α -1,4, liên kết α -1,6 và phân nhánh. Enzym thuỷ phân tinh bột phân huỷ chủ yếu liên kết α -glucozit. Nhóm enzym này gồm các enzym: α -amylaza, β -amylaza, glucoamylaza và dextrinaza.

– *Protein và lipit*. Protein là hợp chất hữu cơ cao phân tử có chứa 15–17,5% nitơ (tính theo khối lượng khô) và thành phần quan trọng trong cơ thể động vật, thực vật và vi sinh vật. Tất cả các protein đều có cấu tạo từ axit amin. Các axit amin được tạo thành trong quá trình trao đổi chất trong tế bào. Việc tổng hợp axit amin thông qua nhiều phản ứng hoá học với sự xúc tác của các enzym khác nhau, nhưng có thể quy về hai loại phản ứng: amin hoá và chuyển amin. Các axit amin có trong tế bào ở dạng tự do là nguyên liệu tổng hợp các phân tử protein. Quá trình phân giải protein nhờ proteaza của cơ thể sinh vật thành các phân tử nhỏ hơn. Các chất này tiếp tục phân huỷ thành axit amin nhờ peptidaza, một phần xây dựng lên cấu trúc của tế bào và một phần phân

giải thành NH_3 và N_2 . Còn lipit có nhiều trong cơ thể sinh vật, chúng thường là chất dự trữ hoặc chất bảo vệ tế bào. Lipit là các ester của glyxerin và axit béo hoặc là các chất sáp (ester phức tạp của axit béo và rượu đơn nguyên tử từ cao phân tử).

12.1.3. Vi sinh vật phân giải các chất hữu cơ trong tự nhiên

a) Các vi sinh vật phân giải hydratcacbon

Trong tự nhiên, vi sinh vật làm cho gỗ hư hỏng là các loại nấm mục trắng, nâu và xốp. Ngoài nấm, còn có nhiều loại vi khuẩn cũng có khả năng phân giải hydratcacbon-lignin chỉ sau khi đã xử lý gỗ bằng tác nhân vật lý hoặc hoá học, làm tăng sự kết tinh của xenlulozơ và làm tăng khả năng tiếp xúc của cơ chất với enzym.

– *Các nhóm vi khuẩn và xạ khuẩn:* Trong tự nhiên, trong điều kiện độ ẩm tăng cao thường làm tăng khả năng phân giải xenlulozơ của vi khuẩn, nhưng chủ yếu là các chi thuộc nhóm vi khuẩn hiếu khí, Gram âm và trực khuẩn kỵ khí tuỳ tiện, sau đó mới đến các vi khuẩn kỵ khí và *Actinomycetales*. Các vi sinh vật hiếu khí có khả năng phân giải xenlulozơ thường thuộc về các chi: *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Cellvibrio*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Angiococcus*, *Polyangium*, *Sporocytophaga*, *Sorangium*, *Archangium*, *Promyxobacterium*,... (vi khuẩn); *Micromonospora*, *Proactino-myces*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*,... (xạ khuẩn). Nhưng trong thực tế, người ta thấy chi *Bacillus*, *Fravobacterium* và *Pseudomonas* là các chi phân lập được có tần suất cao nhất. Một vài chủng của chi *Streptomyces* cũng tấn công cả ligno-xenlulozơ in vitro. Hầu hết các chủng này đồng hoá hydratcacbon, một vài chủng có khả năng phân giải cả lignin nhân thom.

Ngoài các vi khuẩn hiếu khí, còn có một số vi khuẩn kỵ khí có khả năng tham gia vào quá trình phân giải xenlulozơ. Người ta gọi quá trình phân giải xenlulozơ kỵ khí là quá trình lên men xenlulozơ. Diễn hình là vi khuẩn trong khu hệ vi sinh vật trong dạ cỏ động vật nhai lại: *Ruminococcus flaveficiens*, *R. albus*, *R. parvum*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Cillobacterium cellulosolvens*,...

– *Nấm sợi:* Nấm sợi phát triển mạnh trên môi trường xốp có độ ẩm trên 70%, tối ưu 95% và ở điều kiện nhiệt độ ấm (24°C). Các loại nấm mốc này thường gặp thuộc nấm bất toàn và nấm Ascomysetes. Chúng hình thành bào tử đính và ở dải pH khá rộng từ 2,5 đến 11. Các loại nấm này chủ yếu thuộc

các chi *Aspergillus*, *Penicilium*, *Trichoderma* và các chi khác có khả năng phân giải pectin, hemixenlulozơ và xenlulozơ.

+ Nấm đốm (staining fungi): Đây là các loại nấm phát triển sâu vào trong tế bào gỗ tạo thành các đốm màu nâu. Hầu hết các loài thuộc nhóm nấm bất toàn và nấm *Ascomysetes*. Phụ thuộc vào độ ẩm của gỗ (khoảng 30%) và nhiệt độ 30 – 35°C, quần thể nấm phát triển lúc đầu là màu xanh, sau đó tạo thành màu nâu. Ví dụ như các loài: *Ceratocystis spp.*, *Cladosporium spp.*, *Aureobasidium spp.*...

+ Nấm mục xốp (soft rot fungi): Nấm này có khoảng 300 loài thuộc các chi: *Chaetomium*, *Humicola* và *Phialophora* của nấm bất toàn và *Ascomysetes*. Khác với nhóm nấm mục trắng và nấm mục nâu thuộc nhóm *Basidiomycetes*, chúng phát triển chủ yếu bên trong thành tế bào gỗ. Chúng phân huỷ chủ yếu xenlulozơ, hemixenlulozơ và ít tác động lên lignin. Loại nấm này đòi hỏi độ ẩm và nhiệt độ môi trường rộng. Nhiều loài, ví dụ như *Chaetomium globosum* có thể sinh trưởng ở pH từ 3 đến 11.

+ Nấm mục nâu (brown rot fungi): Loại nấm này thuộc *Basidiomycetes* thường xâm nhập vào bên trong loại gỗ xốp phân huỷ hydratcacbon ở thành tế bào và cũng không tác dụng lên lignin. Những loài nấm mục nâu quan trọng: *Phaeolus schweinitzi*, *Piptoporus betulinus*, *Laetiporus sulphureus*, *Sperassis crispa*, *Deadalea quercina*, *Lentinus lepideus*, *Paxillus pamoides*, *Gloeophllum spp.*... Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của nấm mục nâu 22–31°C, phân lớn chết ở nhiệt độ cao hơn 55°C. Chúng sinh trưởng ở điều kiện độ ẩm môi trường thấp 40–55%. Nấm này có thể xâm nhập vào cây còn tươi qua rễ, phân huỷ cả thân gỗ và cả phần libe làm cho cây mục.

+ Nấm mục trắng (white rot fungi). Nấm này cũng thuộc nấm *Basidiomycetes*. Chúng phân giải cả xenlulozơ, hemixenlulozơ và lignin. Các loài nấm mục trắng điển hình: *Armillaria mellea*, *Fonus fomentarius*, *Meripilus giganteus*, *Phellimes pini*, *Polyporus squamosus*, *Fomes annosus*; *Coriolus rericolor*, *Schizophillum anumine*. *Stereum spp.*, *Trametes hirsuta*; *Hirachporus abietinus*, *Peniophora gigantea*, *Trametes gibbosa*. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 22–31°C, nhiệt độ sinh trưởng tối đa không quá 44°C. Độ ẩm tối ưu có loại rất thấp 45% (như *Fomes annosus*), cao 50–120% (như *Coriolus rericolor*) và rất cao 100–150% (như *Hirachporus abietinus*).

b) *Sự phân giải hợp chất cacbon trong tự nhiên nhờ vi sinh vật*

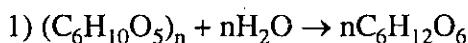
Giống như các quá trình phân giải các chất hữu cơ trong tự nhiên, quá trình phân giải hợp chất cacbon trong tự nhiên là quá trình sinh hoá phức tạp.

Nhờ hoạt động sống của vi sinh vật, một số lượng lớn chất hữu cơ bị phân giải và làm giảm khối lượng. Trong quá trình này, các hydratcacbon (xenlulozơ, pectin, hemixenlulozơ, lignin,...) được phân giải thành những phần nhỏ hơn, sinh khối vi sinh vật mới được tạo thành đồng thời tạo ra các sản phẩm của quá trình trao đổi chất, các chất khí (N_2 , CO_2 ,...). Ngoài ra, tạo thành các axit hữu cơ như: axit fomic, axit axetic, axit propionic, axit béo, axit lactic,..., các chất này tiếp tục chuyển hoá thành các sản phẩm khác.

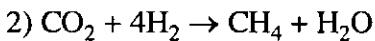
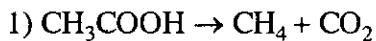
Chu trình chuyển hoá hợp chất cacbon được chuyển hoá qua hàng loạt các phản ứng hoá học. Xúc tác mỗi phản ứng là một enzym. Để duy trì sự sống, các vi sinh vật sử dụng các sản phẩm do chúng phân huỷ hay do vi sinh vật khác chuyển hoá. Trong quá trình chuyển hoá vật chất trong tự nhiên có nhiều loại vi sinh vật cùng tham gia. Sản phẩm chuyển hoá của chủng vi sinh vật này lại là cơ chất cho vi sinh vật khác, hoạt động của vi sinh vật diễn ra phức tạp và có mối liên quan chặt chẽ.

Xenlulozơ là hợp chất cacbon phân bố nhiều nhất, là thành phần cơ bản của tế bào thực vật và là nguồn cacbon dự trữ lớn nhất trong tự nhiên. Do vậy, sản phẩm của quá trình phân giải xenlulozơ là một phần cơ bản nhất tạo nên phân hữu cơ và mùn rác. Chúng giữ vai trò to lớn trong sản xuất nông nghiệp.

* Lên men xenlulozơ là quá trình phân giải khí khí nhờ các vi khuẩn khử sunphat hay vi khuẩn sinh metan. Cơ chế hoá học của quá trình lên men xenlulozơ phức tạp, song có thể tóm tắt theo các phương trình sau:



Sơ đồ trên cũng chỉ là giả định, vì metan được hình thành, hoặc do axit axetic phân giải, hoặc do CO_2 hoàn nguyên nhờ phản ứng hydro:



Do vậy, lên men hydro lượng khí ($CO_2 + H_2$) chỉ bằng 1/3 khối lượng xenlulozơ bị phân giải, còn lên men metan thì lượng khí ($CH_4 + CO_2$) cao hơn, bằng 1/2 khối lượng xenlulozơ bị phân giải. Nhờ có sự phân bố các vi sinh vật phân giải xenlulozơ trong tự nhiên mới thực hiện được chu trình cacbon từ xenlulozơ (Gusterov, 1970).

– Lên men phân giải xenlulozơ hiếu khí có ý nghĩa quan trọng đối với cây trồng. Cũng như phân giải khí khí, xenlulozơ được phân giải thành các axit hữu cơ thường là các axit uronic (axit mùn) và các oxit axit đơn giản hơn. Các chất này tiếp tục bị oxy hoá và sản phẩm cuối cùng là CO_2 và H_2O . Cơ chế hoá học của lên men xenlulozơ phức tạp, song có thể tóm tắt theo các phương trình sau:

- 1) $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- 2) $n\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 + \text{O}_2 \rightarrow \text{R}-\text{CHOHCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{kcal}$.
- 3) $\text{R}-\text{CHOHCOOH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{kcal}$.

Qua các giai đoạn trung gian trong quá trình phân giải xenlulozơ hình thành đường hoà tan và các axit hữu cơ có ý nghĩa rất quan trọng. Chúng là nguồn dinh dưỡng thích hợp cho các loại vi sinh vật đất, đặc biệt là các vi sinh vật cố định nitơ (*Azotobacter* và *Clostridium*). Phân bón hữu cơ có nhiều xenlulozơ, người ta phát hiện thấy nhiều vi sinh vật cố định nitơ phát triển mạnh. Ngoài xenlulozơ, vi sinh vật còn phân giải các chất pectin, lignin,... các chất này dễ bị oxy hoá nhờ các vi sinh vật thành CO_2 , H_2O , các loại đường và axit hữu cơ như axit galactonic, axit axetic.

c) Cơ chế hình thành mùn rác nhờ vi sinh vật

Vi sinh vật giữ vai trò quan trọng tạo độ phì của đất, vì chúng không những tham gia vào quá trình hình thành đất, mà chúng còn khoáng hoá các chất hữu cơ của xác thực, động vật hình thành mùn đất (humus) làm tăng độ phì của đất. Theo V.R. Williams, vai trò của vi sinh vật trong việc hình thành chất mùn được xác định qua định nghĩa chất mùn như sau: “Chất mùn tự nhiên bao gồm 3 axit mùn chính (uronic): Unmic, humic và apocrenic. Chúng thường xuyên được sinh ra do 3 kiểu phân giải các chất hữu cơ trong tự nhiên: axit unmic (axit nâu) theo kiểu phân giải khí khí; axit humic (axit đen) theo kiểu hiếu khí và axit apocrenic (axit không màu) do nấm phân giải các chất hữu cơ”.

Cũng như quá trình tạo độ phì của đất, các oxit axit trong quá trình lên men phân giải hydratcacbon tổ hợp với các protein và axit amin tạo thành mùn rác với sự tham gia trực tiếp của vi sinh vật. Trong các axit mùn hình thành qua phân giải chất hữu cơ thực vật như xenlulozơ thì axit humic hình thành qua quá trình lên men hiếu khí có giá trị tạo độ phì của đất cao nhất.

Rác thải giàu chất hữu cơ sau khi đã loại bỏ cẩn thận các chất trơ (thuỷ tinh, chất dẻo, kim loại,...) cần khoáng hoá các chất hữu cơ tạo thành mùn

rác bằng phương pháp ủ trước khi sử dụng trong nông nghiệp, không nên bón trực tiếp các chất hữu cơ chưa ủ vào đất, vì nó sẽ làm thay đổi hệ sinh thái đất dẫn đến hệ vi sinh vật trong đất sinh ra các chất trao đổi trung gian không thích hợp cho sinh trưởng bình thường của cây trồng.

Do vậy, phương pháp ủ rác thải hiếu khí là cách nhận được các sản phẩm ổn định nhất, giống như quá trình oxy hoá sinh học các chất hữu cơ diễn ra tự nhiên trong đất (University of Stuttgart).

d) Các vi sinh vật phân giải hydratcacbon trong bể ủ rác thải

Trong tự nhiên, khu hệ vi sinh vật có khả năng phân huỷ hydratcacbon vô cùng phong phú bao gồm cả vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. Để sinh trưởng, phát triển, vi sinh vật không những cần hydrat cacbon làm nguồn dinh dưỡng, mà còn cần các nguồn nitơ (hữu cơ và vô cơ), các nguyên tố đa lượng như P, K, Mg, Ca, S,... và các nguyên tố vi lượng như Mn, Mo, Fe, Zn,...

Trong quá trình ủ rác, ngoài việc cân đối các thành phần dinh dưỡng, để đảm bảo cho vi sinh vật phát triển nhanh còn cần điều kiện nuôi cấy tối ưu như: độ ẩm, pH, nhiệt độ, tỷ lệ oxy và khí cacbonic trong môi trường, sẽ thúc đẩy nhanh quá trình lên men, rút ngắn thời gian xử lý. Tuy nhiên, trong quá trình xử lý rác thải, nhiệt độ trong đống ủ tăng lên nhanh. Theo Sochnborn, 1986, đã nghiên cứu so sánh 2 quá trình xử lý rác thải: Xử lý rác thải trong bể ủ có hệ thống thông gió, cưỡng bức, chỉ sau 5– 10 giờ nhiệt độ trong bể ủ đã tăng lên 40–55°C và kéo dài suốt quá trình ủ và xử lý rác thải trong bể ủ không có hệ thống thông gió nhiệt độ trong bể ủ lên tới 75–80°C.

Mỗi loại vi sinh vật có khả năng sinh trưởng, phát triển ở nhiệt độ tối thiểu, tối thích và tối đa khác nhau. Mỗi loại vi sinh vật có nhiệt độ sinh trưởng, phát triển khác nhau, nên người ta chia chúng thành 3 nhóm: ưa lạnh (dưới 25°C), ưa ấm (20 – 55°C) và ưa nhiệt (trên 45°C), người ta cũng còn chia ra loại cực ưa nhiệt (trên 70°C). Trong quá trình thu gom rác thải thành đống, các vi sinh vật có sẵn trong rác thải bắt đầu hoạt động làm cho nhiệt độ đống rác thải tăng lên. Khi nhiệt độ tăng lên cao (trên 50°C), các vi sinh vật ưa ấm ngừng hoạt động hoặc chết đi, chỉ còn các vi sinh vật ưa nhiệt tồn tại và phát triển. Chính vì vậy, các loại nấm (nấm mốc, nấm men, nấm sợi,...) thường ít chịu nhiệt hơn, cho nên bị chết trong quá trình ủ ở nhiệt độ cao. Trong số các loại vi sinh vật thì vi khuẩn, xạ khuẩn có khả năng chịu được nhiệt độ cao hơn. Tuy nhiên, trong quá trình ủ rác, cũng giống như quá trình lên men vi sinh vật nói chung được chia thành 4 pha: pha lag, pha log,

pha ổn định và pha suy vong. Thường thì pha log, vi sinh vật sinh trưởng và phát triển theo luỹ thừa và pha tử vong – số lượng tế bào có khả năng sống giảm theo luỹ thừa. Nhưng trong quá trình xử lý rác thải thì quá trình lên men này diễn ra dài hơn. Do đó, trong các pha, vi sinh vật có thể chịu được ở nhiệt độ khác nhau sẽ sinh trưởng và phát triển ở các giai đoạn ủ khác nhau. Chính vì vậy, trong quá trình ủ, sự biến động của các nhóm vi sinh vật cũng rất phong phú và đa dạng. Số lượng các chủng vi sinh vật có khả năng chịu được nhiệt độ cao cũng tăng lên và các chủng này sinh trưởng và phát triển mạnh hơn. Trong số các nhóm vi sinh vật thì vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng chịu được nhiệt độ cao hơn. Muốn thúc đẩy quá trình xử lý nhanh hơn, ngoài việc tăng cường các điều kiện lên men phù hợp, chọn các chủng có hoạt tính sinh học cao, còn phải tuyển chọn các chủng vi sinh vật phù hợp với nguồn cơ chất của rác thải và chịu được nhiệt độ trong bể xử lý.

Như vậy, việc lựa chọn các vi sinh vật nhằm tăng cường xử lý rác thải bảo vệ môi trường và sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ sản xuất nông nghiệp cần dựa trên các nguyên tắc chính sau:

- Các chủng vi sinh vật phải có hoạt tính sinh học cao như khả năng sinh phức hệ enzym xenlulaza cao và ổn định.
- Phải sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện thực tế của đống ủ, cạnh tranh với vi sinh vật có sẵn trong đống ủ và có khả năng chịu nhiệt.
- Có tác dụng cải tạo đất và có lợi cho thực vật khi phân ủ được bón vào đất, tức là có khả năng phát huy sau khi bón vào đất.
- Không độc cho người, cây trồng, động vật và vi sinh vật hữu ích trong đất.
- Nuôi cấy dễ dàng, sinh trưởng tốt trên môi trường tự nhiên, thuận lợi cho quá trình sản xuất chế phẩm.

12.2. CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT XỬ LÝ RÁC THẢI

12.2.1. Nguyên lý của các biện pháp xử lý rác thải

a) Các biện pháp xử lý chất thải

Những chỉ tiêu cần đạt được trong quá trình xử lý chất thải là: (1) Không ảnh hưởng đến sức khoẻ của con người; (2) Không ảnh hưởng đến động, thực vật; (3) Không ảnh hưởng đến các nguồn nước và đất; (4) Không gây ảnh hưởng tới không khí và gây tiếng ồn; (5) Không xâm phạm tới trật tự không gian, quy hoạch đất đai, vùng rừng cấm, vùng bảo tồn thiên nhiên.

Rác thải nguy hại cần được phân loại và xử lý riêng dựa vào tính chất và thành phần độc hại của chúng. Dựa vào nguồn gốc rác thải, người ta đề xuất các biện pháp xử lý chất thải như sau:

– *Đốt chất thải*: Đốt chất thải là quá trình oxy hoá chất thải bằng oxy của không khí ở nhiệt độ cao ($1.100\text{--}1.200^{\circ}\text{C}$).

– *Công nghệ cố định và đóng rắn chất thải*: Trước khi đem chôn lấp chất thải nguy hại, cần phải làm ổn định chất thải để ngăn chặn sự rò rỉ và thấm thấu của chất thải, gây ô nhiễm nguồn nước và đất xung quanh bãi chôn lấp. *Ôn định đóng rắn chất thải* là công nghệ trộn vật liệu thải với vật liệu đóng rắn (vôi, xi măng, polyme,...) tạo thành thể rắn bao lấy chất thải hoặc cố định chất thải trong cấu trúc của vật rắn.

– *Bãi chôn lấp an toàn*: Mục đích của việc chôn lấp chất thải là giảm đến mức thấp nhất sự ô nhiễm bề mặt do chất thải gây ra và ngăn chặn sự ô nhiễm nước ngầm do sự rò rỉ trong lòng các hố chất thải bằng kim loại, vật liệu phù hợp bao bọc xung quanh hố chôn lấp.

– *Xử lý chất thải làm phân bón hữu cơ*: Nước ta là nước nông nghiệp, do vậy nhu cầu phân bón cũng rất lớn. Việc xử lý chất thải hữu cơ làm phân bón cũng đang được ứng dụng nhiều. Quá trình phân huỷ nhanh các chất hữu cơ thành mùn, rút ngắn thời gian xử lý đang được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm nghiên cứu.

– *Xử lý rác thải bệnh viện*: Các chất thải trong quá trình điều trị, giải phẫu bệnh lý ở các bệnh viện phải được xử lý, thu gom riêng, không được xả chung vào hệ thống rác thải công cộng.

b) *Bán chất của phương pháp xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật*

Xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật là nhờ hoạt động sống của vi sinh vật (vi sinh vật tự nhiên có trong rác thải và vi sinh vật thuần chủng được bổ sung trong quá trình xử lý) mà các cơ chất có trong rác thải phân huỷ thành các phân nhỏ hơn, hình thành sinh khối vi sinh vật cao hơn, các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật và các loại khí như CO_2 , CH_4 ,... Các quá trình chuyển hoá này có thể xảy ra trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Quá trình ủ chất thải hữu cơ như là một quá trình sinh học phân huỷ chất thải hữu cơ và ổn định các thành phần cuối cùng của chúng dưới tác dụng của vi sinh vật ưa nhiệt.

Ủ hiếu khí là quá trình phân giải các chất hữu cơ nhờ vi sinh vật với sự có mặt của oxy. Sản phẩm cuối cùng là CO_2 , NH_3 , nước, nhiệt và sinh khối

vì sinh vật mới. Còn ủ kỵ khí không có mặt của oxy và sản phẩm cuối cùng là CH₄, CO₂, NH₃, một lượng nhỏ các loại khí khác, axit hữu cơ và sinh khối vi sinh vật.

Trong quá trình ủ rác sẽ xảy ra một loạt các chuyển hóa khác nhau. Các quá trình này có thể theo mục đích có lợi như làm cho sản phẩm cuối cùng của quá trình xử lý ổn định trước khi sử dụng; chất lượng chất dinh dưỡng (N, P, K thường nằm ở dạng hữu cơ) được cải tạo làm tăng chất lượng đất có lợi cho cây trồng; và tiêu diệt các loại vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên, quá trình này cũng còn có những hạn chế nhất định, thường thời gian ủ kéo dài kéo theo hàng loạt khó khăn khác và nếu quá trình ủ chính không kiểm soát được thì sẽ gây ô nhiễm tiếp cho môi trường.

Khả năng xử lý rác thải bằng phương pháp vi sinh vật còn phụ thuộc vào tỷ lệ giữa các chất có trong rác thải. Chính vì vậy, ngày nay, người ta thường kiểm tra tỷ lệ giữa cacbon: nitơ : photpho : kali có mặt trong các loại chất thải trong quá trình ủ, tạo điều kiện thích hợp cho các loại vi sinh vật phát triển tốt, rút ngắn thời gian xử lý, làm tăng số lượng và chất lượng mùn tạo thành. Đặc biệt là tỷ lệ giữa nguồn cacbon và nguồn nitơ, nếu tỷ lệ giữa C/N > 50 thì quá trình phân giải sẽ bị kéo dài và chất lượng mùn thấp. Còn nếu tỷ lệ C/N < 30 thì nitơ sẽ bị mất đi dưới dạng khí N₂ hoặc NH₃.

Ngoài ra, thông khí nhằm cung cấp oxy cho các vi sinh vật hô hấp hiếu khí tiến hành quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ nhanh chóng, không sinh ra mùi hôi thối, đồng thời có tác dụng làm tản nhiệt và làm giảm độ ẩm trong đống ủ; đó là những ưu điểm của quá trình ủ hiếu khí so với ủ kỵ khí. Lượng oxy được cung cấp cho bể ủ qua hai con đường chính: Sự khuếch tán của không khí và thổi khí cưỡng bức. Lượng oxy được cung cấp bởi sự khuếch tán rất nhỏ, chỉ vào khoảng 0,5 – 5% tổng lượng oxy đòi hỏi. Vì vậy, thổi khí cưỡng bức là nguồn cung cấp oxy chủ yếu của quá trình ủ hiếu khí.

12.2.2. Các phương pháp xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật

Ủ rác thải làm phân bón hữu cơ nhằm bổ sung lại các chất hữu cơ cho cây trồng mà hàng năm bị lấy đi khỏi đất, bởi vì chất hữu cơ trong đất được xem là một trong nhu cầu cơ bản nhất của phân bón sinh học và nếu hàm lượng này xuống dưới mức bình thường thì sẽ xảy ra quá trình “sa mạc hóa”. Cho nên, phương pháp ủ rác thải làm phân bón đã có từ lâu đời nhằm giải quyết đồng thời hai lợi ích, vừa loại bỏ rác thải, vừa cung cấp chất hữu cơ cho nông nghiệp.

a) Phương pháp ủ kỵ khí (anaerobic composting)

Ủ kỵ khí là quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ không có mặt của oxy; sản phẩm cuối cùng là khí CH_4 , CO_2 , NH_3 , một lượng nhỏ các loại khí khác, axit hữu cơ và sinh khối vi sinh vật. Bản chất của quá trình này là nhờ sự hoạt động của các vi sinh vật mà các chất hữu cơ khó tan (xenlulozơ, hemixenlulozơ, lignin, tinh bột và các chất cao phân tử khác) được chuyển thành các chất dễ tan và các chất khí, trong đó metan chiếm tuyệt đại đa số (trên 64%).

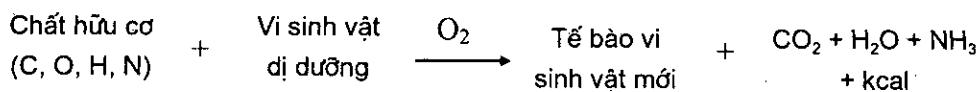
Hội thảo quốc tế ở Nairobi về "Các nguồn năng lượng mới và năng lượng tái sinh" tháng 8/1981, đã xác nhận 3 loại công nghệ quan trọng của cuối thế kỷ XX là: công nghệ tạo khí metan sinh học, các nhà máy năng lượng mặt trời và năng lượng hydro là những công nghệ có thể giải quyết được nhu cầu năng lượng ở nông thôn, đặc biệt là ở những quốc gia đang phát triển, trong đó năng lượng khí metan được coi là quan trọng và có triển vọng hơn cả. Sản xuất khí metan sinh học chủ yếu được ứng dụng trong xử lý chất thải và nước thải. Nguồn cơ chất thích hợp cho quá trình sản xuất khí metan là các chất thải chính hay phụ phẩm nông nghiệp, chất thải sinh hoạt và chất thải của chăn nuôi.

Nhược điểm của phương pháp xử lý kỵ khí là quá trình xử lý thường kéo dài, khó triển khai xử lý khối lượng lớn rác thải, khó tận thu được hết khí, gây ô nhiễm môi trường. Hơn nữa, mùn rác tạo thành trong quá trình xử lý kỵ khí không có giá trị cao bằng xử lý hiếu khí.

b) Phương pháp ủ rác hiếu khí (aerobic composting)

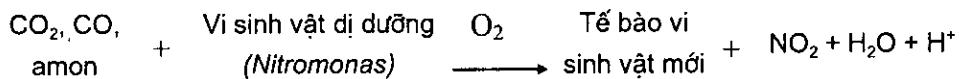
Trừ các thành phần như chất dẻo, cao su, thuỷ tinh, sành sứ, còn các thành phần hữu cơ khác có chứa protein, lipit, hydratcacbon, xenlulozơ, lignin, hemixenlulozơ, đều được chuyển hoá trong quá trình lên men. Ủ hiếu khí là quá trình phân giải các chất hữu cơ với sự có mặt của oxy sẽ tạo ra sản phẩm lên men chính là mùn (humus). Quá trình này thể hiện như sau:

– Oxy hoá cacbon hiếu khí

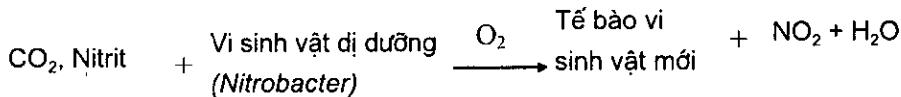


– Nitrat hoá hiếu khí:

+ Giai đoạn 1:



+ Giai đoạn 2:



Dựa vào phương thức cung cấp oxy vào bể ủ rác thải, có thể chia thành hai phương pháp ủ hiếu khí: lên men tự nhiên có đảo trộn và lên men có thổi khí cưỡng bức. Để xây dựng các hệ thống thiết bị xử lý rác hoàn chỉnh nhằm tạo điều kiện tốt nhất cho quá trình, người ta chia các hệ thống ủ như sau: (1) Hệ thống mở gồm có đống ủ có đảo trộn và đống ủ tĩnh có thể hút khí, thổi khí, cả hút và thổi khí và cấp khí kết hợp với điều chỉnh nhiệt độ; (2) Hệ thống kín gồm nồi phản ứng đứng nuôi cấy liên tục hay không liên tục và nồi phản ứng nằm ngang tĩnh hoặc có đảo trộn nguyên liệu.

Dựa vào phương thức cung cấp oxy vào bể ủ rác thải có thể chia thành hai phương pháp ủ rác hiếu khí: lên men tự nhiên có đảo trộn và lên men có thổi khí cưỡng bức.

c) **Phương pháp xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật có điều khiển**

Vi sinh vật sinh nhiệt trong quá trình lên men các chất hữu cơ, nhưng phần lớn các loại vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng và phát triển ở dải nhiệt độ hẹp. Điều đó cũng có nghĩa là vi sinh vật chỉ phát triển bền vững có giới hạn trong khoảng nhiệt độ nhất định. Người ta chia vi sinh vật thành các nhóm vi sinh vật khác nhau: ưa lạnh, chịu lạnh, ưa ấm, ưa nhiệt và cực ưa nhiệt. Thường vi sinh vật ưa ấm có dải nhiệt độ sinh trưởng, phát triển 25–45°C, còn ưa nhiệt từ 45–70°C. Hầu hết các loài nấm không có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ trên 50°C, chỉ có một vài loại có thể chịu được ở 60–62°C. Các chủng này cũng bị mất hoạt tính hoàn toàn ở nhiệt độ cao, do vậy các vi khuẩn và xạ khuẩn ưa ấm chết, lúc đó hình thành các loại vi sinh vật ưa nhiệt.

Chất lượng của quá trình ủ rác phụ thuộc vào cơ chất và hàm lượng nước trong rác thải, đồng nghĩa với khả năng sinh nhiệt của quá trình trao đổi chất, các lỗ xốp trao đổi nhiệt và khả năng cung cấp oxy cho quá trình hô hấp hiếu khí,... Các yếu tố trong quá trình ủ không có tác động riêng rẽ mà

chúng có mối tương quan nhất định đến nhau như mối tương quan giữa O₂ và CO₂; giữa O₂ và cấp khí; giữa cấp O₂ và loại bỏ nhiệt để bảo đảm điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển, rút ngắn được thời gian ủ, tăng cường khả năng phân giải các chất và nâng cao chất lượng mùn tạo thành.

Khả năng sinh nhiệt trong bể ủ còn phụ thuộc vào các cơ chất ủ khác nhau, mỗi một loại chất hữu cơ thường thích hợp cho một số loại vi sinh vật nhất định, trên cơ sở đó sự sinh nhiệt cũng khác nhau. Do vậy, xác định lượng nhiệt sinh ra (lượng nhiệt sinh ra/ đơn vị thể tích – thời gian) là rất khó. Trao đổi khí trong bể ủ rác thải vừa cung cấp O₂, vừa loại bỏ CO₂, nhiệt và hơi nước. Đối với quá trình ủ hiếu khí thì cứ phân giải 1g glucozơ đến CO₂ tạo ra 15,6kJ, nhưng lên men axit lactic chỉ có 0,49kJ. Như vậy, ủ bằng phương pháp kỹ khí thì khả năng sinh nhiệt không có ý nghĩa, còn trong điều kiện ủ hiếu khí, hệ thống ủ thường được đánh giá nồng độ oxy qua khí thải, nồng độ oxy tối thiểu là 5%.

BẢNG 12.4. HAI BIỆN PHÁP Ủ RÁC THẢI CÓ ĐIỀU KHIỂN KHÁC NHAU TRONG BỂ Ủ THÔNG THƯỜNG (SCHONBORN, 1986)

Các chỉ tiêu	Chiến lược	
	Điều khiển triệt để	Điều khiển không triệt để
Dạng bể ủ	Bể kín	Bể hở
Kiểm soát quá trình	Giữ đến 60°C	Giữ điều kiện cấp oxy
Điều khiển thổi khí	Đặt thời gian cần thiết để hạn chế nhiệt; cung cấp oxy	Cố định thời gian cấp khí
Độ dài của quá trình thổi khí	Loại bỏ nhiệt và cấp oxy	Cấp khí theo khối lượng rác thải
Kết quả:		
– Oxy hoá	Cung cấp oxy	Cung cấp oxy
– Q _{quạt}	Lớn	Nhỏ
– Xu hướng làm khô	Nhiều	Ít
– Thời gian ủ	Ngắn	Dài
– Khả năng phân giải	Nhanh, mạnh	Chậm, yếu

**BẢNG 12.5. SO SÁNH CÂN BẰNG VẬT CHẤT
GIỮA 2 HỆ THỐNG Ủ CÓ KIỂM SOÁT**

Hệ thống kiểm soát	Thời gian ủ (ngày)	Khả năng phân giải			
		Chất rắn tổng số (%)	Mùn tổng số (%)	Mùn dễ tiêu (%)	Loại nước (%)
Triệt để	15,8	20,4	53,1	72,3	80,9
Không triệt để	21	4,3	11,3	15,4	19,4

Mối quan hệ giữa oxy và dioxit cacbon, giữa loại bỏ nhiệt và cung cấp oxy trong quá trình ủ rác rất quan trọng và khó tách riêng biệt được. Lượng không khí được tăng cường cung cấp cho bể ủ nhằm loại bỏ nhiệt hơn là cung cấp oxy. Trong thực tế, 1kg oxy dùng để oxy hoá hoàn toàn các chất hữu cơ thành CO_2 và nước thì thu được 14.000kJ. Trong khi không khí đầu vào là 20°C và 50% độ ẩm tương đối (RH), không khí đầu ra là 60°C và 100% độ ẩm tương đối. Qua tính toán cho thấy, phải mất 38,7kg không khí khô để loại bỏ nhiệt và chỉ có 4,31kg không khí dùng để cung cấp oxy với tỷ lệ 8,98. Rõ ràng phần lớn lượng không khí cần cho bể ủ để loại bỏ nhiệt của bể ủ để không ảnh hưởng đến khả năng phân giải của các loại vi sinh vật trong bể ủ. Chính quá trình cấp khí cũng giải quyết được mối tương quan giữa khả năng sinh nhiệt và nhiệt độ trong bể ủ. Mỗi tương quan này ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật, tạo điều kiện cho vi sinh vật ưa nhiệt hoạt động. Chính điều này chỉ rõ, nếu tuyển chọn được các chủng vi sinh vật vừa có hoạt tính phân giải mạnh, vừa có khả năng chịu được nhiệt độ cao sẽ tăng cường được quá trình phân giải chất thải, rút ngắn được thời gian xử lý và nâng cao chất lượng mùn hữu cơ tạo thành sau khi ủ. Điều đó càng cung cố những ý tưởng: Kiểm soát quá trình xử lý rác thải phải dựa trên cơ sở nồng độ oxy cung cấp thích hợp và quá trình ủ “càng nóng, càng tốt”.

Trong thực tế, có nhiều hạn chế trong các biện pháp xử lý rác thải bằng phương pháp ủ hiếu khí. Trong điều kiện xử lý bằng phương pháp này, nếu nhiệt độ lên cao quá hoặc chất ủ bị khô đều hạn chế khả năng phân giải chất ủ, làm quá trình xử lý chậm. Feinstein, 1985, đã tổng kết các biện pháp ủ cho thấy, nếu ủ rác thải trong điều kiện hiếu khí có điều khiển bằng cách thổi khí để giữ nhiệt độ bể ủ và có bổ sung nước tạo độ ẩm chất ủ thích hợp thì rút ngắn được thời gian xử lý, tỷ lệ mùn hữu cơ cũng như chất lượng mùn tạo thành cao.

Dựa trên kết quả phân tích các nguồn chất thải, thành phần và chất lượng của từng loại rác thải giàu hữu cơ, người ta đã lựa chọn các phương pháp xử lý bằng công nghệ vi sinh vật thích hợp theo 2 hệ thống xử lý:

a) Hệ thống lén men trong các thiết bị (Vessel composting units)

Dựa trên cơ sở của phương pháp ủ thành đống có thổi khí, người ta cho rác vào các bể hay các thùng có dung tích khác nhau, dưới các thùng hay bể có lắp đặt hệ thống thổi khí từ dưới lên. Đặc biệt là nhờ hệ thống này, có thể bổ sung vào bể ủ các vi sinh vật đã được tuyển chọn nhằm nâng cao hiệu suất phân giải và rút ngắn thời gian xử lý. Phương pháp này được sử dụng nhiều ở Nhật Bản, còn ở nước ta một số địa phương cũng đã sử dụng phương pháp này để sản xuất phân bón hữu cơ từ rác thải sinh hoạt.

b) Hệ thống xử lý rác công nghiệp (Commercial composting)

Cho đến nay đã có rất nhiều kiểu ủ rác công nghiệp khác nhau được triển khai trên thế giới (khoảng 50 kiểu). Đặc điểm chung của các kiểu ủ rác công nghiệp là tự động hóa rất cao, vì thế hiệu suất phân huỷ rác rất tốt. Tuy nhiên, việc cung cấp điện năng để vận hành toàn bộ hệ thống máy móc này rất tốn kém. Ở Việt Nam, năm 1979, được Đan Mạch viện trợ và lắp ráp một nhà máy xử lý rác rất hiện đại tại thành phố Hồ Chí Minh, nhưng do nhiều nguyên nhân, trong đó có việc cung cấp điện năng quá tốn kém, vì thế hiện nay nhà máy không hoạt động.

12.2.3. Đánh giá chất lượng mùn rác

Mùn rác sau khi xử lý bằng phương pháp ủ (composting) thường được phân loại trước khi sử dụng làm phân bón hữu cơ. Tuy nhiên trong rác thải, đặc biệt là rác thải sinh hoạt, có thể còn nhiều chất gây độc cho cây, hoặc quá trình ủ không tốt như không đảm bảo điều kiện xử lý: cấp khí không đủ, thành phần dinh dưỡng không cân đối,... làm cho chất lượng mùn không đảm bảo, ảnh hưởng xấu đến cây trồng. Do đó cần đánh giá chất lượng mùn rác để kiểm tra chất lượng quá trình ủ, chất lượng mùn rác (nhất là độ độc) trước khi cho phép sử dụng cho cây trồng.

a) Các tiêu chuẩn đánh giá

(1) Độ ẩm không vượt quá 14% (đánh giá bằng cân khối lượng khô tuyệt đối ở 105°C); (2) Hàm lượng mùn (humus) tạo thành (hoà mùn vào nước, lọc qua rây 1mm, xác định lượng chất hoà tan (bằng cân khối lượng khô tuyệt đối (105°C) của mẫu chưa qua trù đi mẫu qua rây); (3) Khả năng bền vững của cây: đánh giá năng sinh trưởng, phát triển của hạt mầm, của cây và biotest (các phép thử sinh học).

b) Các phương pháp đánh giá

– Thủ khả năng nảy mầm của hạt cài: Phương pháp này đánh giá khả năng chịu đựng của cây đối với mùn rác. Có thể chọn nhiều loại hạt khác nhau để thử nghiệm chọn nồng độ thích hợp để bón cho cây trồng. Cách làm: Mùn rác có kích thước không quá 5mm. Lấy 1,5g cài xoong gieo lên 127m^2 có 100% mùn rác; 30% mùn rác trộn với 70% đất trồng và 100% đất trồng. Thực nghiệm tiến hành trong 10 ngày, sau đó xác định khối lượng tươi và khối lượng khô của hạt mầm.

– Thủ khả năng nảy mầm và sự phát triển của rễ mầm của hạt lúa: Phương pháp này đơn giản hơn, cách làm như sau: Cân 100g chế phẩm hoặc mùn rác hoà vào 100ml nước cát, lắc trên máy lắc 24 giờ, lọc lấy nước và pha loãng vào nước cát theo các nồng độ: 10, 20,..., 100%. Ngâm 100 hạt lúa vào các nồng độ dịch chiết kéo dài 24 giờ, sau đó vớt ra ú trong tủ ấm 30°C . Xác định tỷ lệ hạt nảy mầm và đo độ dài của rễ mầm. So sánh với lô đối chứng bằng đất trồng chuẩn (đất phù sa).

– Xác định khả sinh trưởng, phát triển của cây mạ: Lô đối chứng sử dụng đất phù sa, còn các lô thí nghiệm bổ sung chế phẩm hoặc mùn rác theo nồng độ: 10%; 20%;..., 90%. Gieo 5 hạt lúa đã nảy mầm vào mỗi chậu và nuôi trong nhà lưới. Xác định chiều cao của cây mạ sau 14 ngày.

Phụ thuộc vào nguồn gốc, thành phần và tính chất của các loại rác thải mà lựa chọn các biện pháp xử lý phù hợp khác nhau để vừa bảo vệ môi trường, vừa không ảnh hưởng tới sức khoẻ cho con người và không ảnh hưởng tới động, thực vật. Đặc biệt đối với việc xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật, chất thải cần lựa chọn, phân loại sao cho phù hợp với khả năng sinh trưởng, phát triển của các loại vi sinh vật có trong bể ú.

Quá trình xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật là bắt chước các quá trình “tự làm sạch” trong tự nhiên, là quá trình lên men “tự sinh nhiệt”. Ngoài việc bảo đảm cân đối các nguồn dinh dưỡng, cần bảo đảm mối quan hệ tương tác giữa việc cung cấp O_2 , thải loại CO_2 với việc loại bỏ nhiệt và giữ độ ẩm môi trường thích hợp sẽ thúc đẩy nhanh quá trình phân giải của vi sinh vật, rút ngắn thời gian xử lý và thu được mùn có chất lượng và số lượng cao. Xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật với ý nghĩa “nhiệt độ càng cao, càng tốt” thì việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật ưa nhiệt có hoạt tính phân giải mạnh các chất hữu cơ có trong bể ú là hết sức quan trọng, vừa tăng cường khả năng phân giải, vừa rút ngắn thời gian xử lý và làm sạch chất thải sau khi ú. Trong các phương pháp xử lý rác thải bằng công nghệ vi sinh vật

thì biện pháp ủ hiếu khí có kiểm soát khống chế nhiệt độ và bổ sung nước tạo độ ẩm thích hợp (Rutgers) là tốt nhất.

12.3. XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH VẬT

12.3.1. Nước thải, phân loại nước thải và đặc tính của nước thải

Nước thải là gì: Nước đã qua sử dụng và được thải vào môi trường. Do vậy, có nhiều loại nước thải và mức độ ô nhiễm khác nhau. Có hiểu biết về phân loại và các tính chất đặc trưng của nước thải mới tìm cách xử lý tối ưu. Nước thải được mô tả bằng các tính chất thuỷ lý, thuỷ hoá và thuỷ sinh. Các tính chất đặc trưng nhất của nước thải được liệt kê ở bảng 12.6. Tuy vậy, nhiều tính chất có liên quan mật thiết đến nhau. Ví dụ: Nhiệt độ là một tính chất vật lý, có liên quan đến hoạt tính sinh học và nồng độ oxy hoà tan có trong nước thải.

Những chất gây ô nhiễm bẩn quan trọng liên quan đến xử lý nước thải được liệt kê ở bảng 12.7. Tiêu chuẩn nước thải sau khi xử lý bậc 2 phải loại bỏ được các chất hữu cơ phân huỷ bằng biện pháp sinh học, các chất huyền phù và các loại vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là các chất gây ô nhiễm chính. Nước thải được tái sử dụng, nhất thiết phải loại bỏ các chất hữu cơ khó phân huỷ bằng biện pháp sinh học, các kim loại nặng và các chất vô cơ hoà tan.

12.3.2. Các phương pháp phân tích đánh giá chất lượng nước thải

Phương pháp thử nghiệm để đánh giá tính chất của nước thải dựa vào các tính chất chính sau đây: (1) Khả năng phân huỷ của các chất trong nước thải; (2) Tác động sinh học lên các thuỷ sinh vật (độc tính của nước thải); (3) Tích tụ sinh học của các chất trong nước thải trong các sản phẩm sinh học; và (4) Phân tích hoá học các thành phần của chất thải gây hại môi trường.

a) Phương pháp lấy mẫu và xử lý các mẫu nước thải

Phụ thuộc vào từng loại nhà máy và các quy trình sản xuất mà chọn các thiết bị và thời gian thích hợp để lấy mẫu, đảm bảo tính chất đặc trưng nhất của nước thải, các cơ sở sản xuất.

Đối với các cơ sở sản xuất, các sản phẩm đơn giản và đồng nhất, BOD_5 và COD cũng như một số loại khác như thành phần kim loại, nồng độ dầu,... thấp thì thời gian lấy mẫu vào lúc 5 và 24 giờ trong một ngày, kéo dài khoảng 1 tuần, sau đó trộn các mẫu trong ngày lại với nhau để phân tích. Trong thử nghiệm, cần quan tâm đến độc tính của nước thải.

BẢNG 12.6. ĐẶC TRƯNG CỦA NƯỚC THẢI VÀ NGUỒN NƯỚC THẢI

Tính chất đặc trưng	Nguồn nước
1. Tính chất vật lý	<ul style="list-style-type: none"> – Màu sắc – Mùi – Chất rắn – Nhiệt độ
	<ul style="list-style-type: none"> – Chất thải sinh hoạt và công nghiệp, sự thối rữa của các vật liệu hữu cơ trong tự nhiên. – Nước ủ rác thải, chất thải công nghiệp. – Nước cấp sinh hoạt, nước thải sinh hoạt và công nghiệp, sự trôi rửa đất, nước chảy thẳng vào hay sự thẩm qua. – Chất thải sinh hoạt và công nghiệp.
2. Thành phần hóa học	
* Các chất hữu cơ:	
– Hydrat cacbon	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Chất béo, dầu và dầu mỡ	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Thuốc trừ sâu	– Chất thải nông nghiệp.
– Phenol	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Protein	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Chất gây ô nhiễm nặng	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Các chất tạo bọt	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Các hợp chất khác	– Nước thải có sự thối rữa của các chất hữu cơ có trong tự nhiên.
* Các chất vô cơ:	
– Chất kiềm tính	– Chất thải sinh hoạt, cấp nước sinh hoạt và nước ngầm.
– Clorit	– Chất thải sinh hoạt, cấp nước sinh hoạt và nước ngầm.
– Kim loại nặng	– Chất thải công nghiệp.
– Nitơ	– Chất thải sinh hoạt và nông nghiệp.
– pH	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Photpho	– Chất thải sinh hoạt và chất lỏng trong tự nhiên.
– Các chất gây ô nhiễm nặng	– Nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
– Lưu huỳnh	– Cấp nước, nước thải sinh hoạt, thương nghiệp và công nghiệp.
* Các chất khí:	
– Hydro sunphit	– Ủ rác thải sinh hoạt.
– Metan (CH_3)	– Ủ rác thải sinh hoạt.
– Oxy	– Cấp nước sinh hoạt và nước bề mặt.
3. Thành phần sinh học	
– Động vật thuỷ sinh	– Nguồn nước hồ và nhà máy xử lý nước.
– Thực vật thuỷ sinh	– Nguồn nước hồ và nhà máy xử lý nước.
– Vi sinh vật trong nước:	
+ Ví khuẩn	– Chất thải sinh hoạt, nước mặt và nhà máy xử lý nước.
+ Cỏ khuẩn	– Chất thải sinh hoạt, nước mặt và nhà máy xử lý nước.
+ Virut	– Chất thải sinh hoạt.

BẢNG 12.7. CÁC CHẤT GÂY Ô NHIỄM QUAN TRỌNG CÓ LIÊN QUAN ĐẾN VIỆC XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Chất gây ô nhiễm	Lý do quan trọng
* Các chất huyền phù	* Các chất huyền phù cần tăng cường loại bỏ bùn và xử lý bằng lén men ky khí trước khi đổ vào môi trường sống của động, thực vật.
* Chất hữu cơ bị phân huỷ sinh học	* Bao gồm các loại protein, cacbonhydrat và mỡ – các chất phân huỷ sinh học được đo bằng BOD và COD. Nếu chúng thải ra môi trường sẽ dẫn đến việc làm cạn kiệt nguồn oxy và làm tăng khả năng nhiễm trùng.
* Vi trùng gây bệnh	* Lây lan bệnh cho cộng đồng.
* Các chất dinh dưỡng	* Các chất N, P và C là nguồn dinh dưỡng có giá trị, nếu thải ra môi trường với số lượng lớn sẽ gây ô nhiễm cho nguồn nước.
* Các chất gây ô nhiễm chính	* Các hợp chất hữu cơ và vô cơ có độc tính như chất gây ung thư,... tìm thấy trong nước thải.
* Các chất hữu cơ khó hòa tan	* Các chất này thường bền vững với phương pháp xử lý nước: như các chất hoạt hoá bề mặt, phenol và thuốc trừ sâu,...
* Các kim loại nặng	* Chúng thường nhiễm vào nguồn nước từ sản xuất thương mại và công nghiệp, cần phải loại bỏ nếu như nước thải tái sử dụng.
* Các chất vô cơ hòa tan	* Các chất này như canxi, natri, sunphat thường có trong nước cấp sinh hoạt và cũng cần loại bỏ nếu nước tái sử dụng.

Trong quá trình lấy mẫu nước thải cần chú ý các điểm sau: (1) Lấy mẫu bảo đảm mẫu đó là mẫu tiêu biểu cho cơ sở sản xuất; (2) Điểm lấy mẫu phải khuấy trộn tốt trước khi lấy; (3) Bình đựng mẫu phải có nắp đậy và làm lạnh hoặc giữ trong tủ lạnh; (4) Cần loại bỏ các tiểu phần lớn hơn $200\mu\text{m}$ trước khi trộn mẫu; (5) Dung tích bình đựng mẫu phải đủ trộn các mẫu lấy lại trước khi phân chia vào bình mẫu. Lượng nước thải cần lấy ít nhất là 1 lít cho một lần thử; (6) Mẫu nước thải cần bảo quản trong lạnh (-2°C), tránh ánh sáng và giữ không quá 1 tuần; (7) Vận chuyển các mẫu lấy được đến nơi phân tích càng nhanh càng tốt và được bảo quản trong lạnh suốt quá trình vận chuyển.

b) Các chỉ tiêu đánh giá chất lượng nước thải

Trong công nghệ sinh học xử lý nước thải, nhiều danh pháp sử dụng cần được định nghĩa cho rõ ràng, những danh pháp quan trọng nhất như sau: (1) COD – Nhu cầu oxy hoá học (Chemical oxygen demand); (2) TOC – Cacbon hữu cơ tổng số (Total organic carbon); (3) BOD – Nhu cầu oxy sinh hoá và bCOD – một phần phân huỷ sinh học của COD; (4) NOD – Nhu cầu oxy nitrat hoá; (5) Chất khô (DM) và chất rắn tổng số (TS); (6) Chất rắn huyền phù (SS); (7) Chất rắn huyền phù bay hơi (VSS); (8) Khối lượng khô

sau nung (AFDW); (9) Sinh khối vi sinh vật trong nồi phản ứng (MLSS) và (10) Chỉ số bùn (SVI).

Trong xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học, người ta quan tâm đến hiệu số giữa COD và BOD, nếu hàm lượng chất hữu cơ phân giải bằng biện pháp sinh học thì mới tiến hành xử lý bằng biện pháp này và theo dõi quá trình xử lý. Trong quá trình xử lý, việc đánh giá sinh khối vi sinh vật trong bể xử lý và chỉ số bùn rất được quan tâm, vì đó là chỉ tiêu đánh giá hiệu suất xử lý và khả năng thải loại bùn khỏi nước.

12.3.3. Nguồn nước, lưu lượng và thành phần của nước thải

Lưu lượng nước thải phụ thuộc vào từng nguồn nước và theo thời gian trong ngày, trong tháng và trong năm. Bởi vậy, muốn đánh giá lưu lượng từng nguồn nước, cần lấy mẫu và đánh giá trong một thời gian dài thì mới chính xác. Tuy vậy ngày nay, người ta đánh giá lưu lượng nguồn nước thải dựa trên lưu lượng nguồn nước cấp.

a) Nước thải sinh hoạt

Nguồn nước thải sinh hoạt trong cộng đồng là nguồn nước thải các khu vực dân cư, vùng thương mại, khu vực cơ quan bệnh viện và khu vui chơi, giải trí. Các số liệu về lưu lượng nước thải được đo trực tiếp. Tuy vậy, từng khu vực dân cư, việc xác định lưu lượng trực tiếp rất khó khăn và không chính xác, cho nên người ta xác định lượng nước thải bằng cách đo lượng nước tiêu thụ. Lưu lượng nước thải của hệ thống nhỏ (dưới 1.000 dân) thường khác nhiều so với lưu lượng của hệ thống lớn. Người ta chia nước thải sinh hoạt thành các nguồn nước sau đây:

– *Khu vực dân cư*: Lưu lượng nước thải khu vực dân cư thường xác định bằng mật độ dân cư. Lượng nước tiêu thụ trong khu vực dân cư khoảng 25 – 180 lít/ngày/người, trung bình 40 – 100 lít/ngày/người. Tuy vậy, đối với khu vực dân cư lớn thì lưu lượng nước thải được xác định dựa trên vùng đất sử dụng và mật độ dân cư.

– *Vùng thương mại*: Lưu lượng nước thải vùng thương mại thường thể hiện bằng m^3 /ngày và dựa trên các số liệu về nước cấp đầu vào để so sánh. Lưu lượng trung bình của khu vực này thường từ 7,5–14 $m^3/ha/ngày$. Vùng này bao gồm sân bay, bến tàu, nhà hàng khách sạn, trụ sở của các ngành công nghiệp và các trung tâm thương nghiệp của khu vực.

– *Khu vực cơ quan*: Lưu lượng nước thải của các khu vực bệnh viện, trường học, nhà tù, nhà nghỉ, nhà ăn,....

– *Khu vực vui chơi giải trí*: Khu vực này bao gồm các quán cà phê, các câu lạc bộ, bể bơi,... Lưu lượng của chúng thường thay đổi theo mùa trong năm.

b) *Nước thải công nghiệp*

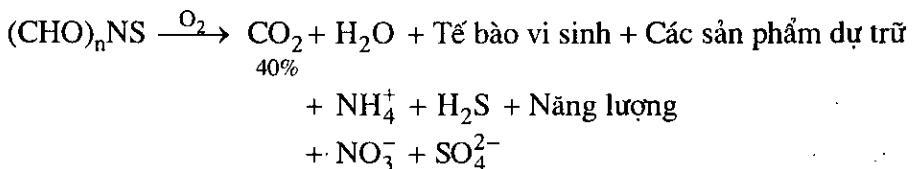
Nguồn nước thải công nghiệp bao gồm các cơ sở công nghiệp nặng, công nghiệp thực phẩm,... Tuy vậy, lưu lượng nước thải khu vực này phụ thuộc vào loại nhà máy, xí nghiệp, độ lớn của trang thiết bị, mức độ tái sử dụng nước và các phương pháp xử lý nước thải. Lưu lượng nước thải nhà máy công nghiệp nặng thường từ 9 đến 14 m³/ha/ngày, công nghiệp nhẹ: 14 – 28m³/ha/ngày. 95% nước đã sử dụng trong các phân xưởng hoặc các quy trình công nghệ khác nhau đều trở thành nước thải.

12.3.4. Các biện pháp xử lý nước thải

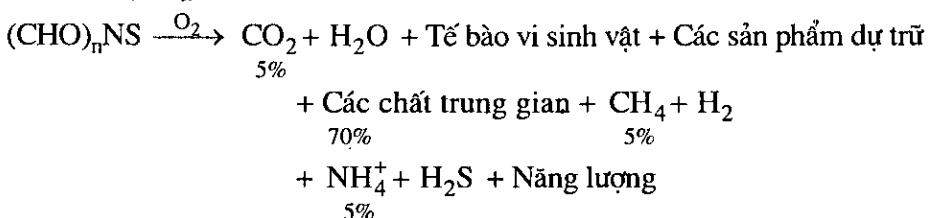
Nguyên tắc xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học là dựa chính vào sự hoạt động sống của vi sinh vật có khả năng phân giải các chất hữu cơ hoặc vô cơ làm nguồn năng lượng và nguồn cacbon để thực hiện quá trình sinh trưởng, phát triển của chúng. Cả 2 nhóm vi sinh vật: tự dưỡng và dị dưỡng cùng được sử dụng để xử lý nước thải. Tuy vậy, trong nhóm vi sinh vật dị dưỡng có 3 nhóm nhỏ: hiếu khí, ký khí và ký khí không bắt buộc cùng tham gia vào quá trình phân huỷ các chất. Nhóm hiếu khí cần oxy hòa tan để phân huỷ các chất hữu cơ, ngược lại nhóm ký khí có khả năng oxy hoá các chất hữu cơ trong điều kiện không cần oxy tự do. Chúng có thể sử dụng năng lượng có trong các hợp chất như nitrat, sunphat. Còn nhóm ký khí không bắt buộc có thể phát triển trong điều kiện có và không có oxy hòa tan.

Sơ đồ trao đổi chất hữu cơ nhờ các vi sinh vật hiếu khí và ký khí theo phương trình sau:

* Điều kiện hiếu khí :



* Điều kiện ký khí:



Mục đích làm sạch nước thải là tách các hợp chất hữu cơ và vô cơ để nồng độ của chúng không vượt quá mức cho phép. Phụ thuộc vào tính chất nhiễm bẩn và nồng độ của chúng có thể sử dụng các biện pháp làm sạch nước thải khác nhau. Nhưng phổ biến nhất là phương pháp cơ học (lắng, lọc), cơ lý (kết lắng, trung hoà, để lắng), lý hoá (trao đổi ion, hấp phụ), trao đổi nhiệt và sinh hoá học. Mỗi phương pháp có các ưu và nhược điểm riêng, tùy phạm vi ứng dụng mà có thể sử dụng một vài phương pháp sẽ cho phép loại bỏ hoàn toàn được các chất nhiễm bẩn.

Biện pháp sinh học làm sạch nước thải là quá trình công nghệ được sử dụng rộng rãi nhất trong nhiều lĩnh vực công nghiệp có lượng lớn nước nhiễm bẩn song với nồng độ các chất thấp. Làm sạch nước thải bằng biện pháp sinh học là dùng các loại vi sinh vật sử dụng các chất dinh dưỡng có trong nước thải làm nguồn năng lượng. Chúng phân huỷ các chất thành CO_2 , nước, muối khoáng và một số chất thành NO_3 và NO_2 .

Biện pháp sinh học làm sạch nước thải có các ưu điểm sau: (1) Có thể xử lý nước thải có phổ nhiễm bẩn các chất hữu cơ rộng, (2) Hệ thống có thể tự điều chỉnh phổ và nồng độ các chất nhiễm bẩn, (3) Thiết kế các trang thiết bị đơn giản và (4) Chi phí cho phần thực nghiệm không cao. Nhưng có các nhược điểm sau: (1) Đầu tư cơ bản cho việc xây dựng các thiết bị của hệ thống làm sạch cao, (2) Phải có chế độ công nghệ làm sạch hoàn chỉnh, (3) Một vài chất hữu cơ có độc tính ảnh hưởng đến quần thể vi sinh vật trong bùn hoạt tính làm giảm hiệu suất làm sạch và (4) Cần làm loãng các nguồn nước có nồng độ các chất hữu cơ cao, do vậy làm tăng lượng nước thải.

Tuy còn có nhược điểm song phương pháp làm sạch bằng biện pháp sinh học vẫn là phương pháp phổ biến và được áp dụng rộng rãi nhất. Phụ thuộc vào điều kiện sống của vi sinh vật – hiếu khí và kỵ khí – người ta chia các phương pháp xử lý nước thải bằng các biện pháp sinh học theo 2 nguyên tắc này.

Có 2 nhóm lớn mà quá trình làm sạch nước thải bằng biện pháp sinh học là tự nhiên và tăng cường. Phương pháp tự nhiên là phương pháp không có sự điều chỉnh điều kiện nuôi cấy vi sinh vật – tự xử lý ở ngoài đồng ruộng, lọc qua đồng cỏ và tự làm sạch trong các ao hồ sinh học. Vi sinh vật nằm trên lớp mặt của đất, của nước sẽ tạo thành quần lạc sinh vật mà quá trình hoạt động sống của chúng sẽ làm sạch nước.

Biện pháp tăng cường là hoạt động của vi sinh vật trong bùn hoạt tính hoặc màng sinh học. Sự hình thành quần lạc sinh vật là quá trình hoạt động

làm sạch nước thải trong các thiết bị xử lý nước thải. Đó là các loại bể sục khí (aerotank) và bể lọc sinh học (biofilter), hoặc các nồi phản ứng lên men khí metan.

12.3.5. Vai trò của vi sinh vật trong quá trình làm sạch nước thải

Bùn hoạt tính bao gồm các búi nhỏ màu nâu thẫm có kích thước từ vài chục đến vài trăm micromet (μm). Khi quan sát dưới kính hiển vi thì nhận thấy nó bao gồm 70% là cơ thể sinh vật sống và khoảng 30% là các chất có bản chất vô cơ. Cơ thể sinh vật sống cùng với các chất mang quên lại với nhau tạo thành dạng keo tụ – một quần lạc sinh vật bao bọc bởi một màng nhày xung quanh.

Tỷ lệ giữa các tế bào có màng nhày (capsul) và tế bào không có màng nhày trong bùn hoạt tính được biểu thị bằng hệ số kz.

Theo Bukov et al., 1987 thì trong bùn hoạt tính có thấy nhiều chi vi sinh vật khác nhau: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Desulfotoma-cillum*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*,... Trong đó, số lượng nhiều nhất là các loài thuộc chi *Pseudomonas*. Chúng oxy hoá rượu, axit béo, parafin, hydrocacbon nhân thơm và các hợp chất khác. Một nhóm khác cũng tiêu biểu trong bùn hoạt tính là chi *Bacterium* (trên 30 loài). Chúng thực hiện quá trình phân huỷ dầu, parafin, naften, phenol, anhydrit và các axit béo. Các loài của chi *Bacillus* có thể oxy hoá các hydratcacbon mạch thẳng. Khả năng oxy hoá các chất hữu cơ khác nhau cũng khác nhau và với vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas* trong thực tế oxy hoá các chất mạnh hơn các chi khác trong điều kiện hiếu khí (bảng 12.8).

Khả năng phân huỷ các hợp chất hữu cơ khác nhau của các nhóm vi sinh vật khác nhau còn phụ thuộc vào từng biện pháp xử lý nước thải:

a) Xử lý bằng bùn hoạt tính hiếu khí

Một số chi vi khuẩn thường thấy trong bùn hoạt tính của phương pháp xử lý nước thải bằng phương pháp sục khí (bảng 12.9). Tuy vậy, việc nhận biết chức năng của các chi này trong nước thải còn nhiều hạn chế. Các loài nấm mốc và nấm men cũng thường có mặt trong bùn hoạt tính song chưa rõ loại nào chiếm ưu thế và thường xuất hiện trong điều kiện có lượng đường hoặc các chất hữu cơ cao.

BẢNG 12.8. TỐC ĐỘ OXY HOÁ CÁC CHẤT HỮU CƠ CỦA CÁC NHÓM VI SINH VẬT (mg/g CHẤT/giờ)

Nhóm vi sinh vật	Hợp chất có trong nước		
	Kiem	Rượu	Axit béo
<i>Pseudomonas</i>	12–22	16–20	20–30
<i>Bacillus</i>	8–16	10–16	11–20
<i>Bacterium</i>	10–16	12–18	16–30

BẢNG 12.9. CÁC CHI VI KHUẨN THƯỜNG THỰC HIỆN CÁC CHỨC NĂNG TRONG BÙN HOẠT TÍNH

Các chi vi khuẩn	Chức năng trong bùn hoạt tính
<i>Pseudomonas</i>	Loại cacbonhydrat và phản nitrat hoá
<i>Arthrobacter</i>	Loại cacbonhydrat
<i>Bacillus</i>	Phân huỷ protein
<i>Cytophaga</i>	Phân huỷ các chất polyme
<i>Zoogloea</i>	Hình thành các chất keo tụ
<i>Acinetobacter</i>	Tích lũy polyphosphat
<i>Nitrosomonas</i>	Nitrat hoá
<i>Nitrobacter</i>	Nitrat hoá
<i>Sphaerotilus</i>	Phát triển nhung mao

Quá trình nitrat hoá thường gặp các loài của 2 chi *Nitrosomonas* và *Nitrobacter* oxy hoá amoni thành nitrit hoặc oxy hoá tiếp đến nitrat:



Nhưng quá trình phản nitrat hoá $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ có nhiều loại vi sinh vật tham gia: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Hyphomicrobium* và *Thiobacillus*.

Photphat hoà tan thải ra trong nước thải là nguồn dinh dưỡng cho cây trồng rất có giá trị. Tuy nhiên, photphat có thể loại khỏi nước thải bằng cách kết lăng với các ion kim loại như Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} hoặc kết hợp với các loại ion này. Đóng vai trò làm tích tụ photpho là vi khuẩn thuộc chi *Acinetobacter*. Là vi khuẩn hiếu khí, Gram âm và hình que ngắn ($1,5 \times 2-3 \mu\text{m}$) và photpho được tích luỹ ở dạng poly-P.

b) Xử lý nước thải bằng màng lọc sinh học

Tuỳ thuộc vào từng loại màng lọc sinh học các hệ vi sinh vật trong quá trình xử lý nước thải có sự phân bố khác nhau trong hệ thống.

c) Xử lý kỵ khí

Phụ thuộc vào điều kiện môi trường bên trong và bên ngoài nước thải, các nhóm vi sinh vật có thể tồn tại trong bùn hoạt tính khác nhau, chúng biểu thị khả năng thích ứng trên các nguồn cơ chất sẵn có trong nước thải, cũng như khả năng thích ứng với điều kiện sống mới.

Thay đổi thành phần môi trường nước thải có thể làm tăng hay giảm số lượng từng loài khác nhau bởi chúng cùng cạnh tranh vì nguồn cơ chất mà tất cả đều nằm trong cùng một quần lạc (biosenose). Ảnh hưởng lên mối tương tác giữa các vi sinh vật và các sản phẩm sinh tổng hợp của các nhóm khác nhau có thể không thể sống cộng sinh mà sống đối kháng và theo nguyên tắc *amencalizma*, *komensalizma* và *netralizma*. Sự hình thành quần lạc vi sinh vật trong bùn hoạt tính còn phụ thuộc vào sự dao động của nhiệt độ theo mùa, khả năng cung cấp oxy và các thành phần muối khoáng có trong nước thải. Vai trò của các thông số này đối với việc hình thành bùn hoạt tính là một quá trình phức tạp để nhận một quần lạc phù hợp nhất của một loại bùn hoạt tính.

Một yếu tố quan trọng trong quá trình làm sạch nước là sự có mặt của các Protozoa (động vật nguyên sinh) có trong bùn hoạt tính. Chức năng của các protozoa rất khác nhau: Không những chúng tham gia vào việc sử dụng các chất hữu cơ mà còn điều chỉnh thành phần loài và tuổi của vi sinh vật trong bùn hoạt tính giữ chúng luôn ở mức tối ưu. Hấp thụ phần lớn các vi sinh vật, các loại protozoa có khả năng kích thích một lượng lớn các loại enzym ngoại bào của vi sinh vật, mà chúng được làm đậm đặc trong màng nhày và tích cực tham gia vào việc phân huỷ các chất nhiễm bẩn. Trong bùn hoạt tính thường gặp đại diện của 4 lớp Protozoa: *Sarcodina*, *Mastgophora*, *Ciliata* và *Suctoria*, nhưng thường gặp nhất trong bùn hoạt tính là giống *Amoeba* thuộc lớp *Sarcodina*.

Trong bùn hoạt tính chất lượng cao thì cứ 1 triệu tế bào vi khuẩn có 10–15 protozoa. Tỷ lệ này được gọi là hệ số Protozoa, ký hiệu là kp. Sự có mặt của các loài động vật nguyên sinh không những tăng cường quá trình làm sạch nước thải giàu các hợp chất hữu cơ và kết lỏng bùn mà còn tăng cường loại bỏ các loại vi sinh vật gây bệnh.

Tốc độ oxy hoá các chất bằng biện pháp sinh học tăng khi các hệ số kz và kp tăng, dẫn đến khả năng kết lăng của bùn cũng tăng và làm tăng hiệu suất làm sạch nước thải.

Tuy vậy, Protozoa rất mẫn cảm với sự có mặt của các chất độc, tuy nồng độ có trong nước thải thấp như phenol và formaldehit nhưng úc chế sự phát triển của chúng.

Trong màng lọc sinh học của bể xử lý lọc sinh học sau một thời gian xử lý cũng xuất hiện quần lạc vi sinh vật. Trên bề mặt chất nhiễm bẩn của màng lọc sinh học sẽ tạo thành màng sinh học: Vi sinh vật đính vào các chất mang và phủ kín mặt màng lọc. Khác với quần lạc của bùn hoạt tính, thành phần và số lượng các loài là tương đối đồng nhất cho tất cả các hệ thống làm sạch. Mỗi một cấp độ khác nhau của màng lọc có một quần lạc vi sinh vật cho riêng mình, sự khác nhau không chỉ là số lượng mà cả chất lượng. Bằng lưu lượng nước thải qua màng lọc sinh học do hoạt động sống của quần lạc chiếm ưu thế sẽ thay đổi theo đặc tính nhiễm bẩn hữu cơ trong nước, sau đó sẽ đưa ra cấp thấp hơn. Trong tự nhiên, chất nhiễm bẩn dễ sử dụng hơn thì ưu thế của từng loại vi sinh vật phát triển mạnh hơn có thể sử dụng các hợp chất đó với tốc độ nhanh hơn. Tiếp tục nước thải đi qua các phần khác có các chất khó sử dụng hơn thì các loại quần lạc khác lại phát triển và sử dụng chúng. Phần dưới cùng của các lớp quần lạc là lớp chứa cơ thể của nguyên sinh động vật và các cơ thể khác thực hiện nhu cầu sử dụng một phần màng sinh học tạo thành các lỗ nhỏ trên bề mặt chất mang. Với quần lạc sinh học như vậy có thể loại bỏ tất cả các hợp chất hữu cơ khỏi nước thải.

Sự hình thành quần lạc sinh học của thiết bị làm sạch nước thì thời gian của quá trình làm sạch phụ thuộc vào độ dài của dòng chảy. Chế độ thiết bị làm sạch nước thải hỏ, thành phần quần lạc trong môi trường nước không thay đổi. Vi sinh vật trong đất, nước và không khí rơi vào thiết bị sẽ cạnh tranh sử dụng cơ chất giữa chúng. Trước hết, trong hệ thống làm sạch tích tụ các vi sinh vật phân huỷ các hợp chất hữu cơ săn có một vài hợp chất với tốc độ lớn và dẫn đến nồng độ thấp hơn. Vị trí đặc biệt ở đó là các nhóm vi sinh vật tạo thành các quần thể đồng thời liên kết tạo thành màng bao bọc chúng. Quá trình thích nghi của bùn hoạt tính dần dần xuất hiện các dạng vi sinh vật mới có khả năng phân huỷ các chất nhiễm bẩn mà chúng đã làm quen.

Trong trường hợp, khi trong nước thải có nhiều các thành phần hữu cơ, lúc đầu bùn hoạt tính có thể hình thành trong điều kiện phòng thí nghiệm và

khi đó chỉ xuất hiện quần lạc vi sinh vật bao gồm một số lượng nhỏ các loài riêng rẽ không bền vững với điều kiện tự nhiên nhưng chúng tạo tiền đề cho khâu khởi đầu trong chuỗi mắt xích tạo thành quần lạc sinh học tự nhiên để làm sạch nước thải.

Trong công nghệ xử lý nước thải, để tạo thành các quần lạc sinh vật của hệ thống làm sạch có thể sử dụng bùn hoạt tính của thiết bị làm sạch đang làm việc có cùng phổ nhiễm bẩn. Nếu không có các hệ thống đang làm sạch muốn hình thành bùn hoạt tính có thể sử dụng nước thải từ các đơn vị sản xuất hoặc nước sông có hệ vi sinh vật tự nhiên làm nguồn ban đầu bằng cách làm tăng nồng độ nhiễm bẩn chính lên và tạo bùn hoạt tính bằng phương pháp làm giàu.

Cũng cần chú ý, nhiều hợp chất hoá học có thể có tác dụng gây độc đối vi sinh vật của bùn hoạt tính, phá huỷ hoạt động sống của chúng. Với nồng độ cao các chất như phenol, formaldehit và các chất sát trùng có trong nước thải sẽ phân huỷ protein của chất nguyên sinh dẫn đến phân huỷ thành tế bào. Đặc biệt là các kim loại nặng cũng có thể phá huỷ tế bào theo thứ tự các nguyên tố có độ độc như sau: $Sb > Ag > Cu > Hg > Co > Ni > Pb > Cr > Cd > Zn > Fe$.

Tác động làm giảm khả năng phát triển của bùn hoạt tính nếu tăng nồng độ các loại muối vô cơ trong nước thải. Ví dụ, nồng độ chlorit tăng đến 30g/l làm giảm chất lượng làm sạch nước thải.

12.3.6. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình làm sạch nước thải

Điều chỉnh hiệu suất của quá trình làm sạch nước thải bằng biện pháp sinh học là điều kiện nuôi cấy vi sinh vật cần được duy trì ở mức tối ưu cho từng môi trường xử lý nước thải. Các thông số cần quan tâm nhất là: Nhiệt độ, pH, nồng độ oxy hòa tan, mức độ khuấy trộn, nồng độ và tuổi của bùn hoạt tính quay vòng trong hệ thống và các hợp chất gây ngộ độc cho vi sinh vật có trong nước.

a) Nhiệt độ

Phần lớn các thiết bị làm sạch nước thải dạng hiếu khí làm việc trong điều kiện hở và khó có thể điều chỉnh được nhiệt độ. Nhiệt độ có thể thay đổi rất lớn phụ thuộc vào thời gian trong năm và điều kiện khí hậu do vậy nhiệt độ có thể dao động từ 2–5 cho tới 25–35°C. Sự dao động này trước hết ảnh hưởng đến thành phần quần thể sinh vật – giảm nhiệt độ xuống dưới

10 – 15°C thì vi sinh vật ưa lạnh phát triển mạnh sẽ giảm số lượng tổng số vi sinh vật và sinh vật khác. Tốc độ quá trình làm sạch sẽ giảm xuống 2 lần nếu nhiệt độ giảm từ 20°C xuống 6°C. Do vậy trong thời kỳ mùa đông có thể tăng hàm lượng bùn hoạt tính trong hệ thống sẽ duy trì khả năng phân giải của quần thể sinh vật.

Thay đổi nhiệt độ từ 29°C lên 37°C, tốc độ làm sạch có thể tăng lên 2–3 lần. Trong quần thể sinh vật của hệ thống chủ yếu là các loại vi sinh vật ưa ấm và ưa nhiệt phát triển, nó thúc đẩy nhanh quá trình làm sạch. Nếu tăng nhiệt độ thì không những làm tăng quá trình làm sạch mà còn làm giảm khả năng hoà tan oxy trong nước, cho nên phải tăng cường thổi khí.

b) pH

Phần lớn các loại vi khuẩn phát triển tốt trong môi trường trung tính hoặc kiềm nhẹ, còn phần lớn nấm mốc và nấm men pH tối ưu là 5,0 – 6,5. Trong môi trường kiềm, vi khuẩn không phát triển. Do vậy, cần điều chỉnh pH môi trường nước thải sao cho tương đối phù hợp cho các loại vi sinh vật phát triển được. Thay đổi pH trong môi trường nước thải trong phạm vi từ 5,5 – 8,5, nếu tăng hoặc giảm pH thì hiệu suất làm sạch của thiết bị giảm. Nhìn chung, trong quá trình xử lý nước thải, không điều chỉnh pH vì vi sinh vật có khả năng tự điều chỉnh.

c) Nồng độ oxy hoà tan

Tốc độ hoà tan oxy trong nước thải không nhất thiết phụ thuộc vào tốc độ sử dụng oxy của vi sinh vật có trong bùn hoạt tính. Điều kiện sử dụng oxy cũng như các cơ chất khác được xem là ảnh hưởng nồng độ của oxy lên tốc độ phát triển của vi sinh vật được mô tả theo phương trình tương tự của Monod. Giảm nồng độ oxy hoà tan sẽ giảm tốc độ phát triển của bùn hoạt tính dẫn đến làm giảm tốc độ làm sạch. Qua các nghiên cứu cho thấy, nếu nồng độ oxy hoà tan giảm đến 1mg/l không nhận thấy sự thay đổi tốc độ làm sạch, còn giảm đến 0,5mg/l quá trình làm sạch gần như đình trệ. Do vậy, nên giữ nồng độ oxy hoà tan nằm trong khoảng 1–5mg/l.

Giảm nồng độ oxy hoà tan trong nước không chỉ gây cản trở cho việc tiêu thụ các chất nhiễm bẩn hữu cơ mà tăng các sản phẩm của quá trình hoạt động của vi sinh vật trong nước thải. Đồng thời trong bùn hoạt tính phát triển loài vi khuẩn có lông *Sphaerotilus nataus* làm tan bùn, dẫn đến làm giảm lượng bùn chung và làm mất chức năng của thiết bị làm sạch.

d) Khuấy trộn nước thải và bùn hoạt tính trong bể sục (aerotank)

Quá trình này nhằm giữ cho bùn hoạt tính luôn ở trạng thái chuyển động tạo điều kiện thuận lợi cho vận chuyển các chất dinh dưỡng và oxy. Tăng cường khuấy sẽ đánh tan các cụm bùn hoạt tính lớn cho nhỏ ra với mục đích làm tăng bề mặt tiếp xúc của vi sinh vật với môi trường. Tuy vậy, nếu kích thước các búi bùn nhỏ quá sẽ ảnh hưởng đến tốc độ lắng của bùn sau này, số lượng tế bào vi sinh vật và nguyên sinh động vật tự do sẽ giảm.

e) Các nguyên tố dinh dưỡng

Ngoài cacbon, vi sinh vật còn cần nitơ và photpho làm vật liệu để xây dựng lên tế bào và giữ vai trò quan trọng trong trao đổi năng lượng trong tế bào. Nếu thiếu nitơ và photpho sẽ làm giảm hiệu suất quá trình làm sạch. Lượng nitơ và photpho cần thiết cho vi sinh vật được xác định bằng các hợp chất hữu cơ có trong nước thải có thể tính toán trên cơ sở lý thuyết (x. 12.1).

Nguồn nguyên tố dinh dưỡng có thể lấy từ nước thải, từ nguồn phân chuồng hay bể phốt có chứa lượng lớn nitơ và photpho, nhưng nhìn chung chúng có thể là chất ức chế cho sự phát triển của bùn hoạt tính.

f) Liều lượng và tuổi của bùn hoạt tính

Hiệu suất làm sạch nước thải không chỉ phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy vi sinh vật mà còn phụ thuộc vào nồng độ nước thải và tuổi của bùn hoạt tính. Trong thiết bị làm sạch nước thải kiểu aerotank thì nồng độ bùn hoạt tính không cao hơn 2–4 g/l. Nhưng nếu tăng nồng độ bùn hoạt tính lên, tốc độ làm sạch sẽ tăng lên song lượng oxy hòa tan sẽ bị hạn chế. Tuy vậy, hiệu suất xử lý còn phụ thuộc vào tuổi của bùn hoạt tính (tuổi của vi sinh vật trong bùn hoạt tính). Tuổi của bùn hoạt tính (T) phụ thuộc vào thời gian quay vòng của bùn và được xác định bằng công thức sau:

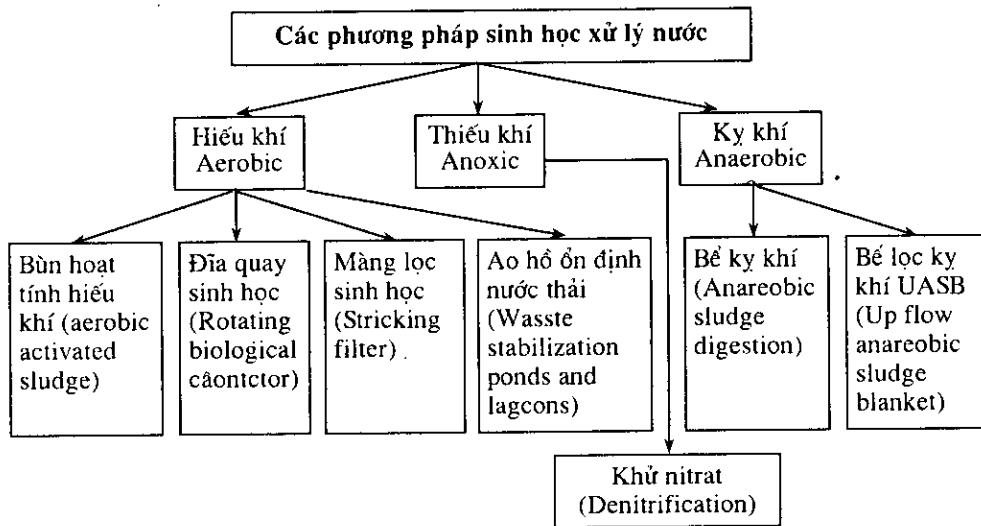
$$T = \frac{V_o \cdot X_{cp}}{Q_{cl} \cdot W_n}$$

Trong đó: V_o – Thể tích của bể sục, m³; X_{cp} – Nồng độ bùn hoạt tính trung bình, kg/m³; Q_{cl} – Lượng nước thải đã xử lý, m³/h; W_n – Tốc độ phát triển của bùn hoạt tính, kg/m³/h.

Nếu giảm tuổi trung bình của bùn hoạt tính trong hệ thống xử lý sẽ làm tăng hiệu suất xử lý: Bùn hoạt tính "trẻ" sẽ xốp hơn, có kích thước bé hơn và lượng động vật nguyên sinh ít hơn; đồng thời khả năng kết lắng của bùn hoạt tính "trẻ" trong bể lắng cũng tốt hơn.

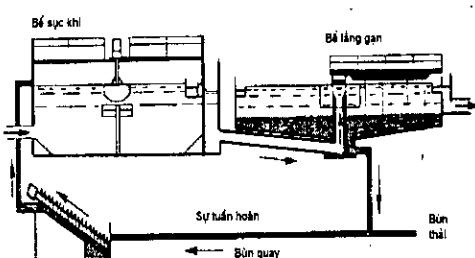
12.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Các phương pháp xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học có thể phân thành 2 nhóm lớn hiếu khí và kỵ khí, tuy vậy còn có phương pháp kỵ khí không bắt buộc, phương pháp thiếu khí trong quá trình khử nitrat. Trong thực tế có nhiều phương pháp hiếu khí và kỵ khí có thể tóm tắt các phương pháp này ở hình 12.1. Phụ thuộc vào từng loại nước thải và các điều kiện của nhà máy mà chọn các biện pháp xử lý cho thích hợp. Phương pháp xử lý nước thải được sử dụng phổ biến nhất là bể sục khí (aerotank) (hình 12.2a và 12.2b).

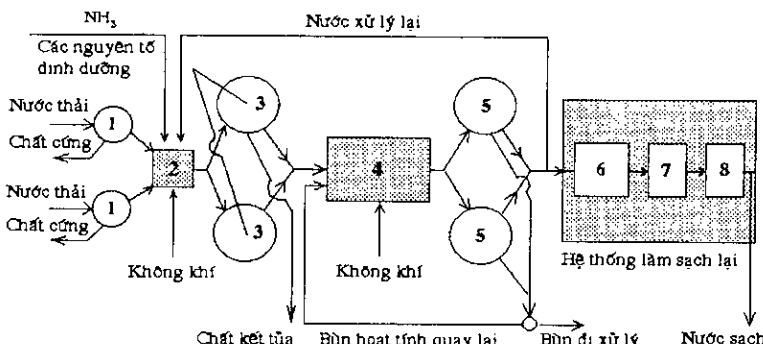


12.4.1. Xử lý nước thải bằng bể hiếu khí

Công nghệ xử lý nước thải bằng bể hiếu khí (bùn hoạt tính) là quá trình xử lý sinh học hiếu khí, trong đó vi sinh vật tạo thành (trong bùn hoạt tính) được hồi lưu với nước thải trong bể có sục khí. Để đảm bảo có oxy thường xuyên và trộn đều với nước thải với bùn hoạt tính, người ta cung cấp oxy bằng hệ thống khuấy trộn và thổi khí hoặc cung cấp oxy tinh khiết. Công nghệ này dựa trên cơ sở của hệ thiết bị "Bể hiếu khí – bể lắng thứ cấp".



Hình 12.2a. Lưu đồ chung của quá trình xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính



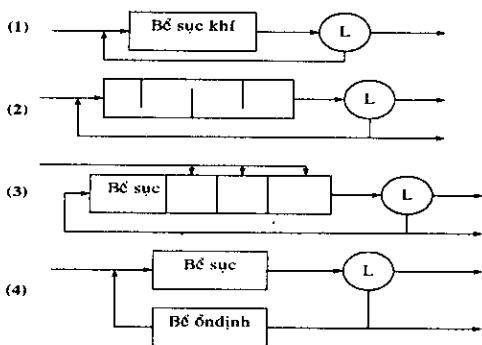
Hình 12.2b. Sơ đồ công nghệ làm sạch nước thải theo phương pháp hiếu khí

1. Lắng loại cát sỏi; 2. Bể trung gian; 3. Lắng sơ bộ; 4. Bể sục khí, 5. Lắng lần hai, 6. Kênh sinh học, 7. Bể làm trong, 8. Xử lý bằng chất phản ứng.

Nguyên lý của quá trình xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính là trong bể hiếu khí, hệ sinh vật trong bể được cung cấp các chất hữu cơ và oxy. Các loại vi sinh vật sử dụng chất hữu cơ và chuyển hóa chúng bằng các quá trình trao đổi chất hiếu khí – một phần chuyển thành vi sinh vật mới, phần còn lại chuyển thành CO_2 , nước và chất khoáng. Theo dòng nước thải từ bể hiếu khí đến bể lắng, vi sinh vật tạo bong và kết lắng trong bùn hoạt tính.

Từ bể lắng, một phần bùn hoạt tính được hồi lưu lại bể hiếu khí để duy trì hoạt tính của vi sinh vật, còn bùn hoạt tính thừa được đưa vào bể nén và tách bùn. Người ta sử dụng bùn hoạt tính để tách protein đơn bào, tách các chất có hoạt tính sinh học hoặc làm phân bón cho cây trồng. Sơ đồ tổng quát công nghệ xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính được trình bày ở hình 12.3.

Bể hiếu khí có cấu tạo như nồi lên men thông thường, song quá trình lên men theo chế độ lên men liên tục dạng chemostat. Hai đặc điểm của hệ thống xử lý bùn hoạt tính khác so với lên men thông thường là: (1) Thành phần vi sinh vật không phải là giống thuần khiết mà là quần thể vi khuẩn,



Hình 12.3. Các quá trình xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính

1. Bể hiếu khí khuấy trộn hoàn toàn thông thường (Completely mixed); 2. Bể dòng chảy nút (Flug flow); 3. Bể làm thoáng theo bậc (Step aeration); 4. Bể ổn định tiếp xúc (Contact stabilization)

nấm men, nấm mốc, động vật nguyên sinh và các cơ thể khác; (2) Bùn hoạt tính bao gồm cả tế bào chết, các mảnh vỡ của tế bào và các tế bào trẻ hoạt động và phát triển bằng cách phân tán nhỏ trong môi trường lén men.

Quá trình xử lý bằng bùn hoạt tính bao gồm các bước có thể tóm tắt như sau:

1) Hấp phụ các chất hữu cơ hòa tan, dạng keo và huyền phù vào trong hoặc trên mặt các hạt bùn hoạt tính.

2) Các chất hữu cơ được phân huỷ đến các sản phẩm cuối như CO_2 , H_2O , khoáng chất và sinh khối vi sinh vật mới.

3) Sự chuyển hoá các chất bởi các loại vi sinh vật và kết lỏng bùn hoạt tính có sự tham gia của các loài động vật nguyên sinh và các loài ăn thịt khác trong nước xử lý.

4) Oxy hoá amoniac đến nitrit và sau đó đến nitrat bằng vi khuẩn nitrit hoá.

5) Trong trường hợp không cung cấp đủ năng lượng (= chất thải) tế bào của vi sinh vật sẽ xảy ra hiện tượng tự phân.

Bể hiếu khí được thiết kế theo nhiều kiểu tuỳ thuộc vào thành phần nước thải đầu vào, vốn đầu tư,... Người ta có thể chọn các quá trình xử lý nước thải có các điểm mút khác nhau.

a) *Bể hiếu khí khuấy trộn thông thường*

Nước thải và bùn hoạt tính được khuấy trộn hoàn toàn trong bể sục. Nồng độ chất thải cũng như mức độ sử dụng O_2 ở mọi phần của bể hiếu khí đều giống nhau. Loại bể này thường được áp dụng khi nước thải được chảy liên tục vào bể có khuấy trộn. Nước thải sau khi lắng và bùn hồi lưu được đưa vào bể sục sao cho chất hữu cơ và oxy hòa tan đồng đều theo chiều dài của bể. Thời gian nước thải lưu trong bể từ 3 – 5 giờ, tải trọng khoảng 0,8 – 2kg $\text{BOD}_5/\text{m}^3/\text{ngày}$, lượng bùn hồi lưu từ 15 – 50%. Hàm lượng bùn 2.500–4.000 mg/l, thời gian lưu bùn từ 5 – 15 ngày. Hiệu quả xử lý BOD là 85 – 90%.

b) *Bể hiếu khí theo dòng chảy nút*

Bùn hoạt tính hồi lưu trộn cùng với nước thải đầu vào bể sục khí. Dòng chảy của nước thải và bùn hoạt tính qua bể hiếu khí chảy theo các vách ngăn. Nhu cầu sử dụng cơ chất và oxy giảm dần theo chiều dài của dòng nước chảy. Không khí cho vào đồng đều theo suốt chiều dài của bể hiếu khí.

Quá trình làm thoáng khí xảy ra sự hấp thụ, kết bong và oxy hoá các chất hữu cơ nhờ vi sinh vật. Bùn hoạt tính được tách ra ở bể lắng thứ cấp. Thời gian nước thải lưu trong bể sục là 4–8 giờ, lượng bùn hồi lưu 15–50%. Tải trọng khoảng 0,3–0,6kg BOD₅/m³/ngày với hàm lượng bùn khoảng 1.500–3.000 mg/l, thời gian lưu bùn từ 5–15 ngày. Hiệu suất xử lý BOD khoảng 85–95%.

c) Bể hiếu khí làm thoáng theo bậc

Đây là phương pháp cải tiến của phương pháp xử lý bằng bùn hoạt tính thông thường. Nước thải sau khi lắng qua bể lắng sơ cấp cho vào bể sục ở nhiều điểm tương ứng, như vậy nhu cầu oxy giảm dần.

Với biện pháp làm thoáng kéo dài, thời gian lưu của nước thải trọng bể sục đủ để oxy hoá lượng lớn các chất hữu cơ và lượng sinh khối tổng hợp được cao: lượng bùn 200–3.500mg/l, thời gian lưu nước 3–5 giờ; tải trọng 0,5–0,9kg BOD₅/m³/ngày. Thời gian lưu bùn 5–15 ngày, lượng bùn hồi lưu 2–5%. Khả năng khử BOD₅ khoảng 85–95%. Chất lượng nước sau xử lý tốt.

d) Bể hiếu khí ổn định tiếp xúc

Quá trình này gồm 2 bể riêng biệt, một bể ổn định bùn hoạt tính và bể tiếp theo là bể xử lý nước thải để bùn hoạt tính và nước thải tiếp xúc nhanh trong bể xử lý. Sau bể sục khí, nước thải qua bể lắng thứ cấp và bùn hồi lưu đưa về bể ổn định. Nhu cầu làm thoáng khí chỉ bằng 50% so với công nghệ xử lý bằng bùn hoạt tính cổ điển. Phương pháp này được sử dụng để xử lý nước thải mà chất hữu cơ chủ yếu ở dạng lơ lửng hoặc dạng keo, thời gian lưu trong bể ổn định 1,5 – 5 giờ, trong bể tiếp xúc 20 – 40 phút, lượng bùn hồi lưu 25–50%, thời gian lưu bùn 5–15 ngày. Hàm lượng bùn trong bể tiếp xúc là 1.000–3.000 mg/l, lượng bùn trong bể ổn định là 4.000–10.000 mg/l. Tải trọng từ 0,6–0,75kg BOD/m³/ngày. Hiệu quả xử lý là 80–90%.

e) Quá trình xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính đặc biệt

Sử dụng oxy tinh khiết thay cho việc cung cấp oxy hòa tan bằng cách thổi khí trộn đều bùn hoạt tính sẽ tăng cường quá trình làm sạch nước thải bằng biện pháp sinh học. Qua thực nghiệm cho thấy, phần lớn các quá trình xử lý hiếu khí, thành phần dinh dưỡng cung cấp thường bị hạn chế. Việc sử dụng oxy tinh khiết sẽ tăng cường hiệu suất xử lý và rút ngắn thời gian lưu của nước thải trong hệ thống. Song khó khăn nhất là thiết bị của hệ thống xử lý để sử dụng triệt để lượng oxy cung cấp. Do vậy người ta đã thiết kế loại

thiết bị kín để xử lý nước thải – bể hiếu khí oxy (oxytank). Tính toán sao cho việc tăng hiệu suất sử dụng oxy đồng thời giải phóng lượng CO₂ tích luỹ trong môi trường nuôi theo chu kỳ thì sẽ nâng cao hiệu suất xử lý nước thải. Sơ đồ oxytank trình bày ở hình 12.4.

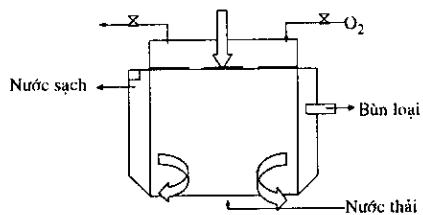
Tăng tốc độ oxy hóa các chất hữu cơ trong hệ thống xử lý sinh học với việc sử dụng oxy tinh khiết sẽ không chỉ khắc phục tình trạng các chất dinh dưỡng hạn chế bằng cách tăng hàm lượng bùn trong bể xử lý. Bằng biện pháp đó sẽ tăng cường các quá trình lên men phân giải các chất có sự tham gia của các enzym ngoại bào nằm trong vỏ nhầy của tế bào hoặc các trong búi bùn hoạt tính.

Tuy vậy, trong mục đích làm sạch nước thải thì sơ đồ dòng chảy trong bể hiếu khí oxy trong thực tế không khác các mô hình làm sạch nước thải hiếu khí khác.

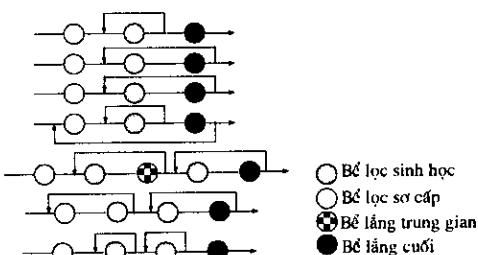
f) Bể lọc sinh học chảy chậm

Hệ thống lọc sinh học chảy chậm là hệ thống lọc sinh học được tìm ra lần đầu tiên tại Lawrence Experiment Station ở Massachusetts năm 1891. Ngay từ những năm 40 của thế kỷ XX, ở Mỹ, 60% hệ thống xử lý nước thải đã sử dụng hệ thống loại này để xử lý nước thải. Năm 1946, Hội đồng nghiên cứu quốc gia của Mỹ đã đã dùng các công thức toán học để thiết kế hệ thống lọc chảy chậm (hình 12.5). Sự phát triển công nghệ sản xuất các loại polyme đã giúp tăng nhanh công nghệ xử lý nước thải bằng phương pháp xử lý này.

Hệ thống lọc sinh học chảy chậm bao gồm: Bể lọc có cấu tạo hình trụ chứa vật liệu lọc, hệ thống phân phối nước đảm bảo tưới đều trên toàn bộ bề mặt bể lọc và chảy từ từ qua các vật liệu lọc có màng sinh học cố định, hệ thống thu và dẫn nước sau khi lọc, hệ thống dẫn và phân phối khí vào bể từ dưới lên trên.



Hình 12.4. Bể hiếu khí oxy (oxytank)



Hình 12.5. Lưu đồ dòng chảy trung bình và tỷ lệ cao với các kiểu hồi lưu khác nhau.

BẢNG 12.10. CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA BỂ LỌC SINH HỌC

	Mức thấp	Mức cao	Vật liệu lọc plastic	Vật liệu thô
Tải trọng hữu cơ (kg BOD ₅ /m ³ /ngày)	0,08 – 0,32	0,32 – 1,0	0,8 – 2,5	0,8 – 5,0
Tải trọng nước thải (m ³ /m ² /ngày)	1–4	10 – 40	15 – 85	50 – 175
Độ sâu của bể, m	1,5–3,0	1,25 – 2,5	4,5 – 12	4 – 12
Tỷ lệ quay vòng	Không	1:1–4:1	3 : 1	Không
Vật liệu lọc	Đá, vv..	Đá, vv..	Tổng hợp	Tổng hợp
Lưu lượng dòng chảy	Cách đoạn	Liên tục	Liên tục	Liên tục
Nước ra	Liên tục	Liên tục	Liên tục	Liên tục
Các lớp của màng lọc	Nhiều	ít	ít hoặc không	ít hoặc không
Chuyển hoá BOD ₅ (%)	80–85%	65 – 80	65 – 85	40 – 65

BẢNG 12.11. TÍNH CHẤT CỦA CÁC LOẠI VẬT LIỆU LỌC CỦA BỂ LỌC SINH HỌC CHẨY CHẬM

Loại vật liệu	Kích thước (mm)	Khối lượng/dơn vị thể tích (kg/m ³)	Diện tích bề mặt riêng (m ² / m ³)	Không gian cho phép (%)
Đá granit	25 – 75	1250 – 3750	55 – 70	40 – 50
Đá granit	100 – 120	800 – 1000	40 – 50	50 – 60
Xỉ quặng	50 – 80	900 – 1200	55 – 70	40 – 50
Vòng gốm	40 x 40	650	115	68
Gỗ đỗ	1200x1200x500	165	46	75
Plastic	600x600x1200	30 – 100	80 – 100	94 – 97

Trước đây vật liệu lọc thường sử dụng đá (đường kính 25–100mm), bể lọc cao khoảng 1,0 – 2,5m, song những năm gần đây, vật liệu lọc thường là các chất tổng hợp và chiều cao của bể có thể cao tới 12m–18m. Việc phân phối nước thải vào bể người ta đã thiết kế máy phân tán nước thải vào bể và tuỳ thuộc vào chất lượng nước thải mà thay đổi lưu lượng và thời gian lưu trong bể lọc. Với hệ vi sinh vật bám vào giá thể là các vật liệu lọc như đá granit, vòng gốm, các loại nhựa plastic,... quá trình oxy hoá diễn ra rất nhanh, do vậy hệ thống này có ưu điểm là có thể xử lý nước có mức độ ô nhiễm cao, rút ngắn được thời gian xử lý, đồng thời có thể xử lý có hiệu quả nước cần xử lý bằng các quá trình khử nitrat và phản nitrat hoá. Tuy vậy, nhược điểm của phương pháp xử lý này là không khí đầu ra thường có mùi hôi và nhiều ruồi muỗi. Năng lực khử chất thải bằng phương pháp lọc sinh

học là việc lựa chọn vật liệu lọc, hệ vi sinh vật bám vào màng lọc. Các thông số thiết kế có thể tham khảo trong các bảng 12.10 và 12.11.

g) *Đĩa quay sinh học (RBC)*

RBC bao gồm một hệ thống đĩa plastic tròn mỏng được sắp xếp sát với nhau và được ngâm 40% diện tích vào bể có nước thải chảy qua. Trục quay nằm ngang và các đĩa được quay tròn trong môi trường nước thải với tốc độ 1 vòng/phút. Vi sinh vật tạo thành màng sinh học cố định trên mặt các đĩa, khi các đĩa quay vào nước thải, các chất hữu cơ trong nước bị vi sinh vật hấp thụ và phân huỷ. Khi màng quay ra khỏi mặt nước, oxy từ không khí sẽ bị hấp thụ và giữ cho vi sinh vật phát triển hiếu khí.

Sự phát triển của RBC không đòi hỏi diện tích rộng, trang thiết bị đơn giản, khả năng tải trọng cao, đặc biệt là các quá trình nitrat hoá diễn ra thuận lợi. Nhưng nhược điểm là không điều chỉnh được nhiệt độ và không tránh được mưa nắng.

Đĩa quay sinh học được áp dụng đầu tiên ở CHLB Đức từ những năm 60. Ở Mỹ và Canada, 70% hệ thống RBC được sử dụng để loại các chất hữu cơ, 25% để loại nitrat. Hệ thống đĩa quay thường bao gồm các đĩa tròn polystyren và polyvinyl clorit. Tương tự như bể lọc sinh học chậm một lớp, màng sinh học hình thành và bám chặt vào bề mặt đĩa quay.

Yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hoạt động của RBC là lớp màng sinh học trên mặt các đĩa quay. Lớp màng nhày dày chừng 0,16 – 0,32cm. Vi sinh vật trong màng sinh học trong đĩa quay thường là các loại vi khuẩn yếm khí tuy nhiên như *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, còn các vi sinh vật hiếu khí như *Bacillus* ở lớp trên của màng sinh học. Khi thiếu khí hoặc yếm khí thì tạo thành lớp màng sinh vật mỏng có các loài vi sinh vật yếm khí như *Desulfovibrio* và một số vi khuẩn khử sunphat khác. Trong điều kiện kỵ khí, vi sinh vật thường tạo mùi khó chịu. Nấm và các vi sinh vật hiếu khí thường phát triển ở lớp màng trên và cùng tham gia vào việc phân huỷ các chất hữu cơ. Tuy vậy, nấm chỉ phát triển mạnh hoặc phát huy tác dụng khi môi trường nước thải có độ pH thấp, vì nấm khó cạnh tranh thức ăn với các loại vi khuẩn trong điều kiện bình thường. Tảo phát triển lớp trên của màng sinh học đóng vai trò như một màng lọc và tăng cường sức chịu đựng CO₂ của màng sinh học. Nhìn chung, pH tối ưu của hệ thống đĩa quay từ 6,5–7,8, khi oxy hoá mạnh các chất hữu cơ chứa cacbon thì pH thích hợp 8,2–8,6. pH tối ưu cho quá trình nitrat hoá trong hệ

thống này khoảng 7,2–7,8. Quá trình oxy hoá thường làm kiềm hoá môi trường, vì vậy cần bổ sung thêm các chất nhằm tăng cường quá trình trên.

Các chất dinh dưỡng có trong nước thải sinh hoạt thường đủ cho vi sinh vật phát triển, vì vậy không cần bổ sung thêm các chất dinh dưỡng. Tuy nhiên, với nước thải công nghiệp, cần thêm chất dinh dưỡng để tỷ lệ cân đối là $BOD_5 : N : P = 100 : 5 : 1$.

Nhiệt độ ở mức 13 – 32°C không ảnh hưởng đến quá trình hoạt động của hệ thống xử lý nước thải kiểu này. Tuy vậy, khi nhiệt độ giảm xuống quá 13°C thì hiệu quả xử lý giảm đáng kể. Để đạt hiệu quả xử lý cao, nước thải cần phải đảm bảo điều kiện thoáng khí trong toàn bộ hệ thống để quá trình oxy hoá và nitrat hoá diễn ra bình thường. Nếu giữ nồng độ oxy hòa tan trong môi trường nước thải ở mức 1–2mg/l để dự phòng việc thiếu oxy sẽ hạn chế hiệu quả xử lý ở lớp nước dưới bể.

Một yếu tố quan trọng khác cũng ảnh hưởng đến hiệu suất xử lý của hệ thống này là việc lựa chọn và sắp xếp vật liệu lọc. Vật liệu thường gấp ở dạng đĩa có diện tích bề mặt từ 6 – 7,62m²/m³. Như vậy mật độ trung bình 9.300m²/1 trục dài 8m, mật độ cao từ 11.000 – 16.700m²/1 trục dài 8m, thể tích thích hợp là 5 lít/m². Rõ ràng, việc sử dụng vật liệu lọc có diện tích bề mặt lớn sẽ có hiệu quả xử lý cao. Vật liệu dạng lưới nói chung hoạt động tốt hơn dạng đĩa nhờ diện tích bề mặt lớn hơn. Tuy nhiên, khi sử dụng các vật liệu lọc có diện tích lớn, ở giai đoạn đầu của quá trình xử lý có thể làm tắc nghẽn và nước thải vào phía trong đĩa thoát ra chậm cũng làm giảm hiệu suất xử lý. Vì vậy nên giảm bớt số đĩa ở giai đoạn này. Vận tốc quay của đĩa quay khoảng 0,3m/giây.

Mức độ tải trọng cho RBC để oxy hoá cacbon nằm trong khoảng 0,5–1,0kg BOD_5/m^3 /ngày. Việc nạp chất hữu cơ ở giai đoạn đầu nên giảm bớt để đề phòng sự thiếu oxy. Tải trọng nước trên bề mặt vật liệu của đĩa quay thay đổi từ 0,03 – 0,06m³/m²/ngày trong xử lý oxy hoá các chất hữu cơ và 0,01m³/m²/ngày trong xử lý bằng nitrat hoá. Tuy vậy tải trọng của nước thải còn phụ thuộc vào thời gian lưu, nghĩa là phụ thuộc vào độ thoáng của vật liệu lọc và thùng chứa. Mỗi quan hệ giữa thể tích bồn chứa và diện tích bề mặt vật liệu có ý nghĩa rất lớn để tăng hiệu quả xử lý. Người ta cho rằng, dung tích tối ưu cho bồn chứa xử lý nước sinh hoạt khoảng 4,88 lít/m² bề mặt vật liệu lọc. Cần cứ vào đó, thời gian lưu nước trong bồn chứa khoảng 40–90 phút cho quá trình oxy hoá cacbon và 90 – 230 phút cho quá trình nitrat hoá.

12.4.2. Xử lý nước thải bằng ao hồ ổn định (wastewater stabilization ponds)

Xử lý nước thải bằng ao hồ sinh học là phương pháp xử lý có công nghệ thấp và giá thành rẻ, nhưng lại là phương pháp xử lý có hiệu suất cao. Quy trình xử lý diễn ra giống như các quá trình trong tự nhiên, tuy nhiên đòi hỏi thời gian xử lý dài và diện tích đất sử dụng lớn.

Có 3 kiểu ao hồ ổn định sinh học chính và chúng thường sắp xếp theo trình tự các loại ao hồ có khả năng xử lý nước thải theo những yêu cầu tiêu chuẩn chất lượng nước ra:

1) Ao kỵ khí (sâu 2 – 5m), nó tiếp nhận nước thải thô có độ nhiễm bẩn ($BOD_5 > 300\text{mg L}^{-1}$) và chất rắn huyền phù (SS) cao; tải trọng BOD_5 cao ($100 - 400\text{g/m}^3/\text{ngày}$), không có oxy hòa tan và chất huyền phù (SS) lắng xuống xuống đáy bể và ở đó diễn ra quá trình phân huỷ kỵ khí ở nhiệt độ cao hơn 15°C .

2) Ao kỵ khí tùy tiện (facultative ponds), sâu 1–2m, tiếp nhận hoặc nước thải thô (ao kỵ khí bắt buộc sơ cấp) hoặc nước thải đã lắng (ao kỵ khí tùy tiện thứ cấp), lớp nước sâu hơn là vùng kỵ khí còn lớp nước cao hơn là vùng hiếu khí, ở đó lượng oxy cho quá trình trao đổi chất của vi sinh vật do hoạt tính quang hợp của vi tảo phát triển trong nước cung cấp và chính chúng đã tạo thành màu xanh của nước.

3) Ao xử lý bổ sung, sâu 1–2m, tiếp nhận nước đầu ra của bể kỵ khí tùy tiện và tiếp tục được xử lý chủ yếu làm giảm các loại vi sinh vật gây bệnh và các chất dinh dưỡng tới mức độ cho phép, chủ yếu bằng quang hợp của thực vật nổi để điều chỉnh chất lượng nước đầu ra cuối cùng.

Từ những kiểu ao cơ bản, người ta đã nghiên cứu nhằm cải tiến nhiều loại ao hồ khác nhau để xử lý nước thải tốt hơn. Hệ thống xử lý bằng ao hồ ổn định có nhiều ưu điểm hơn so với các quá trình xử lý khác:

1) Đây là phương pháp xử lý rẻ nhất, cả về cấu trúc, vận hành và bảo quản và không đòi hỏi cung cấp thêm năng lượng (sử dụng năng lượng mặt trời).

2) Có khả năng loại các loại vi sinh vật gây bệnh nhanh và có hiệu quả nhất là nước đầu ra có thể tái sử dụng trong nông nghiệp và sinh hoạt.

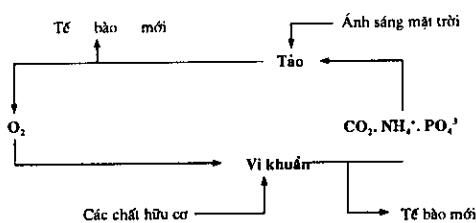
3) Có khả năng hấp thụ các chất vô cơ và hữu cơ tan trong nước rất tốt.

4) Có khả năng chịu được nồng độ kim loại nặng cao (khoảng 30 mg/l).

5) Việc vận hành và bảo quản ao hồ cũng rất đơn giản: ao hiếu khí và tùy tiện cần phải loại bùn và tảo, thay nước và làm cỏ thường xuyên, còn ao kỵ khí thường 2–3 năm thì cần loại một nửa lượng bùn.

Chính do có nhiều ưu điểm, nên phương pháp xử lý ao hồ ổn định được sử dụng rộng rãi trên thế giới từ những vùng lạnh như ở Alaska ở miền Bắc hay New Zealand ở miền Nam xa xôi, ở thành phố Auckland có hồ rộng tới 5km². Ở Mỹ, một phần ba các cơ sở xử lý nước thải sử dụng phương pháp ao hồ ổn định và phương pháp này cũng được sử dụng rộng rãi ở các nước châu Âu như Pháp, Đức, Bồ Đào Nha,... và ở các nước ở Trung Đông, châu Phi, châu Á và châu Mỹ La Tinh.

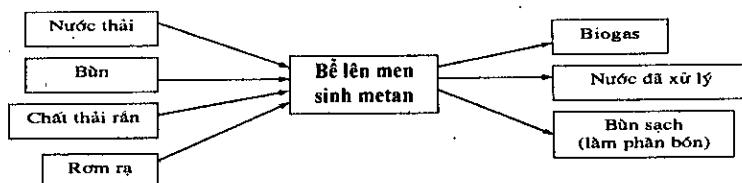
Sinh thái vi sinh vật trong ao hồ ổn định nước thải là hỗn hợp các nhóm vi sinh vật khác nhau, cụ thể là nhiều loại vi sinh vật hoá dưỡng chuyển hoá các chất hoá học trong quá trình làm sạch nước thải. Đặc tính sinh học của ao hồ (ngoài ao kỵ khí) là mối quan hệ mật thiết giữa tảo và vi sinh vật: Tảo và các thực vật thuỷ sinh thông qua quá trình quang hợp, sản sinh ra oxy cung cấp cho vi sinh vật hiếu khí để oxy hoá các chất hữu cơ thành các nguồn thức ăn vô cơ cung cấp lại cho sự phát triển của tảo và thực vật thuỷ sinh trong ao (hình 12.6). Do vậy, để giải thích mối quan hệ gắn bó giữa vi sinh vật và các loại thực vật nói, người ta đã xác định các loại tảo và vi khuẩn tìm thấy trong các loại ao hồ khác nhau.



Hình 12.6. Sơ đồ mối quan hệ giữa vi tảo và vi khuẩn trong ao hồ ổn định

12.4.3. Xử lý nước thải bằng lên men kỵ khí (quá trình sinh metan)

Làm sạch nước thải bằng biện pháp xử lý kỵ khí được sử dụng để xử lý các nguồn nước thải có nồng độ các chất hữu cơ cao. Quá trình lên men được thực hiện trong thiết bị lên men đặc biệt – bể sinh metan (metantank). Các quá trình hình thành metan trong điều kiện kỵ khí để làm giảm BOD và ổn định bùn được trình bày ở hình sau:



Hình 12.7. Sơ đồ quá trình hình thành metan

a) Cơ sở sinh học của quá trình lên men khí sinh metan

Mô tả quá trình phân huỷ các chất hữu cơ bằng lên men khí sinh metan theo 3 giai đoạn theo sơ đồ của Barker được trình bày ở sơ đồ sau:

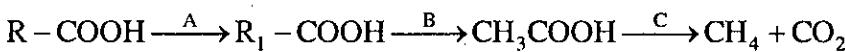
	Giai đoạn 1	Giai đoạn 2	Giai đoạn 3
Các chất hữu cơ			
- Chất béo	Vi sinh vật	Các chất tan	Các axit hữu cơ
- Hydratcacbon	→	→	→ CH ₄ +CO ₂
- Protein	hydrolaza	sinh axit	sinh metan

Giai đoạn 1: Dưới tác dụng của các enzym hydrolaza ngoại bào của vi sinh vật, các chất hữu cơ như chất béo, hydratcacbon (chủ yếu là xenlulozơ và tinh bột) và protein bị phân huỷ và chuyển hoá thành các hợp chất hữu cơ đơn giản dễ tan trong nước như đường đơn, peptit, glyxerin, axit béo, axit amin,...

Giai đoạn 2: Dưới tác dụng của vi khuẩn, các chất hữu cơ sẽ chuyển hoá thành các axit hữu cơ có khối lượng phân tử nhỏ hơn như axit axetic, axit butyric, axit propionic, các andehyt, alcol và một số nhỏ các loại khí: CO₂, H₂, MH₃, N₂,...

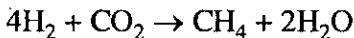
Giai đoạn 3: là giai đoạn sinh metan và cũng là giai đoạn quan trọng nhất của toàn bộ quá trình. Dưới tác dụng của các vi khuẩn sinh metan, các axit hữu cơ và các hợp chất đơn giản khác sẽ chuyển hoá thành CH₄, CO₂, O₂, H₂S,... Sự tạo thành khí metan xảy ra theo 2 cách sau:

- CO₂ bị khử thành CH₄, trong đó chất cung cấp điện tử là H₂ và rượu.
- Các axit hữu cơ biến thành CH₄ theo các phản ứng:

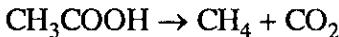


Trong đó A, B, C là các loại vi khuẩn khác nhau tham gia vào các bước chuyển hoá. Zavarin G.A. đã đề nghị chia vi khuẩn thành 4 nhóm tham gia vào quá trình này:

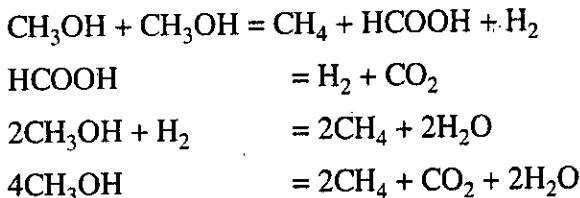
+ Nhóm 1: Nhóm vi khuẩn sử dụng hydro, cacbonic và fomic để chuyển hoá thành khí metan, chúng không tạo metan từ axit hữu cơ:



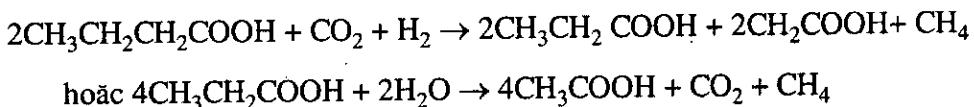
+ Nhóm 2: Ngoài phản ứng trên còn có thể sinh metan từ axit axetic:



+ Nhóm 3: Ngoài 2 phản ứng trên còn có thể sử dụng metanol:



+ Nhóm 4: Có khả năng sử dụng các chất hữu cơ:



Sự phân chia thành các giai đoạn của quá trình lên men khí sinh metan chỉ là quy ước, vì trong thực tế, toàn bộ quá trình hóa học của cả 3 giai đoạn hoạt động cùng một lúc và đồng bộ với nhau, khi đó toàn bộ hệ thống đạt được trạng thái cân bằng và pH luôn giữ ở mức trung tính. Nếu một khâu trong đó bị thay đổi, ví dụ tích luỹ axit chẳng hạn, sẽ làm giảm pH môi trường, ảnh hưởng đến hoạt động của vi khuẩn sinh metan làm cho quá trình bị đình trệ.

b) Vi sinh vật sinh axit hữu cơ

Như trình bày ở phần trên, nhóm vi sinh vật tham gia vào quá trình sinh axit hữu cơ, thì trước hết phải tham gia vào giai đoạn phân huỷ các chất hữu cơ trong nước thải thành các axit hữu cơ và khí. Song vi khuẩn khí trong bể lên men sinh metan thường chiếm tuyệt đối (5.10^8 tế bào/ml) còn vi khuẩn khí không bắt buộc thường không quá 10^6 tế bào/ml.

Các vi sinh vật khí thường là vi khuẩn Gram âm, không hình thành bào tử, phân huỷ các polysaccharit thành axit axetic, axit butyric và CO_2 . Có tới 30% chủng phân lập có khả năng tạo thành hydro.

Thành phần loài côn trùng thuộc vào thành phần của môi trường lên men:

– Khi có mặt trong môi trường nhiều xenlulozơ các chủng vi khuẩn sau đây chiếm đa số: *B. sereus*, *B. megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. riboflavina*, *P. reptilirova*, *Leptospira biflexa*, *Alcaligenes faecalis* và *Proteus vulgaris*.

– Nước thải giàu tinh bột tạo điều kiện cho *Micrococcus candidus*, *M. varians*, *M. urea*, *Bacillus cereus*, *B. megeterium* và *Pseudomonas spp.* sinh trưởng và phát triển.

– Nước thải giàu protein thích hợp cho các loài sau đây phát triển: *Bacillus cereus*, *B. curculans*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Micrococcus varians*, *Escherichia coli*, *Baracolobacterium intermedium*, *Pseudomonas coliforma* và *Pseudomonas spp.*

– Dầu béo thực vật thường kích thích sự sinh trưởng của *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Alcaligenes* và *Pseudomonas*.

Mặc dù có khả năng tạo ra nhiều axit hữu cơ, song các loại nấm mốc không đóng vai trò gì quan trọng trong quá trình phân huỷ khí các chất hữu cơ phức tạp (bảng 12.12).

BẢNG 12.12. VI KHUẨN SINH AXIT HỮU CƠ

Tên vi khuẩn	pH	Nhiệt độ (°C)	Sản phẩm
<i>Bacillus cereus</i>	5,2	25 – 35	Axit axetic, axit lactic
<i>B. knoifelkampi</i>	5,2 – 8,0	–	Axit axetic, axit lactic
<i>B. megaterium</i>	–	25 – 35	Axit axetic, axit lactic
<i>Bacteroides succinigenus</i>	–	25 – 35	Axit axetic, axit succinic
<i>Clostridium carnegi</i>	5,0 – 8,5	25 – 37	Axit formic, axit axetic
<i>C. cellobiñhavus</i>	–	25 – 38	Axit lactic, etanol, CO ₂
<i>C. dissolveus</i>	–	35 – 51	Axit formic, axit axetic, axit lactic, axit succinic
<i>C. thermocellulaseum</i>	5,0 – 8,5	55 – 65	Axit lactic, axit succinic, etanol
<i>Pseudomonas spp</i>	–	30 – 45	Axit formic, axit axetic, axit lactic, axit succinic, etanol
<i>Riminococcus sp.</i>	–	33 – 48	Axit formic, axit axetic, axit succinic

Tuy vậy, thực tế cho đến nay người ta còn ít quan tâm nghiên cứu đến hệ sinh thái tham gia vào quá trình phân huỷ khí, nhất là các loài phân huỷ các chất hữu cơ và chuyển hoá chúng thành axit hữu cơ.

c) Vi khuẩn sinh metan

Các sản phẩm tạo ra ở giai đoạn 1 chưa được phân huỷ hoàn toàn như các chất béo bậc thấp, các alcol bậc thấp sẽ tiếp tục phân huỷ để tạo thành metan và cacbonic. Ở giai đoạn này, vi khuẩn sinh metan đóng vai trò chủ yếu. Chúng là loại vi sinh vật yếm khí tuyệt đối và rất khó phân lập. Do vậy, người ta biết về chúng rất ít, nhất là về sinh lý. Những vi khuẩn sinh metan, về mặt hình thái chúng thuộc các loại cầu khuẩn bát cầu khuẩn và trực

khuẩn (*Metanococcus*, *Metanosarcina*, *Metanobacterium*). Tất cả các vi khuẩn sinh metan đều không tạo thành nha bào (capsul).

Một số loại vi khuẩn sinh metan trong bể lên men khí sinh metan với các axit hữu cơ bị chúng chuyển hoá được trình bày ở bảng 12.13.

BẢNG 12.13. VI KUẨN SINH METAN

Tên vi khuẩn	pH	Nhiệt độ (°C)	Axit bị chuyển hoá
<i>Metanobacterium omelianskii</i>	6,5 – 8	37 – 40	CO ₂ , H ₂ , rượu I và II
<i>M. propionicum</i>	–	–	Axit propionic
<i>M. firmicum</i>	–	–	H ₂ , CO ₂ , axit fomic
<i>M. sochngenii</i>	–	–	Axit axetic
<i>M. suboxydans</i>	–	–	A.butiric, axit valenic, axit arponic
<i>M. ruminanticum</i>	–	–	H ₂ , axit fomic
<i>Metanococcus vanirielli</i>	1,4 – 9,0	–	Axit fomic, H ₂
<i>M. mazei</i>	–	30 – 37	Axit axetic, axit butyric
<i>Metanosarcina metanica</i>	–	35 – 37	Axit axetic, axit butyric
<i>M. barkerti</i>	7,0	30	CO ₂ , H ₂ , axit axetic, metanol

Về sinh lý thì các chủng vi khuẩn sinh metan giống nhau và không sinh trưởng khi nồng độ oxy trong môi trường vượt quá 0,1%. Trong điều kiện thí nghiệm, người ta nuôi cấy chúng ở môi trường có thể năng oxy hoá – khử khoảng 0,36V. Trong điều kiện tự nhiên, những vi sinh vật sinh metan phát triển cùng với vi khuẩn yếm khí khác. Những chủng này phát triển bên cạnh tạo thế năng cần thiết cho vi khuẩn sinh metan. Vi khuẩn sinh metan không thể phân huỷ các hợp chất polyme ngay cả hydratcacbon.

Trong bể lên men khí sinh metan, các chủng vi khuẩn sinh metan thường cạnh tranh với vi khuẩn tạo hydro sunphua và thường khử lẫn nhau. Vì vậy, trong bể ủ thì giai đoạn đầu tạo hydro sunfua còn giai đoạn sau tạo metan.

d) Lý thuyết vận hành

Quá trình lên men khí sinh metan xem ra đơn giản hơn so với quá trình hiếu khí, nhưng thực chất đó là vấn đề khá phức tạp liên quan đến động học quần thể của hệ vi sinh vật khí khí. Nếu giữ số quần thể vi sinh vật không đổi thì hệ vi sinh vật yếm khí phải cung cấp chất hữu cơ nhiều gấp 5 lần so với hệ hiếu khí. Trong thực tế, tải trọng cặn bùn trong nước

thải phải là 1,67kg chất khô/m³/ngày. Vì trên thực tế có tới 40 – 50% không bị phân huỷ sinh học, cho nên thực tế tải trọng chỉ khoảng 0,8kg/m³/ngày. Trong khi đó ở bể hiếu khí thường tải trọng theo BOD₅ khoảng 0,5kg/ ngày. Chính vì vậy, thời gian lưu bùn trong bể kỵ khí lâu hơn. Sinh khối vi sinh vật rất nhỏ, chỉ dưới 1% so với tổng chất khô, rõ ràng là rất ít chất hữu cơ có trong cặn sau khi xả khỏi bể. Người ta đã xác định được rằng, trong bể ủ kỵ khí sinh metan thì 70–75% metan tạo ra do phân huỷ axit axetic, còn lại khoảng 25–30%, do tổng hợp từ CO₂ và N₂. Lượng vi khuẩn tạo metan từ H₂ nhiều hơn do phân huỷ axit béo. Trong 1ml cặn bùn có 10⁷ vi khuẩn sinh metan từ H₂, 10⁵–10⁶ – phân huỷ axetat, 10⁶–10⁷ phân huỷ propionat và butyrat. Quá trình lên men kỵ khí trong bể ủ kỵ khí diễn ra chậm và giải phóng rất ít năng lượng.

Giống như các quá trình làm sạch nước thải bằng phương pháp hiếu khí, hàm lượng các thành phần trong môi trường bể ủ kỵ khí sinh metan nhất thiết không tăng cao quá nồng độ xác định, nếu cao sẽ ức chế quá trình lên men. Nồng độ của một số chất gây độc không vượt quá mức cho phép như sau (mg/l):

Axeton	800	Thiếc	50
Benzol	200	Đồng	25
Toluen	200	Crom III	25
Rượu amilic	100	Crom VI	3

Khả năng khuấy trộn đóng vai trò quan trọng làm tăng khả năng tạo khí và tốc độ phân huỷ chất thải. Với chế độ khuấy tăng từ 3–5 vòng/phút sẽ làm tăng khả năng sinh khí trung bình từ 12–15%, còn nếu hoàn toàn không khuấy trộn, hiệu suất sinh khí giảm đi 3 lần.

Trong lên men kỵ khí sinh metan, chế độ nhiệt cũng đóng vai trò quan trọng. Tốc độ các phản ứng sinh hoá sẽ tăng khi tăng nhiệt độ. Có 2 chế độ lên men: lên men ấm với nhiệt độ 30–35°C và nhiệt độ cao 50–60°C. Khi lên men ở nhiệt độ cao, tốc độ phân huỷ các chất hữu cơ tăng lên, thời gian lên men rút ngắn và tải trọng bùn tăng lên. Một ưu điểm nữa là lên men ở nhiệt độ cao thì các trứng giun và các loại vi trùng gây bệnh sẽ bị tiêu diệt nhanh chóng. Tuy nhiên, nhược điểm của lên men nhiệt là khó tách nước khỏi bùn.

Tốc độ phân huỷ các hợp chất hữu cơ tăng khi tăng lượng chất nhiễm bẩn trong nước thải. Điều khó khăn thực hiện quá trình công nghệ là ở chổ

khó có thể điều chỉnh quá trình lên men như điều kiện lên men hiếu khí, do vậy quá trình lên men kỵ khí thường diễn ra chậm.

Cấu tạo các bể lên men kỵ khí rất khác nhau, song điểm chung nhất là các bể có cấu tạo một bể chịu áp suất có cánh khuấy và vỏ để giữ nhiệt. Tuy nhiên, không những cần thiết kế bể metan đủ công suất mà còn phải vận hành đúng quy trình và lượng chất thải dầu vào bể phải điều hoà sao cho vi sinh vật và chất hữu cơ luôn ở nồng độ không tránh hiện tượng đột ngột tăng các axit hữu cơ sẽ làm giảm hiệu suất lên men.

– Bể tự hoại:

Hố xí tự hoại là kiểu lên men kỵ khí lâu đời nhất, bể tự hoại vừa để lắng sơ bộ vừa để lên men cặn. Khi nước chảy qua bể với tốc độ chậm thì cặn lắng xuống đáy và bắt đầu lên men kỵ khí phân huỷ các chất hữu cơ. Các bọt khí tạo ra lại nổi lên mặt nước kéo theo ít cặn lơ lửng lên tới mặt nước và khi bọt vỡ ra thì cặn lại bắt đầu lắng xuống. Kết quả tạo thành một màng dày ở mặt nước do nhiều hạt cặn bám theo bọt nước nổi lên.

Quá trình lắng và lên men cặn cùng diễn ra trong một dung tích cho nên hiệu quả lắng và hiệu quả lên men đều thấp. Quá trình lên men như vậy thường không lên men đến cùng mà thường chỉ dừng lại ở giai đoạn lên men axit. Vì khuẩn và các sản phẩm trao đổi chất đều có thể trôi trong nước. Thời gian lưu bể thường từ 2 – 4 ngày và thời gian lưu cặn từ 6 tháng đến 1 năm.

– Bể lắng hai vỏ và bể lắng trong kết hợp lên men:

Đặc điểm của những loại bể này ngăn lắng cách ly với ngăn lên men. Nước thải đi qua ngăn lắng, cặn lơ lửng lắng xuống qua khe hở và lên men ở ngăn dưới. Vì hai ngăn được tách riêng cho nên khắc phục được các nhược điểm xảy ra với bể tự hoại. Ở ngăn lên men kỵ khí đều tồn tại vi khuẩn tạo axit và tạo metan. Khí tạo ra được thoát qua bể mặt tự do giữa máng lắng và tường bể. Do vậy sự phát triển của vi khuẩn trong bể lắng hai vỏ tốt hơn.

Sản phẩm của vi khuẩn tạo axit còn lưu lại lâu trong cặn ở ngăn lên men cho nên dù để cho vi khuẩn tạo metan phát triển. Do đó lượng khí metan tạo ra cũng đáng kể. Thời gian nước lưu lại ở ngăn lắng khoảng 1,5 giờ như ở những loại bể lắng khác. Thời gian lên men trong bể từ 6 đến 12 tháng, cặn sau khi lên men có chất lượng tốt và dễ khử nước ở sân phơi bùn.

Nguồn khí metan (còn được gọi khí sinh học – biogas) được sử dụng làm nhiên liệu sinh học có giá trị. Mô hình thu nhận khí metan từ phế thải giàu

chất hữu cơ như phân gia súc, bã thải của công nghiệp chế biến thực phẩm bằng cách lên men kỹ khí được trình bày trên hình 12.8. Trong thực tế người ta đã xây dựng nhiều cơ sở sản xuất khí sinh học làm nhiên liệu hoặc chuyển thành điện năng phục vụ đời sống con người.

12.5. CHỐNG Ô NHIỄM KHÔNG KHÍ VÀ MÔI TRƯỜNG SỐNG

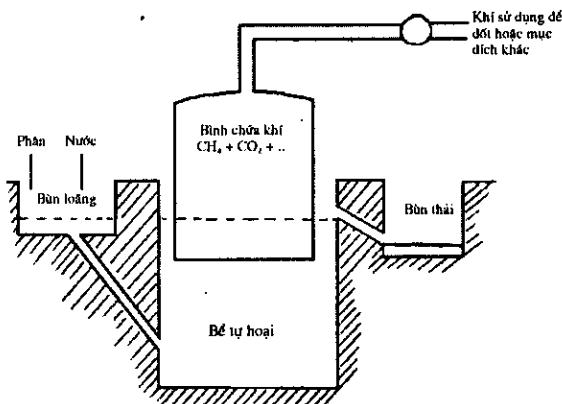
12.5.1. Chống ô nhiễm môi trường không khí

Không khí ô nhiễm do hoạt động sống của con người. Hàng loạt nhà máy nả khói thải độc hại lên bầu trời. Hàng ngày xe cộ trong các thành phố lớn đã xả một lượng khí độc vào khu vực thành phố, đốt rác thải không những thải một lượng lớn CO_2 mà còn cả khí độc khác vào môi trường,... Những hoạt động này không những ảnh hưởng trực tiếp đến sức khoẻ của con người, mà xả vào môi trường lượng lớn khí thải như vậy sẽ gây nên hiệu ứng nhà kính, làm thay đổi khí hậu Trái Đất. Điều lo lắng không phải của riêng một nước nào mà đây là nỗi lo của toàn nhân loại, cho nên có Nghị định Kyoto về giảm thiểu khí thải vào môi trường.

Hiện nay người ta xử lý khói thải của các nhà máy, phân xưởng bằng các chất xúc tác, hấp phụ hoặc trao đổi ion. Nghiên cứu chống khói thải từ xe cộ bằng cách thiết kế bộ xử lý khói trước khi thải vào môi trường, khuyến cáo nông dân không nên đốt các phế thải nông nghiệp mà nên xử lý thành phân bón cho cây trồng. Công nghệ vi sinh vật tham gia vào việc tạo những nhiên liệu mới như cồn, khí gas hoặc tạo năng lượng mặt trời... để giảm thiểu sử dụng các nhiên liệu độc hại và đang cạn kiệt như dầu mỏ, khí đốt.

12.5.2. Khí metan từ rác thải gây ô nhiễm môi trường

Khí gas là sản phẩm của quá trình phân huỷ các chất hữu cơ có trong bãi chôn lấp, thành phần chính trong các chất hữu cơ có trong rác thải tạo thành



Hình 12.8. Mô hình thu nhận khí metan từ phân gia súc bằng lên men kỹ khí

khí ga là xenlulozơ. Thành phần khí gas chủ yếu là metan (bảng 12.14). Người ta thiết kế hệ thống thu nhận metan để làm khí đốt, nhưng phải kiểm soát chặt chẽ bã chôn lấp hợp vệ sinh từ khâu thiết kế ban đầu đến khâu diêu hành

chôn lấp phế thải rất tốn kém. Đối với các bãi thải lớn, lượng metan cũng chỉ tập trung vào giai đoạn đầu theo các giai đoạn phân huỷ từ I đến III (bảng 12.15), còn những giai đoạn sau vì nồng độ khí metan thấp nên việc thu nhận làm nguồn năng lượng không kinh tế.

Nếu sử dụng kỹ thuật hoàn hảo thì cũng chỉ thu nhận được 40% lượng metan sinh ra trong bãi chôn lấp. Đây là nguồn khí gây hiệu ứng nhà kính lớn, theo kết quả nghiên cứu của M. Saburo, 1993, thì một phân tử metan làm nóng Trái Đất lên gấp 20 lần một phân tử khí CO₂.

BẢNG 12.14. THÀNH PHẦN KHÍ GAS
Ở BÃI CHÔN LẤP RÁC THẢI

Thành phần	% thể tích
Metan (CH ₄)	55,5
Cacbon dioxit (CO ₂)	41,2
Nitơ (N ₂)	2,1
Oxy (O ₂)	1,1
Hydro (H ₂)	0,01

BẢNG 12.15. THỜI GIAN CHO CÁC GIAI ĐOẠN PHÂN HUỶ KHÁC NHAU

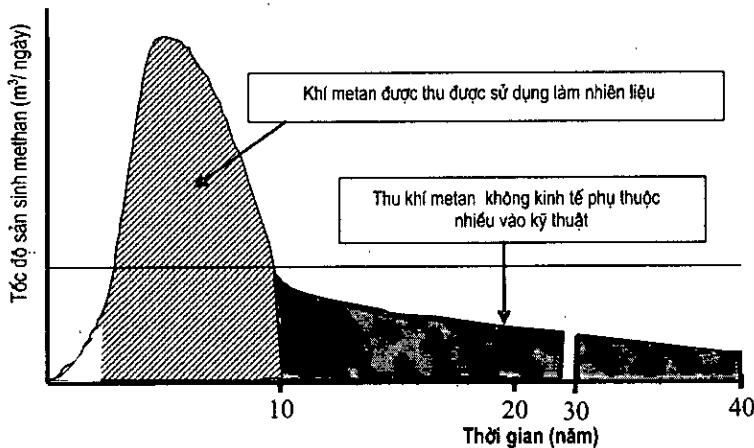
Các giai đoạn	Thời gian
I	Tới 1 tuần
II	1 tháng đến 6 tháng
III	3 tháng đến 3 năm
IV	8 năm đến 40 năm
V	1 năm đến 40 năm
Tổng cộng	10 - 80 năm

12.5.3. Kiểm soát nước thải, khí thải bãi chôn lấp rác thải bằng vi sinh vật khử sunphat

Chôn lấp rác thải là biện pháp được áp dụng từ lâu đời. Biện pháp này đơn giản, dễ thực hiện và có thể thu biogas làm khí đốt. Nhưng nhược điểm

của biện pháp này là tốn diện tích, vì thời gian xử lý thường kéo dài 30 – 40 năm, mà nếu không chôn lấp đúng quy cách còn gây ô nhiễm nguồn nước ngầm và không khí xung quanh bãi chôn lấp. Hơn nữa các nhà khoa học Nhật Bản đã khẳng định, lượng khí CH_4 thải ra rất lớn, nếu có biện pháp thu gom để làm nguồn nhiên liệu cũng chỉ tận thu được 30 – 40%, còn lượng lớn vẫn bay vào không khí. Đây cũng là một nguyên nhân làm cho trái đất nóng lên, vì không những mỗi phân tử CH_4 đốt nóng gấp 20 lần một phân tử CO_2 mà cây xanh lại không sử dụng để tái sản xuất các chất hữu cơ được. Nếu xử lý rác thải bằng biện pháp chôn lấp đúng cách, tránh được hiện tượng trên thì chỉ có xử lý bằng vi sinh vật khử sunphat có xục khí tăng cường nước rác để chuyển sunphit thành sunphat trước khi bổ sung lại bể ủ.

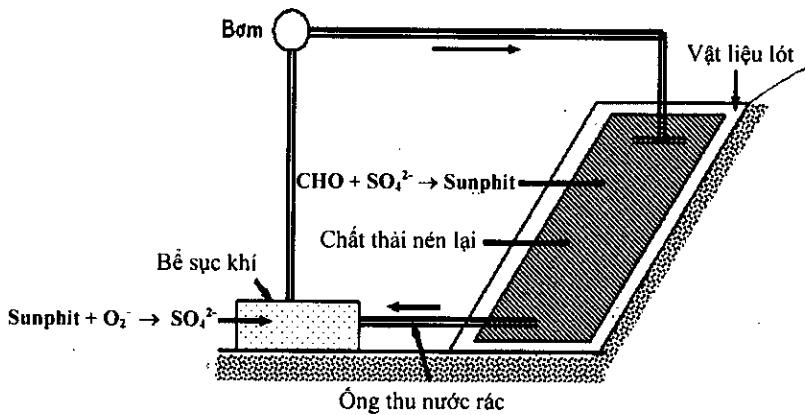
Sơ đồ mô hình chôn lấp rác thải sử dụng vi khuẩn khử sunphat được trình bày trên hình 12.9 và 12.10. Bằng cách này, vừa thúc đẩy nhanh quá trình xử lý gấp 2–4 lần phương pháp lên men metan, vừa bảo vệ được môi trường. Do vậy, ngày nay ở các nước tiên tiến, người ta chỉ sử dụng biện pháp chôn lấp để xử lý các chất vô cơ không đốt được, hoặc rác thải sinh hoạt được ép thành khối làm giảm thể tích, nhằm tiết kiệm diện tích chôn lấp.



Hình 11.9. Tỷ lệ sinh khí metan trong quá trình chôn lấp chất thải ổn định

Quá trình chuyển hóa các chất hữu cơ nhờ vi khuẩn sinh metan (VKSMT) được trình bày ở phương trình (1) và vi khuẩn khử sunphat (VKKSF) ở phương trình (2).

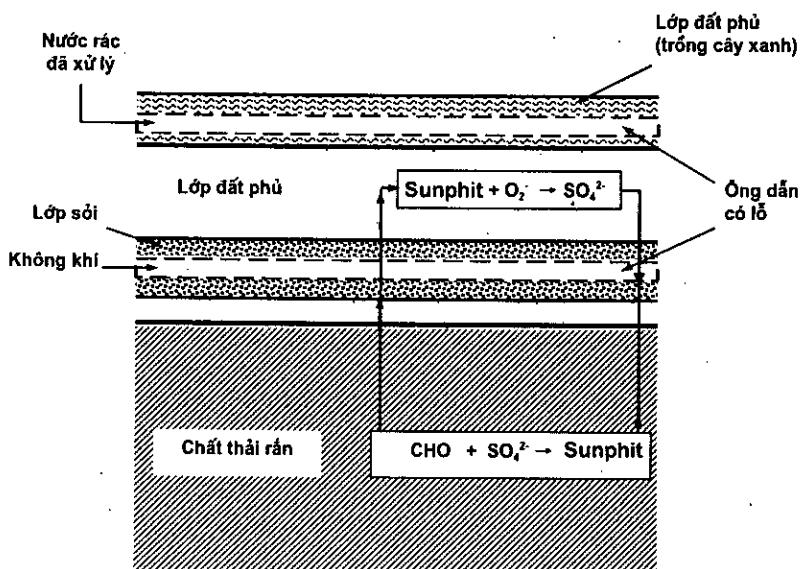




Hình 12.10. Sơ đồ mô tả chôn lấp rác có áp dụng biện pháp kiểm soát sự phát sinh khí metan

Sử dụng vi khuẩn khử sunphat có nhiều ưu điểm hơn vi khuẩn sinh metan như sau:

- 1) VKKSF thích nghi với quá trình biến động nhiệt độ bể ủ hơn VKSMT.
- 2) VKKSF sử dụng các loại cơ chất rộng hơn so với VKSMT, vi khuẩn này chỉ sử dụng axetat, hydro và hydroxit cacbon.



Hình 12.11. Sơ đồ chôn lấp rác thải có kiểm soát metan và tái sử dụng sunphit

3) Sunphit sinh ra trong quá trình khử sunphat trong bể ủ có thể cố định (fix) các kim loại nặng độc (Cd, Cr, Pb, Cu, Fe, Zn, Al) và không cho chúng lan ra môi trường.

4) Gần đây, nhiều nhà nghiên cứu đã công bố quá trình khử sunphat đóng vai trò quan trọng trong việc phân huỷ nhiều chất gây ô nhiễm vi thể như PAHs, PCP và dioxin.

5) Nhiều loại vi khuẩn khử sunphat có hoạt tính phân giải xenlulozơ mạnh.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 12

1. Xử lý nước thải, chất thải bằng biện pháp sinh học là các phương pháp xử lý môi trường hỗn hợp nhiều chất ô nhiễm. Biện pháp này nên sử dụng một chủng vi sinh vật, một số chủng của một chi (giống) vi sinh vật, một tập hợp chủng có hoạt tính phân giải hay sử dụng riêng rẽ các chủng?
2. Xử lý chất thải bằng phương pháp ủ hiếu khí thì không phụ thuộc nhiều vào yếu tố nào sau đây: Độ ẩm môi trường, nhiệt độ không khí, ánh sáng và khả năng cung cấp oxy không khí?
3. Để tăng cường quá trình xử lý nước thải, người ta thường kiểm tra tỷ lệ C : N : P : K có trong chất thải để điều chỉnh môi trường lên men xử lý thích hợp. Tỷ lệ nào sau đây là tỷ lệ các chất trong môi trường xử lý kỵ khí?
4. Các chất nào được coi là chất thải?
5. Trong chất thải thực vật, thì chất nào là chất tạo nên độ cứng của gỗ và khó phân giải nhất?
6. Trong quá trình xử lý rác thải bằng phương pháp ủ hiếu khí, sản phẩm lên men chính nhất là chất nào?
7. Các phương pháp: Thủ khả năng nảy mầm của hạt cải dưới tác động của mùn; thủ khả năng nảy mầm và sự phát triển của rễ mầm của hạt lúa dưới tác động của mùn; xác định khả sinh trưởng, phát triển của cây mạ dưới tác động của mùn và đánh giá liều độc LD50 của mùn, phương pháp nào không phải là phương pháp thường dùng để đánh giá chất lượng mùn rác sau khi ủ làm phân bón hữu cơ?
8. Để đánh giá chất lượng nước thải ô nhiễm các chất hữu cơ có khả năng phân giải bằng biện pháp sinh học, người ta dựa vào chỉ tiêu nào sau đây là chính: (a) COD; (b) BOD; (c) NOD; (d) TS (Chất rắn tổng số)?
9. Trong xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học, người ta quan tâm đến tỷ lệ giữa COD và BOD trong nước thải, loại nước thải có tỷ lệ

BOD/COD bằng: 3/4; 2/3; 1/2 và 1/3, tỷ lệ nào không nên xử lý bằng biện pháp sinh học?

10. Quá trình làm sạch nước thải bằng biện pháp sinh học là phương pháp tự nhiên và phương pháp tăng cường. Phương pháp nào sau đây: (a) Tự xử lý ở ngoài đồng ruộng; (b) Lọc qua đồng cỏ; (c) Bùn hoạt tính có sục khí và (d) Tự làm sạch trong các ao hồ sinh học, là phương pháp tăng cường?
11. Trong bùn hoạt tính chất lượng cao thì cứ 1 triệu tế bào vi khuẩn có 10–15 tế bào protozoa. Tỷ lệ này được gọi là hệ số Protozoa, ký hiệu là kp. Sự có mặt của các loài động vật nguyên sinh không có tác động nào sau đây: (a) tăng cường khả năng phân tán của bùn hoạt tính; (b) tăng cường quá trình làm sạch nước thải giàu các hợp chất hữu cơ; (c) làm tăng khả năng kết lắng bùn và (d) tăng cường loại bỏ các vi sinh vật gây bệnh?
12. Bể hiếu khí có cấu tạo như nồi lén men thông thường, song quá trình lén men xử lý nước thải bằng phương pháp bùn hoạt tính có sục khí thường theo chế độ lén men nào?
13. Đặc điểm nào sau đây: (a) Thành phần vi sinh vật là giống thuần khiết; (b) Thành phần vi sinh vật không phải là giống thuần khiết; (c) Thành phần vi sinh vật là một quần thể vi sinh vật không thuần khiết; và (d) Sinh khối thu nhận chỉ là tế bào sống, là đặc điểm của hệ thống xử lý bùn hoạt tính khác so với lén men thông thường trong công nghiệp?
14. Quá trình xử lý nước thải bằng bùn hoạt tính, các chất hữu cơ không được phân hủy đến các sản phẩm cuối nào sau đây: CO₂, CH₄, Khoáng chất hay sinh khối vi sinh vật mới?
15. Nhận định nào sau đây: (a) Là phương pháp xử lý có công nghệ thấp và giá thành rẻ, (b) Là phương pháp xử lý có hiệu suất cao, (c) Là quá trình xử lý diễn ra giống như lén men khí và (d) Thời gian xử lý dài và diện tích đất sử dụng lớn, không phải là nhận định về quá trình xử lý nước thải bằng ao hồ sinh học?

Chương 13

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT NHIÊN LIỆU SINH HỌC

13.1. SỰ PHÁT SINH NHIÊN LIỆU SINH HỌC

13.1.1. Quang hợp – nguồn năng lượng cơ bản

Tổng kinh tế thế giới đạt được hiện nay phụ thuộc vào các nhiên liệu hoá thạch: than đá, dầu và khí tự nhiên. Nhu cầu này ngày càng tăng. Trong đó, 93% nhiên liệu hoá thạch của thế giới sử dụng để sản xuất năng lượng, chỉ có 7% sử dụng để sản xuất công nghiệp các dung môi, chất dẻo và là nguyên liệu chính để sản xuất các chất hữu cơ khác.

Việc làm cạn kiệt năng lượng hoá thạch của thế giới ngày càng tăng. Do đó, con người đang quan tâm đến các nguồn năng lượng khác như năng lượng hydro, thuỷ triều, sóng và gió; thu nhận năng lượng ánh sáng mặt trời và nhiệt địa và rất sai lầm, nhưng có ý nghĩa nhất là năng lượng hạt nhân. Tuy vậy, không còn nghi ngờ rằng, nguồn nhiên liệu hoá thạch sẽ cạn kiệt trong tương lai không xa.

Hiện nay, giá trị của các hệ thống năng lượng sinh học nhờ sự tiến bộ của công nghệ sinh học đã mang lại giá trị kinh tế thật sự cho các quá trình lựa chọn. Sinh khối như chất thải của rừng, nông nghiệp và chăn nuôi cũng như chất thải công nghiệp và chất thải sinh hoạt có thể chuyển hoá nhờ các quá trình hoá lý và/hoặc lên men thành nhiên liệu sạch và các sản phẩm thay thế hoá dầu. Nguồn nhiên liệu hoá thạch cạn kiệt và trở nên đắt đỏ, việc chuyển hoá các chất thải hữu cơ thành nhiên liệu lỏng trở nên hấp dẫn và kinh tế hơn.

Các cơ thể quang hợp cả ở dưới biển và trên đất liền được xem là cơ thể chuyển hoá năng lượng mặt trời và có thể phục hồi lại được. Sự quang hợp của cây xanh chỉ cố định được khoảng 2×10^{11} tấn cacbon chứa năng lượng khoảng 2×10^{21} Jun mà nó cho là gấp 10 lần nhu cầu năng lượng của thế giới và 200 lần nhu cầu năng lượng thực phẩm của con người hằng năm. Phần lớn cường độ và vai trò của quang hợp trở nên không có giá trị khi chúng ta chỉ sử dụng một tỷ lệ nhỏ nguồn cacbon cố định. Thực vậy, sinh khối từ quang hợp còn tồn tại nhiều ở dạng vốn có của nó trong tự nhiên mà không được chuyển hoá thành nhiên liệu dự trữ và thực phẩm chế biến như cồn và khí metan. Hiệu quả hữu hiệu của việc thu nhận năng lượng mặt trời

nhờ cây xanh mới chỉ đạt 3-4% mà các loại cây quang hợp hữu hiệu hơn là cây ngô, lúa miến (một loại kê), đặc biệt là cây mía có hiệu suất cao nhất.

Cuộc khủng hoảng năng lượng hiện nay trên thế giới làm cho chúng ta quan tâm hơn nữa đến năng lượng tự nhiên không phải từ nhiên liệu hoá thạch. Để tăng cường công nghiệp hoá, các nước chậm phát triển đang bị áp lực về phát triển cả kinh tế và thương mại nên cần quan tâm đến việc phát triển các nguồn năng lượng mới. Sinh khối có thể được xem là nguồn năng lượng có thể tái tạo và có thể được chuyển hoá thành, hoặc là năng lượng trực tiếp sử dụng, hoặc các hợp chất mang năng lượng bằng cách đốt trực tiếp, các hệ thống phân huỷ khí khí, chưng cất phân giải cấu trúc, hoá lỏng, thuỷ phân hoá học và thuỷ phân sinh hoá.

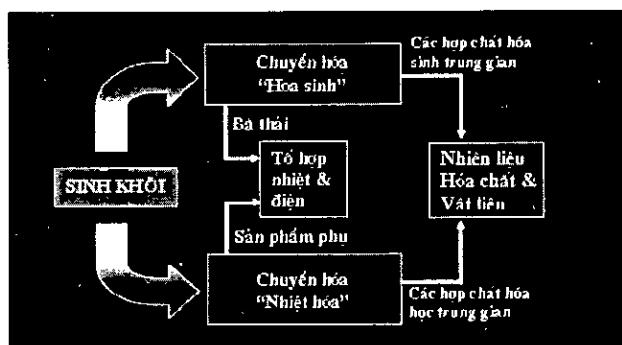
13.1.2. Các nguồn sinh khối

Có ba hướng cơ bản để cung cấp sinh khối, có thể thực hiện như trình bày trên hình 13.1.

(1) Cây trồng còn được gọi là "cây trồng năng lượng".

(2) Cây cỏ tự nhiên.

(3) Chất thải nông nghiệp và các chất thải khác.



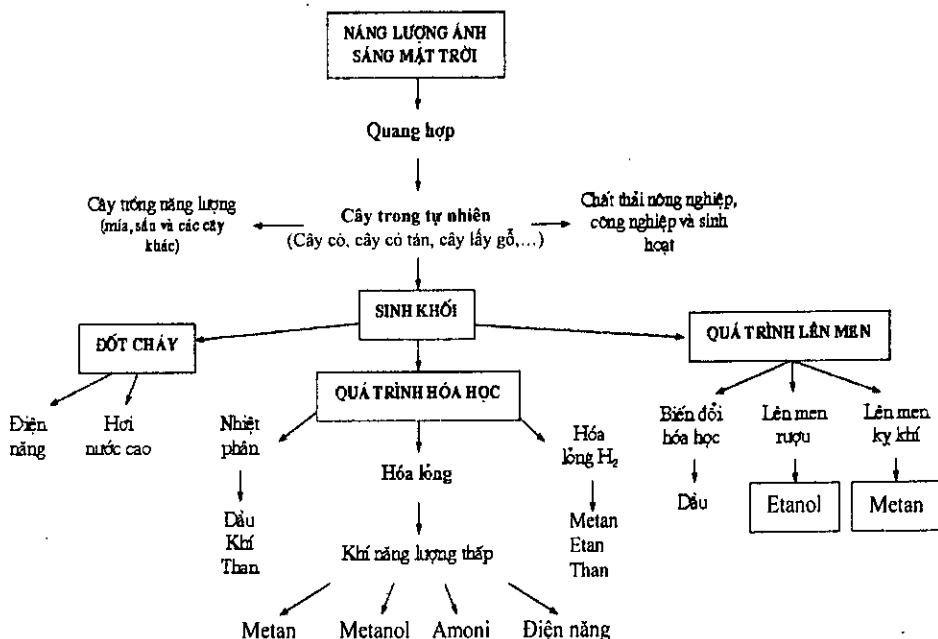
Hình 13.1. Sơ đồ chuyển hóa sinh khối thành năng lượng và nguyên liệu chế biến

Nguồn năng lượng để tạo nên sinh khối là năng lượng mặt trời.

Chuyển hóa sinh khối thành nhiên liệu hữu dụng có thể thực hiện bằng cả biện pháp sinh học hoặc bằng biện pháp hoá học, hoặc kết hợp cả hai biện pháp. Sản phẩm chính cuối cùng của cả hai biện pháp là metan và etanol, nhưng các sản phẩm khác cũng có và phụ thuộc vào sinh khối ban đầu và quy trình sử dụng, ví dụ : nhiên liệu rắn, hydro, khí năng lượng thấp, metanol và các hydrocacbon mạch dài hơn (hình 13.2).

Khái niệm sinh khối cây trồng năng lượng là sinh khối dùng để cung cấp năng lượng dựa trên thực tế là sự cố định cacbon hiệu suất cao hơn so với việc thu gom từ tự nhiên hoặc chất thải nông nghiệp hoặc công nghiệp. Hiện nay ở nhiều nước đã xây dựng chương trình trồng những loại cây cho năng lượng cao mà trong đó cây mía và cây sắn đang được phát triển mạnh (trước

hết để sản xuất etanol) ở Brazil, Australia và Nam Phi, hoặc các cây cho nhiều lignoxenlulozơ cũng đang được phát triển ở Thụy Điển và Mỹ. Sau đó, người ta quan tâm đến việc trồng cây phát triển rừng để chuyển hóa thành nhiên liệu lỏng. Phân tích giá cả của tất cả các quá trình này đều đáng khích lệ phát triển, nhưng trong trường hợp cụ thể thì hiện nay người ta quan tâm nhất là cây mía.

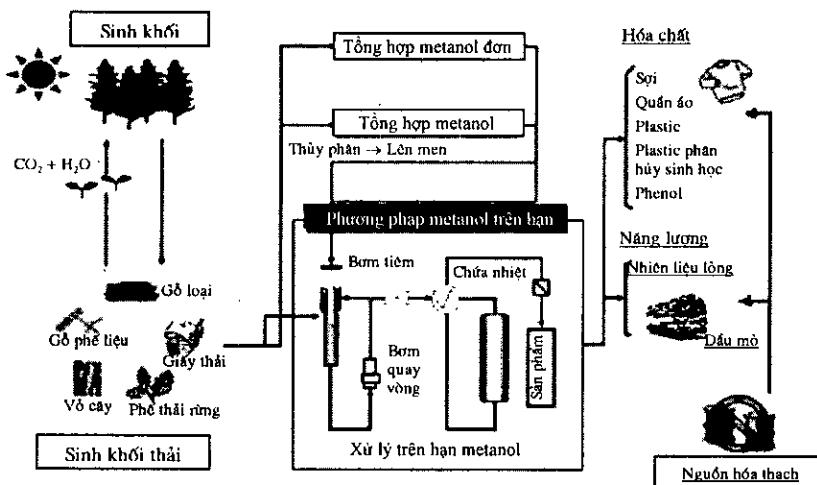


Hình 13.2. Sự chuyển hóa sinh khối thành năng lượng

Việc phát triển trồng cây để tạo để sinh khối cây trồng năng lượng còn phụ thuộc rất nhiều yếu tố như khí hậu, vị trí địa lý của mỗi quốc gia, tuy nhiên, hầu hết các quốc gia rất quan tâm phát triển nhiên liệu sinh học từ chất thải hữu cơ như chất thải nông nghiệp, chất thải sinh hoạt và chất thải công nghiệp. Chuyển hóa sinh khối thành nhiên liệu sinh học một mặt thay thế nguồn năng lượng từ dầu mỏ, mặt khác nhằm cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp chế biến.

Vấn đề kỹ thuật chuyển hóa sinh khối thành nhiên liệu sinh học còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có mức độ ẩm và sự phức tạp của sinh khối. Với nguyên liệu có hàm lượng nước cao, thường người ta sử dụng quá trình nước để không cần sấy khô cơ chất như quá trình lên men rượu thành etanol và phân huỷ khí thành metan cũng như khử hoá học thành hydrocacbon

có dầu. Còn các nguyên liệu có độ ẩm thấp như gỗ, rơm rạ và bã mía có thể đốt thu nhiệt tạo điện năng; dùng các quá trình nhiệt hoá như hoá lỏng và nhiệt phân để sản xuất các hợp chất giàu năng lượng như dầu khí, dầu lỏng và cuối cùng là metanol và amoni; hoặc có thể xử lý bằng cách thuỷ phân kiềm hoặc thuỷ phân sinh học để sản xuất các nguyên liệu dự trữ sử dụng chuyển hoá năng lượng sinh học sau đó (hình 13.2). Ngoài ra, từ nguyên liệu là phế liệu, các sản phẩm gỗ, người ta đã chuyển hoá thành nhiên liệu lỏng và các hoá chất sử dụng trong công nghiệp bằng phương pháp hoá học (phương pháp metanol trên hạn) được trình bày trên hình 13.3.

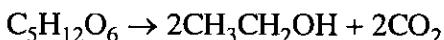


Hình 13.3. Chuyển hoá hóa học sinh khối gỗ bằng metanol trên hạn thành nhiên liệu lỏng và các chất hóa học sử dụng trong công nghiệp.

Trong khi dự trữ dầu mỏ giảm nhanh và công nghiệp hiện đại thật sự còn chưa có năng lực thay đổi nhiên liệu thay thế thì không còn hy vọng nào khác là đặt niềm tin vào việc thu nhận nhiên liệu thay thế từ sinh khối. Chính vì vậy, một số phương pháp luận cần được kiểm chứng.

13.1.3. Công nghệ sản xuất nhiên liệu sinh học từ sinh khối

Sản xuất rượu (cồn) bằng phương pháp lên men đường và tinh bột đã có từ xa xưa và nó được xem như là một trong những quá trình lên men vi sinh vật đầu tiên mà con người sử dụng để sản xuất các sản phẩm lên men truyền thống. Quá trình chuyển hoá được tóm tắt bằng phản ứng sau:



Sản xuất cồn công nghiệp bằng phương pháp lên men được thực hiện bằng 2 giai đoạn: lên men chuyển hoá đường thành rượu và chưng cất thành cồn có nồng độ etanol cao.

Hiện nay, sản xuất cồn công nghiệp được thực hiện bằng phương pháp tổng hợp hoá dầu, nghĩa là không sử dụng vi sinh vật. Etanol được tổng hợp bằng phương pháp hoá dầu được sản xuất bằng cách hydrat hoá etylen từ những năm 1940. Trong khoảng 20 năm phát triển cracking dầu mỏ ở cấp độ lớn thì quá trình sản xuất etanol bằng phương pháp lên men hầu như bị lãng quên. Ở các nước phát triển, cồn được sản xuất bằng biện pháp hoá học, còn ở những nước chậm phát triển, nguyên liệu thô rẻ cho nên etanol vẫn được sản xuất bằng kỹ thuật lên men truyền thống.

Trong khi lợi ích của etanol được xem là nhiên liệu sạch, không sinh cacbon monoxit độc hại trong quá trình đốt, ít gây ô nhiễm hơn so với nhiên liệu thông thường và hiện nay, quá trình lên men sản xuất etanol hiện nay rẻ hơn sản xuất từ dầu mỏ bằng phương pháp hoá học. Bằng cách này, sử dụng etanol làm nhiên liệu thay thế dầu mỏ ở các nước công nghiệp sẽ kinh tế hơn khi giá dầu ngày càng tăng.

Quy trình công nghệ chuyển hoá sinh khối thành nhiên liệu sinh học còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có mức độ ẩm và sự phức tạp của sinh khối, đặc biệt là vấn đề kỹ thuật. Nhìn chung, quá trình công nghệ phải thuỷ phân hydratcacbon thành đường đơn như glucozơ, xylozơ, sau đó thực hiện quá trình lên men chuyển hoá thành nhiên liệu sinh học. Tuy vậy, không phải các hợp chất hydratcacbon đều dễ dàng thuỷ phân được bằng enzym, ví dụ như các hợp chất lignoxenlulozơ trong gỗ thường rất khó phân huỷ và thường được phân giải nhờ thuỷ phân kiềm. Do vậy, trong giai đoạn tiền xử lý các chất khó phân giải này, người ta thường sử dụng axit để thuỷ phân (xem chi tiết ở phần 13.2).

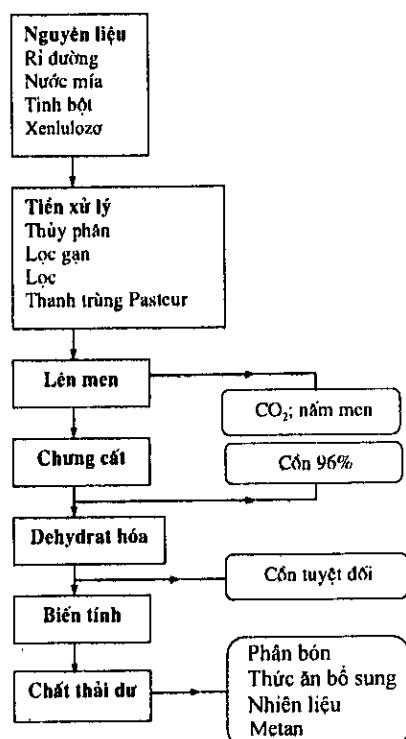
Hơn nữa, trong quá trình lên men rượu chuyển hoá đường thành etanol (xem mục 6.2, chương 6 của giáo trình này), trong các chủng nấm men sử dụng trong lên men rượu thì *Saccharomyces cerevisiae* không có khả năng chuyển hoá đường pentozơ (thường gọi là đường 5) có nhiều trong hemi-xenlulozơ, chất này có trong sinh khối. Chính vì vậy, nếu muốn sử dụng các loại đường pentozơ chuyển hoá thành nhiên liệu sinh học, người ta phải thực hiện quá trình lên men kỹ khí tạo metan hoặc tạo chủng vi sinh vật có thể lên men sản xuất etanol bằng công nghệ ADN tái tổ hợp.

Các hợp chất hydratcacbon trong sinh khối thô có ưu điểm là có thể chuyển hoá được thành etanol sinh học (chủ yếu) và hydro, phần còn lại không chuyển được thành etanol sẽ chuyển thành khí metan (khí biogas). Khoảng 15% nguyên liệu đâu vào không chuyển thành nhiên liệu sinh học được tách ra ngoài ở dạng chất rắn và có thể làm nhiên liệu để đốt, hoặc là có thể tái sử dụng trong phân xưởng tiền xử lý cùng với nguyên liệu thô ban đầu.

Như vậy, quá trình sản xuất etanol nhiên liệu từ đường và tinh bột bằng phương pháp lên men đơn giản và đã được nghiên cứu triển khai trong sản xuất công nghiệp. Hiệu suất lên men sản xuất phụ thuộc vào chủng giống có hiệu suất cao và chịu được nồng độ cồn trong dịch lên men cao, nhằm tiết kiệm dung tích lên men. Để etanol có thể sử dụng làm nhiên liệu thay thế xăng dầu, thường người ta phải tinh chế để tạo cồn sạch không chứa nước, thường nồng độ cồn phải đạt 99,95% (hình 13.4).

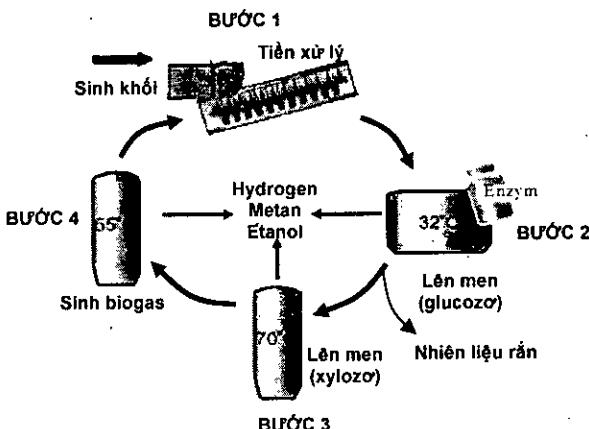
Tuy nhiên, sản xuất nhiên liệu sinh học từ sinh khối khó phân giải như phế liệu gỗ chứa nhiều lignoxenlulozơ thường khó tận thu được etanol cao, vì phân giải chúng thành đường khó thực hiện, hơn nữa, những loại đường pentozơ không thể lên men chuyển hoá trực tiếp thành đường. Chính vì thế, sau khi lên men, chất thải dư rất lớn. Người ta tiếp tục nghiên cứu để chuyển hoá thành: (1) cô đặc làm thức ăn bổ sung hay phân bón hữu cơ; (2) khoáng hoá thành tro; (3) lên men ky khí tái sinh metan và (4) chuyển hoá thành SCP (protein đơn bào) nhờ vi sinh vật.

Sau đây, xin giới thiệu một số điểm mới trong quá trình công nghệ sản xuất nhiên liệu sinh học từ chất thải giàu hydratcacbon của Công ty BioGassol. Quá trình sản xuất cũng bao gồm các bước sau: 1. Tiền xử lý; 2.



Hình 13.4. Lưu đồ sản xuất etanol

Thuỷ phân; 3. Lên men và 4. Phân huỷ khí khép kín (hình 13.5). Tuy vậy, trong từng giai đoạn có những điểm mới cần chú ý. Công nghệ này đã được thử nghiệm ở mức độ pilot tại DTU (dự án Maxifuels) và được áp dụng đại trà năm 2007.



Hình 13.5. Sơ đồ quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học từ chất thải giàu hydratcacbon (theo Cty BioGasol)

Các bước: 1. Tiên xử lý; 2. Thuỷ phân; 3. Lên men và 4. Phân hủy khí khép kín.

Các bước tiến hành cụ thể như sau:

Bước 1. Tiên xử lý. Quá trình tiên xử lý sử dụng phương pháp mới gọi là gây nổ ướt (wet explosion), nghĩa là sinh khối được cắt vụn và trộn với nước tạo thành bùn nhão và được chỉnh pH 6,7 đến 7,3 tùy theo loại sinh khối, sau đó nâng áp suất và nhiệt độ lên cao (170–200°C) bằng hơi nước có cấp oxy. Kết quả sinh khối được bung ra do oxy hoá ướt được thực hiện ở nhiệt độ cao và áp suất cao. Phương pháp tiên xử lý mà BioGasols sử dụng không cần bổ sung hoá chất và chỉ một lượng nhỏ oxy. Phương pháp này rất có hiệu quả đối với sinh khối nguyên liệu như rơm rạ, thân cây ngô, cây mía và các vật liệu gỗ. Đây là phương pháp xử lý sơ bộ mới hiệu quả nhất so với các quá trình xử lý sơ bộ khác trên thị trường cả về hiệu suất và giá thành các loại đường tạo thành.

Bước 2. Thuỷ phân và lên men glucozo. Để làm tăng thuỷ phân các nguyên liệu sinh khối đã xử lý sơ bộ, người ta sử dụng enzym trong quá trình thuỷ phân hydratcacbon thành đường và lên men thành rượu etanol. Để hạ giá thành, công ty BioGasol đã sản xuất enzym tại nhà máy bằng một chủng nấm (hợp tác với hãng Novozymes A/S). Sản phẩm chủ yếu của quá trình thuỷ phân là glucozo và xylozo. Glucozo được lên men đồng thời thành

etanol nhờ nấm nem. Sau khi kết thúc lên men rượu, nhờ quá trình tác động của hơi nước tạo thành 2 phần chất rắn và lỏng. Dịch lỏng được chuyển qua lên men trong nồi lên men xylozo.

Bước 3. Lên men xylozo. Nhiều loại sinh khối và phế thải nông nghiệp chứa 10–40% xylozo trong tổng số các hydratcacbon, do đó xylozo là đường đơn đứng thứ hai sau glucozo. Tuy nhiên, lên men xylozo là bước chủ yếu hướng tới việc hạ giá thành sản xuất etanol từ sinh khối chứa nhiều lignoxenlulozo. Lên men xylozo được thực hiện trong nồi phản ứng “cố định” ở 70°C. Ở đây, Cty BioGasol chuyển pentose thành cồn sinh học nhờ vi khuẩn kỵ khí ưa nhiệt, nó có thể chuyển hoá cả hexozơ và pentozơ thành etanol hoặc etanol/ hydro. Bước này là quá trình chuyển hoá duy nhất chỉ có ở công ty BioGasols.

Bước 4. Sản sinh biogas và khép kín quá trình nước. Sau khi lên men sản xuất etanol, phần còn lại chủ yếu các chất hữu cơ. Các chất còn lại này được phân giải nhờ lên men kỵ khí để tạo thành metan được sử dụng làm nhiên liệu sinh học. Tuy nhiên, quá trình ủ kỵ khí dài, đổi lại tận thu được nguồn năng lượng. Ngược lại, với quá trình xử lý chất thải bằng phương pháp hiếu khí, quá trình xử lý kỵ khí có lợi là do tái sử dụng được quá trình ngâm và cân bằng năng lượng dư của quá trình xử lý chất thải. Chắc chắn thu nhập từ quá trình sản xuất metan sẽ thấp hơn rất nhiều so với sản xuất etanol, nhưng rất có ý nghĩa là khép kín trong quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học từ sinh khối.

13.2. CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT ETANOL NHIÊN LIỆU TỪ SINH KHỐI

13.2.1. Tình hình sản xuất etanol nhiên liệu

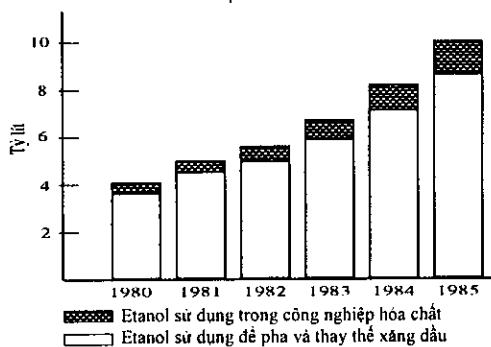
Với lý do các nhiên liệu hoá thạch sớm muộn cũng sẽ cạn kiệt và việc sử dụng các nguồn nhiên liệu dầu mỏ quá lớn đã ảnh hưởng đến bầu không khí của Trái Đất gây hiệu ứng nhà kính, ảnh hưởng đến đời sống của con người, nhiều quốc gia và tập đoàn năng lượng lớn trên thế giới đã có chiến lược sử dụng tiết kiệm có hiệu quả dầu mỏ và dầu tư nghiên cứu sử dụng các dạng nhiên liệu sạch thay thế một phần dầu mỏ, trong đó có nhiên liệu sinh học (xăng pha etanol và diesel sinh học).

Trong lịch sử, trước Chiến tranh Thế giới thứ II, người ta đã có ý tưởng sử dụng etanol và metanol làm nhiên liệu cho các động cơ, loại xe hơi Henry Ford T được thiết kế để sử dụng rượu, xăng dầu hoặc hỗn hợp giữa xăng và rượu để chạy.

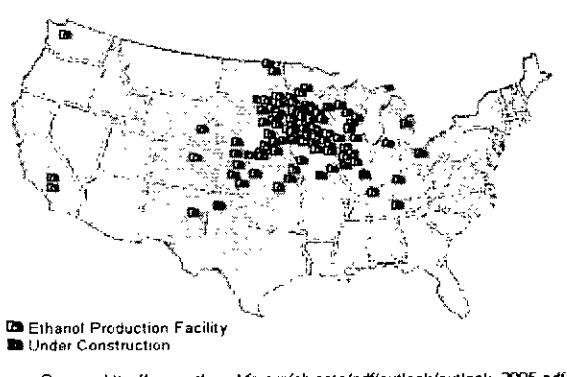
Brazil là quốc gia sản xuất và sử dụng etanol sinh học lớn nhất thế giới. Người ta đã sử dụng các quá trình công nghệ sinh học lớn để nghiên cứu trồng và chuyển hoá cây mía và cây sắn thành etanol nhờ lên men nấm men. Ngay từ năm 1975, Chính phủ Brazil đã thực thi chương trình Proalcool và trở thành hình mẫu cho nhiều quốc gia học tập để phát triển nhiên liệu sinh học. Chương trình sản xuất etanol của Brazil được trình bày trên hình 13.6. Ngay trong những năm 80 của thế kỷ trước, ở Brazil đã sản xuất được gần $4 \times 10^6 \text{m}^3$ etanol. Quốc gia này hiện có trên 60.000 đồn điền trồng mía với 6,5 triệu ha và trên 300 nhà máy sản xuất đường, từ đó đã sản xuất etanol nhiên liệu dùng trong nước và xuất khẩu (tương đương 220.000 thùng dầu/ngày), hàng năm tiết kiệm được trên 2 tỷ USD chi phí cho việc nhập xăng dầu.

Mỹ là quốc gia tiêu thụ năng lượng nhiều nhất thế giới, sự thiếu hụt cán cân thương mại năng lượng lên trên 80 tỷ USD và cũng phát triển các sản phẩm sinh học nhằm thay thế một phần dầu mỏ. Hàng năm Mỹ cũng đã sản xuất trên 13 triệu m^3 cồn nhiên liệu (hình 13.7). Thậm chí một số quốc gia phát triển khác như Australia, Thụy Điển và Pháp cũng quan tâm đến các quy trình sản suất rượu cồn sinh học bằng cách sử dụng, hoặc chất thải nông nghiệp, hoặc chất thải lâm nghiệp lớn.

Trung Quốc cũng là nước sản xuất etanol nhiên liệu đứng thứ 3 thế giới, hàng năm sản lượng etanol tăng trên 3,5 triệu m^3 . Nhiều nước khác như Ấn Độ, Thái Lan, Indonesia, Australia,... cũng đẩy mạnh nghiên cứu, sản xuất và sử dụng etanol nhiên liệu.



Hình 13.6. Chương trình etanol của Brazil



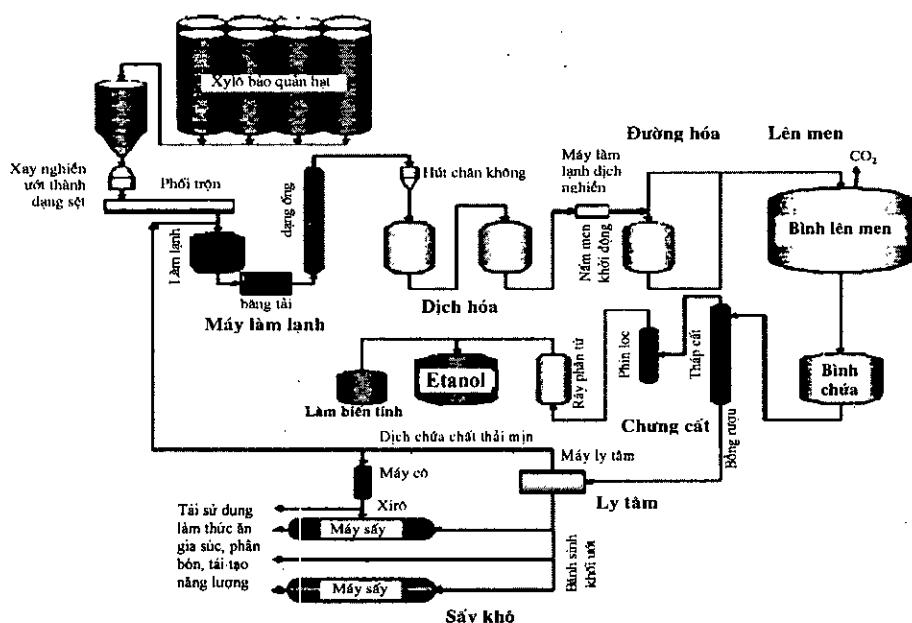
Hình 13.7. Các địa điểm sản xuất etanol ở Mỹ

13.2.2. Công nghệ sản xuất etanol từ đường mía và tinh bột

Quá trình công nghệ lên men sản xuất etanol từ đường hoặc rỉ đường mía cũng như từ bột sắn đã được đề cập trong chương 5 của giáo trình này. Do đó trong phần này không nhắc lại các quá trình lên men Tuy nhiên, trên các nguyên liệu ban đầu khác nhau, quy trình công nghệ cũng có những điểm khác nhau. Hình 13.8 mô tả quá trình công nghệ lên men sản xuất cồn nhiên liệu từ ngô hạt ở Mỹ.

Quá trình sản xuất cồn nhiên liệu từ tinh bột và đường cũng cần lưu ý một số điểm sau:

- Lên men trực tiếp từ rỉ đường là quá trình có thể lên men trực tiếp nhờ nấm men tạo thành etanol, còn từ bột sắn phải nhờ quá trình hồ hoá và thuỷ phân bằng enzym, tốt nhất là các chế phẩm amylaza chịu nhiệt.
- Lựa chọn chủng nấm men có khả năng chuyển hoá và chịu được độ cồn cao, vừa tiết kiệm được thời gian lên men, vừa tiết kiệm được thời gian thu hồi (chưng cất) nhằm hạ giá thành sản phẩm.
- Tận thu dịch hèm làm phân bón hữu cơ, thức ăn bổ sung cho chăn nuôi hoặc sử dụng các phương pháp lên men kỹ tạo metan.



Hình 13.8. Sơ đồ quá trình sản xuất cồn nhiên liệu từ ngô hạt

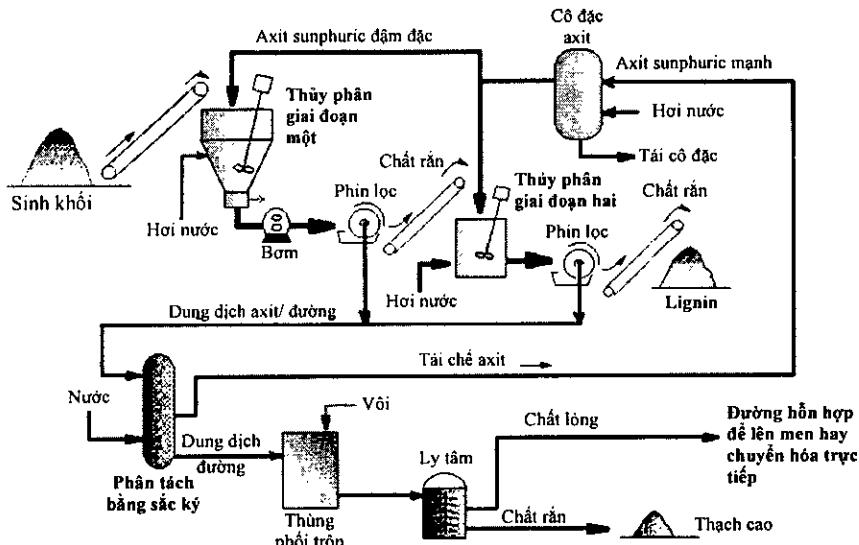
13.2.3. Công nghệ sản xuất etanol từ sinh khối

Công đoạn chủ yếu mang tính quyết định trong việc sản xuất etanol từ sinh khối là công đoạn tiền xử lý để thuỷ phân nguyên liệu thành đường. Còn quá trình sản xuất etanol bằng men thì được thực hiện như đã trình bày ở mục 6.2.

Hiện nay, có hai cách chính để thuỷ phân là thuỷ phân bằng axit và thuỷ phân bằng enzym. Phương pháp thuỷ phân bằng axit đã có từ lâu và vẫn được sử dụng rộng rãi cho đến hiện nay, tuy phương pháp sử dụng axit thường ổn định và khó có thể nghiên cứu hạ được giá thành. Còn hiện nay, phương pháp thuỷ phân sử dụng enzym thì giá thành enzym vẫn cao khó áp dụng được vào thực tế. Nhờ tiến bộ của công nghệ sinh học, công việc nghiên cứu nhằm tạo chế phẩm có hoạt lực cao và hạ giá thành chế phẩm enzym đang được quan tâm. Ngày nay, nhờ thành công của công nghệ, giá thành enzym của hãng Novoenzym ngày càng giảm. Từ năm 2000 đến 2004, giá enzym xylanlaza sử dụng trong công nghệ sản xuất cồn bằng enzym đã giảm xuống 10 lần, hy vọng giá sẽ còn giảm nữa thì việc ứng dụng enzym này mới thể thực hiện được.

a) Thuỷ phân bằng axit

Phương pháp thuỷ phân sinh khối bằng axit được chia làm 2 loại: thuỷ phân bằng axit đặc và thuỷ phân bằng axit loãng.



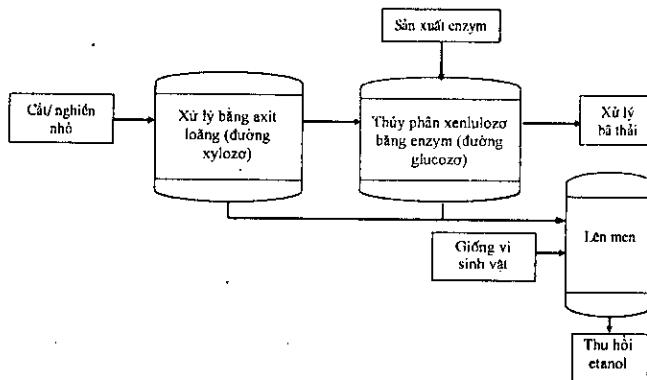
Hình 13.9. Lưu đồ chuyển hóa xenlulozơ/hemixenlulozơ thành hỗn hợp đường bằng cách thuỷ phân axit đặc của Arkenol

Công nghệ thuỷ phân bằng axit dựa trên việc sử dụng axit đặc để phá huỷ cấu trúc tinh thể của xenlulozo, sau đó có thể thuỷ phân bằng axit loãng. Tuy nhiên, công đoạn tách chiết axit khỏi đường, thu hồi và cô đặc axit là công đoạn mấu chốt của quy trình. Sau khi đã bị phá vỡ cấu trúc, xenlulozo sẽ hình thành dạng gel và dễ dàng bị thuỷ phân. Dưới tác dụng của nhiệt, xenlulozo sẽ nhanh chóng bị chuyển hoá thành glucozo.

– Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất etanol điển hình bằng cách thuỷ phân sinh khối bằng axit mạnh được trình bày trên hình 13.9. Quy trình này do Arkenol (Mỹ) đề xuất và được áp dụng ở mức độ công nghiệp hiện nay.

Trong quy trình này, sinh khối giàu ligno-xenlulozo có hàm ẩm 10% được xử lý bằng axit sunphuric nồng độ 70–80%. Tỷ lệ axit sử dụng so với sinh khối là 1,23 : 1 và nhiệt độ giữ ở mức 50°C. Sau đó bổ sung nước để pha loãng axit đến 20–30% và nâng nhiệt độ lên 100°C và giữ ở nhiệt độ này khoảng 1 giờ. Quá trình thuỷ phân diễn ra tạo dạng gel, dịch gel lấy ra khỏi bể phản ứng và lọc ép để thu nhận dịch đường và axit. Chất rắn còn lại có thể tái thuỷ phân lần thứ hai. Sau đó dịch đường và axit được phân tách bằng cột sắc ký. Dịch đường được trung hoà và chuyển sang giai đoạn lên men để thu nhận etanol. Điều quan trọng là khâu thu hồi axit. Theo Arkenol, người ta đã nghiên cứu thu hồi được 97% lượng axit sử dụng.

– Sơ đồ quy trình công nghệ sản xuất etanol điển hình bằng cách thuỷ phân sinh khối bằng axit loãng được trình bày trên hình 13.10. Quy trình này do Scholler (Đức) đề xuất và được áp dụng ở mức độ công nghiệp hiện nay.



Hình 13.10. Sơ đồ tóm tắt quá trình sản xuất cồn từ lignoxenlulozo bằng enzym

Quá trình thuỷ phân được thực hiện bằng hai giai đoạn: Giai đoạn đầu được thực hiện ở nồng độ axit thấp (ôn hoà) để thuỷ phân hemixenlulozo,

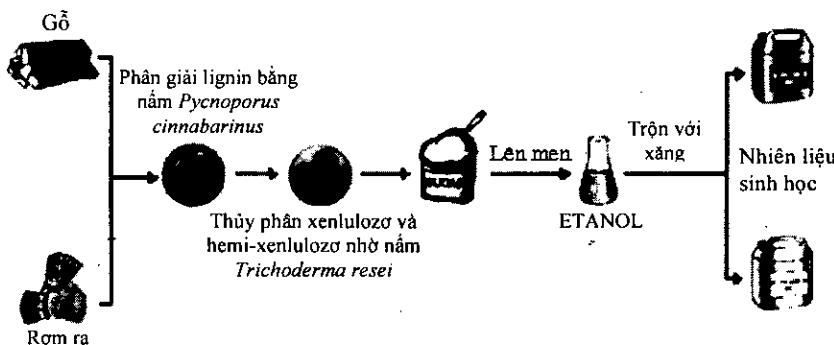
còn giai đoạn sau xử lý ở nồng độ axit cao hơn để thuỷ phân xênlulozơ dạng polyme bền vững hơn.

Trong giai đoạn đầu, nguyên liệu được xử lý bằng dung dịch axit sunphuric 0,7% ở nhiệt độ 190°C với thời gian lưu là 3 phút. Sau đó lọc lấy dịch thuỷ phân, phần chất rắn còn lại tiếp tục xử lý với dung dịch axit 4% ở nhiệt độ 215°C , kéo dài 3 phút nữa. Dịch thuỷ phân lần sau được lọc, phần bã được sử dụng đốt lò hơi hoặc sản xuất điện. Dịch thuỷ phân từ mỗi quá trình được thu hồi, trung hoà và lên men tạo etanol.

b) Thuỷ phân bằng enzym

Hiện nay, hướng ứng dụng enzym trong sản xuất cồn nhiên liệu từ sinh khối đang được quan tâm nghiên cứu nhiều, hứa hẹn đem lại những thành tựu mới về công nghệ. Nghĩa là, trong quá trình sản xuất, người ta cố gắng thay thế công đoạn thuỷ phân dùng axit bằng thuỷ phân dùng enzym.

Quy trình công nghệ sản xuất etanol nhiên liệu từ sinh khối sử dụng enzym thuỷ phân được tóm tắt trên hình 13.11.



Hình 13.11. Các bước sản xuất cồn sinh học bằng công nghệ lên men

– Vi sinh vật sử dụng trong sản xuất etanol từ sinh khối:

Giống như quá trình sản xuất etanol từ tinh bột, trong quá trình sản xuất etanol từ sinh khối có hai công đoạn cần vi sinh vật tham gia là quá trình đường hoá và quá trình lên men. So với quá trình sản xuất từ tinh bột thì sản xuất etanol từ sinh khối giàu lignoxenlulozơ có độ phức tạp hơn nhiều ở cả hai công đoạn đường hoá và lên men.

Trong nhóm vi sinh vật có khả năng sinh etanol, nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có ứng dụng rộng rãi nhất, nhiều chủng có khả năng tích lũy tối 18% etanol trong dịch lên men. Tuy nhiên, các chủng nấm men *S. cerevisiae*

chỉ có thể lên men các loại đường đơn như *glucozơ*, *galactozơ*, đường đôi như *saccarozơ* và đường ba như *raffinozơ*, chúng không có khả năng lên men đường pentozơ năm cạnh như đường xylozơ, chúng được thuỷ phân từ hemixenlulozơ và có nhiều trong sinh khối.

Ngoài nấm men *S. cerevisiae* là ứng cử viên tiềm năng nhất cho công đoạn lên men chuyển hoá glucozơ thành etanol, thì người ta cũng phát hiện ra một loại vi khuẩn *Zymomonas mobilis* có khả năng lên men đồng hình sinh etanol và chịu được nồng độ cồn tới 120g/l. Đây là loại vi sinh vật duy nhất sử dụng glucozơ trong điều kiện khí theo con đường Entner-Doudoroff (EDP) trong khi đa số các vi sinh vật khác sử dụng con đường Embden-Meyerhof (EMP). Theo con đường EDP thì tạo ra lượng ATP chỉ bằng một nửa so với EMP, do đó lượng sinh khối ít hơn và lượng glucozơ chuyển trực tiếp thành etanol cao hơn. Hiệu suất sinh etanol của *Zymomonas* cao hơn 5–10% so với *Saccharomyces cerevisiae*. Hơn nữa, vi khuẩn *Zymomonas mobilis* không gây độc hại cho con người và không đòi hỏi điều kiện nuôi cấy ngặt nghèo như vi khuẩn khác.

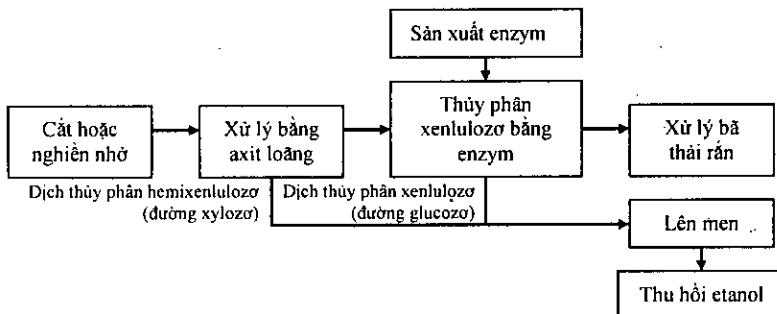
Một trong những khó khăn hiện nay là rất ít vi sinh vật có khả năng lên men xylozơ mà trong dịch thuỷ phân sinh khối thực vật chiếm 20,3% lượng đường tạo ra và cả *Saccharomyces cerevisiae* và *Zymomonas mobilis* không có khả năng này. Trong số các loài nấm men chỉ có 4 loài có thể lên men xylozơ ở mức độ khác nhau. Nấm men *Pachysolen tannophilus* đang được sử dụng để lên men dịch thuỷ phân hemixenlulozơ để tạo cồn, nhưng tích lũy etanol trong môi trường quá ít (không quá 2%). Chính vì vậy, hiện nay người ta đang tập trung nghiên cứu tạo chủng *Saccharomyces cerevisiae* tái tổ hợp có hiệu suất cao và chịu được etanol tích lũy trong dịch lên men.

Trong số những vi sinh vật có khả năng thuỷ phân nguyên liệu thực vật, nấm mốc *Trichoderma reesei* được quan tâm nhiều hơn cả. Trong công đoạn sản xuất enzym, một số gen sinh xenlulaza từ các chủng có hoạt tính cao như *Erwinia chrysanthemi*, *Axitothermus cellulolyticus* đã được tách dòng và biểu hiện để tạo chủng tái tổ hợp có hoạt tính cao. Hơn nữa, các vi sinh vật sản xuất các xenlulaza truyền thống như *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*,... cũng đang được sử dụng. Tuy nhiên, việc giảm giá thành chế phẩm enzym để đảm bảo cho sản xuất cồn nhiên liệu vẫn là chủ đề đáng được quan tâm của các nhà công nghệ sinh học.

– Quy trình công nghệ sản xuất etanol nhiên liệu bằng thuỷ phân enzym:

Trong quá trình sản xuất etanol nhiên liệu hiện nay, quy trình công nghệ nào cũng có sử dụng dung dịch axit loãng để xử lý sơ bộ, trước khi xử lý bằng enzym. Tuy nhiên, trong tương lai, việc sử dụng axit để thuỷ phân cần được loại bỏ.

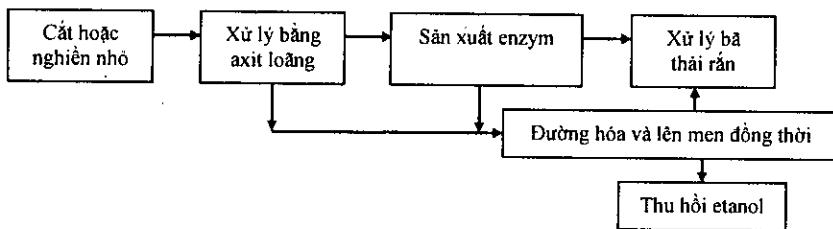
Quy trình công nghệ sản xuất cồn nhiên liệu từ sinh khối thường dùng là công nghệ SHF (hình 13.12) là công nghệ mà giai đoạn thuỷ phân và giai đoạn lên men tách rời nhau. Công nghệ này, trong giai đoạn xử lý sơ bộ, người ta xử lý nguyên liệu bằng dung dịch axit hay kiềm loãng có tác động của nhiệt độ cao.



Hình 13.12. Sơ đồ quá trình sản xuất etanol bằng công nghệ thuỷ phân và lên men tách biệt (Separate hydrolysis and fermentation-SHF)

Một trong những cải tiến quan trọng của quy trình sản xuất ứng dụng enzym là công nghệ kết hợp cả hai quá trình đường hoá và lên men trong cùng một công đoạn, hay còn gọi là quá trình đường hoá và lên men đồng thời (simultaneous saccharification and fermentation—SSF). Đề xuất này là của công ty Gulf Oil và Trường Đại học Arkansas và đã được đăng ký bản quyền.

Hướng phát triển của công nghệ này nhằm giảm thiểu thiết bị cần thiết và quan trọng hơn là làm giảm sự ức chế ngược của sản phẩm đối với enzym. Ví dụ, sự có mặt của glucozơ trong dung dịch sẽ ức chế khả năng thuỷ phân xenlobiozơ của enzym β -glucosidaza. Trong quy trình này, enzym xenlulaza và vi sinh vật lên men được sử dụng đồng thời, lượng đường tạo thành tức thì chuyển hoá sang etanol. Theo tính toán, so với quy trình hai công đoạn tách biệt thì quy trình hai công đoạn đồng thời sẽ làm tăng hiệu suất chuyển hoá xenlulozơ thành etanol lên 40%.



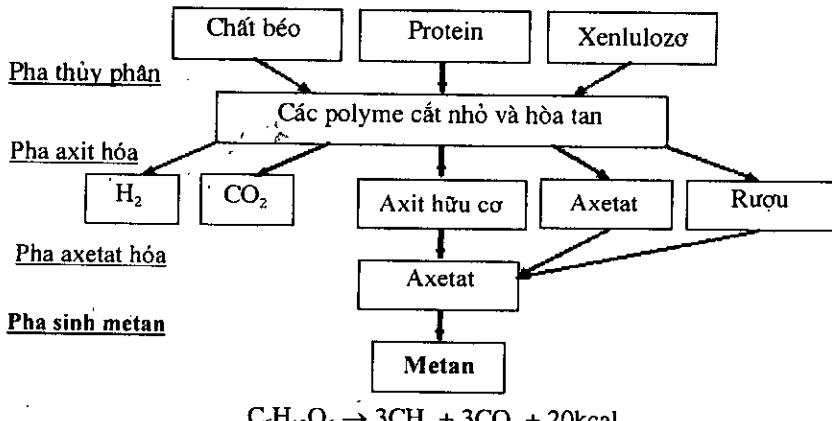
Hình 13.13. Sơ đồ quá trình sản xuất etanol nhiên liệu bằng công nghệ thuỷ phân và lên men đồng thời (Simultaneous saccharification and fermentation-SSF)

Tuy nhiên, bản thân quy trình đường hoá và lên men đồng thời cũng còn gặp nhiều khó khăn để có thể thương mại hoá, vì sự khác nhau giữa nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzym xenlulaza ($45\text{--}50^{\circ}\text{C}$) và nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật lên men etanol ($28\text{--}35^{\circ}\text{C}$). Ngoài ra, một số thành phần của dịch thuỷ phân sinh khối và etanol tạo ra cũng tác động ức chế lên enzym.

13.3. CÔNG NGHỆ LÊN MEN SẢN XUẤT METAN TỪ SINH KHỐI

Ở điều kiện lý tưởng, cứ 10kg chất hữu cơ khô có thể sản xuất được 3m^3 khí sinh học (biogas) đủ để đun nấu khoảng 3 giờ, thắp sáng 3 giờ hoặc làm lạnh 24 giờ với thiết bị thích hợp. Trong thực tế, khí gas được xem như là một phần cung cấp nguồn năng lượng của thế giới. Trung Quốc là nước tiêu thụ khí gas lớn nhất với trên 7 triệu cơ sở sản xuất khí gas cung cấp lượng khí gas tương đương 22 triệu tấn than đá.

Biogas được sử dụng để đốt nóng tạo hơi nước chạy máy phát điện và ở California (Mỹ) một nhà máy đã cung cấp điện năng cho 20.000 gia đình bằng cách ủ phân trâu, bò tạo khí metan.



Hình 13.14. Vi sinh vật sản sinh khí metan

Như vậy, sản xuất khí metan từ các nguyên liệu hữu cơ bằng lên men kỹ khí nhằm cung cấp nguồn năng lượng có giá trị cho nhiều mục đích sử dụng.

Quá trình lên men sản xuất khí metan từ chất thải giàu chất hữu cơ được trình bày chi tiết ở chương 12. Cơ chế của quá trình sản sinh khí metan trải qua 4 pha (giai đoạn) được tóm tắt trên hình 13.14.

Hiện nay, việc sản xuất khí metan từ sinh khối chưa được các nhà đầu tư quan tâm phát triển sản xuất quy mô lớn, nhưng về mặt thủ công thì quá trình này có giá trị cung cấp nguồn nhiên liệu hữu hiệu. Nhưng về an toàn môi trường, việc phát triển sản xuất khí metan, cũng cần được quan tâm, vì một phân tử khí CH_4 thoát vào trong không khí, làm nóng Trái Đất lên 21 lần so với khí CO_2 , do đó cần thu hồi triệt để. Tuy nhiên, phương pháp sản xuất này chưa mang lại hiệu quả kinh tế ở mức độ sản xuất công nghiệp. Do đó, những tranh luận này vẫn còn tiếp diễn và tập trung vào các điểm chính sau đây:

- 1) Quá dồi dào metan có trong tự nhiên, cụ thể trong các lĩnh vực khí tự nhiên và lĩnh vực dầu khí.
- 2) Sản xuất metan bằng phương pháp khí hóa lỏng từ than đá kinh tế hấp dẫn hơn.
- 3) Sản xuất khí metan nhờ vi sinh vật đắt hơn so với khí tự nhiên.
- 4) Tính toán giá thành lưu giữ, vận chuyển và phân phối nhiên liệu khí gas, sản xuất ở mức độ lớn thực sự chưa kinh tế.
- 5) Khí metan không thể sử dụng cho xe cộ, chuyển hoá sang trạng thái lỏng khó và đắt.

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 13

1. Trong các loại nhiên liệu: than đá, dầu mỏ, khí tự nhiên và gỗ, loại nào không phải là nhiên liệu hoá thạch?
2. Vì sao nói các cơ thể quang hợp cả ở biển và trên đất liền được xem là nguồn năng lượng có thể tái tạo (năng lượng tái tạo)?
3. Qua quang hợp, hằng năm cây xanh cố định được khoảng bao nhiêu tấn cacbon chứa năng lượng?
4. Việc sản xuất khí metan từ sinh khối ngoài phương pháp lên men kỹ khí còn bằng quá trình hoá học có tên là gì?
5. Vì sao etanol được xem là nhiên liệu sạch?
6. Nếu muốn sử dụng các loại đường pentozơ này chuyển hóa thành nhiên liệu sinh học, người ta phải thực hiện quá trình lên men gì?
7. Để etanol có thể sử dụng làm nhiên liệu thay thế xăng dầu, thường người ta phải tinh chế để tạo cồn sạch không chứa nước, thường nồng độ cồn phải đạt bao nhiêu % trở lên?
8. Sản xuất nhiên liệu sinh học từ sinh khối khó phân giải như phế liệu gỗ chứa nhiều lignoxenlulozơ, công ty BioGasol sử dụng phương pháp gì trong tiến xử lý hợp chất này?
9. Hiện nay nước nào trên thế giới đứng đầu sản xuất cồn nhiên liệu từ ngô?
10. Có mấy cách để thuỷ phân sinh khối thành đường?
11. Từ năm 2000 đến 2004, giá enzym xylanaza hãng Novoenzymes sử dụng trong công nghệ sản xuất cồn bằng enzym đã giảm xuống khoảng mấy lần?
12. Phương pháp thuỷ phân sinh khối bằng axit được chia làm mấy loại?
13. Để tiết kiệm được thời gian thu hồi (chưng cất) nhằm hạ giá thành sản phẩm cồn cần lựa chủng nấm men có đặc điểm gì?
14. Sinh khối giàu lignoxenlulozơ sau khi xử lý bằng axit đặc được pha loãng bằng nước đến nồng độ axit còn bao nhiêu và giữ ở nhiệt độ 100°C bao nhiêu lâu để tạo gel?
15. Người ta đã phát hiện ra một loại vi khuẩn nào có khả năng lên men đồng hình sinh etanol và chịu được nồng độ cồn tới 120g/l?

Chương 14

ỨNG DỤNG CHỦNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP TRONG SẢN XUẤT MỘT SỐ CHẤT HOẠT TÍNH SINH HỌC

14.1. SẢN XUẤT INSULIN BẰNG CÁC CHỦNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP

14.1.1. Đại cương về insulin và ứng dụng trong điều trị bệnh tiểu đường

Insulin là chất hoạt tính sinh học được sản xuất và thương mại hoá đầu tiên (1982) bằng chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp. Insulin là một loại hormon được sản xuất bởi các tế bào beta (β) tuyến tụy, có vai trò quan trọng trong chuyển hoá đường glucozơ trong máu, giúp ổn định và giữ cân bằng hàm lượng đường trong cơ thể người và động vật. Ở người, khi bị thiếu hụt insulin lâu dài dẫn đến bị bệnh tiểu đường, các bệnh về mắt (bệnh glucom, khô giác mạc, mù loà), hoặc lở loét do rối loạn chuyển hoá,...

Bệnh tiểu đường (Diabet) do thiếu hụt insulin được phát hiện lần đầu tiên ở một bệnh nhân người Hy Lạp, vào năm 1552 trước Công nguyên. Năm 1921, Frederick Banting và Charles Best thuộc Đại học Toronto (Canada) phát hiện các tế bào tuyến tụy người và động vật sản xuất ra insulin. Từ năm 1922, con người đã biết tách chiết insulin từ tuy bò, tuy lợn để chữa bệnh tiểu đường cho con người. Sử dụng insulin tách chiết từ tuy bò, tuy lợn,... để chữa bệnh cho người bị tiểu đường có hiệu quả không cao, sau một thời gian điều trị nhất định hiệu quả giảm dần, do phản ứng loại thải protein lạ ở người bệnh.

Cấu trúc phân tử insulin người được phát hiện năm 1926, gồm 51 axit amin. Năm 1955, Frederick Sanger và cộng sự đã xác định trật tự sắp xếp của 51 axit amin trong phân tử insulin người (insulin là phân tử protein đầu tiên được giải trình tự). Năm 1962, Frederick Sanger được nhận giải Nobel về xây dựng cấu trúc protein).

Năm 1963 – 1965, insulin được tổng hợp nhân tạo bằng con đường hoá học, tuy nhiên giá thành quá đắt, không phù hợp trong chữa bệnh.

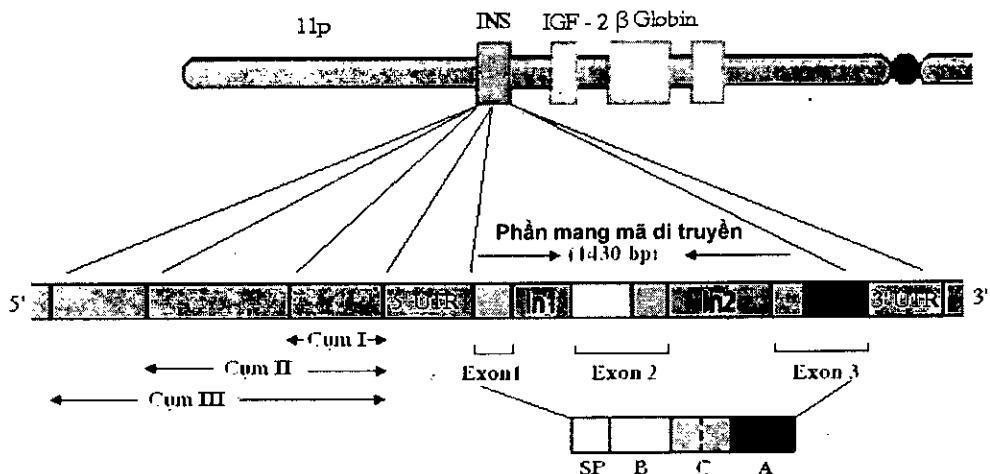
Năm 1978, Herbert Boyer (Công ty Genetech) thành công sản xuất insulin tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli*.

Năm 1982, sản phẩm insulin người do hãng Novo sản xuất được phép lưu hành ở châu Âu. Năm 1983, sản phẩm insulin người được thương mại hoá ở Mỹ. Năm 1986, sản phẩm thương mại đầu tiên gọi là Humulin do Công ty Eli Lily và Genetech sản xuất, được sử dụng trong chữa bệnh cho con người. Năm 1987, thành công tổng hợp nhân tạo insulin trong tế bào nấm men. Đến nay có rất nhiều chế phẩm insulin với nhiều tên thương mại khác nhau được bán trên thị trường, góp phần điều trị bệnh tiểu đường, bảo vệ sức khoẻ con người.

Insulin có vai trò quan trọng, giúp điều chỉnh nồng độ đường trong máu ở mức thích hợp. Khi hàm lượng glucozơ trong máu cao, insulin đóng vai trò các chìa khoá cho phép glucozơ từ máu qua màng tế bào chất vào trong tế bào, đồng thời insulin xúc tác quá trình chuyển hoá glucozơ trong gan thành các chất dự trữ glycogen và các chất béo. Ngược lại, khi hàm lượng glucozơ trong máu thấp, insulin giữ vai trò chuyển hoá glycogen dự trữ trong gan thành glucozơ đưa vào máu, không cho glucozơ từ máu chuyển vào tế bào. Thiếu hụt insulin trong cơ thể trong một thời gian dài gây nên bệnh tiểu đường và nhiều bệnh về mắt, bệnh dạ dày,...

Bệnh tiểu đường hay còn gọi là đái tháo đường là một trong những bệnh gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khoẻ của con người, ước tính năm 2010 trên thế giới có tới 221 triệu người mắc bệnh. Bệnh tiểu đường gồm 2 dạng chính gọi là typ I và typ II. Bệnh tiểu đường typ này thường gặp ở trẻ em hoặc người trẻ tuổi, do gen insulin bị hỏng, dẫn đến hàm lượng insulin quá ít hoặc thiếu hụt hoàn toàn. Bệnh nhân bị bệnh tiểu đường typ I (chiếm khoảng 5–10%) và những bệnh nhân bị bệnh tiểu đường typ I cần phải bổ sung insulin liên tục để đảm bảo cuộc sống. Bệnh tiểu đường typ II thường gặp ở người lớn (chiếm khoảng 90–95%), người bệnh vẫn tạo được một hàm lượng insulin nhất định, do gen insulin hoạt động yếu nên trong cơ thể hàm lượng insulin dưới mức bình thường, hoặc thiếu một số loại enzym chuyển hoá. Bệnh nhân bị bệnh tiểu đường typ II có thể do ảnh hưởng của béo phì, có tới 90% bệnh nhân tiểu đường typ II bị béo phì.

Nghiên cứu bộ gen người cho thấy gen mã hoá insulin (INS) nằm ở nhiễm sắc thể số 11, trên cánh ngắn (11p) gần gen IGF và gen β-globin. Gen mã hoá insulin người gồm 2 phần: vùng mang mã di truyền (coding region) và vùng không mang mã (no coding region).



Hình 14.1. Cấu trúc gen mã hoá insulin ở người

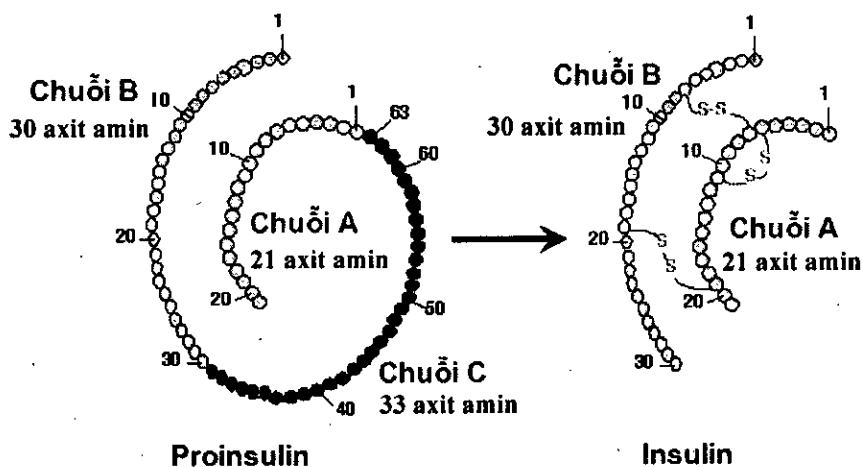
Vùng không mang mã di truyền chia làm 3 cụm gen ký hiệu I, II và III. Trong vùng không mang mã có các trình tự điều hoà, trình tự tăng cường hoạt động gen (enhancer) và các trình tự lặp lại. Vùng mang mã di truyền có kích thước 1.430 bp. Trong vùng mang mã di truyền có 2 intron, intron thứ nhất (In1) nằm giữa đoạn trình tự mã hoá chuỗi peptit tín hiệu và chuỗi peptit B, intron thứ 2 (In2) nằm giữa đoạn gen mang mã di truyền mã hoá chuỗi peptit C.

Đoạn gen mang mã di truyền mã hoá 4 chuỗi peptit trong cấu trúc của phân tử insulin: chuỗi peptit tín hiệu (SP—signal peptide), chuỗi peptit B, chuỗi peptit C và chuỗi peptit A. Trong cơ thể người, insulin được tổng hợp qua một chuỗi các biến đổi, đầu tiên phân tử preproinsulin được tổng hợp. Preproinsulin là chuỗi peptit dài gồm 110 axit amin được tổng hợp trong các tế bào β của đảo tuy (đảo Langerhans) trong tuyến tuy. Phân tử preproinsulin gồm 4 vùng cấu trúc (4 chuỗi peptit ngắn): chuỗi peptit tín hiệu (SP) gồm 24 axit amin, chuỗi peptit B gồm 30 axit amin, chuỗi peptit C gồm 35 axit amin và chuỗi peptit A có 21 axit amin. Sau khi được tổng hợp, phân tử preproinsulin được đưa tới mạng lưới nội chất. Trong mạng lưới nội chất, chuỗi tín hiệu bị cắt bỏ, tạo nên phân tử proinsulin dạng gấp cuộn gồm 86 axit amin. Phân tử proinsulin tiếp tục được chuyển tới hệ thống Golgi, trong hệ thống Golgi có các enzym thích hợp cắt bỏ đoạn peptit C và hình thành các liên kết disunphit tạo thành phân tử insulin hoạt tính.

Phân tử insulin người hoạt tính có khối lượng phân tử 5.807 Dalton, gồm 2 chuỗi peptit. Chuỗi peptit A gồm 21 axit amin, mang một cầu nối disunphit

(S-S) giữa axit amin thứ 6 với axit amin thứ 11. Chuỗi peptit B gồm 30 axit amin. Hai chuỗi peptit của phân tử insulin người được liên kết với nhau bằng hai cầu nối disunphit (S-S) giữa axit amin thứ 7 của chuỗi peptit A và axit amin thứ 7 của chuỗi peptit B (A7–B7), và một cầu nối giữa axit amin thứ 20 của chuỗi peptit A và axit amin thứ 19 của chuỗi peptit B (A20 – B19).

14.1.2. Sản xuất insulin người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp



Hình 14.2. Sơ đồ cấu trúc phân tử insulin người

Ngày nay, insulin người được sản xuất ở quy mô công nghiệp, bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp mang gen mã hoá insulin người. Insulin người tái tổ hợp đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh tiểu đường cho người bệnh. Có nhiều công ty dược phẩm khác nhau đã sử dụng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp từ vi khuẩn và nấm men trong sản xuất insulin, tạo nên nhiều loại insulin tái tổ hợp, với các tên thương mại khác nhau Humulin®, Humalog® (Eli Lilly), Ovolin® (Novo Nordisk),.... Hiện nay, có nhiều phương pháp sản xuất insulin dựa trên các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, chủ yếu là vi khuẩn (*E. coli*, *Bacillus brevis*,...) hoặc nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia Pastoris*...). Hai nhóm phương pháp chủ yếu để sản xuất insulin bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, là phương pháp hai chuỗi và phương pháp miniproinsulin.

a) Sản xuất insulin người tái tổ hợp theo phương pháp hai chuỗi

Nguyên lý chung của phương pháp hai chuỗi trong sản xuất insulin người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp gồm các bước cơ bản sau:

– Tách dòng các đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A và chuỗi peptit B:

Để tách dòng các đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A và chuỗi peptit B của phân tử insulin người, cần tách chiết mARN mã hoá phân tử propeinsulin từ các tế bào đảo tuy và sử dụng kỹ thuật phiên mã ngược tạo cADN mạch kép. Cắt các đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A và peptit B bằng kỹ thuật phân tử với các loại enzym giới hạn đặc hiệu.

– Tạo vectơ tái tổ hợp mang gen mã hoá chuỗi A và chuỗi B riêng rẽ:

Từ các đoạn gen (cADN) đã tạo được, sử dụng enzym giới hạn và các enzym cần thiết để tạo hai loại vectơ biểu hiện tái tổ hợp, một vectơ mang đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A và một vectơ tái tổ hợp mang đoạn gen mã hoá chuỗi peptit B. Để biểu hiện gen mã hoá insulin người tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli*, người ta thường gắn đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A hoặc peptit B với vectơ biểu hiện gen có promoter của gen *lac Z*.

– Biến nạp mỗi loại vectơ tái tổ hợp vào tế bào *E. coli*:

Sử dụng kỹ thuật súc nhiệt để biến nạp riêng mỗi loại vectơ tái tổ hợp mang đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A vào một tế bào *E. coli* BL21, và biến nạp vectơ tái tổ hợp mang đoạn gen mã hoá chuỗi peptit B vào các tế bào *E. coli* BL21 khác. Sàng lọc và thu nhận các dòng tế bào *E. coli* mang các đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A và chuỗi peptit B riêng rẽ.

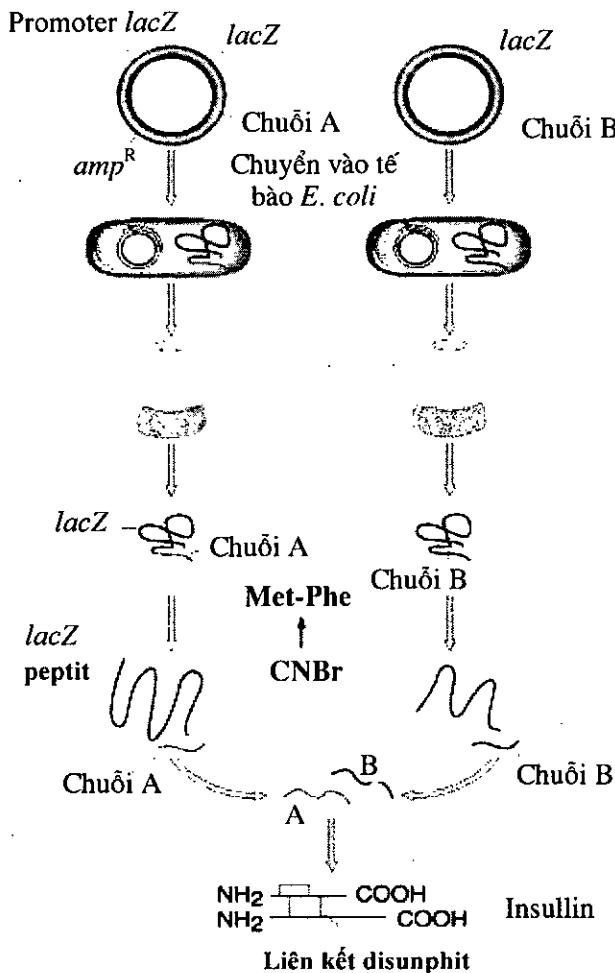
– Lên men thu sinh khối và thu nhận các chuỗi peptit riêng biệt:

Các chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang các đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A và chuỗi peptit B, được lên men trong các thiết bị lên men khác nhau với môi trường thích hợp để thu sinh khối. Sử dụng các kỹ thuật phân tử để thu nhận sản phẩm protein lai từ sinh khối vi khuẩn thu được. Từ dòng tế bào *E. coli* mang đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A thu nhận được các phân tử protein lai: chuỗi A – lacZ. Từ dòng tế bào *E. coli* mang đoạn gen mã hoá chuỗi peptit B, thu nhận được các phân tử protein lai: chuỗi B – lacZ. Thực hiện các phản ứng với xyanua bromid (CNBr) để cắt liên kết giữa các axit amin cuối cùng của chuỗi peptit với axit amin đầu tiên của enzym β – Galactosidaza (Phe – Met), thu riêng các chuỗi peptit A và peptit B.

– Phản ứng tạo insulin hoạt tính:

Các chuỗi peptit A và peptit B sau khi đã tinh sạch được trộn với nhau tạo hỗn hợp các chuỗi peptit A với chuỗi peptit B. Trong điều kiện thích hợp, giữa hai chuỗi peptit A và chuỗi peptit B hình thành các liên kết disunphit để

tạo nên phân tử insulin hoạt tính. Trong công nghệ sản xuất insulin tái tổ hợp, đây là bước quan trọng khó thực hiện. Phân tử insulin chỉ có hoạt tính khi có sự hình thành hai liên kết disunphit giữa chuỗi A và chuỗi B và một liên kết disunphit trong chuỗi peptit A. Sau khi có insulin hoạt tính, tiến hành kiểm tra độ tinh sạch, độc tố, hoạt tính và bổ sung phụ gia để bảo quản và đóng gói.



Hình 14.3. Sơ đồ sinh tổng hợp insulin theo phương pháp hai chuỗi

Phương pháp sản xuất insulin tái tổ hợp hai chuỗi lần đầu tiên được ứng dụng thành công ở Công ty Eli Lilly (1982). Phương pháp hai chuỗi có nhiều ưu điểm hơn các phương pháp khác là dễ thực hiện, hiệu quả thu được các chuỗi peptit A và peptit B trong tế bào vi sinh vật cao. Tuy nhiên, phương

pháp hai chuỗi có hạn chế là hiệu quả tạo các cầu disunphit chính xác rất thấp, do đó hiệu suất tạo insulin hoạt tính không cao.

b) Sản xuất insulin tái tổ hợp theo phương pháp miniproinsulin

Sinh tổng hợp insulin tái tổ hợp theo phương pháp miniproinsulin (MPI) được phát triển đầu tiên do Công ty Novo Nordisk. Nguyên lý chung của phương pháp miniproinsulin gồm một số bước chủ yếu sau:

- Tách chiết phân tử ARN thông tin mã hoá propeinsulin:

Các phân tử ARN thông tin mã hoá propeinsulin được tách chiết từ các tế bào beta đảo tuy của người. Sử dụng kỹ thuật phiên mã ngược tạo cADN mạch kép mã hoá propeinsulin. Từ phân tử cADN mã hoá propeinsulin tạo đoạn gen mã hoá proinsulin bằng kỹ thuật phân tử cắt bỏ đoạn gen mã hoá chuỗi peptit tín hiệu (24 axit amin). Sau đó, sử dụng kỹ thuật phân tử để thay thế đoạn gen mã hoá chuỗi peptit C (35 axit amin) bằng một đoạn gen mã hoá từ 6–9 axit amin (có thể sử dụng đoạn gen mã hoá ba cặp axit amin Lys–Arg) để tạo nên gen mã hoá miniproinsulin (MPI).

- Tạo vectơ tái tổ hợp:

Tạo vectơ tái tổ hợp bằng cách gắn đoạn gen mã hoá miniproinsulin (MPI) vào vectơ biểu hiện bằng các kỹ thuật phân tử thông dụng trong phòng thí nghiệm. Trong nhiều nghiên cứu, để tổng hợp insulin người tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli*, người ta thường sử dụng các vectơ biểu hiện pET (pET–DnaK, pET–FHI,...) tạo các vectơ tái tổ hợp pET–MPI.

- Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ để tạo dòng *E. coli*:

Bằng các kỹ thuật biến nạp khác nhau (thường dùng kỹ thuật sốc nhiệt), vectơ tái tổ hợp pET– MPI được đưa vào tế bào *E. coli* BL 21.

- Lên men thu sinh khối:

Nuôi cấy các dòng *E. coli* biểu hiện mang vectơ pET– MPI trong các thiết bị lên men với môi trường thích hợp để thu sinh khối tế bào và thu nhận miniproinsulin thô.

- Thu nhận và tinh sạch MPI:

Mini proinsulin đã thu nhận được tinh sạch, xác định cấu trúc, trình tự axit amin bằng sắc ký khối phổ MS/MS và so sánh với cấu trúc của phân tử insulin người chuẩn. Xử lý miniproinsulin bằng trypsin và enzym cacboxypeptitaza để

disunphit cắt bỏ đoạn axit amin ngắn thu được insulin người hoạt tính. Thủ hoạt tính, xác định nội độc tố, phụ gia, điều kiện bảo quản và đóng gói.

Ưu điểm của phương pháp MPI là hiệu suất sinh tổng hợp protein lai trong tế bào vi sinh vật tương đối cao, miniproinsulin có sự gấp cuộn đúng và sự tạo thành các cầu nối disunphit đúng hơn nhiều so với các phương pháp khác. Hiện nay, ngoài biểu hiện MPI trong tế bào vi khuẩn *E. coli*, công ty Novo Nordisk đã sử dụng phương pháp miniproinsulin để sinh tổng hợp insulin người có hoạt tính trong các tế bào nấm men tái tổ hợp.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về sinh tổng hợp insulin người trong các chủng vi sinh vật tái tổ hợp còn rất ít, hiệu quả chưa rõ ràng. Những nghiên cứu đầu tiên về tạo dòng và biểu hiện miniproinsulin người tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli* của PGS.TS. Trần Linh Thước và cộng sự, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh được công bố năm 2005. Đề tài cấp Bộ Y tế 2005–2007 của PGS.TS. Lê Văn Phùng (Đại học Y Hà Nội) đã có các kết quả bước đầu về sinh tổng hợp insulin người trong *E. coli* theo phương pháp hai chuỗi. Với sự quan tâm của Chính phủ và các Bộ, ngành, trong một tương lai gần, chúng ta có thể sản xuất được insulin phục vụ điều trị người bị bệnh tiểu đường.

14.2. SẢN XUẤT INTERLEUKIN-2 CHỐNG UNG THƯ BẰNG CHỦNG VI SINH TÁI TỔ HỢP

14.2.1. Khái quát về interleukin và ứng dụng

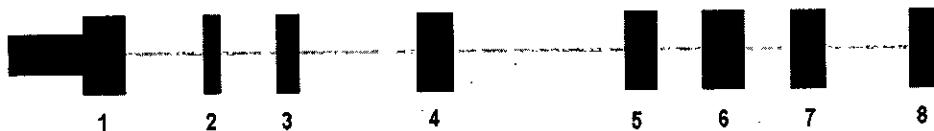
Interleukin là một họ gồm nhiều loại protein, glycoprotein xytokin có vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch và hoạt động của tế bào người và động vật. Ngày nay, các nhà khoa học đã phát hiện hàng chục loại interleukin khác nhau, ký hiệu từ IL-1, IL-2, IL-3, đến IL-35,... Vai trò, và tác dụng của một số loại interleukin đã được xác định, nhiều loại interleukin còn đang được tiếp tục nghiên cứu. Chức năng của nhiều loại interleukin trong hệ thống miễn dịch đã được nghiên cứu gồm tương đối kỹ: Interleukin 1 (IL-1) có vai trò kích thích sự tăng sinh của các tế bào miễn dịch T và B; Interleukin 2 (IL-2) có khả năng kích thích sự tăng sinh của các tế bào miễn dịch T và B, đồng thời giữ vai trò hoạt hoá các tế bào Natural Killer (NK); Interleukin 4 (IL-4) có vai trò kích thích các tế bào B và hoạt hoá sự tạo thành tương bào, gây hiện tượng tiết kháng thể IgE; Interleukin 5 (IL-5) kích thích tế bào B, gây quá trình tiết IgM và IgA trong tương bào;

Interleukin 6 (IL-6) gây quá trình biệt hoá các tế bào B, làm tăng quá trình tăng sinh và hoạt động của tế bào T,...

Các loại interleukin có vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch của tế bào và cơ thể, kích thích sự tăng sinh của các tế bào lympho T (TH1, TH2), tế bào lympho B (B-Lph), tế bào CD4+, tế bào NK,... tạo nên các loại kháng thể giúp tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể. Ở người, nhiều loại tế bào khác nhau có khả năng sản sinh nhiều loại interleukin khác nhau, mỗi loại interleukin giữ vai trò khác nhau trong quá trình miễn dịch của tế bào và cơ thể. Ví dụ, đại thực bào (macrophage) sinh các loại IL-1, IL-6, IL-10, IL-12; nguyên bào sợi (fibroblasts) có thể sản sinh IL-1, IL-6, IL-8, IL-11,...

Gen mã hoá các interleukin người nằm trên các nhiễm sắc thể khác nhau trong bộ nhiễm sắc thể người. Trên nhiễm sắc thể số I mang nhiều gen mã hoá các loại interleukin khác nhau: IL-10, IL-19, IL-20, IL-23, IL-24. Nhiễm sắc thể số II mang gen mã hoá interleukin 1 (IL-1). Trên nhiễm sắc thể số X mang các gen mã hoá interleukin IL-2 và IL-22, các gen mã hoá IL-10, IL-34 nằm trên nhiễm sắc thể số XI, gen mã hoá IL-22 và IL-26 nằm trên nhiễm sắc thể số XII,...

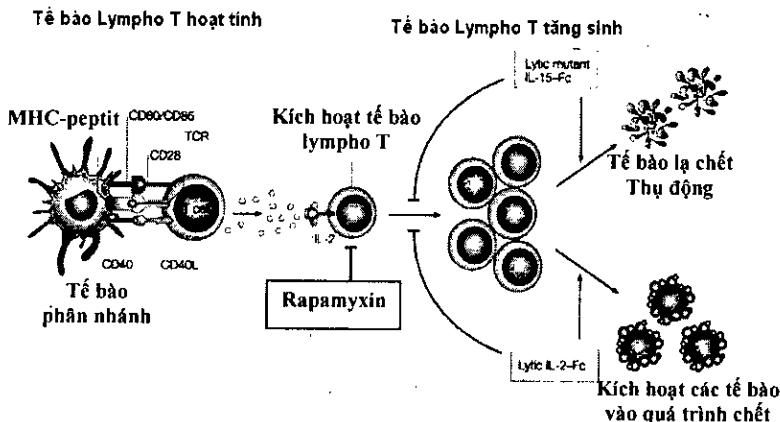
Interleukin-2 (IL-2) là một xytokin quan trọng do khả năng kích thích sự tăng sinh mạnh của các tế bào miễn dịch T và NK, nên IL-2 có khả năng ức chế tế bào ung thư và hạn chế sự phát triển của khối u. Interleukin-2 được phát hiện lần đầu tiên năm 1975, phân tử interleukin-2 là một glycoprotein gồm 153 axit amin, khối lượng 15kDa, gồm 4 chuỗi peptit xoắn kiểu δ. Gen mã hoá IL-2 người nằm trên nhiễm sắc thể số 10, gen mã hoá interleukin-2 đã được tách dòng năm 1983.



Hình 14.4. Sơ đồ cấu trúc gen interleukin-2 của người

Gen mã hoá Interleukin-2 của người ở dạng thê khám (phân đoạn) gồm 8 vùng mang mã (exon) xen kẽ trong 7 vùng không mang mã (intron). Do vậy, trong công nghệ sản xuất Interleukin-2 của người từ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, cần sử dụng kỹ thuật phiên mã ngược để tạo đoạn cADN mã hoá 153 axit amin trong phân tử protein Interleukin-2 của người.

Interleukin-2 kích thích hệ miễn dịch tạo các tế bào Natural Killer (NK) có khả năng tấn công các tế bào ung thư, do đó IL-2 được sử dụng trong điều trị nhiều loại ung thư như ung thư bàng quang, ung thư thận, ung thư não,...



Hình 14.5. Sơ đồ cơ chế hoạt động của IL-2

Hiện nay, cơ quan quản lý Dược phẩm và Thực phẩm Mỹ (US FDA) đã cho phép sử dụng interleukin-2 trong điều trị ung thư hắc tố (melanoma) và ung thư thận ác tính. Các thử nghiệm sản xuất và sử dụng interleukin-2 trong điều trị nhiều loại bệnh ung thư khác nhau đang được thực hiện ở nhiều nước trên thế giới.

14.2.2. Sản xuất Interleukin-2 của người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp

Interleukin-2 của người là một trong những chất hoạt tính sinh học có khả năng kìm hãm sự phát triển của khối u và các tế bào ung thư, được nhiều hãng dược phẩm sản xuất bằng con đường sinh tổng hợp trong vi khuẩn *E. coli* hoặc trong tế bào nấm men. Nhiều sản phẩm thương mại đã được sử dụng ở nhiều nước trên thế giới như ProleukinRIL-2 (Hãng Amgen Pharmaceutical – Mỹ), RecoSun (Trung Quốc),...

Công nghệ sản xuất Interleukin-2 của người trong các chủng vi sinh vật tái tổ hợp gồm một số bước cơ bản giống nhau. Tuỳ theo hãng sản xuất, công nghệ sản xuất IL-2 tái tổ hợp khác nhau chủ yếu do lựa chọn vectơ tách dòng, vectơ biểu hiện khác nhau và một số điều kiện môi trường nuôi cấy, kỹ thuật tinh sạch,...

Trong phạm vi cuốn sách này, chúng tôi xin giới thiệu tóm tắt một số bước cơ bản trong quy trình công nghệ sinh tổng hợp IL-2 của người từ các

chủng vi sinh vật tái tổ hợp, do PGS.TS Trương Nam Hải thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Nhà nước: Nghiên cứu tạo interleukin-2 tái tổ hợp dùng cho điều trị bệnh ung thư (2005-2007).

a) Tạo đoạn gen mã hoá Interleukin-2 của người

Tách chiết ARN tổng số từ các tế bào lách của người bằng các kỹ thuật thông thường trong sinh học phân tử. Nhận đoạn cADN mã hoá IL-2 từ ARN thông tin mã hoá Interleukin-2 của người với các cặp mồi đặc hiệu, thu nhận được đoạn cADN mã hoá interleukin-2 của người có kích thước khoảng 400bp.

b) Tạo vectơ tái tổ hợp

Sử dụng kỹ thuật phân tử để nối đoạn cADN mã hoá IL-2 của người vào vectơ tách dòng. Có thể sử dụng vectơ pCR 2.1-TA, tạo nên vectơ tái tổ hợp pCR 2.1-IL-2.

c) Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* DH5 α

Sử dụng kỹ thuật sốc nhiệt hoặc điện xung để tạo dòng vi khuẩn *E. coli* DH5 α mang gen mã hoá IL-2 của người.

d) Hoàn thiện gen mã hoá IL-2 của người

Sau khi giải trình tự kiểm tra đoạn gen mã hoá IL-2, thiết kế mồi gây đột biến mất điểm glycosyl hoá và nhân gen với thiết bị PCR để tạo được gen mã hoá IL-2 của người đã mất điểm glycosyl hoá (phân tử protein IL-2 của người tự nhiên có điểm glycosyl hoá ở vị trí ba axit amin đầu tiên ở đầu N. Đặc tính này làm tăng tính thấm của màng tế bào, do vậy gây độc tính với bệnh nhân, do đó các sản phẩm IL-2 thương mại phải loại bỏ đặc tính này).

e) Tạo dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* BL 21 có khả năng biểu hiện gen IL-2 của người

Bằng các kỹ thuật phân tử thông dụng, chuyển đoạn gen IL-2 của người từ vectơ pCR 2.1-TA sang vectơ biểu hiện pET32a (+) nhờ xử lý với cặp enzym giới hạn Not I và Nco I. Sau đó, biến nạp vectơ biểu hiện pET32a (+) mang gen IL-2 của người vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3).

f) Thực hiện quá trình lên men và thu nhận IL-2 của người

Các chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang gen mã hoá IL-2 của người được lên men trong thiết bị lên men ở môi trường LBA có bổ sung (nồng độ cuối cùng 100 mg/l) ở 370°C sau 3 giờ cảm ứng bằng IPTG. Thu protein tan trong dịch nổi bằng phương pháp ly tâm, thu nhận protein không tan bằng phương pháp phá tế bào.

g) Tách và tinh sạch IL-2 của người

Sau khi thu nhận được IL-2 của người từ kết quả lên men, tiến hành tách và tinh sạch IL-2 của người bằng sắc ký ái lực. Xác định tính an toàn của IL-2, thử nghiệm lâm sàng, nghiên cứu điều kiện bảo quản và đóng gói.

14.3. SẢN XUẤT INTERFERON CỦA NGƯỜI BẰNG CÁC CHỦNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP

14.3.1. Khái quát về interferon và ứng dụng

Interferon (IFN) là loại protein có khả năng chống virut đặc hiệu, được sản xuất trong cả tế bào người và động vật khi bị virut xâm nhiễm. Interferon được phát hiện đầu tiên vào năm 1957, do Alick Isaacs (Anh) và Jean Lindenmann (Thụy Sĩ) khi thực hiện thí nghiệm nuôi cấy các tế bào phôi gà. Trong các thí nghiệm nuôi cấy tế bào phôi gà, các ông đã phát hiện sự xuất hiện một loại protein mới gây ức chế tái bản của virut, gọi là interferon (IFN). Trước 1980, interferon được sản xuất từ tế bào bạch cầu người, bằng cách gây nhiễm virut tế bào bạch cầu, sau đó nuôi các tế bào bạch cầu người trong phôi gà để thu nhận interferon, do đó giá thành interferon rất đắt.

Năm 1980, các nhà khoa học đã thành công trong công nghệ sản xuất interferon người trong tế bào *E. coli* và nấm men tái tổ hợp. Interferon là protein hoặc glycoprotein có khối lượng phân tử từ 16 – 45kD được sản sinh trong các tế bào eukaryote bị nhiễm virut, hoặc một số tác nhân khác (axit nucleic, vi khuẩn, kháng nguyên,...). Interferon được tạo ra trong một tế bào, có tác dụng ngăn cản sự xâm nhiễm của virut ở các tế bào xung quanh hoặc kìm hãm sự phát triển của các khối u,...

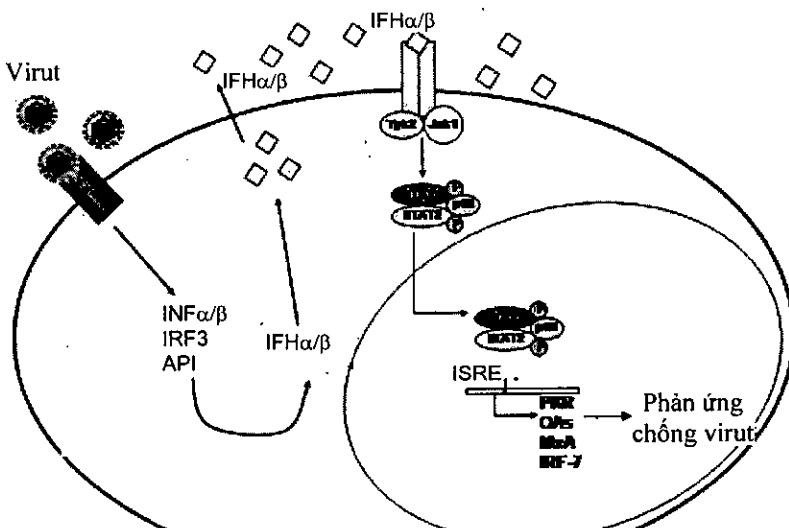
Interferon ở người được chia thành hai nhóm: Interferon nhóm I gồm 3 loại interferon: Interferon alpha (IFN α), interferon beta (IFN β) và interferon omega (IFN ω). Các interferon thuộc nhóm I tương đối bền trong điều kiện axit. Interferon nhóm II gồm một loại interferon gamma –IFN γ , kém bền trong môi trường axit.

- Interferon alpha (IFN α) là loại protein có 166 – 172 axit amin với khoảng 18 loại axit amin khác nhau. Khối lượng phân tử của IFN α khoảng 19,4kD. Interferon alpha được sản sinh trong các tế bào bạch cầu người (lymphocyt, monocyt, macrophag).

Interferon beta (IFN β) là protein có 187 axit amin, khối lượng phân tử khoảng 20kD. Interferon beta được sản sinh từ các tế bào nguyên bào sợi (fibroblast) và tế bào biểu bì.

Interferon gamma (IFN γ) còn được gọi là interferon miễn dịch, gồm 220 axit amin, khối lượng phân tử 17kD, được tạo ra chủ yếu từ các tế Lympho T (Th 1 cells, Tc cells, dendritic cells, NK cells).

Hiện nay, nhiều loại interferon được sản xuất nhờ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, được thương mại hóa và sử dụng rộng rãi trong phòng, chống các bệnh do nhiễm virut, bệnh ung thư,... Trong tế bào người, interferon alpha được mã hóa bởi 22 alen khác nhau nằm trên cánh ngắn của NST số 9. Interferon alpha tái tổ hợp là loại interferon được sản xuất sử dụng nhiều nhất.

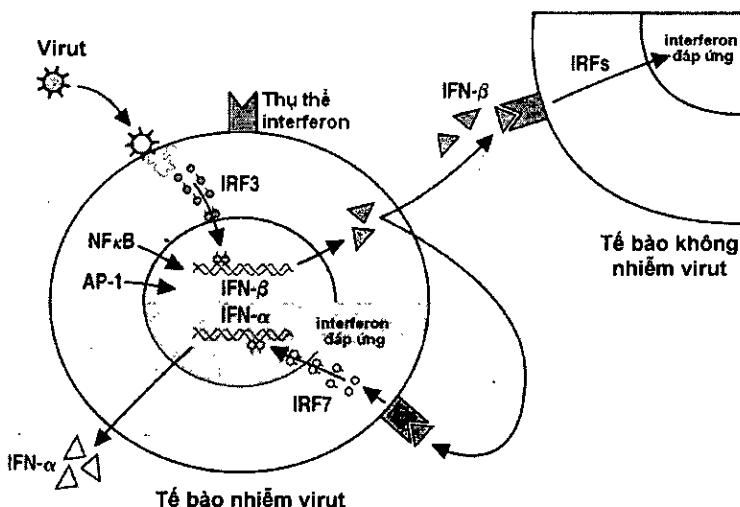


Hình 14.6. Sơ đồ cơ chế tác động của INF α và IFN β

Interferon beta do một gen nằm trên nhiễm sắc thể số 2 mã hóa. Các loại interferon khác nhau, được sản xuất trong các loại tế bào khác nhau theo những cơ chế đặc trưng riêng. Interferon beta (IFN β) được sản sinh khi có các tác nhân xâm nhiễm tế bào. Sau khi được tạo thành trong tế bào, IFN β được giải phóng ra ngoài tế bào và hoạt động theo hai hướng. Hướng thứ nhất: IFN β được chuyển tới các tế bào xung quanh, kích hoạt các tế bào xung quanh sản xuất kháng thể chống lại sự xâm nhiễm của virut. Hướng thứ hai: IFN β ra khỏi tế bào, tác động tới các thụ thể trên màng tế bào sinh ra nó để kích hoạt tế bào sản sinh interferon alpha chống lại các tác nhân virut xâm nhiễm tế bào.

Interferon gamma (IFN γ) do một gen nằm trên nhiễm sắc thể số 12 của người mã hoá. Gen mã hoá IFN γ gồm 4 exon xen kẽ giữa các intron. Interferon gamma được sản sinh trong các tế bào lympho T (tế bào TH, TKL, TCD8,...).

Hiện nay, interferon được ứng dụng rộng rãi trong thực tiễn. IFN có vai trò quan trọng trong miễn dịch tế bào và tác dụng phòng, chống nhiễm virut. IFN có tác dụng hoạt hoá các enzym endonucleaza gây thoái hoá ARN virut, ức chế phiên mã của virut, làm hạn chế quá trình lắp ghép các virion, ức chế sinh trưởng, phát triển của virut,...



Hình 14.7. Cơ chế tác động của interferon

14.3.2. Sản xuất interferon người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp

Hiện nay, interferon được sản xuất nhờ nhiều loại vi sinh vật tái tổ hợp khác nhau như vi khuẩn *E. coli*, nấm men hoặc baculovirut,.... Interferon alpha -2a (IFN α - 2a) tái tổ hợp được sản xuất bằng công nghệ sinh tổng hợp trong *E. coli* với nhiều sản phẩm thương mại của nhiều hãng sản xuất khác nhau Intron A, Roferon A, Wellferon (Wellcome), Infergen Alferon,... Roferon - A (Roche). Interferon alpha - 2b (IFN α - 2b) với nhiều loại sản phẩm như: Intron A (Schering Plough), Laferon (Nga), Inrec (Cuba), Superferon (Việt Nam),... Interferon alpha-2a được sử dụng nhiều trong phòng chống các bệnh do nhiễm virut như viêm gan B, viêm gan C, virut herpes, HIV và ung thư sarcoma.

Interferon beta tái tổ hợp gồm nhiều tên thương mại khác nhau, được sử dụng trong điều trị các bệnh ung thư phổi, ung thư tế bào sắc tố và các bệnh do nhiễm virut.

Interferon gamma tái tổ hợp điển hình là interferon-gamma-1b (Actimmune), được sinh tổng hợp trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp. Interferon gamma được sử dụng trong điều trị các bệnh “Chronic granulomatous”, bệnh rối loạn chuyển hoá do nhiễm virut, các bệnh do nhiễm vi khuẩn mycobacterium,...

Công nghệ sản xuất interferon trong tế bào vi khuẩn *E. coli* gồm một số bước cơ bản:

1) Tạo gen mã hoá interferon

Tùy theo mục đích sản xuất các loại INF khác nhau, cần thu nhận được các loại ARN thông tin mã hoá các loại INF tương ứng. Ví dụ, thu nhận gen mã hoá INF α , cần phải tách chiết ARN thông tin mã hoá IFN α từ tế bào bạch cầu người, ngược lại muốn thu nhận gen mã hoá interferon beta IFN β cần thu nhận ARN thông tin từ các tế bào nguyên bào sợi ở người.... Sử dụng kỹ thuật phân tử để tạo các đoạn cADN tương ứng với đoạn gen mã hoá loại interferon cần thiết.

2) Tạo vectơ tái tổ hợp

Bằng các kỹ thuật phân tử, gắn gen mã hoá interferon người vào vectơ biểu hiện được cải biến từ thực khuẩn thể phage λ , tạo các vectơ phage λ tái tổ hợp mang gen mã hoá interferon người

3) Tạo dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp mang gen mã hoá interferon người

Biến nạp phage λ tái tổ hợp vào tế bào *E. coli*, tạo dòng *E. coli* tái tổ hợp. Kiểm tra khả năng biểu hiện gen ở thể biến nạp.

4) Lên men thu sinh khối và thu nhận interferon

Thực hiện kỹ thuật lên men trong các thiết bị lên men ở các điều kiện môi trường thích hợp để thu sinh khối tế bào, tách chiết interferon.

5) Tinh sạch và thu nhận interferon thành phẩm

Sau khi thu nhận và tinh sạch interferon, cần kiểm tra hoạt tính và thêm các phụ gia (NaCl, KH₂PO₄, dextran...) để có thể giữ hoạt tính và bảo quản lâu dài. Thủ nghiệm lâm sàng để kiểm tra tính an toàn của sản phẩm, sau đó tinh chế, tiệt trùng, nghiên cứu điều kiện bảo quản và đóng gói.

Interferon được sử dụng phổ biến ở trong nước và nước ngoài trong điều trị và phòng, chống một số bệnh do virut. Nhiều bệnh viện và cơ sở y tế trong nước như bệnh viện Chợ Rẫy TP. Hồ Chí Minh, bệnh viện Bạch Mai, bệnh viện K Hà Nội,... đã sử dụng interferon có hiệu quả trong điều trị viêm gan virut, trong điều trị ung thư. Tác dụng kiểm soát tế bào ung thư của IFN α và IFN β , do các interferon này tác động tới các đại thực bào (macrophage) và tế bào lympho TKL sản sinh interferon γ tăng khả năng miễn dịch tự nhiên, hạn chế sự phát triển và phân chia của tế bào khối u.

14.4. SẢN XUẤT HORMON SINH TRƯỞNG NGƯỜI NHỜ CHỦNG VI SINH VẬT TÁI TỔ HỢP

14.4.1. Khái quát về hormon sinh trưởng người (hGH) và ứng dụng

Hormon sinh trưởng người (hGH – Human Growth Hormone) là loại hormon do các tế bào tuyến yên trong não sản xuất. Hormon sinh trưởng người có vai trò điều hoà quá trình sinh trưởng và phát triển của xương, cơ bắp,... thiếu hụt hGH làm cho cơ thể chậm phát triển, hoặc có thể gây hội chứng lùn bẩm sinh ở trẻ em.

Hormon sinh trưởng người được phát hiện năm 1920. Năm 1950, đã tách chiết được hGH từ tuyến yên của não người chết với dung môi axeton.

Từ năm 1956, hormon sinh trưởng tách được chiết từ tuyến yên não bò, não cừu,... để chữa bệnh lùn cho một số người bệnh. Hormon sinh trưởng cừu được sử dụng điều trị bệnh lùn ở trẻ em (để có được 5mg hormon sinh trưởng cừu cần tách chiết từ 500.000 não cừu), giá thành chữa bệnh rất đắt.

Năm 1972, lần đầu tiên cấu trúc phân tử của hGH được xác định đầy đủ. Năm 1985, Công ty Genetech sản xuất thành công hormon sinh trưởng người (hGH) trong vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp với tên thương mại là Protropin.

Hormon sinh trưởng người tái tổ hợp hiện nay chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp gen. Có nhiều loại sản phẩm thương mại khác nhau được ứng dụng trong điều trị bệnh cho con người hoặc giúp cho sự phát triển cơ bắp của các vận động viên thể hình: Genotropin, Humantrope, Norditropin, Nutropin, ProLease, Saizen, Serostim,....

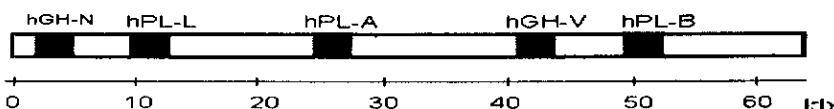
Ở nhiều nước trên thế giới, hormon sinh trưởng người tái tổ hợp được sử dụng rộng rãi, hiệu quả chữa bệnh cao. Bằng công nghệ sản xuất hormon sinh trưởng người nhờ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp, giá thành sản phẩm

rẻ hơn rất nhiều so với các công nghệ khác. Để thu được 5mg hGH chỉ cần thực hiện lên men 15 giờ các chủng vi khuẩn tái tổ hợp trong bình lên men 5 lít, giá thành rẻ hơn rất nhiều so với tách chiết từ não động vật, đồng thời tránh được sự lây truyền các bệnh truyền nhiễm, bệnh bò điên,...

Hormon sinh trưởng người là protein có kích thước nhỏ, gồm 191 axit amin với khối lượng phân tử 22 – 125kD, trong cấu trúc phân tử có sự hình thành 2 liên kết disunphit giữa các axit amin xystein.

Hormon sinh trưởng người có vai trò quan trọng trong sự phát triển bình thường của con người, thiếu hGH lâu dài trẻ em bị hội chứng lùn. Hiện nay, ngoài việc chuyển gen mã hoá hormon sinh trưởng người vào vi sinh vật để sản xuất hGH tái tổ hợp, gen mã hoá hormon sinh trưởng người, bò,... đã được chuyển vào nhiều loài động vật (cá hồi, lợn, cừu,...) tạo các giống động vật chuyển gen có khả năng sinh trưởng nhanh, hiệu quả kinh tế cao.

Hormon sinh trưởng người do một họ gen gồm 5 gen mã hoá, các gen nằm trên cánh dài của nhiễm sắc thể số 17 của người (17q22–24), kích thước khoảng 66kb. Gen hGH – N kích thước 22 kb mã hoá hGH, gen hGH – V có kích thước khoảng 20 kb. Các gen hPL – L, hPL – A và hPL – B mã hoá prolactin.



Hình 14.8. Cấu trúc cụm gen mã hoá hormon sinh trưởng người

Gen mã hoá hGH bị đột biến hoặc rối loạn, dẫn đến tình trạng thiếu hụt hormon sinh trưởng người, gây nên hội chứng lùn bẩm sinh di truyền qua các thế hệ trong gia đình.

14.4.2. Công nghệ sản xuất hormon sinh trưởng người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp

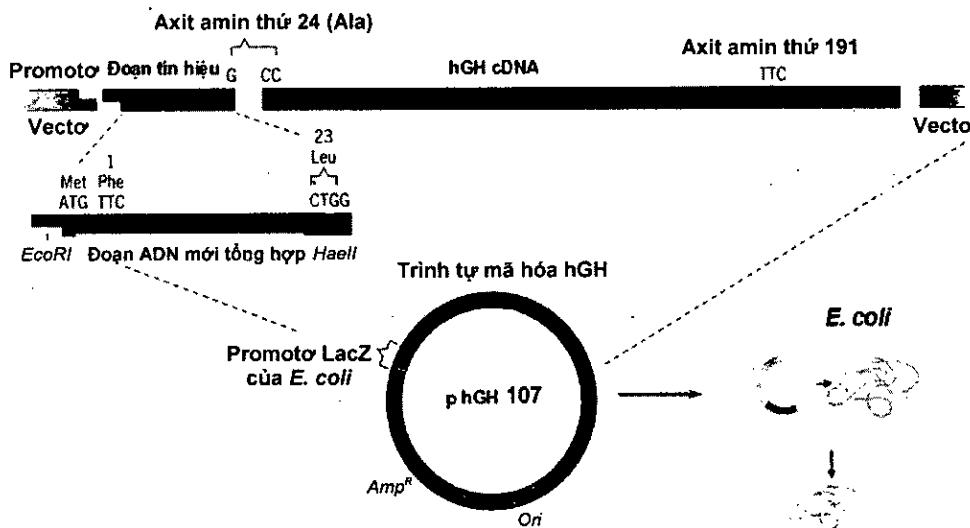
Công nghệ sản xuất hGH người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp có thể tóm tắt theo một số bước cơ bản sau:

1) Tách chiết và tinh sạch ARN thông tin hGH từ các tế bào thùy trước tuyến yên và thực hiện kỹ thuật phiên mã ngược tạo cADN mạch kép mang thông tin di truyền mã hoá hormon sinh trưởng người.

2) Do gen mã hoá hormon sinh trưởng người có đoạn trình tự mã hoá chuỗi peptit tín hiệu không tương thích promoter của *E. coli*. Vì vậy, biểu

hiện gen hGH tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* rất yếu hoặc không hoạt động. Để có thể sinh tổng hợp hormon sinh trưởng người trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp, cần thay đổi cấu trúc đoạn gen mã hoá chuỗi peptit tín hiệu trước khi tách dòng gen hGH.

Sử dụng kỹ thuật phân tử thông dụng với các enzym giới hạn đặc hiệu để cắt bỏ đoạn gen mã hoá 23 – 24 axit amin của chuỗi peptit tín hiệu. Người ta thường sử dụng enzym giới hạn EcoR I cắt bỏ đoạn trình tự tín hiệu của gen hGH, sau đó tổng hợp nhân tạo một đoạn ADN mã hoá 23 – 24 axit amin đầu tiên (thay đổi trình tự gen nhưng không thay đổi trình tự axit amin). Đoạn ADN tái tổ hợp mã hoá chuỗi peptit tín hiệu được nối với đoạn còn lại của gen hGH để thực hiện quá trình tái tổ hợp tạo gen mã hoá hGH.



Hình 14.9. Sơ đồ công nghệ sản xuất hGH tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*

- 3) Chuyển gen mã hoá hGH tái tổ hợp vào các vectơ biểu hiện thích hợp.
- 4) Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào *E. coli*, nuôi cấy trong những điều kiện thích hợp thu sinh khối tế bào vi khuẩn *E. coli*, tách chiết và tinh sạch hGH.

Tùy theo hệ thống tế bào biểu hiện trong công nghệ sản xuất hormon sinh trưởng người tái tổ hợp (vi khuẩn, baculovirut, nấm men,...), có thể sử dụng các loại vectơ biểu hiện khác nhau. Trong sản xuất, hGH người tái tổ hợp thường sử dụng các vectơ biểu hiện là plasmid (phGH 107) để biểu hiện trong tế bào *E. coli*. Biểu hiện gen hGH trong tế bào sinh vật bậc cao thường sử dụng vectơ biểu hiện rdGH/pMT,...

CÂU HỎI ÔN TẬP CHƯƠNG 14

1. Insulin giữ vai trò gì trong cơ thể người?
2. Nếu thiếu hụt insulin trong cơ thể trong một thời gian dài gây nên bệnh gì?
3. Gen mã hoá insulin nằm ở nhiễm sắc thể số 11, gồm mấy phần? Kể tên.
4. Vùng không mang mã insulin chia làm mấy cụm gen, ký hiệu là gì?
5. Hai nhóm phương pháp chủ yếu để sản xuất insulin bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp là gì?
6. Phương pháp hai chuỗi trong sản xuất insulin người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp gồm mấy bước cơ bản?
7. Kể tên các bước cơ bản sản xuất insulin bằng phương pháp hai chuỗi.
8. Kể tên các bước cơ bản sản xuất insulin bằng phương pháp miniproinsulin.
9. Kể tên các loại interleukin có vai trò quan trọng trong cơ thể người và động vật.
10. Nêu tóm tắt một số bước cơ bản trong quy trình công nghệ sinh tổng hợp IL-2 của người từ các chủng vi sinh vật tái tổ hợp.
11. Interferon (IFN) là loại protein được sản xuất trong tế bào người và động vật có khả năng chống đặc hiệu lại vi sinh vật nào?
12. Công nghệ sản xuất interferon trong tế bào vi khuẩn *E. coli* gồm các bước cơ bản nào?
13. Hormon sinh trưởng người (hGH – Human Growth Hormone) là loại hormon do cơ quan nào của người sản xuất ra?
14. Nếu thiếu hormon sinh trưởng người (hGH) gây nên bệnh gì?
15. Hormon sinh trưởng người là protein có bao nhiêu axit amin?

ĐÁP ÁN CÂU HỎI ÔN TẬP

Chương 1

1. 3 giai đoạn: Công nghệ sinh học truyền thống, công nghệ sinh học cận đại và công nghệ sinh học hiện đại
2. Mang tính thực hành, hướng tới công nghiệp
3. Công nghệ lên men truyền thống
4. 4 pha
5. Tế bào động vật và tế bào động vật
6. Chất trao đổi thứ cấp
7. Sơ cấp
8. Là một tập hợp các ngành sinh hoá học, vi sinh vật học, tế bào học, di truyền học với mục tiêu đạt tới sự ứng dụng công nghệ các vi sinh vật, các mô, các tế bào nuôi và các cấu phần của tế bào
9. Công nghệ lên men
10. Vi sinh vật học
11. Là quá trình sản xuất một sản phẩm bằng cách nuôi cấy một lượng lớn vi sinh vật
12. Sử dụng các vi sinh vật, các tế bào động vật và thực vật lên men trong các nồi lên men và nồi phản ứng sinh học có sục khí để sinh tổng hợp các sản phẩm mong muốn
13. Ảnh hưởng độc tính của các thành phần môi trường
14. Các chất kháng sinh
15. Penicillin

Chương 2

1. Cổ khuẩn (Archaea)
2. Màu tím
3. Màng ngoài (outer membrane)
4. Vi khuẩn lam
5. Do chúng có đặc điểm cấu tạo tế bào giống như vi khuẩn
6. *Spirulina*
7. Vi nấm
8. Cổ khuẩn (Archaea)
9. Là cơ thể đơn bào hoặc đa bào và nhân của tế bào có màng nhân
10. Vi khuẩn
11. Giúp tế bào vi khuẩn chuyển động
12. Cổ khuẩn
13. Cổ khuẩn
14. Thành tế bào có peptidoglycan
15. Đơn bào

Chương 3

1. Là chủng vi sinh vật đã được biến đổi gen bằng cách cài gắn thêm một hoặc một số gen từ các loài sinh vật khác nhờ kỹ thuật sinh học phân tử
2. Nhằm loại bỏ một số gen độc, gen có hại, được tạo dòng thuần có độ ổn định cao và lâu dài.
3. Tạo chủng giống có năng suất cao, hạ giá thành sản phẩm và tạo các sản phẩm mới
4. 6 bước: (1) Xác định và tách chiết gen đích, (2) Lựa chọn loại vectơ tách dòng, (3) Tạo

vectơ tái tổ hợp, (4) Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào tế bào vi sinh vật để tạo chủng tái tổ hợp, (5) Chọn lọc và tạo dòng vi sinh vật tái tổ hợp và (6) Thu nhận sản phẩm tái tổ hợp

5. Gen đích là các gen mã hóa các protein cần thiết để tạo chủng tái tổ hợp tùy theo mục đích của con người.
6. Để có gen đích mã hóa protein tinh thể diệt côn trùng, nhằm tạo chủng vi khuẩn *E.coli* hoặc vi khuẩn *Bacillus* tái tổ hợp làm thuốc trừ sâu, trừ muỗi sinh học,... cần phải xác định và tách chiết và tinh sạch từng loại gen *Cry* (I, II, IV...) từ các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*.
7. Plasmid
8. Khoảng 20–25 chu kỳ
9. Để phát hiện vectơ mang gen tái tổ hợp với vectơ chưa biến nạp.
10. Kỹ thuật súc nhiệt
11. Kỹ thuật điện xung hoặc bắn gen.
12. Bằng chỉ thị kháng sinh, bằng gen chỉ thị màu và bằng lai phân tử
13. Vì vectơ có chứa gen kháng sinh.

Chương 4

1. Sinh trưởng
2. Số lượng lớn tế bào cùng một loại
3. Thời gian thế hệ (g, h)
4. Thời gian tăng đôi ($tđ, h$)
5. CFU/ml hoặc g của mẫu

6. Môi trường lỏng (môi trường dịch thể)
7. Dựa vào khả năng sử dụng nguồn cacbon
8. Proteaza
9. Môi trường tự nhiên
10. Tự dưỡng
11. Môi trường hỗn hợp
12. Môi trường chọn lọc
13. Số lượng không tăng, khối lượng tế bào tăng
14. Quá trình lên men (fermentation)
15. Kỵ khí bắt buộc (obligate anaerobe)

Chương 5

1. Nhiệt độ bên ngoài không khí
2. 3 nhóm
3. Oxy
4. Chuyển hóa sinh học các chất hữu cơ nhờ các vi sinh vật tạo thành năng lượng hóa học dưới dạng ATP có oxy phân tử tham gia
5. Axit xitic
6. Lên men bề mặt
7. Lên men trên môi trường xốp
8. 7 loại
9. Lên men rượu (ethylic)
10. Lên men theo mẻ có bổ sung
11. Chuẩn bị vật liệu nhân giống
12. 1–10 lít
13. 100–500 lít
14. Hydro được tách ra từ một chất chuyển đến chất nhận cuối cùng là một hợp chất hữu cơ
15. Lên men sản xuất cồn

Chương 6

1. Chất cho electron là các phân tử hữu cơ, chất nhận cũng là các phân tử hữu cơ
2. Sinh khối nấm men tăng
3. Lên men kỵ khí
4. 46,6%
5. Theo con đường EMP và chu trình Krebs
6. Do cho hiệu suất rượu thấp
7. 5 giai đoạn
8. Lên men chính ngắn (vài ngày) và lên men phụ dài (hàng tháng)
9. Thùng gỗ sồi kín
10. Pectinaza
11. Từ malt
12. 3–5%
13. Amylaza chịu nhiệt
14. *Lactobacillus bulgaricus*
15. *Propionibacterium* và lên men propionic

Chương 7

1. Sinh khối vi sinh vật giàu protein
2. Tốc độ tăng sản lượng lương thực, thực phẩm không đáp ứng tốc độ tăng trưởng dân số; nguồn thuỷ sản tuy lớn nhưng không phải là vô tận; Công nghệ sản xuất protein bằng vi sinh vật dễ dàng, thuận lợi hơn trồng trọt; công nghệ sản xuất protein bằng vi sinh vật dễ dàng, thuận lợi hơn trồng trọt.
3. Các sản phẩm chế biến thuỷ sản
4. Cacbon dioxit (CO_2)

5. Có thể giết chết nấm men hoặc làm cho bánh mỳ nở nhanh quá
6. 40 – 60%
7. Cho động vật nuôi
8. Bổ sung thêm các axit amin không thay thế.
9. *Saccharomyces*
10. Có khả năng đồng hóa nhiều nguồn hydratcacbon khác nhau, nhất là các loại pentozơ và axit hữu cơ
11. Xử lý nguyên liệu, tách bỏ môi trường thừa sau lên men
12. Amylaza
13. 90°C và 10 phút
14. 60–70%
15. *Spirulina*

Chương 8

1. Enzym có thể thực hiện xúc tác mãi mãi
2. Một phản ứng
3. Tổ hợp enzym–cơ chất (ES)
4. Các loại đường đơn
5. 6 nhóm
6. Pasteur
7. Anh em Buchner
8. Apoenzym
9. Hydrolaza (thuỷ phân)
10. Ligaza
11. Không
12. Càng nhỏ
13. $1/2 V_{max}$
14. Không đòi hỏi cấp nhiều không khí
15. Nước

Chương 9

1. Peptit
2. Cả 20 loại

3. Không cần thiết cho sự sống của tế bào
4. Do tế bào của chúng có cơ chế điều hoà thích nghi với quá trình trao đổi chất
5. Các chất kháng sinh
6. Theo mẻ
7. Phương pháp lên men vi sinh vật
8. *Bacillus subtilis*
9. Do tác động của axit malic
10. Biotin
11. 2–3 ngày
12. Phương pháp trao đổi ion
13. Một ít mỳ chính
14. *Aspergillus niger*
15. Thiết bị đơn giản hơn

Chương 10

1. Các axit amin
2. Fleming
3. Với lượng lớn mới ức chế
4. Là hợp chất do vi sinh vật sinh ra mà ngay với số lượng nhỏ cũng ức chế vi sinh vật khác
5. Phổ kháng khuẩn (phổ hoạt tính)
6. 4 nhóm
7. 4 cạnh
8. *Penicillium chrysogenum*
9. Nhóm xạ khuẩn
10. Nước biển
11. Không cần đảm bảo vô trùng trong quá trình xác định
12. Phương pháp đông khô
13. 120 đến 144 giờ
14. Axit 6-aminopenicillanic
15. Không đòi hỏi phản ứng xảy ra ở nhiệt độ thấp

Chương 11

1. Khoảng 30kg

2. Oxy phân tử tham gia vào quá trình chuyển hóa từ amon thành nitrat, không tham gia vào quá trình chuyển hóa thành nitơ phân tử
3. Ví khuẩn
4. Ở nhiệt độ khoảng 1.000°C và áp suất từ vài trăm đến 1.000 atm
5. Thành đậm amoni (NH_3)
6. *Rhizobium*
7. Nitrogenaza
8. Một số loài của *Rhizobium*.
9. Các kim loại tham gia vào các quá trình oxy hóa – khử
10. Cải tạo môi trường đất và tránh dư thừa của phân hóa học ảnh hưởng đến môi trường
11. *Rhizobium*
12. Polygalacturonaza
13. *Bacillus megaterium*
14. *Bacillus thuringiensis*
15. *Beauveria bassiana*

Chương 12

1. Một tập hợp chủng có hoạt tính phân giải
2. Ánh sáng
3. $500 : 10 : 4 : 1$
4. Các chất do con người tạo ra, nhưng không còn giá trị sử dụng vào mục đích phục vụ cuộc sống của con người
5. Lignin
6. Mùn (humus)
7. Đánh giá liều độc LD_{50} của mùn.
8. BOD
9. 1/3
10. Bùn hoạt tính có sục khí
11. Tăng cường khả năng phân tán của bùn hoạt tính

12. Lên men liên tục dạng chemostat
13. Thành phần vi sinh vật là một quần thể vi sinh vật không thuần khiết
14. CH_4
15. Quá trình diễn ra giống như lên men khí

Chương 13

1. Gỗ
2. Vì chúng chuyển hóa năng lượng mặt trời và có thể phục hồi lại được.
3. 2×10^{11} tấn
4. Hoá lỏng
5. Không sinh cacbon monoxit độc hại trong quá trình đốt.
6. Lên men khí tạo metan hoặc tạo chủng vi sinh vật có thể lên men sản xuất etanol bằng công nghệ ADN tái tổ hợp.
7. 99,95%
8. Phương pháp gây nổ ướt (wet explosion)
9. Mỹ
10. 2 cách: thuỷ phân bằng axit và thuỷ phân bằng enzym
11. 10 lần
12. 2 loại: thuỷ phân bằng axit đặc và thuỷ phân bằng axit loãng.
13. Chuyển hoá tốt và chịu được độ cồn cao
14. Nồng độ 20–30% và khoảng 1 giờ
15. *Zymomonas mobilis*

Chương 14

1. Cân bằng hàm lượng glucozơ trong máu
2. Tiểu đường, mù lòa,...

3. 2 phần ; vùng mang mã di truyền và vùng không mang mã
4. 3 cụm gen, class I, class II và class III.
5. Phương pháp 2 chuỗi và phương pháp miniproinsulin (MPI)
6. 5 bước
7. a) Tách dòng các đoạn gen mã hoá chuỗi peptit A và chuỗi peptit B
 b) Tạo 2 loại vectơ tái tổ hợp riêng rẽ.
 c) Biến nạp mỗi loại vectơ tái tổ hợp vào tế bào *E. coli*.
 d) Lên men và thu nhận các chuỗi peptit riêng biệt.
 e) Phản ứng tạo insulin hoạt tính.
8. Phương pháp MPI gồm 5 bước:
 a) Tách chiết ARN thông tin mã hoá proinsulin
 b) Tạo vectơ tái tổ hợp
 c) Biến nạp vào tế bào chủ
 d) Lên men thu sinh khối
 e) Thu nhận và tinh sạch MPI
9. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6...
10. Gồm 7 bước
 - a) Tạo đoạn gen mã hoá Interleukin- 2 của người
 - b) Tạo vectơ tái tổ hợp
 - c) Biến nạp vectơ tái tổ hợp vào *E. coli* DH5α.
 - d) Hoàn thiện gen mã hoá IL-2 của người.
 - e) Tạo dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 có khả năng biểu hiện IL-2 của người
 - f) Lên men và thu nhận IL-2 của người.
 - g) Tách và tinh sạch IL-2 của người
11. Virus
12. 5 bước cơ bản
 - a) Tạo gen mã hoá interferon
 - b) Tạo vectơ tái tổ hợp
 - c) Tạo dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp mang gen mã hoá Interferon
 - e) Tinh sạch và thu nhận interferon thành phẩm
13. Tuyến yên trong não người
14. Gây bệnh lùn bẩm sinh
15. 191 axit amin

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Nguyễn Lan Dũng, Nguyễn Đình Quyết, Phạm Văn Ty. *Vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 1998.
2. Lương Đức Phẩm, *Công nghệ vi sinh vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 1998.
3. Trần Thị Thanh. *Công nghệ vi sinh*. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 2001.
4. Phạm Văn Ty, Vũ Nguyên Thành. *Công nghệ sinh học, Tập năm: Công nghệ vi sinh và môi trường*, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 2004.
5. Lê Trần Bình và những người khác. *Áp dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu tài nguyên sinh vật Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2003.
6. John E. Smith, *Biotechnology*, Fourth Edition, Cambridge University Press, 2004
7. Lê Gia Hy, *Giáo trình vi sinh vật học* (Giáo trình giảng dạy lớp Công nghệ sinh học và công nghệ môi trường, Trường Đại học Dân lập Phương Đông, Hà Nội), 2007
8. <http://www.textbookofbacteriology.net/>. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.
9. Alexander N. Glazer and Hiroshi Nikaido, *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*, Second Edition, Cambridge University Press, 2004
10. Buchholz K., V. Kasche, U. T. Bornscheuer. *Biocatalysts and Enzyme Technology*, WILEY–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
11. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/filtration.html>, Martin Chaplin, *Enzyme Technology*, 2004.

MỤC LỤC

	Trang
Phần thứ nhất: Nguyên lý cơ bản của vi sinh vật	
Chương 1: Nhập môn công nghệ vi sinh vật	5
1.1. Công nghệ sinh học vi sinh vật là gì?	5
1.2. Công nghệ lên men	8
1.3. Sản phẩm của các quá trình lên men	13
1.4. Cải biến di truyền chủng giống sử dụng trong công nghệ lên men	17
Chương 2. Tuyển chọn và bảo quản chủng sản xuất trong công nghệ vi sinh vật	20
2.1. Tiêu chuẩn của chủng giống trong công nghiệp vi sinh vật	20
2.2. Phân lập giống thuần chủng và chọn giống vi sinh vật	33
2.3. Phân loại vi sinh vật	41
2.4. Bảo quản chủng giống vi sinh vật	43
Chương 3. Kỹ thuật tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp	51
3.1. Một số khái niệm chung về vi sinh vật tái tổ hợp	51
3.2. Kỹ thuật tạo chủng vi sinh vật tái tổ hợp	52
Chương 4. Môi trường dinh dưỡng và động học của quá trình lên men vi sinh vật	62
4.1. Dinh dưỡng và môi trường nuôi cấy vi sinh vật	62
4.2. Động học của quá trình lên men vi sinh vật	69
4.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men vi sinh vật	81
Chương 5. Kỹ thuật lên men vi sinh vật	86
5.1. Các phương pháp lên men	86
5.2. Quy trình công nghệ lên men các sản phẩm lên men truyền thống	88
5.3. Quy trình công nghệ lên men sinh tổng hợp bằng phương pháp lên men chìm	94

Phần thứ hai: Ứng dụng công nghệ vi sinh vật	
Chương 6. Công nghệ lên men trong chế biến thực phẩm	105
6.1. Các sản phẩm lên men trong chế biến thực phẩm	105
6.2. Ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất đồ uống có cồn	106
6.3. Ứng dụng lên men lactic trong chế biến thực phẩm	124
Chương 7. Công nghệ lên men sản xuất protein đơn bào	144
7.1. Nguồn protein từ sinh khối vi sinh vật	144
7.2. Vi sinh vật dùng trong sản xuất protein đơn bào (SCP)	145
7.3. Công nghệ sản xuất SCP từ các nhóm vi sinh vật	146
7.4. Quy trình công nghệ sản xuất protein đơn bào (SCP) từ sinh khối vi tảo	152
Chương 8. Công nghệ sản xuất và ứng dụng enzym vi sinh vật	157
8.1. Khái niệm cơ bản về công nghệ enzym	157
8.2. Ứng dụng công nghệ enzym	178
8.3. Mục đích và các yêu cầu chủ yếu để xây dựng mới hoặc cải tiến các quy trình công nghệ sản xuất enzym	184
8.4. Tuyển chọn vi sinh vật có khả năng sinh enzym cao	190
8.5. Phương pháp nuôi cấy vi sinh vật để sản xuất enzym	196
8.6. Tách chiết và tinh sạch chế phẩm enzym	199
Chương 9. Công nghệ lên men sản xuất các sản phẩm trao đổi chất (bậc một)	202
9.1. Các chất trao đổi sơ cấp	202
9.2. Công nghệ lên men sản xuất các axit amin	206
9.3. Công nghệ lên men sản xuất axit xiticric	211
Chương 10. Công nghệ lên men sản xuất các chất trao đổi thứ cấp	218
10.1. Các chất trao đổi thứ cấp	218
10.2. Công nghệ lên men sản xuất kháng sinh	221
10.3. Công nghệ lên men sản xuất penixilin	240
10.4. Bán tổng hợp các chất kháng sinh từ penixilin	245

Chương 11. Công nghệ sinh học vi sinh vật ứng dụng trong nông nghiệp	252
11.1. Sản xuất phân bón vi sinh vật	252
11.2. Công nghệ vi sinh vật sản xuất thuốc sinh học bảo vệ thực vật	263
11.3. Dùng vi sinh vật diệt vi sinh vật có hại	269
Chương 12. Công nghệ vi sinh vật môi trường	281
12.1. Cơ sở sinh học–sinh thái học trong xử lý chất thải bảo vệ môi trường	281
12.2. Công nghệ vi sinh vật xử lý rác thải	293
12.3. Xử lý nước thải bằng phương pháp vi sinh vật	302
12.4. Các phương pháp sinh học xử lý nước thải	315
12.5. Chống ô nhiễm không khí và môi trường sống	331
Chương 13. Công nghệ sản xuất nhiên liệu sinh học	337
13.1. Sự phát sinh nhiên liệu sinh học	337
13.2. Công nghệ lên men sản xuất etanol nhiên liệu từ sinh khối	344
13.3. Công nghệ lên men sản xuất metan từ sinh khối	352
Chương 14. Ứng dụng chủng vi sinh vật tái tổ hợp trong sản xuất một số chất hoạt tính sinh học	355
14.1. Sản xuất insulin bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp	355
14.2. Sản xuất interleukin–2 chống ung thư bằng chủng vi sinh tái tổ hợp	362
14.3. Sản xuất interferon của người bằng các chủng vi sinh vật tái tổ hợp	366
14.4. Sản xuất hormon sinh trưởng người nhờ chủng vi sinh tái tổ hợp	370
Đáp án câu hỏi ôn tập	374
Tài liệu tham khảo	380

Chịu trách nhiệm xuất bản:

Chủ tịch Hội đồng Thành viên kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Tổng biên tập kiêm Phó Tổng Giám đốc NGUYỄN QUÝ THAO

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:

Phó Tổng biên tập NGUYỄN VĂN TƯ
Giám đốc Công ty CP Sách ĐH-DN NGÔ THỊ THANH BÌNH

Biên tập nội dung và sửa bản in: NGUYỄN HỒNG ÁNH

Trình bày bìa: ĐINH XUÂN DŨNG

Thiết kế sách và chế bản: BÌNH MINH

Công ty CP Sách Đại học – Dạy nghề, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam
giữ quyền công bố tác phẩm.

CƠ SỞ CÔNG NGHỆ VI SINH VẬT VÀ ỨNG DỤNG

(DÙNG CHO SINH VIÊN CÁC TRƯỜNG ĐẠI HỌC, CAO ĐẲNG CÓ LIÊN QUAN ĐẾN
SINH HỌC, Y HỌC, NÔNG NGHIỆP)

Mã số: 7K833y2 – DAI

Số đăng ký KHXB: 245 - 2012/CXB/22 - 280/GD.

In 600 cuốn (QĐ in số: 75), khổ 16 x 24 cm.

In tại Công ty CP In – Thương mại Hà Tây.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 10 năm 2012.



CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC - DẠY NGHỀ

HEVOBCO

25 HÀN THUYỀN – HÀ NỘI

Website : www.hevobco.com.vn ; Tel : 043. 9724715

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

1. Đất ngập nước	GS. TS. Lê Văn Khoa
2. Động vật học có xương sống	GS. TS. Lê Vũ Khôi
3. Sinh thái học côn trùng	PGS. TS. Phạm Bình Quyết
4. Cơ sở hoá sinh	PGS. TS. Trịnh Lê Hùng
5. Tài nguyên nước Việt Nam	Nguyễn Thanh Sơn
6. Virut học	PGS. TS. Phạm Văn Ty
7. Bộ sách về công nghệ sinh học	
<i>Tập một : Sinh học phân tử và tế bào – Cơ sở khoa học của công nghệ sinh học</i>	PGS. TS. Nguyễn Như Hiển
<i>Tập hai : Công nghệ tế bào thực vật và động vật</i>	GS. TS. Vũ Văn Vụ GS. TS. Nguyễn Mộng Hùng
<i>Tập ba : Enzym và ứng dụng</i>	GS. TSKH. Phạm Thị Trần Châu PGS. TS. Phan Tuấn Nghĩa
<i>Tập bốn : Công nghệ di truyền</i>	TS. Trịnh Đình Đạt
<i>Tập năm : Công nghệ vi sinh và môi trường</i>	PGS. TS. Phạm Văn Ty TS. Vũ Nguyên Thành
8. Cơ sở lý thuyết và kỹ thuật sản xuất thực phẩm	TS. Nguyễn Xuân Phương TSKH. Nguyễn Văn Thoa

Bạn đọc có thể mua tại các Công ty Sách - Thiết bị trường học ở các địa phương hoặc các Cửa hàng của Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam :

Tại Hà Nội : 25 Hàn Thuyên ; 187B Giảng Võ ; 232 Tây Sơn ;

Tại Đà Nẵng : Số 15 Nguyễn Chí Thanh ; Số 62 Nguyễn Chí Thanh ;

Tại Thành phố Hồ Chí Minh : Cửa hàng 451B - 453, Hai Bà Trưng, Quận 3 ;

Chi nhánh công ty CP Sách Đại học - Dạy nghề, 240 Trần Bình Trọng - Quận 5 ;

Tại Thành phố Cần Thơ : Số 5/5, đường 30/4 ;

Website : www.nxbgd.vn



8934994150798

7K833y2



Giá: 75.000 đ