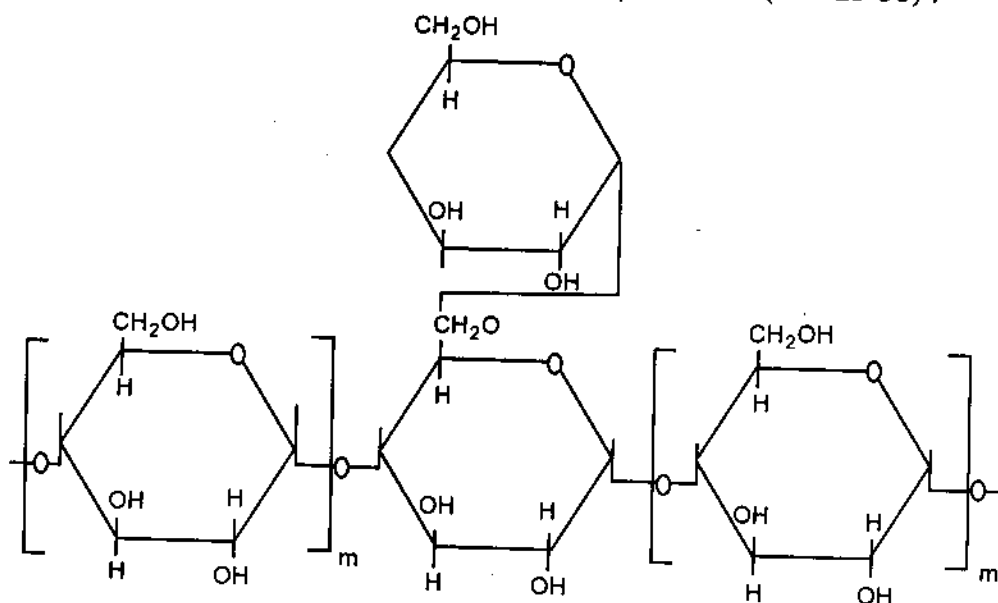


Amilopectin chứa từ 0,1 - 0,8% P_2O_5 . Đó là một chuỗi phân nhánh cấu tạo bởi các gốc α -D-glucopirano, liên kết với nhau bằng gáy nối 1-4 và 1-6 glucosit. Amilopectin như một loại xi măng, co giãn được, liên kết các tinh thể amilo với nhau. Amilopectin có cấu tạo như sau ($m = 25-30$) :



2.6.2. Vi sinh vật phân giải tinh bột

- Nhiều loại VSV có khả năng sản sinh men amilaza ngoại bào làm phân giải tinh bột thành các thành phần đơn giản hơn. Có thể phân biệt một số loại amilaza sau đây :

+ α -amilaza : tác động đồng thời lên nhiều dây nối (α -1-4) kể cả các dây nối bên trong đại phân tử. Sản phẩm quá trình phân giải này ngoài mantozơ còn có các oligomer chứa 3-4 gốc glucosơ.

+ β -amilaza : khác với α -amilaza, men β -amilaza chỉ tác động vào phần ngoài đại phân tử.

+ Amila 1-6 glucosidaza : phân cách dây nối 1-6 glucosit ở các chỗ phân nhánh.

+ Glucoamilaza : phân giải tinh bột thành glucozơ và các α -oligosaccarit.

- Dưới đây là tên một số các loại VSV có hoạt tính amilaza cao và có ý nghĩa nhiều trong việc phân giải tinh bột :

+ *Aspergillus cadidus*, *Asp. niger*, *Asp. oryzae*, *B. mesentericus*, *B.sulitilis* có khả năng tiết ra men α .amilaza.

+ *Asp. Awamori*, *Asp. Oryzae* tiết ra men β .amilaza.

+ *Asp. Awamorii*, *Asp. niger*, *Asp. oryzae* tiết ra men glucoamilaza.

III - QUÁ TRÌNH TỔNG HỢP VÀ PHÂN GIẢI CÁC HỢP CHẤT CHỨA NITƠ

3.1. Vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên

Trong đó :

I - Quá trình cố định nitơ phân tử.

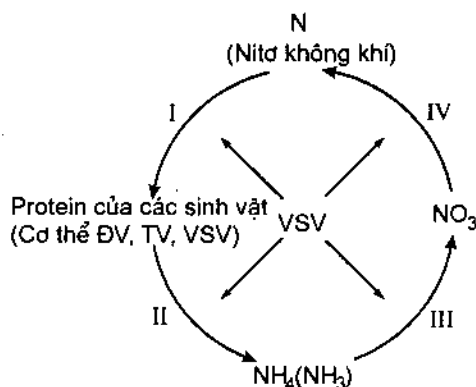
II - Quá trình amôn hoá.

III - Quá trình nitơrat hóa.

IV - Quá trình phản nitơrat hoá.

3.2. Quá trình amôn hóa

Quá trình phân huỷ, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ dưới tác dụng của VSV để thành các hợp chất hữu cơ đơn giản hơn là NH_4^+ hoặc NH_3 , được gọi là quá trình amôn hóa.



Hình 8.3. Sơ đồ vòng tuần hoàn nitơ trong tự nhiên

3.2.1. Quá trình amôn hóa protein

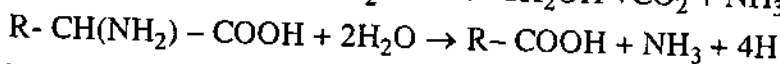
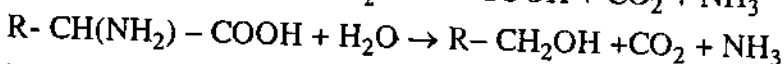
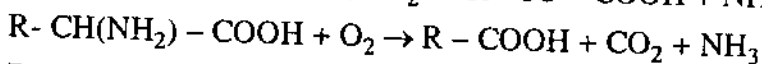
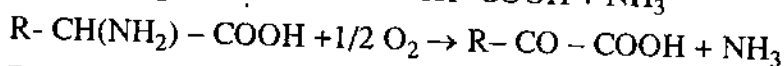
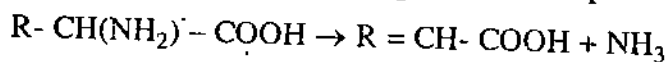
a) Định nghĩa : Dưới tác dụng của VSV, protein được phân giải để cho NH_3 gọi là quá trình amôn hoá protein.

b) VSV chủ yếu : Có rất nhiều loại VSV có khả năng phân giải protein : vi khuẩn hảo khí, yếm khí, xạ khuẩn, nấm.

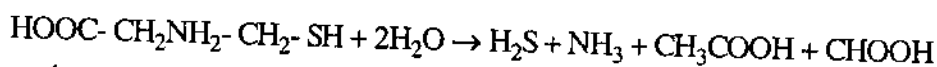
c) Cơ chế phân giải

Dưới tác dụng của men proteinaza, các protein được phân giải thành các hợp chất đơn giản hơn (polipeptit và olizopeptit). Các chất này được tiếp tục phân giải thành axit amin nhờ tác dụng của men peptidaza ngoại bào. Các chất này cũng có thể trực tiếp hấp thụ vào tế bào VSV, sau đó được tiếp tục chuyển hoá thành axit amin. Các axit amin này sẽ được sử

dụng một phần vào quá trình sinh tổng hợp protein của VSV, một phần được tiếp tục phân giải để tạo ra NH_3 , CO_2 và nhiều sản phẩm trung gian khác.



Khi phân giải các axit amin chứa S (như mêtionin, xistin, xistein), VSV giải phóng ra khí H_2S :



d) Ứng dụng

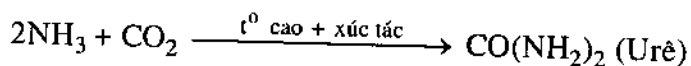
Quá trình amôn hóa protein thường gặp trong sản xuất và đời sống. Nắm được quá trình này, chúng ta có thể vận dụng vào các quá trình chế biến và bảo quản nông sản phẩm, đặc biệt là những nông sản quý như : trứng, sữa, thịt hộp, cá hộp... Chúng ta cũng vận dụng quá trình này trong chế biến thức ăn cho người và gia súc.

3.2.2. Quá trình amôn hoá urê, axit uric

a) Urê

- Urê là một loại hợp chất hữu cơ đơn giản chứa tới 46,6% N.

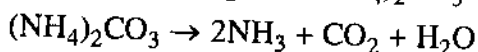
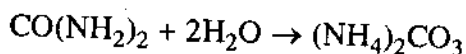
- Urê thường có trong nước tiểu động vật và người. Urê có thể điều chế dưới điều kiện áp suất 150-200at và 150-190°C.



- Vi khuẩn amôn hoá urê : *Planosarcina ureae*, *Micrococcus ureae*, *Sarcina ureac*, *Sarcina hansenii*, *Bacillus pasteurii*, *Bac. hesmogenes* v.v...

Nhiều loại xạ khuẩn và nấm mốc cũng có khả năng phân giải urê.

Vi khuẩn urê thường thuộc loại hảo khí hoặc yếm khí không bắt buộc. Chúng phát triển tốt trong môi trường trung tính hoặc hơi kiềm. Chúng không sử dụng được cacbon trong urê, urê chỉ được dùng làm nguồn cung cấp nitơ cho chúng. Chúng có men ureaza làm xúc tác quá trình phân giải urê thành NH_3 , CO_2 , H_2O .



b) *Axit uric* : là một hợp chất nitơ hữu cơ chứa trong nước tiểu (khoảng 0,5g/l). Chúng được phân giải thành urê và axit tauric. Sau đó urê được tiếp tục phân giải như trên.

3.2.3. Quá trình amôn hoá kitin

- Kitin là một hợp chất cao phân tử bền vững. Cấu trúc của kitin gần với cấu trúc của xenlulo, nhưng trong phân tử của các gốc glucosơ, người ta thấy gốc hidroxin ở nguyên tử C thứ hai được thay thế bằng những gốc amin đã được axetin hoá.

- VSV phân giải kitin :

Nhiều loại VSV có khả năng phân giải kitin. Đáng chú ý nhất là những loại thuộc các giống khác sau : *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Penicillium*.

- Quá trình phân giải kitin được nghiên cứu khá kỹ ở vi khuẩn *Bac. chitinovorum* và xạ khuẩn *Streptomyces griseus*. Chúng có khả năng sinh ra các men ngoại bào : Kitinaza và Kitobiaza. Kitinaza tác dụng đồng thời lên các phần khác nhau của phân tử kitin và làm phân giải thành kitobio và kitotrio (một phần N - axetilglucosamin cũng được sinh ra). Kitotrio sẽ được tiếp tục phân giải thành các gốc đơn phân tử (monomer) nhờ xúc tác của men kitobiaza.

3.3. Quá trình nitrat hóa

3.3.1. Định nghĩa

Dưới tác dụng của một số loài VSV đặc biệt, NH_4^+ được hình thành do quá trình amôn hoá hoặc NH_4^+ ở các loại phân hoá học sẽ được tiếp tục chuyển hoá thành NO_2^- (nitrit) rồi sau đó thành NO_3^- gọi là quá trình nitrat hoá.

3.3.2. Vi sinh vật chủ yếu

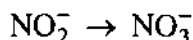
Quá trình này chia làm hai giai đoạn khác nhau do hai loại vi khuẩn đảm nhiệm :

+ *Giai đoạn I* : Giai đoạn nitrit hoá

Vi khuẩn tham gia vào giai đoạn chuyển hoá NH_3 thành NO_2^- thuộc về 4 giống : *Nitrosomonas*, *Nitrocystis*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira*.

Quá trình nitrit hoá được trình bày theo phương trình sau :

Men xúc tác cho quá trình oxi hoá này là men thông thường của quá trình hô hấp hiếu khí.

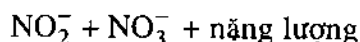


+ *Giai đoạn 2* : Giai đoạn nitrat hoá

Vi khuẩn tham gia vào giai đoạn này gồm các giống sau :

Nitrobacter, Nitrospira, Nitrococcus.

Cơ chế của quá trình được biểu thị bằng sơ đồ sau :



Vi khuẩn nitorat hóa thuộc loại tự dưỡng hóa năng.

Ngoài quá trình nitrat hóa do VSV tự dưỡng hoá năng còn có quá trình nitrat hoá do nhiều loại VSV tự dưỡng. Chúng không có khả năng đồng hoá CO_2 trong không khí nhưng có khả năng chuyển NH_3 thành nitrit rồi thành NO_3^- .

Nhóm VSV dị dưỡng gồm nhiều loại vi khuẩn và xạ khuẩn thuộc các giống (chi) *Alcaligenes, Anthrobacter, Corynebacterium, Achromobacter, Pseudomonas*. Ngoài việc nitrat hoá các chất NH_3^+ hay NO_2^- , nhiều loại trong số các VSV dị dưỡng nói trên còn có thể tiến hành quá trình nitrat hoá đối với nhiều hợp chất chứa nitơ khác (amit, amin, oxim, hidroxamat...).

3.3.3. Tác hại của quá trình nitrat hóa

- NO_3^- dễ bị rửa trôi.
- NO_3^- làm chua đất.
- NO_3^- là nguồn N của vi khuẩn phản nitrat hoá làm cho đất mất N.
- NO_2^- , NO_3^- độc đối với cây.

3.4. Quá trình phản nitrat hoá

3.4.1. Định nghĩa

NO_3^- trong tự nhiên, dưới tác dụng của một số VSV đặc biệt sẽ được chuyển hoá thành N_2 , gọi là quá trình phản nitrat hoá.

3.4.2. Vi sinh vật

- *Pseudomonas denitrificans* ; *Ps. aeruginosa* ; *Ps. stutzeri* ; *Ps. fluorescens*.

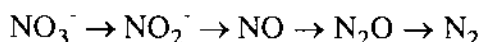
- Một số loại vi khuẩn tự dưỡng hóa năng cũng có khả năng thực hiện quá trình này như : *Thiobacillus denitrificans* ; *Hidrogenomonas agilis*.

Vi khuẩn phản NO_3 là nhóm vi khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Chúng thường là vi khuẩn yếm khí tùy tiện. Trong điều kiện có

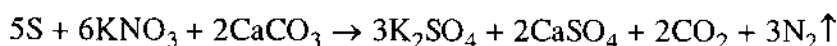
oxi, nó có thể dùng oxi của không khí, trong điều kiện không có oxi của không khí nó dùng oxi của NO_3^- . Chúng có thể sản sinh men NO_3^- reductaza hoặc NO_2^- reductaza. Vi khuẩn phản nitrat thường hoạt động mạnh trong môi trường trung tính hay hơi kiềm.

3.4.3. Cơ chế quá trình có thể tóm tắt như sau :

Quá trình phản nitrat hoá khử NO_3^- đến N_2 như sau :



Thiobacillus denitrificans là VSV dinh dưỡng hoá năng, oxi hoá phân tử S lấy năng lượng để tiến hành quá trình tổng hợp chất hữu cơ của cơ thể. Trong điều kiện không có oxi, nó dùng oxi của NO_3^- để oxi hoá S, khử NO_3^- để có N_2 :



3.5. Quá trình cố định N_2

- Nitơ là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng không thể thiếu được, không chỉ đối với cây trồng, mà ngay cả đối với VSV. Nguồn dự trữ nitơ trong tự nhiên rất lớn, chỉ tính riêng trong không khí, nitơ chiếm khoảng 78,16% thể tích của không khí. Người ta ước tính rằng, trong bầu không khí bao trùm lên 1ha đất đai chứa khoảng 8 triệu tấn nitơ, lượng nitơ này có thể cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng hàng chục triệu năm (nếu như cây trồng đồng hoá được chúng).

- Trong cơ thể các loài sinh vật trên Trái Đất chứa khoảng $10 - 25.10^9$ tấn nitơ. Trong các vật trầm tích chứa khoảng 4.10^{15} tỉ tấn nitơ. Nhưng tất cả nguồn nitơ trên cây trồng đều không tự đồng hoá được, mà phải nhờ VSV. Thông qua hoạt động sống của các loài VSV, nitơ nằm trong các dạng khác nhau được chuyển hóa thành dễ tiêu cho cây trồng sử dụng.

Hàng năm cây trồng lấy đi từ đất hàng trăm triệu tấn nitơ. Bằng cách bón phân, con người trả lại cho đất được khoảng trên 40%, lượng thiếu hụt còn lại cơ bản được bổ sung bằng nitơ do hoạt động sống của VSV. Vì vậy việc nghiên cứu, sử dụng nguồn đạm sinh học này được xem là một giải pháp quan trọng trong nông nghiệp, đặc biệt trong sự phát triển nền nông nghiệp bền vững của thế kỉ XXI này.

Quá trình cố định nitơ phân tử là quá trình đồng hoá nitơ của không khí thành đạm amôn dưới tác dụng của một số nhóm VSV có hoạt tính nitrogenaza.

Bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử được hai nhà bác học là Hellrigel và Uynfac tìm ra năm 1886, gồm 2 nhóm VSV tham gia đó là :

3.5.1. Quá trình cố định nitơ phân tử nhờ vi sinh vật sống tự do và hội sinh

Là quá trình đồng hoá nitơ của không khí dưới tác dụng của các chủng giống VSV sống tự do hoặc hội sinh, có sự tham gia của hoạt tính *nitrogenara*.

Thuộc về nhóm này có tới hàng nghìn chủng VSV khác nhau, trong đó phải kể đến một số VSV sau :

a) Vi khuẩn *Azotobacter*

- Năm 1901, nhà bác học Beyjeirinh đã phân lập được từ đất một loài VSV có khả năng cố định nitơ phân tử cao, ông đặt tên cho loài VSV này là *Azotobacter*. Vi khuẩn *Azotobacter* khi còn non có tiên mao, có khả năng di động nhờ tiên mao (Flagellum) ; Là vi khuẩn hình cầu (song cầu khuẩn) ; Gram âm không sinh nha bào, hảo khí, kích thước tế bào dao động 1,5 - 5,5 μ m, khuẩn lạc dạng S màu trắng trong, lỏng, nhầy. Khi già, khuẩn lạc có màu vàng lục hoặc màu nâu thẫm, tế bào được bao bọc lớp vỏ dày và tạo thành nang xác, gặp điều kiện thuận lợi, nang xác này sẽ nứt ra và tạo thành các tế bào mới.

- Vi khuẩn *Azotobacter* thích ứng ở pH = 7,2 - 8,2, ở nhiệt độ 28 - 30 $^{\circ}$ C, độ ẩm 40 - 60%. *Azotobacter* đồng hoá tốt các loại đường đơn và đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucosơ, nó có khả năng đồng hoá được 8 - 18mg N. Ngoài ra, *Azotobacter* còn có khả năng tiết ra một số vitamin thuộc nhóm B như B₁, B₆ ..., một số axit hữu cơ như : axit nicotinic, axit pantotenic, biotin, auxin. Các loại chất kháng sinh thuộc nhóm Anixomyxin.

- Thuộc về giống *Azotobacter* có rất nhiều loài khác nhau : *Azotobacter chroococcum* ; *Azotobacter axitum* ; *Azotobacter araxii* ; *Azotobacte v.v...*

b) Vi khuẩn *Beijeriniskii*

- Năm 1893 nhà bác học Ấn Độ Stackê đã phân lập được một giống vi khuẩn ở ruộng lúa nước pH rất chua, có khả năng cố định nitơ phân tử, ông đặt tên là vi khuẩn *Beijeriniskii*. Giống Vi khuẩn *Beijeriniskii* có hình cầu, hình bầu dục hoặc hình que ; Gram âm không sinh nha bào, hảo khí, một số loài có tiên mao, có khả năng di động ; Kích thước tế bào dao động 0,5 - 2,0 \times 1,0 - 4,5 μ m. Khuẩn lạc thuộc nhóm S, rất nhầy, lỏng, không màu hoặc màu nâu tối khi già, không tạo nang xác.

- Vi khuẩn *Beijeriniskii* có khả năng đồng hoá tốt các loại đường đơn, đường kép, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucosơ nó có khả năng cố định được 5 - 10mg N.

Khác với vi khuẩn *Azotobacter*, vi khuẩn *Beijeriniskii* có tính chống chịu cao với axit, nó có thể phát triển ở môi trường pH = 3, nhưng vẫn phát triển ở pH trung tính hoặc kiềm yếu, vi khuẩn *Beijeriniskii* thích hợp ở độ ẩm 70 - 80% ở nhiệt độ 25 - 28⁰C. Vi khuẩn *Beijeriniskii* phân bố rộng trong tự nhiên, nhất là ở vùng nhiệt đới và á nhiệt đới.

c) Vi khuẩn *Clostridium*

- Năm 1939, nhà bác học người Nga Vinogradskii đã phân lập, tuyển chọn được một giống vi khuẩn yếm khí, có khả năng cố định nitơ phân tử cao, ông đặt tên cho vi khuẩn này là vi khuẩn *Clostridium*. Đây là trực khuẩn gram dương, sinh nha bào, khi sinh nha bào nó kéo méo tế bào ; Kích thước tế bào dao động 0,7 - 1,3 × 2,5 - 7,5µm ; Khuẩn lạc thuộc nhóm S, màu trắng đục, lồi, nhày. Vi khuẩn *Clostridium* ít mẫn cảm với môi trường, nhất là môi trường thừa P, K, Ca và có tính ổn định với pH. Nó có thể phát triển ở pH = 4,5 - 9,0, độ ẩm thích hợp 60 - 80%, nhiệt độ 25 - 30⁰C. Vi khuẩn *Clostridium* đồng hoá tốt tất cả các nguồn thức ăn nitơ vô cơ và hữu cơ, cứ tiêu tốn 1 gam đường glucosơ, thì nó đồng hoá được 5 - 12mgN.

- Vi khuẩn *Clostridium* có nhiều loài khác nhau : *Clostridium butyrium* ; *Clostridium beijeriniskii* ; *Clostridium pectinovorum* ; *Clostridium gracies* v.v...

3.5.2. Quá trình cố định nitơ phân tử cộng sinh

- Là quá trình đồng hóa nitơ của không khí dưới tác dụng của các loài VSV cộng sinh với cây họ Đậu có hoạt tính *nitrogenaza*.

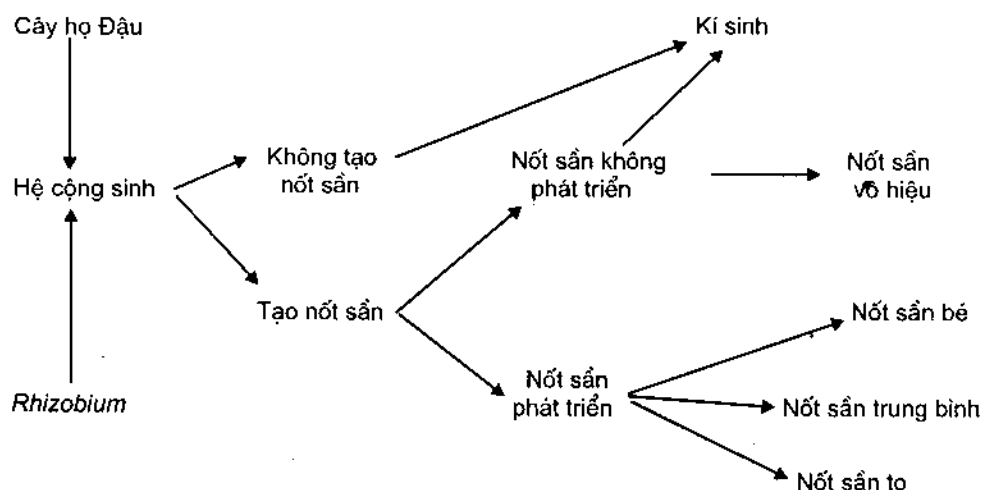
- Năm 1886, Hellriegel và Uynfac đã khám phá ra bản chất của quá trình cố định nitơ phân tử. Họ đã chứng minh được khả năng của cây họ Đậu lấy được nitơ khí quyển là nhờ vi khuẩn nốt sần (VKNS) sống ở vùng rễ cây họ Đậu. Vi khuẩn *Rhizobium* là loại trực khuẩn gram âm không sinh nha bào, hảo khí ; Kích thước tế bào dao động 0,5 - 1,2 × 2,0-3,5µm ; Khuẩn lạc thuộc nhóm S, nhày, lồi, màu trắng trong hoặc trắng đục, kích thước khuẩn lạc dao động 2,3 - 4,5mm sau một tuần nuôi trên môi trường thạch bằng ; Vi khuẩn *Rhizobium* có tiên mao, có khả năng di động, chúng thích hợp ở pH = 6,5 - 7,5, nhiệt độ 25 - 28⁰C, độ ẩm 50 - 70%. Khi già có một số loài tạo được nang xác, khuẩn lạc sẽ chuyển sang màu nâu nhạt. Vi khuẩn *Rhizobium* gồm nhiều loài khác nhau : *Rh. leguminosarum* ; *Rh. phaseoli* ; *Rh. trifolii* ; *Rh. lupini* ; *Rh. japonicum* ; *Rh. meliloti* ; *Rh. cicer* ; *Rh. vicia* ; *Rh. lotus* v.v...

- Hiện nay người ta tạm chia VKNS thành 4 nhóm lớn :

+ *Sinorhizobium fredy* : là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra axit hay là chúng làm axit hóa môi trường.

+ *Bradyrhizobium* : là những loài mà trong hoạt động sống của chúng sản sinh ra chất kiềm, hay là chúng làm kiềm hóa môi trường.

+ *Agrobacterium* và *Phillobacterium* : hai giống này là VKNS nhưng không cộng sinh ở cây họ Đậu mà cộng sinh ở rễ, thân, kẽ lá cây rừng và những cây thủy hải sản. Hai giống này không có ý nghĩa nhiều trong nông nghiệp.



Hình 8.4. Sơ đồ tạo thành hệ cộng sinh ở cây họ Đậu

3.5.3. Các vi sinh vật cố định nitơ phân tử khác

Ngoài những giống VSV cố định nitơ phân tử nói trên, còn vô số những giống khác đều có khả năng cố định nitơ phân tử, chúng có nhiều ý nghĩa trong sản xuất nông, lâm, ngư nghiệp.

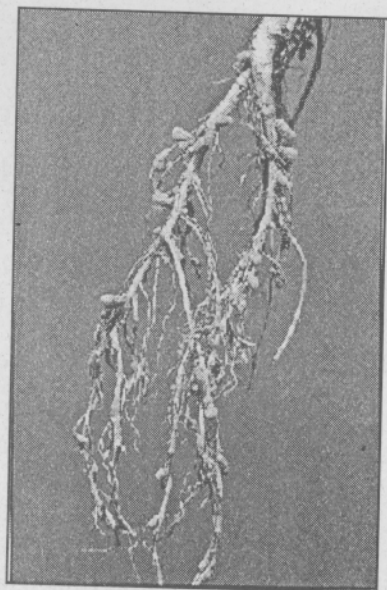
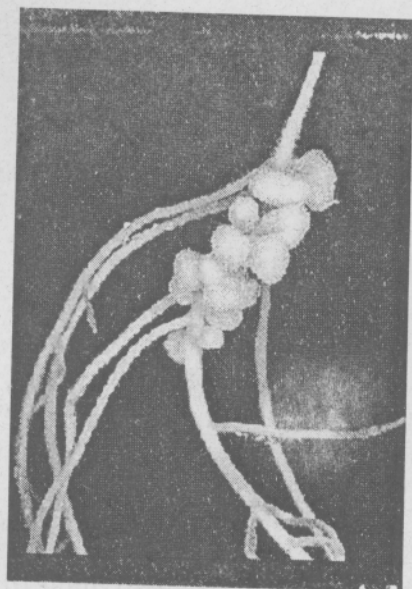
- Vi khuẩn :

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử hảo khí : *Azotomonas insolita* ; *Azotomonas fluorescens* ; *Pseudomonas azotogenis* ; *Azospirillum* v.v...

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử hảo khí không bắt buộc : *Klebsiella pneumoniae* ; *Aerobacter aerogenes* v.v...

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử yếm khí quang hợp : *Rhodospirillum rubrum* ; *Chromatium* sp ; *Chlorobium* sp ; *Rhodomicribium* sp v.v...

+ Nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử yếm khí không quang hợp : *Desulfovibrio desulfuricans* ; *Methanobacterium* sp...



Hình 8.5. Nốt sần ở rễ cây đậu xanh, đậu tương

- Xạ khuẩn : Một số loài thuộc giống : *Streptomyces* ; *Actinomyces* ; *Frankia* ; *Nocardia* ; *Actinopolispora* ; *Actinosynoema*...
- Nấm : *Thodotorula*....
- Tảo, Vi khuẩn lam : *Glococapsa* sp ; *Lingbyaps* ; *Plectonema* ; *Boyryanum* ; *Anabaena azollae* ; *Anabaena ambigua* ; *Anabaena cycadae* ; *Anabaena cylindrica* v.v...

3.5.4. Cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử

- Suốt thời gian dài, cơ chế của quá trình cố định nitơ phân tử là một bí ẩn đầy hấp dẫn của tự nhiên. Con người phải sử dụng những điều kiện kỹ thuật rất cao, rất tốn kém ($400 - 500^{\circ}\text{C}$, 200 - 1000 atm với những chất xúc tác rất đắt tiền) để phá vỡ mối liên kết 3 của phân tử nitơ để có phân đạm hoá học.

Trong khi đó, VSV với sự trợ giúp của hoạt tính nitrogenaza lại phá vỡ mối liên kết 3 của phân tử nitơ một cách dễ dàng ngay trong điều kiện rất bình thường về nhiệt độ và áp suất.

- Có thể nói quá trình cố định nitơ phân tử là quá trình khử N_2 thành NH_3 có xúc tác của enzym nitrogenaza, khi có mặt của ATP.

