

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

PGS. TS. NGUYỄN THỊ HIỀN (CHỦ BIÊN)



CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT
MÌ CHÍNH
VÀ CÁC SẢN PHẨM
LÊN MEN
CỔ TRUYỀN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT



TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

PGS.TS. NGUYỄN THỊ HIỀN
(Chủ biên)

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MÌ CHÍNH VÀ CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN CỔ TRUYỀN



**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI**

60-6C8

6-217-04

KHKT-04

LỜI NÓI ĐẦU

Giáo trình công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩm lên men cổ truyền ra đời nối tiếp giáo trình công nghệ sản xuất mì chính và nước chấm được dùng giảng dạy cho sinh viên ngành công nghệ lên men từ năm 1968 xuất bản tại Đại học Công nghiệp nhẹ năm 1970. Từ đó đến nay, mặc dù sinh viên ngành công nghệ các sản phẩm lên men vẫn học môn học này nhưng vẫn chưa có giáo trình chính thức. Vì vậy để hỗ trợ cho sinh viên ngành công nghệ lên men và các độc giả quan tâm đến các sản phẩm công nghệ sinh học thực phẩm đa dạng và phong phú này, trong quá trình giảng dạy chúng tôi có thu thập thông tin về các tài liệu liên quan để hình thành nên cuốn giáo trình này. Giáo trình gồm hai phần :

- Công nghệ sản xuất mì chính.
- Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men cổ truyền.

Giáo trình này là tài liệu tham khảo cần thiết hiện nay cho sinh viên học các ngành công nghệ lên men và các ngành công nghiệp thực phẩm khác. Tuy nhiên, giáo trình này chắc chắn không tránh khỏi nhiều hạn chế và thiếu sót. Chúng tôi hy vọng rằng trong vài năm tới, đội ngũ cán bộ trẻ của bộ môn sẽ tiếp thu giảng dạy môn học này và bổ sung tư liệu nhiều hơn để giáo trình công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩm lên men cổ truyền ngày càng đáp ứng được nhu cầu dạy và học tốt hơn. Chúng tôi cũng rất mong nhận được những góp ý chân thành của bạn đọc để lần xuất bản sau giáo trình được hoàn thiện hơn.

Thay mặt tập thể tác giả

PGS. TS. Nguyễn Thị Hiền

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn :

Ban Giám hiệu Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Phòng Đào tạo Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm.

Bộ môn Công nghệ sinh học thực phẩm - ĐHBK Hà Nội

Bộ môn Đồ uống - Viện Công nghiệp thực phẩm.

Bộ môn Hoá thực phẩm- Đại học Kỹ thuật Thành phố Hồ Chí Minh

Đặc biệt chúng tôi xin được gửi lời cảm ơn sâu sắc tới PGS.TS. Quản Văn Thịnh người đã đặt nền móng đầu tiên cho môn học này và luôn có những ý kiến bổ sung và đóng góp cho môn học và giáo trình: *Công nghệ sản xuất mì chính và các sản phẩm lên men cổ truyền* ngày càng hoàn thiện hơn.

Chúng tôi xin cảm ơn một số em sinh viên K43, đặc biệt là em Lâm Viết Bình lớp Công nghệ lên men- K43 thuộc Bộ môn Công nghệ sinh học thực phẩm- Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm-Trường Đại học Bách khoa Hà Nội đã giúp đỡ tôi bổ sung thêm tài liệu và đánh máy một số phần liên quan cho kịp xuất bản giáo trình và kịp phục vụ các em sinh viên có những tư liệu cho học tập môn học này.

Chúng tôi cảm ơn Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật đã phối hợp với Phòng Đào tạo Đại học Trường Đại học Bách khoa Hà Nội giúp đỡ cho in ấn nhanh giáo trình này để phục vụ kịp thời cho sinh viên và các đối tượng trong các ngành liên quan cần tham khảo.

Chúng tôi xin cảm ơn tất cả bạn bè, đồng nghiệp và chồng, con tôi đã giúp đỡ và tạo điều kiện mọi mặt cho tôi hoàn thành bản giáo trình này.

Xin cảm ơn tất cả và mong nhận được ý kiến đóng góp chân thành của bạn đọc để giáo trình này ngày càng hoàn thiện hơn.

Tập thể tác giả

PGS.TS. Nguyễn Thị Hiền- ĐHBK Hà Nội (Chủ biên)

PGS.TS. Giang Thế Bính - Viện Công nghiệp thực phẩm

PGS.TS. Nguyễn Đức Lượng- ĐHKT TP.Hồ Chí Minh

PHẦN I

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MÌ CHÍNH

PGS. TS. Nguyễn Thị Hiền, PGS. TS. Giang Thế Bính

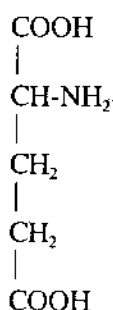
CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN VỀ MÌ CHÍNH

I. KHÁI QUÁT VỀ MÌ CHÍNH

I.1. Khái niệm

Trong đời sống thường nhật, axit amin nói chung và axit glutamic (L-AG) nói riêng có một ý nghĩa to lớn. L-AG là một axit amin công nghiệp quan trọng. Công thức hoá học là:



Muối natri của L-AG là natri glutamat mà ta quen gọi là mì chính, đọc chệch từ “vị tinh” của Trung Quốc.

Mì chính là muối mono natri của axit L-glutamic, thường gặp dưới dạng bột hoặc tinh thể màu trắng ngậm một phân tử nước, là chất điều vị có giá trị trong công nghiệp thực phẩm, trong nấu nướng thức ăn hàng ngày (đặc biệt là các nước phương Đông).

I.2. Vai trò của mì chính và L-AG

I.2.1. Vai trò của L-AG

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu để sản xuất axit glutamic được đẩy mạnh nhất. Ngày nay ta càng sử dụng nhiều axit glutamic trong việc nâng cao sức khoẻ và điều trị một số bệnh của con người.

Axit glutamic rất cần cho sự sống, tuy là một loại aminoaxit không phải thuộc loại không thay thế nhưng nhiều thí nghiệm lâm sàng cho thấy nó là một loại axit amin đóng vai trò

quan trọng trong quá trình trao đổi chất của người và động vật, trong việc xây dựng protit, xây dựng các cấu tử của tế bào.

Axit glutamic có thể đảm nhiệm chức năng tổng hợp nên các aminoaxit khác như alanin, lōsin, cystein, prolin, oxyprolin v. v..., nó tham gia vào phản ứng chuyển amin, giúp cho cơ thể tiêu hoá nhóm amin và tách NH_3 ra khỏi cơ thể. Nó chiếm phần lớn thành phần protit và phần xám của não, đóng vai trò quan trọng trong các biến đổi sinh hoá ở hệ thần kinh trung ương, vì vậy trong y học còn sử dụng axit glutamic trong trường hợp suy nhược hệ thần kinh nặng, mệt mỏi, mất trí nhớ, sự đầu độc NH_3 vào cơ thể, một số bệnh về tim, bệnh teo bắp thịt v. v...

L-AG dùng làm thuốc chữa các bệnh thần kinh và tâm thần, bệnh chậm phát triển trí óc ở trẻ em, bệnh bại liệt, bệnh hôn mê gan.

L-AG còn dùng làm nguyên liệu khởi đầu cho việc tổng hợp một số hoá chất quan trọng: N- acetylglutamat là chất hoạt động bề mặt, vi sinh vật có thể phân giải được, ít ăn da, được dùng rộng rãi trong công nghiệp mỹ phẩm, xà phòng và dầu gội đầu. Axit oxopyrolidicacboxylic, một dẫn xuất khác của L- AG được dùng làm chất giữ ẩm trong mỹ phẩm. Acetylglutamat được dùng trong xử lý ô nhiễm nước biển do dầu hoả và dầu thực vật gây nên.

L-AG phân bố rộng rãi trong tự nhiên dưới dạng hợp chất và dạng tự do, có trong thành phần cấu tạo của protein động thực vật. Trong mô, L-AG tạo thành từ NH_3 và axit α -xetoglutaric. Trong sinh vật, đặc biệt là vi sinh vật, L-AG được tổng hợp theo con đường lên men từ nhiều nguồn cacbon.

1.2.2. Vai trò của mì chính

Khi trung hoà axit glutamic chuyển thành glutamat natri (mì chính), kết tinh có vị ngọt dịu trong nước, gần giống với vị của thịt. Glutamat natri có ý nghĩa lớn đối với đời sống con người, nó được sử dụng ở các nước Trung Quốc, Nhật Bản, Việt Nam... Các nước Châu Âu chủ yếu dùng mì chính để thay một phần thịt cho vào các hỗn hợp thực phẩm, xúp, rượu, bia và các sản phẩm khác.

Mì chính là chất điều vị trong chế biến thực phẩm, làm gia vị cho các món ăn, cháo, mì ăn liền, thịt nhân tạo, các loại thịt cá đóng hộp v. v... nhờ đó sản phẩm hấp dẫn hơn và L- AG được đưa vào cơ thể, làm tăng khả năng lao động trí óc và chân tay của con người.

Các nghiên cứu khoa học đã chỉ ra rằng, glutamat đóng vai trò quan trọng trong cơ chế chuyển hoá chất bổ dưỡng trong cơ thể con người. Trên thực tế, cơ thể của mỗi người chứa khoảng 2 kilogram glutamat được tìm thấy trong các cơ bắp, não, thận, gan và các cơ quan khác.

Lượng glutamat có trong cơ thể người ở dạng tự do và liên kết là khoảng 2000 g. Lượng glutamat tự do có trong cơ thể người là 10 g, trong đó :

- + Cơ bắp : 6,0 g
- + Não : 2,3 g
- + Gan : 0,7 g
- + Thận : 0,7 g
- + Máu : 0,04 g

Các nghiên cứu khoa học cũng đã cho thấy rằng glutamat tự nhiên có trong thực phẩm và glutamat có nguồn gốc từ mì chính đều giống nhau. Chúng được hệ thống ruột hấp thụ và tiêu hoá như nhau. Một khi được tiêu hoá, cơ thể chúng ta không phân biệt được đâu là gluatamte từ thực phẩm hay từ mì chính. Thực tế nghiên cứu cho thấy rằng glutamat từ thực phẩm hay từ mì chính đều quan trọng đối với chức năng của hệ tiêu hoá.

Bảng 1. Lượng mì chính có trong tự nhiên

Mì chính tự nhiên	100 (mg/100g)	Táo	102
Táo	2240	Bắp cải	100
Fomat	1206	Nấm	67
Chè xanh	668	Đậu tương	66
Cá sácđin	280	Khoai lang	60
Mực	146	Tôm	43
Cà chua	140	Hến	41
Sò	132	Cà rốt	33
Ngô	130	Sữa mẹ	22
Khoai tây	102	Sữa bò	2

1.2.3. Mì chính là gia vị an toàn

Tại Mỹ, mì chính được xem như một thành phần thực phẩm phổ biến như muối, bột nở và tiêu. Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (FDA) đã xếp mì chính vào danh sách

các chất được xem là an toàn (GRAS). Việc xếp loại này có nghĩa là mì chính an toàn trong mục đích sử dụng thông thường của nó.

Mì chính cũng được chính phủ các nước trên khắp thế giới cho phép sử dụng, từ Châu Âu, Nhật Bản và các nước Châu Á, các nước Bắc và Nam Mỹ, Châu Phi, Châu Úc.

Vào năm 1987, Hội đồng Chuyên gia Phụ gia thực phẩm (JECFA) của Tổ chức Lương nông Liên Hiệp Quốc (FAO) và Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã xác nhận là mì chính an toàn. Hội đồng đã quyết định là không cần thiết phải quy định cụ thể lượng mì chính sử dụng hàng ngày.

Vào năm 1991, Hội đồng các nhà khoa học về thực phẩm Châu Âu (SCF) đã tái xác nhận tính an toàn của mì chính. SCF cũng nhận thấy rằng không cần phải quy định cụ thể lượng mì chính sử dụng hàng ngày.

Trong báo cáo gửi cho FDA năm 1995, dựa trên việc xem xét một cách toàn diện các tài liệu về mì chính, Hội đồng Thực Nghiệm Sinh học Liên bang Mỹ (FASEB) đã kết luận rằng không có sự khác biệt nào giữa glutamat tự do có trong tự nhiên như trong nấm, phó mát và cà chua với glutamat sản xuất công nghiệp như trong mì chính, protein thủy giải hay nước tương. Báo cáo này cũng kết luận rằng mì chính an toàn đối với hầu như tất cả mọi người.

Tại Việt Nam, từ mấy chục năm qua, mì chính là gia vị được sử dụng rộng rãi trong hầu hết mọi gia đình, và cũng từ lâu, mì chính đã được liệt kê trong danh mục phụ gia thực phẩm được phép sử dụng do Bộ Y tế ban hành.

Tuy nhiên, mì chính là một phụ gia làm tăng vị thực phẩm một cách an toàn (tương tự như giấm, tiêu, muối ăn...) mì chính không thể thay thế thịt, cá, trứng...Do đó, tùy vào loại thực phẩm mà người nội trợ sẽ sử dụng mì chính một cách thích hợp theo khẩu vị của từng gia đình.

** Chú thích :*

FDA	: Food and Drug Administration
GRAS	: Generally Recognized As Safe
JECFA	: Joint Expert Committee on Food Additives
FAO	: Food and Agriculture Organization
WHO	: World Health Organization
SCF	: Scientific Committee for Food
FASEB	: Federation of American Societies for Experimental Biology

II. TÍNH CHẤT CỦA MÌ CHÍNH

II.1. Tính chất lý học

Mì chính là loại bột trắng hoặc tinh thể hình kim óng ánh, kích thước tùy theo điều kiện khống chế khi kết tinh. Mì chính thuần độ 99%, tinh thể hình khối $1 \div 2$ mm màu trong suốt, dễ dàng hoà tan trong nước, và không hòa tan trong cồn, thơm, ngon, kích thích vị giác.

Ví dụ: Đường hoà tan 0,5% không có vị ngọt, muối hoà tan khoảng 0,25% trong nước không có vị mặn nhưng mì chính hoà tan 0,3% đã có vị thơm, ngọt.

Vị của MSG có thể nhận ra rõ nhất trong khoảng pH = $6 \div 8$. Muối MSG thường dùng để tạo vị cho thực phẩm và nồng độ MSG thường trong khoảng 0,2 đến 0,5%. Có 3 loại MSG đó là dạng L,D và LD-MSG nhưng trong đó chỉ có dạng L-MSG là tạo nên hương vị mạnh nhất.

Thuần độ mì chính là tỷ lệ % glutamat natri trong sản phẩm, hiện nay thường sản xuất loại 80 ÷ 99%.

Hằng số vật lý:

+ Trọng lượng phân tử 187.

+ Nhiệt độ nóng chảy 195°C .

+ pH = $6,8 \div 7,2$.

+ Độ hoà tan: tan nhiều trong nước, nhiệt độ tăng độ hoà tan tăng.

25°C độ hoà tan là 74,0 g/100ml nước;

60°C độ hoà tan là 112,0 g/100ml nước;

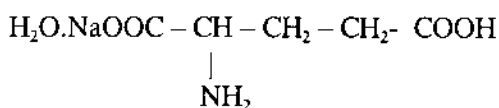
80°C độ hoà tan là $32 \div 34^{\circ}\text{Be}$.

+ Dung dịch 10% MSG trong suốt, không màu, giá trị pH khoảng $6,7 \div 7,2$

II.2. Tính chất hoá học

- Công thức hoá học: $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$

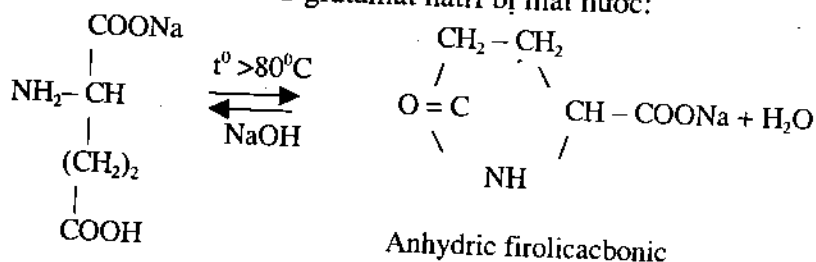
- Công thức cấu tạo:



- Công thức hoàn chỉnh: $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$

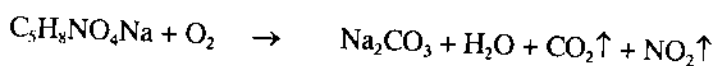
II.2.1. Phản ứng mất nước

Khi nhiệt độ lớn hơn 80°C glutamat natri bị mất nước:

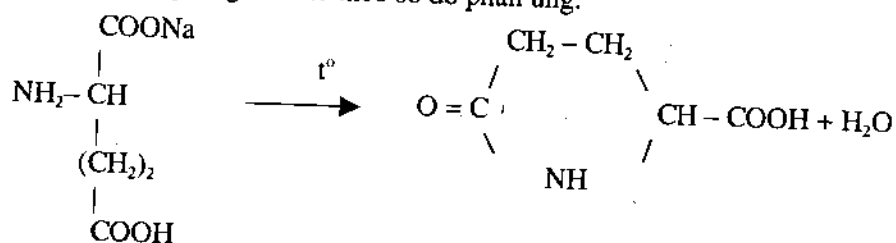


II.2.2. Phản ứng phân huỷ ở nhiệt độ cao

Nung glutamat natri trong chén sứ ở nhiệt độ cao $> 350^{\circ}\text{C}$:



Ở nhiệt độ cao trên dưới 100°C , axit glutamic trong dung dịch nguyên chất bị mất nước và chuyển thành axit hydroglutamic theo sơ đồ phản ứng:



Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự mất mát axit glutamic trong dung dịch ở pH = 6

Thời gian đun nóng (giờ)	Mất mát axit glutamic (%) khi nhiệt độ thay đổi			
	70°C	80°C	90°C	100°C
1	1,5	6,1	8,7	10,2
2	2,0	9,0	11,5	14,5
3	2,6	12,1	15,1	18,4
4	3,6	15,6	19,6	22,6
5	4,3	19,0	23,0	27,5
6	5,1	25,1	28,1	33,1
7	6,1	30,2	33,4	39,7
8	7,2	35,5	39,1	46,0

Sự mất mát axit glutamic trong dung dịch nguyên chất khi đun nóng là rất nhanh. Nhiều công trình nghiên cứu cho biết rằng, sau 8 giờ đun sôi, axit glutamic bị mất đến 50%, ở nhiệt độ cao hơn 100°C các phân tử axit hydroglutamic trùng hợp với nhau tạo thành các hợp chất cao phân tử đặc quánh và nâu sẫm.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến thời gian đun nóng, đến sự mất mát axit glutamic trong dung dịch nguyên chất ở pH = 6 cho ở bảng 2. Qua kết quả ta thấy đun nóng 100°C sau một giờ lượng axit glutamic bị mất đến 10,2%, sau 8 giờ đã mất 46%. Ở nhiệt độ 70°C thì sau 1 giờ axit glutamic trong dung dịch chỉ mất 1,5% và sau 8 giờ cũng chỉ mất đến 7,2%. Đây là tính chất quan trọng để trong quá trình sản xuất mì chính người ta nghiêm cấm việc sử dụng nhiệt độ cao và kéo dài thời gian trong khi sấy và cô đặc.

II.2.3. Tác dụng của pH

Qua nghiên cứu sự mất mát của axit glutamic trong dung dịch nguyên chất ở các điều kiện pH khác nhau ở bảng 3 cho ta thấy rõ:

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến sự mất mát axit glutamic khi đun nóng ở 80°C

Thời gian đun nóng (giờ)	Sự mất mát axit glutamic (%) ở các độ pH khác nhau		
	pH = 4,5	pH = 6	pH = 7,5
1	8,7	6,1	5,12
2	10,1	9,0	6,8
3	12,3	12,1	8,4
4	18,4	15,6	10,3
5	24,1	19,0	12,7
6	30,6	25,1	15,0
7	38,5	30,2	18,1
8	46,2	35,5	21,7

pH có ảnh hưởng rất lớn đến sự phân huỷ axit glutamic. Ở pH = 4,5 axit glutamic tổn hao nhiều nhất: sau 1 giờ là 8,75%; sau 8 giờ tăng lên 46,2%. Trong khi đó nếu môi trường là trung tính hay các điểm lân cận (pH = 6,5 ÷ 7,5 thì sự mất mát giảm được rất nhiều).

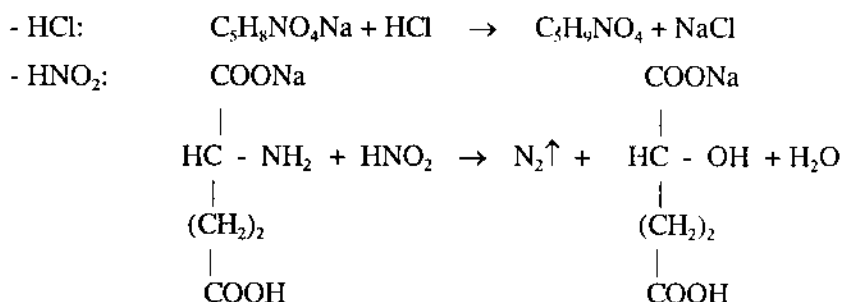
II.2.4. Tác dụng của các yếu tố khác

Sự biến đổi của axit glutamic trong quá trình chế biến còn phụ thuộc vào một số các yếu tố khác như: chịu ảnh hưởng của các axit amin khác, các sản phẩm phân huỷ của đường, các hợp chất có 2 nhóm cacbonyl, các sản phẩm phân huỷ của chất béo, các gốc hydroxyl (OH), các tia bức xạ chiếu sáng v. v...

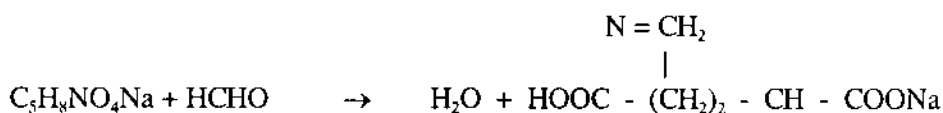
- Các nhân tố ảnh hưởng chủ yếu dẫn đến sự biến đổi axit glutamic là nồng độ, nhiệt độ, độ pH, sự chiếu sáng, các hợp chất hữu cơ, các peroxyt và các ion kim loại.

- Các phản ứng cơ bản thường xảy ra là: sự khử cacboxyl, sự khử amin, sự oxy hoá, sự mất nước, phản ứng ngưng tụ ở nhóm amin và các phản ứng trùng hợp hình thành nên các hợp chất cao phân tử.

II.2.4.1. Tác dụng của axit vô cơ



- Tác dụng với andehyt formic (HCHO):

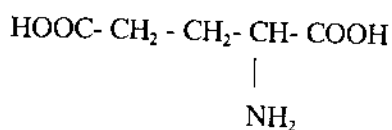


II.2.4.2. Tính hoạt quang

Có tính hoạt động quang học như các aminoxit khác và có 2 dạng đồng phân D, L có C bất đối. Đồng phân L có mùi vị thơm ngon, đồng phân D có mùi vị không thơm ngon nên hạn chế tạo thành trong sản xuất. Trên thế giới hiện nay ngoài việc xác định hàm lượng glutamat natri còn xác định thêm hàm lượng L- glutamic bằng máy đo góc quay cực để đánh giá thêm chất lượng, trong đó: $\alpha_{\text{L}} 20^\circ\text{C} = + 25,16$

III. LỊCH SỬ MÌ CHÍNH

Lịch sử của mì chính đã có hơn 100 năm. Vào năm 1860 nhà khoa học Ritthausen ở Hamburg (Đức) xác định thành phần các protein động vật, đặc biệt là thành phần các axit amin, trong đó có một axit amin với tên gọi là axit glutamic:



và muối natri của nó gọi là glutamat natri, tiếp theo Ritthausen là Woff, nhà hóa học thuần túy, xác định sự khác nhau của các axit amin về trọng lượng phân tử và cấu trúc cùng những hằng số về lý hóa tính của chúng.

Lịch sử mì chính có thể cảm mốc đầu tiên là ngày chàng thanh niên ở Tokyo có tên là Ikeda theo học tại Viện Đại học Tokyo tốt nghiệp cử nhân hóa học năm 1889. Tốt nghiệp xong Ikeda đi dạy tại trường trung học, rồi sang Đức tu nghiệp. May mắn sao Ikeda được làm việc với Woff, tham gia nghiên cứu hóa học protein. Chính thời gian này Ikeda đã học được cách nhận biết và tách từng axit amin riêng rẽ.

Trở lại Nhật Bản, Ikeda làm việc tại Khoa Hóa Viện Đại học Hoàng gia ở Tokyo. Trong bữa ăn gia đình, vợ ông khi chế biến thức ăn thường cho loại rong biển mà các đầu bếp Nhật Bản vẫn thường dùng. Quả là khi cho thêm rong biển thì vị của thức ăn đặc sắc hẳn lên, ngọt hơn, có vị thịt hấp dẫn.

Tại phòng thí nghiệm riêng của mình, Kikunae Ikeda tìm hiểu rong biển có chất nào mà làm cho thức ăn thêm đậm đà vị thịt. Ông không ngờ công trình nhận biết hoạt chất trong rong biển của ông lại mở đường cho một ngành công nghiệp hùng mạnh ở thế kỷ 20.

Từ nghiên cứu cơ bản Ikeda tách được axit glutamic từ rong biển *Laminaria Japonica* rồi chuyển thành natri glutamat. Ikeda đã gọi bạn hùn vốn lập một công ty sản xuất glutamat natri mà ông đặt tên cho thương phẩm này là Ajinomoto theo nghĩa tiếng Nhật là "tinh chất của vị ngon".

Ngày 21 tháng 4 năm 1909, Ikeda đã đăng ký bản quyền sáng chế số 9440 tại Anh quốc với nhan đề: sản xuất chất tạo vị. Thực ra người ta biết axit glutamic trước khi biết muối natri glutamat là một chất điều vị. Tên axit glutamic xuất phát từ thuật ngữ gluten của bột mì. Tách gluten, thủy phân nó bằng axit và cuối cùng thu được một lượng lớn axit amin, trong đó axit glutamic chiếm 80 lượng các axit amin. Năm 1920, bí mật về công nghệ sản xuất mononatri

glutamat (MSG) cũng được khám phá. Người cạnh tranh với Ajinomoto lại chính là người láng giềng Châu Á khổng lồ, đó là các doanh nghiệp Trung Quốc. Bắt đầu từ năm 1920 đến năm 1930, hãng Vị Tinh (Vị Tsin) mà dân miền Bắc gọi chệch đi là “mì chính” sản xuất hàng năm 200 tấn, còn Nhật lúc đó sản xuất hàng năm được 4000 tấn. Khi Nhật mở cuộc chiến tranh xâm lược Trung Quốc, các nhà sản xuất mì chính của Trung Quốc bị dẹp bỏ.

Mãi đến năm 1968 công ty Ajinomoto của Nhật Bản mới hoàn thiện quá trình sản xuất mì chính thương phẩm bằng phương pháp tổng hợp dựa vào chất chủ yếu là acrylonitril ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CN}$). Khi đó, công ty này mới chỉ sản xuất mì chính bằng phương pháp tổng hợp.

Tại thành phố Thượng Hải trong suốt những năm đầu của thế kỷ 20 ngành công nghiệp sản xuất mì chính đã phát triển khá nhanh và nó đã trở thành một sản phẩm thông dụng với hầu hết người dân Châu Á. Mặc dù vậy lúc này mì chính là một sản phẩm khá đắt, năm 1952: 1kg mì chính giá khoảng 3,5 đôla.

Năm 1956 các qui trình lên men dùng tinh bột làm nguyên liệu ban đầu đã phát triển mạnh làm giảm giá thành mì chính, sau đó năm 1964 người ta sử dụng rỉ đường mía làm nguyên liệu để sản xuất mì chính làm cho giá mì chính tiếp tục giảm, điều này tạo tiền đề cho việc sản xuất mì chính trên qui mô thương mại, cho đến năm 1968 giá mì chính khoảng 0,9 đôla/1 kg.

Ngày nay, việc sản xuất axit glutamic rồi chuyển thành MSG (monosodium glutamat - mì chính) không như buổi ban đầu. Người ta không tách axit glutamic có sẵn trong tự nhiên như từ gluten của bột mì, hoặc từ rong biển mà dùng công nghệ vi sinh. Từ tinh bột (chủ yếu là tinh bột sắn - để cung cấp hydratecacbon) với giống vi sinh vật và nguồn nitơ tạo thành axit glutamic rồi chuyển mononatri glutamat.

Theo các nhà kinh tế mỗi năm Việt Nam tiêu thụ lượng mì chính khoảng 50 triệu USD. Theo tờ China Post (10/3/993 - Đài Loan) hầu như các hãng mì chính Đài Loan chuyển ra nước ngoài sản xuất, nếu sản xuất ở Đài Loan thì giá 1 tấn phải chi từ 1200 ÷ 1300 USD, còn sản xuất ở nước ngoài thì chi phí thấp hơn, khoảng 800 ÷ 900 USD.

IV. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT MÌ CHÍNH TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM

Ngày nay sản phẩm mì chính đã được sản xuất hoàn toàn theo phương pháp lên men trên khắp thế giới. Sản lượng mì chính Nhật tăng lên nhanh chóng: 15000 tấn năm 1961, 67000 tấn năm 1966 và 72000 tấn năm 1967. Sản lượng mì chính của thế giới cũng vậy: từ 109000 tấn năm 1965 lên 370 000 tấn năm 1985 và 613 330 tấn năm 1989. Sản lượng mì chính của các nước trên thế giới trong năm 1989 như sau: Đài Loan 146000, Nhật 106000, Trung Quốc 90000, Hàn

Quốc 63000, Indonexia 44000, Pháp 40000, Ba Tư 33000, Italia 14300, Philipin 12100, Malaixia 500, Peru 5500, Tây Ban Nha 3300, Mexico 2750, Việt Nam 1980, Miến Điện 300.

Năm 1965 -1985 sản lượng mì chính trên thế giới khoảng 110 000 tấn.

Bảng 4. Lượng mì chính sản xuất ra và dùng cho xuất khẩu của một số nước

Nước	Sản lượng (tấn)	Xuất khẩu	Số nhà máy
Nhật	52000	13000	11
Mỹ	23400	3000	6
Đài Loan	13000	8000	5
Các nước khác	21300	1000	33
Tổng số	109700	25000	55

Sản lượng mì chính của Nhật Bản đã tăng lên rất nhanh: năm 1966 là 67000 (tấn) dùng cho xuất khẩu là 18700 (tấn), năm 1967 là 72000 (tấn) trong đó xuất khẩu là 18900 (tấn).

Bảng 5. Việc sử dụng mì chính ở một số quốc gia hàng đầu về công nghiệp mì chính

Nước	Xuất khẩu (%)	Tạo hương (%)	Công nghiệp thực phẩm (%)
Nhật	30,3	32,5	37,2
Mỹ	14,0	38,0	48,0
Đài Loan	68,4	26,9	4,7

Kỹ thuật sản xuất mì chính đã vượt khỏi biên giới những nước sáng tạo ra nó đi vào các nước có nhu cầu như Pháp, Canada và nhiều nước khác ở khu vực Châu Á Thái Bình Dương, trong đó có Việt Nam. Ba công ty mì chính hàng đầu thế giới đã đầu tư sản xuất tại Việt Nam gần 100000 tấn mỗi năm theo 2 giai đoạn: Sản xuất từ L-AG nhập ngoại (giai đoạn 1) và sản xuất từ L-AG lên men tại Việt Nam (giai đoạn 2). Đến nay Công ty Vedan đã thực thi giai đoạn 2, Công ty Ajinomoto và Miwon đang ở giai đoạn 1. Những nồi lên men 700 m³ lắp đặt tại Công ty Vedan Việt Nam là những nồi lên men lớn nhất thế giới. Những giống sắn mới được nhập nội cũng là những giống sắn có năng suất thuộc loại cao nhất thế giới (40 ÷ 60 T/ha).

Việt Nam là nước đông dân và có thói quen sử dụng nhiều mì chính, lại rất dồi dào về nguyên liệu sản và rỉ đường mía. Những nguyên liệu này đủ dùng để sản xuất hàng trăm ngàn tấn mì chính, thừa dùng trong nước và có thể xuất khẩu với khối lượng lớn.

Trước đây Việt Nam đã có chương trình nghiên cứu để chủ động nắm vững kỹ thuật sản xuất mì chính, nhưng lực lượng nghiên cứu còn nhỏ, vốn liếng thiếu, thiết bị thô sơ nên kết quả thu được có hạn. Tuy vậy các nhà khoa học cũng đã có một số công trình có ý nghĩa. Trong 2 năm 1968 và 1970, Lê Văn Nhung và cộng sự đã thu thập được nhiều chủng vi sinh vật có khả năng sinh lizin và L-AG từ nước và đất vùng Hà Tây và Hà Nội. Đây là nguồn gen thiên nhiên quý của Việt Nam. Năm 1972, Lương Đức Phẩm đạt được hiệu suất lên men $30 \div 35$ g/l L-AG khi dùng *Brevibacterium flavum* lên men sacaroza hay rỉ đường ở phạm vi bình lắc. Năm 1986, Nguyễn Thiện Luân và cộng sự đạt được hiệu suất lên men $37 \div 45$ g/l L-AG khi lên men môi trường glucoza 12% ở trong bình lắc. Một vài tác giả khác cũng đã thông tin kết quả nghiên cứu của mình trong lĩnh vực này. Song các công trình nghiên cứu nói trên mới dừng ở mức phòng thí nghiệm và hiệu suất lên men còn thấp. Thực tế đòi hỏi những nghiên cứu sâu hơn làm cơ sở khoa học cho việc tiếp thu kỹ thuật mới, thu thập thông tin đặt nền móng cho sáng tạo công nghệ lên men L-AG từ các nguyên liệu mới.

Gần đây với sự phát triển của khoa học người ta đã dùng một nucleotit đặc biệt để tạo thành mì chính, chính điều này đã có ảnh hưởng rất lớn tới sản lượng mì chính trên thế giới. Trong tự nhiên chỉ có hai loại nucleotit tạo nên hương vị là 5 - inosin monophotphat (IMP) và 5 - guanosin monophotphat (GMP).

Từ năm 1960 Công ty Ajinomoto đã bắt đầu sản xuất di - sodium 5 - inositst (IMP) và di- sodium 5- guanylat (GMP) và sau đó các hãng sản xuất mì chính khác cũng đã làm được điều này. Thậm chí công ty Merck ở Mỹ đã tạo ra sản phẩm được gọi là Mertaste gồm 50% IMP và 50% GMP. Người ta đã thừa nhận rằng một hỗn hợp gồm 8% Mertaste và 92% MSG tạo nên hương vị mạnh hơn khoảng 20 lần so với việc chỉ dùng MSG đơn lẻ.

Những nucleotit này cũng có thể được dùng riêng biệt và tác dụng tạo hương tốt nhất của nó thường đạt được khi dùng ở mức $0,002\% \div 0,02\%$ cho những nhu cầu cơ bản.

Nhu cầu về mì chính của thế giới không ngừng tăng. Việc sản xuất mì chính theo phương pháp thủy phân protein lạc, đậu và lúa mì không còn phù hợp nữa. Người ta thì nhau tìm phương pháp mới: tổng hợp hoá học, tổng hợp hoá học kết hợp với sinh học và tổng hợp sinh học nhờ vi sinh vật. Phương pháp cuối được thừa nhận có hiệu quả nhất vì ít phiền phức và L-AG thu được không được lẫn D-AG, một chất có hại cho sức khoẻ con người.

CHƯƠNG 2

CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT MÌ CHÍNH

I. CÁC PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT MÌ CHÍNH

Mì chính dù được sản xuất bằng phương pháp nào cũng thường tuân theo một số tiêu chuẩn sau:

- Tinh thể MSG chứa không ít hơn 99% MSG tinh khiết.
- Độ ẩm (trừ nước kết tinh) không được cao hơn 0,5%.
- Thành phần NaCl không được quá 0,5%.
- Các tạp chất còn lại không chứa asen, kim loại và hợp chất canxi.

Có nhiều phương pháp sản xuất mì chính khác nhau, từ các nguồn nguyên liệu khác nhau. Hiện nay, trên thế giới có bốn phương pháp cơ bản.

I.1. Phương pháp tổng hợp hoá học

Phương pháp này ứng dụng các phản ứng tổng hợp hoá học để tổng hợp nên axit glutamic và các aminoaxit khác từ các khí thải của công nghiệp dầu hoả hay các ngành khác.

Ví dụ: ở Nhật năm 1932 đã tổng hợp được 300 tấn axit glutamic, prolin v.v... từ cracking dầu hoả, từ furfurol tổng hợp ra prolin, lizin.

- *Ưu điểm:* Phương pháp này có thể sử dụng nguồn nguyên liệu không phải thực phẩm để sản xuất ra và tận dụng được các phế liệu của công nghiệp dầu hoả.

- *Nhược điểm:* Chỉ thực hiện được ở những nước có công nghiệp dầu hoả phát triển và yêu cầu kỹ thuật cao. Mặt khác sản xuất bằng con đường này tạo ra một hỗn hợp không quay cực D, L-axit glutamic, việc tách L-axit glutamic ra lại khó khăn nên làm tăng giá thành sản phẩm. Do nhược điểm như vậy nên phương pháp này ít được ứng dụng ở các nước.

1.2. Phương pháp thủy phân protit

Phương pháp này sử dụng các tác nhân xúc tác là các hoá chất hoặc fecmen để thủy phân một nguồn nguyên liệu protit nào đó (khô đậu, khô lạc,...) ra một hỗn hợp các aminoaxit, từ đây tách các axit glutamic ra và sản xuất mì chính.

Quá trình này có thể tóm tắt như sau: gluten của bột mì được thủy phân bằng axit HCl để giải phóng ra tất cả các axit amin ở 150°C . Sau đó các chất cặn bã sẽ được lọc, dịch lọc được cô đặc và giữ ở nhiệt độ thấp để làm giảm độ hòa tan của chất tan, từ đó các hạt tinh thể kết tinh của hydroclorat glutamic natri $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ quá bão hòa sẽ dần dần được tạo thành.



Những hạt tinh thể này sẽ được lọc để tách riêng và sau đó được hòa tan trong nước. Dung dịch này sẽ được trung hòa bằng Na_2CO_3 cho tới $\text{pH} = 3,2$ (pH đẳng điện), ở pH này tinh thể axit glutamic sẽ kết tinh ra khỏi dung dịch và được tách riêng bằng phương pháp ly tâm. Sau đó pha loãng và kết tinh lần 2 với dung dịch Na_2CO_3 ở $\text{pH} = 5,7 \div 7,0$. Than hoạt tính và Na_2CO_3 được thêm vào để khử màu và kết tủa các tạp chất. Tạp chất sẽ được lọc, dịch lọc được cô đặc bằng phương pháp bay hơi chân không thu được dịch cô đặc MSG, dịch cô đặc được tách nước bằng phương pháp ly tâm, sản phẩm thu được được sấy khô tạo nên tinh thể cuối cùng là MSG tinh khiết. Hiệu suất thu hồi MSG thay đổi trong khoảng $15\% \div 25\%$ khi sử dụng bột mì. Đối với đậu nành thì hiệu suất thu hồi MSG thấp hơn rất nhiều chỉ khoảng $4\% \div 7\%$.

Hiện nay ở nước ta và nhiều nước trên thế giới chủ yếu vẫn sử dụng phương pháp này.

- *Ưu điểm* : Dễ khống chế quy trình sản xuất và áp dụng được vào các cơ sở thủ công, bán cơ giới, cơ giới dễ dàng.

- *Nhược điểm*: + Cần sử dụng nguyên liệu giàu protit hiếm và đắt.

+ Cần nhiều hoá chất và các thiết bị chống ăn mòn.

+ Hiệu suất thấp, đưa đến giá thành cao.

1.3. Phương pháp lên men

Phương pháp này lợi dụng một số vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp ra các axit amin từ các nguồn glucit và đạm vô cơ. Phương pháp này đang có nhiều triển vọng phát triển ở khắp các nước, nó tạo ra được nhiều loại aminoaxit như: axit glutamic, lizin, valin, alanin, phenylalanin, tryptophan, methionin v. v...

Phương pháp lên men có nguồn gốc từ Nhật Bản, năm 1956 khi mà Shukuo và Kinoshita sử dụng chủng *Micrococcus glutamicus* sản xuất glutamat từ môi trường có chứa glucoza và amoniac. Sau đó một số loài vi sinh vật khác cũng được sử dụng như *Brevi bacterium* và *Microbacterium*.

Tất cả các loài vi sinh vật này đều có một số đặc điểm sau:

- + Hình dạng tế bào từ hình cầu đến hình que ngắn;
- + Vi khuẩn Gram (+);
- + Hô hấp hiếu khí ;
- + Không tạo bào tử ;
- + Không chuyển động được, không có tiên mao;
- + Biotin là yếu tố cần thiết cho sinh trưởng và phát triển;
- + Tích tụ một lượng lớn glutamic từ hydrat cacbon và NH_4^+ trong môi trường có sục không khí.

Khi sử dụng *Micrococcus glutamicus* có nhiều công thức thiết lập môi trường nuôi cấy khác nhau, dưới đây chúng tôi đưa ra 2 công thức làm ví dụ :

	Tanaka (g/l)	Ajinomoto (g/l)
Glucoza	100	100
Ure	5	8
KH_2PO_4	1	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,04
Dịch thủy phân đậu nành	—	1
Cao ngô	2,5	0,5
Nitơ amin	5	—
Biotin	25	0,5
Fe và Mn	—	0,2
Thời gian lên men	35 h	40 h
Hiệu suất thu hồi	50	44,8

Nhiệt độ lên men giữ ở 28°C và duy trì pH = 8,0 bằng cách thường xuyên bổ sung ure. Điều kiện hiếu khí là rất quan trọng bởi vì nếu không được sục khí thì sản phẩm tạo thành không phải là axit glutamic mà là lactat. Khi sử dụng nguyên liệu lên men là rỉ đường thì cần phải bổ sung các chất kháng biotin để kiểm soát sự sinh trưởng của vi sinh vật.

Phương pháp này có nhiều ưu điểm nên đang được nghiên cứu và ứng dụng ở nước ta và các nước trên thế giới.

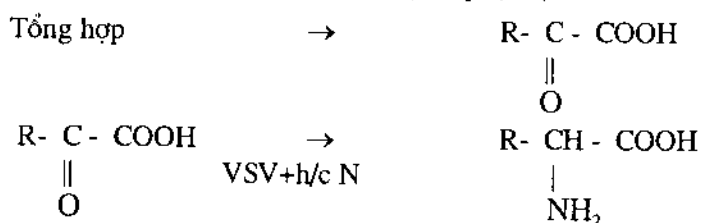
- *Ưu điểm chính:*

- + Không sử dụng nguyên liệu protit.
- + Không cần sử dụng nhiều hoá chất và thiết bị chịu ăn mòn.
- + Hiệu suất cao, giá thành hạ.
- + Tạo ra axit glutamic dạng L, có hoạt tính sinh học cao.

I.4. Phương pháp kết hợp

Đây là phương pháp kết hợp giữa tổng hợp hoá học và vi sinh vật học.

Phương pháp vi sinh vật tổng hợp nên axit amin từ các nguồn đạm vô cơ và glucit mất nhiều thời gian, do đó người ta lợi dụng các phản ứng tổng hợp tạo ra những chất có cấu tạo gần giống axit amin, từ đấy lợi dụng vi sinh vật tiếp tục tạo ra axit amin.



Phương pháp này tuy nhanh nhưng yêu cầu kỹ thuật cao, chỉ áp dụng nghiên cứu chứ ít áp dụng vào công nghiệp sản xuất.

II. NGUYÊN LIỆU SẢN XUẤT MÌ CHÍNH

Trên thế giới hiện nay sử dụng hai phương pháp chủ yếu để sản xuất mì chính: phương pháp thuỷ phân và phương pháp sinh tổng hợp (lên men) nên nguyên liệu ở đây phục vụ chủ yếu cho 2 phương pháp đó.

II.1. Nguyên liệu dùng cho phương pháp thuỷ phân

Một số nguyên liệu trong nước được ứng dụng cho sản xuất có thành phần ở bảng 6.

Chọn nguyên liệu cho phương pháp thuỷ phân ngoài yêu cầu chất lượng nguyên liệu như các loại sản xuất cần chú ý đạt các yêu cầu sau:

- Nguyên liệu có thành phần protit cao.
- Tỷ lệ axit glutamic trong nguyên liệu nhiều.
- Tiến hành tách axit glutamic ra khỏi nguyên liệu dễ dàng.

- Không có hợp chất độc với cơ thể.

Bảng 6. Thành phần nguyên liệu giàu protit

Tên nguyên liệu	Tỷ lệ protit (%)	Tỷ lệ axit glutamic (%)
Bột mì	12 ÷ 15	30 ÷ 36
Đậu xanh	23,2	21
Đậu Hà Lan	22,4	18,5
Đậu tằm	22,4	18,5
Ngô	10	31,3
Lạc	27,5	18
Khô lạc	50 ÷ 60	20,7 ÷ 24,1
Khô bông	40,32	17,5
Khô đậu	35,40	22
Thịt cá	16,5 ÷ 19	12
Thịt gà	20,3 ÷ 22,4	13 ÷ 14
Thịt trâu, bò	18 ÷ 21	13 ÷ 14
Nhộng	23,1	13 ÷ 14

Bảng 7. Thành phần các loại nguyên liệu thông thường

Nguyên liệu Thành phần (%)	Keo protit đậu xanh	Khô lạc	Gluten ướt của bột mì	Gluten khô của bột mì
Thủy phần	12 ÷ 14	8 ÷ 10	65 ÷ 70	7 ÷ 0
Protein	65 ÷ 70	55 ÷ 60	25 ÷ 30	75 ÷ 80
Gluxit	10	15 ÷ 20	3 ÷ 4	10 ÷ 12
Chất béo	không tính	11	0	0
Tạp chất	3 ÷ 5	5 ÷ 8	1	3

Ở nước ta sử dụng một số nguyên liệu thực vật rẻ tiền, cho hiệu suất thu hồi cao và thành phẩm có vị thơm ngon như keo protit, đậu xanh, gluten bột mì, khô lạc v. v... Thành phần các loại nguyên liệu thường dùng trong sản xuất mì chính ghi ở bảng 7.

Ngoài ra một số hạt có tỷ lệ axit glutamic so với hàm lượng protein của nó khá cao, có thể xử lý dùng trong sản xuất như: hạt bông 17,5%; hạt dẻ 22,0%; hạt hướng dương 20,0%.

II.2. Nguyên liệu dùng cho phương pháp lên men

Các nguyên liệu giàu glucit: tinh bột, ri đường, glucoza, sacaroza v. v...

II.2.1. Tinh bột sắn

II.2.1.1. Thành phần và cấu tạo của tinh bột sắn

Tinh bột sắn được sản xuất trong quá trình chế biến củ sắn. Có hai loại sắn: sắn đắng và sắn ngọt khác nhau về hàm lượng tinh bột và xyanua. Sắn đắng có nhiều tinh bột hơn nhưng đồng thời cũng có nhiều axit xyanhydric, khoảng $200 \div 300$ mg/kg. Sắn ngọt có ít axit xyanhydric (HCN) và được dùng làm lương thực, thực phẩm. Sắn trồng ở các tỉnh phía Bắc chủ yếu là sắn ngọt và tinh bột thu được không có HCN.

Thành phần hoá học của tinh bột sắn phụ thuộc chủ yếu vào trình độ kỹ thuật chế biến sắn. Trong tinh bột sắn thường có các thành phần sau:

Tinh bột	:	$83 \div 88\%$
Nước	:	$10,6 \div 14,4\%$
Xenluloza	:	$0,1 \div 0,3\%$
Đạm	:	$0,1 \div 0,4\%$
Chất khoáng	:	$0,1 \div 0,6\%$
Chất hoà tan	:	$0,1 \div 1,3\%$

Tinh bột sắn có kích thước xê dịch trong khoảng khá rộng $5 \div 40$ μm . Dưới kính hiển vi ta thấy tinh bột sắn có nhiều hình dạng khác nhau từ hình tròn đến hình bầu dục tương tự tinh bột khoai tây nhưng khác tinh bột ngô và tinh bột gạo ở chỗ không có hình đa giác.

Cũng như các loại tinh bột khác tinh bột sắn gồm các mạch amilopectin và amiloza, tỷ lệ amilopectin và amiloza là 4:1. Nhiệt độ hồ hoá của tinh bột sắn nằm trong khoảng $60 \div 80^\circ\text{C}$.

II.2.1.2. Thu nhận glucoza từ tinh bột sắn

- Phương pháp thuỷ phân bằng axit: Trong sản xuất công nghiệp người ta thường sử dụng dung dịch đường glucoza thuỷ phân từ tinh bột bằng axit hoặc enzym. Có hai loại axit: HCl và H_2SO_4 . Dùng HCl thời gian thuỷ phân ngắn nhưng không tách được gốc axit ra khỏi dung dịch. Dùng H_2SO_4 thời gian thuỷ phân dài, nhưng có thể tách gốc SO_4^{2-} ra khỏi dịch đường bằng cách dùng CaCO_3 trung hoà dịch thuỷ phân.

- Phương pháp thủy phân bằng enzym: Hai loại enzym được dùng nhiều cho quá trình này là α -amilaza và γ -amilaza. α -amilaza có nhiệm vụ phá huỷ các mối liên kết α -1,4-glucosit của tinh bột tạo ra các sản phẩm có phân tử lượng lớn như dextrin bậc cao, dextrin bậc thấp, mantotriosa và cuối cùng là maltoza. γ -amilaza có tác dụng thủy phân mối liên kết α -1,4 và α -1,6-glucosit bắt đầu từ đầu không khử trên mạch amiloza và amilopectin và sản phẩm cuối cùng là glucoza. Mỗi enzym có pH và nhiệt độ thích hợp. pH và nhiệt độ tối ưu của mỗi loại enzym phụ thuộc vào nguồn gốc của nó. Trong công nghiệp người ta thường kết hợp α -amilaza bền nhiệt với γ -amilaza của nấm mốc để thủy phân tinh bột thành glucoza.

Dịch đường sản xuất theo phương pháp enzym có hiệu suất chuyển hoá cao hơn phương pháp axit, không chứa gốc axit và tạp chất có hại, rất thích hợp cho việc sản xuất glucoza tinh thể và cho lên men nhờ vi sinh vật.

II.2.2. Rỉ đường mía

II.2.2.1. Thành phần rỉ đường mía

Rỉ đường mía là phần còn lại của dung dịch đường sau khi đã tách phần đường kính kết tinh. Số lượng và chất lượng của rỉ đường phụ thuộc vào giống mía, điều kiện trồng trọt, hoàn cảnh địa lý và trình độ kỹ thuật chế biến của nhà máy đường.

Thành phần chính của rỉ đường là: đường 62%; các chất phi đường 10%; nước 20%.

+ Nước trong rỉ đường gồm phần lớn ở trạng thái tự do và một số ít ở trạng thái liên kết dưới dạng hydrat.

+ Đường trong rỉ đường bao gồm: $25 \div 40\%$ sacaroza; $15 \div 25\%$ đường khử (glucoza và fructoza); $3 \div 5\%$ đường không lên men được.

Ở đây do nhiều lần pha loãng và cô đặc một lượng nhất định sacaroza bị biến thành hợp chất tương tự dextrin do tác dụng của nhiệt. Chất này có tính khử nhưng không lên men được và không có khả năng kết tinh.

Đường nghịch đảo của rỉ đường bắt nguồn từ mía và từ sự thủy phân sacaroza trong quá trình chế biến đường. Tốc độ phân giải tăng lên theo chiều tăng của nhiệt độ và độ giảm hay tăng của pH tùy theo thủy phân bằng axit hay kiềm.

Sự phân giải sacaroza thành glucoza và fructoza vừa là sự mất mát sacaroza vừa là sự yếu kém về chất lượng bởi vì glucoza và fructoza sẽ biến thành axit hữu cơ và hợp chất màu dưới điều kiện thích hợp. Trong môi trường kiềm, fructoza có thể biến thành axit lactic, fufurol, oxymetyl, trioxyglutaric, trioxybutyric, axetic, formic và CO_2 . Đường nghịch đảo còn tác dụng với axit amin, peptit bậc thấp của dung dịch đường để tạo nên hợp chất màu. Tốc độ tạo

melanoidin phụ thuộc và pH rỉ đường rất thấp ở pH = 4,9 và rỉ đường rất cao ở pH = 9. Trong rỉ đường còn có trisacarit hay polysacarit. Trisacarit gồm 1 mol glucoza và 2 mol fructoza. Polysacarit gồm dextran và levan. Những loại đường này không có trong nước mía và được các vi sinh vật tạo nên trong quá trình chế biến đường.

Các chất phi đường gồm có các chất hữu cơ và vô cơ. Các chất hữu cơ chứa nitơ của rỉ đường mía chủ yếu là các axit amin cùng với một lượng rất nhỏ protein và sản phẩm phân giải của nó. Các axit amin từ nước mía dễ dàng đi vào rỉ đường vì phần lớn chúng rất dễ hoà tan trong nước trừ tiroxin và xistin.

Nitơ tổng số trong rỉ đường mía của Mỹ xê dịch trong khoảng $0,4 \div 1,5\%$ trung bình là $0,7\%$ trọng lượng của rỉ đường. Theo Matubara và cộng sự, rỉ đường mía có tất cả các axit amin như trong rỉ đường củ cải. Trong quá trình chế biến, lượng đáng kể glutamin và axit glutamic bị biến thành pyrolidoncacbonic. Nếu thủy phân bằng axit hoặc kiềm mạnh thì axit pyrolidoncacbonic sẽ biến trở lại thành L-AG.

Hợp chất phi đường không chứa nitơ bao gồm pectin, araban, galactan hoặc các sản phẩm thủy phân của chúng là arabinoza và galactoza, chất nhầy, chất màu và chất thơm. Pectin bị kết tủa trong quá trình chế biến đường nhưng các chất vừa nói không kết tủa và gần như toàn vẹn đi vào rỉ đường ($1,22 \div 1,56\%$).

Matubara và Kinoshita đã phân tích định tính các loại axit hữu cơ và cho biết các axit sau đây có trong rỉ đường mía của các nước Đông Nam Á: axit aconitic, lactic, malic, succinic, glyconic, xitric và lượng nhỏ fumaric, oxalic và gluconic. Riêng axit aconitic có nồng độ khá cao, xấp xỉ $1,0 \div 1,5\%$. Sự có mặt của axit này càng nhiều thì sản lượng đường càng thấp. Đặc biệt các loại mía có vị chua không thể đưa vào sản xuất được. Mía trồng ở những vùng quá nóng như Louisiana và Florida phát triển rất nhanh nên nồng độ axit aconitic trong mía là $0,1 \div 0,2\%$ và trong rỉ đường là $3 \div 7\%$. Do vậy người ta đã tiến hành thu hồi loại axit này làm phụ phẩm của nhà máy đường trước khi đem rỉ đường đi chế biến.

Các chất màu của rỉ đường bao gồm các chất caramen, melanoit, melanin và phức phenol- Fe^{+2} . Cường độ màu tăng 3 lần khi nhiệt độ tăng thêm 10°C . Độ màu tăng có nguồn gốc sâu xa từ sự biến đổi của sacaroza. Có thể chia các hợp chất màu thành nhiều nhóm:

➤ Chất caramen: Xuất hiện nhờ quá trình nhiệt phân sacaroza kèm theo loại trừ nước và không chứa một chút nitơ nào. Khi pH không đổi, tốc độ tạo chất caramen tỷ lệ thuận với nhiệt độ phản ứng.

➤ Phức chất polyphenol- Fe^{+2} : Là Fe^{+2} -brenzcatechin có màu vàng xanh không thể loại hết ở giai đoạn làm sạch nước mía và đi vào rỉ đường.

➤ **Melanodin:** Đây là sản phẩm ngưng tụ của đường khử và axit amin mà chủ yếu là axit aspartic. Sản phẩm ngưng tụ quen biết nhất là axit fuscazinic đóng vai trò quan trọng làm tăng độ màu của rỉ đường.

➤ **Melanin:** Được hình thành nhờ phản ứng oxy hoá khử các axit amin thơm nhờ xúc tác của enzym polyphenol oxydaza khi có mặt của O_2 và Cu^{+2} .

Các axit amin thơm thường bị oxy hoá là tiroxin và brenzcatechin. Các melanin thường bị loại hết ở giai đoạn làm sạch nước đường nên chỉ tìm thấy lượng rất nhỏ trong rỉ đường.

➤ **Humin:** Được trùng hợp từ 66 ÷ 68 các đơn vị cấu tạo của axit amin. Từ đó phân tích ra được khoảng 52 ÷ 53 gốc axit aspartic, 5 gốc axit amino - β - butyric, 2 gốc axit glutamic, 2 gốc β - amino propionic và 1 gốc axit p - butyric, 2 gốc axit - p - amino - izovaleric. Ngoài ra rỉ đường còn chứa hợp chất màu nâu có công thức cấu tạo $C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$.

➤ **Chất keo:** Có trong rỉ đường chủ yếu là pectin, chất sáp và chất nhầy. Các chất này ảnh hưởng rất nhiều đến sự phát triển của vi sinh vật tạo thành màng bao bọc quanh tế bào ngăn cản quá trình hấp thụ các chất dinh dưỡng và thải các sản phẩm trao đổi chất của tế bào ra ngoài môi trường. Ngoài ra các chất keo là nguyên nhân chính tạo ra một lượng bọt lớn trong môi trường cấy vi sinh vật, giảm hiệu suất sử dụng thiết bị.

Bảng 8. Thành phần tro so với chất khô của rỉ đường mía và rỉ đường củ cải (%)

Thành phần	Rỉ đường củ cải	Rỉ đường mía
K_2O	3,9	3,5
CaO	0,26	1,5
SiO_2	0,10	0,5
P_2O_5	0,06	0,2
MgO	0,16	0,1
Na_2O	1,30	-
Al_2O_3	0,07	0,2
Fe_2O_3	0,02	-
Dư lượng CO_2	3,50	-
Dư lượng SO_2	0,55	1,6
Cl^-	1,60	0,4
Tổng số	11,52	8,0

Các chất phi đường vô cơ chủ yếu là các loại muối tìm thấy trong thành phần tro của rỉ đường. Độ tro của rỉ đường mía thấp hơn độ tro của rỉ đường củ cải. (Bảng 8).

Muối kali có nhiều trong rỉ đường tiếp đến là canxi và dư lượng SO_2 . Điều này dễ hiểu vì muối kali được dùng để bón cho mía còn muối canxi và gốc sunfat được thêm vào ở giai đoạn xử lý nước mía và tinh luyện đường.

II.2.2.2. Thành phần các chất sinh trưởng

Ngoài các nguyên tố kim loại và á kim kể trên, rỉ đường mía còn chứa nhiều nguyên tố khác với lượng cực kỳ nhỏ chỉ có thể tính bằng mg/kg rỉ đường như: Fe 115 (mg/kg); Zn 34; Mn 18; Cu 4,9; B 3,0; Co 0,59; Mo 0,2.

Bảng 9. Thành phần một số chất sinh trưởng của rỉ đường mía và cao ngô ($\mu\text{g}/100$ gám)

Loại chất sinh trưởng	Rỉ đường mía			Cao ngô
	Mexico	Cuba	Mỹ	
B1	140	-	830	640
B2	-	-	250	510
B6	700	-	650	910
Axit nicotinic	-	-	2,10	8,90
Axit pantotenic	12,0	-	2,14	510
Axit folic	-	-	3,80	12,0
Biotin	65	10,8	120	49,0

Rỉ đường mía rất giàu các chất sinh trưởng như axit pantotenic, nicotinic, folic, B₁, B₂ và đặc biệt là biotin. Rỉ đường mía Mỹ không thua kém cao ngô là loại vẫn thường dùng làm nguồn cung cấp chất sinh trưởng cho một số loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

II.2.2.3. Vi sinh vật trong rỉ đường mía

Bảng 10. Phân loại rỉ đường theo số lượng vi sinh vật tạp nhiễm

Loại rỉ đường	Số lượng vi sinh vật trong 1 gam rỉ đường	Đánh giá và xử lý
I	100 000	Rất tốt, không cần xử lý
II	100 000 ÷ 1 000 000	Trung bình, cần thanh trùng
III	1 000 000 ÷ 5 000 000	Nhiễm nặng, cần xử lý nghiêm ngặt bằng hoá chất và tác dụng nhiệt

Có rất nhiều vi sinh vật trong rỉ đường mía. Đa số chúng từ nguyên liệu, một số nhỏ từ không khí, nước và đất vào dịch đường. Loại nào chịu được tác dụng nhiệt hay tác dụng của hoá

chất thì tồn tại. Có thể phân chúng thành ba loại: vi khuẩn, nấm men và nấm mốc. Trong đó loại đầu là nguy hiểm hơn cả vì nó gồm nhiều giống có khả năng sinh bào tử. Người ta chia rỉ đường làm ba loại tùy theo số lượng vi sinh vật tạp nhiễm (bảng 10).

II.2.2.4. Lực đệm của rỉ đường mía

Lực đệm là loại lực có sức tự ngăn cản sự biến đổi phản ứng của rỉ đường khi bổ sung kiềm hoặc axit. Rỉ đường mía có tính đệm đặc trưng. Bình thường pH của rỉ đường mía nằm trong khoảng $5,3 \div 6,0$. Trong quá trình bảo quản pH có thể bị giảm do hoạt động của vi sinh vật tạp nhiễm tạo ra các axit hữu cơ. Khi thêm HCl hay H_2SO_4 vào rỉ đường, axit sẽ tác dụng với các muối kiềm của các axit hữu cơ làm xuất hiện các muối vô cơ (KCl, NaCl hay K_2SO_4 , Na_2SO_4) và các axit hữu cơ tự do. Qua đó pH của rỉ đường bị thay đổi rất ít khi tiếp tục thêm axit HCl hay H_2SO_4 . Lực đệm của rỉ đường biểu hiện mạnh nhất ở $pH = 3,0 \div 5,0$; trung bình ở $pH = 5,0 \div 6,0$; rất ít ở $pH = 6,0 \div 7,07$.

II.2.2.5. Một số phương pháp xử lý rỉ đường mía

Có nhiều phương pháp xử lý rỉ đường nhằm loại các hợp chất có hại như CO_2 , chất keo, chất màu, axit hữu cơ dễ bay hơi và vi sinh vật tạp nhiễm. Yoshii và cộng sự đã nghiên cứu cố định invertaza để thủy phân sacaroza. Điều kiện tối ưu cho phản ứng là $pH = 5,5$ và nhiệt độ $50^\circ C$. Các tác giả đã dùng chất mang Na-alginat cố định enzym invertaza của nấm men và thủy phân sacaroza theo phương pháp liên tục trong thiết bị có cánh khuấy và khẳng định 95% sacaroza của rỉ đường mía nồng độ 55% đã được chuyển hoá thành glucoza và fructoza ở $50^\circ C$ trong 7 giờ.

II.2.3. Nguyên liệu khác

II.2.3.1. Axit HCl

Điều chế bằng nhiều phương pháp khác nhau, chủ yếu là phương pháp điện phân và phương pháp thô.

Yêu cầu kỹ thuật:

	Điện phân	Thô
HCl	> 30%	> 27%
Fe	< 0,01%	< 0,07%
SO_4^{2-}	< 0,077%	< 1%

II.2.3.2. NaOH: ở hai dạng rắn và lỏng

Yêu cầu kỹ thuật:

	Rắn	Lỏng
NaOH	> 96%	> 30%
NaCl	< 1,5%	< 7%
$\text{Fe}_2(\text{CO})_3$	< 0,2%	< 0,2%

II.2.3.3. Na_2CO_3

Yêu cầu kỹ thuật:

$\text{Na}_2\text{CO}_3 > 95\%$

$\text{NaCl} < 1\%$

$\text{Fe} < 0,02\%$

II.2.3.4. Na_2S

Dùng để khử sắt, tránh mùi tanh, màu vàng của sắt. Thường hoà Na_2S thành dung dịch 15° Baumé (Be).

Yêu cầu kỹ thuật:

$\text{Na}_2\text{S} > 63,5\%$

$\text{Fe} < 0,25\%$

Chất không tan < 1%

II.2.3.5. Than hoạt tính

Tạo than từ gỗ, vỏ dừa, bã lạc, bã mía, xương... Than dùng để tẩy màu làm cho mì chính trắng đạt yêu cầu kỹ thuật.

Yêu cầu kỹ thuật: độ tẩy màu, thử bằng thực nghiệm:

Lấy 0,1 g than hoạt tính cho vào 15 ml dung dịch xanh metylen 0,15%, dung dịch xanh sẽ mất màu. Nếu không mất màu nghĩa là sức tẩy màu kém.

II.2.3.6. NaCl tinh chế

Dùng để pha chế vào mì chính, kích thích tiêu hoá và thêm khối lượng.

Yêu cầu kỹ thuật:

- Màu trắng tinh
- $\text{NaCl} > 99\%$
- Ẩm $\leq 0,5\%$

CHƯƠNG 3

SẢN XUẤT MÌ CHÍNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP THUYẾT PHÂN

Như phân các phương pháp sản xuất mì chính đã giới thiệu, phương pháp thuyết phân chủ yếu dùng các tác nhân xúc tác là hoá chất để thuyết phân các nguồn nguyên liệu protit khác nhau tạo ra một hỗn hợp các aminoaxit, từ đó tách axit glutamic ra để sản xuất mì chính. Như vậy, từ cùng một nguyên liệu và một phương pháp sản xuất sẽ có nhiều phương pháp khác nhau để tách riêng axit glutamic ra. Tùy mức độ và phương pháp tách mà hiện nay trong phương pháp hoá học có một số phương pháp khác đang được ứng dụng khắp nơi như: phương pháp trao đổi ion, muối hydric của axit glutamic, điểm đẳng điện v. v. ...

I. PHƯƠNG PHÁP TRAO ĐỔI ION

I.1. Nguyên tắc

Phương pháp này chủ yếu dựa vào tính chất của các cationit có khả năng giữ lại trên bề mặt của nó các anion, trong đó chủ yếu là các anion glutamat. Khi quá trình trao đổi đã bão hoà, tiến hành quá trình nhả bằng NaOH để thu axit glutamic và tạo thành glutamat natri.

Quy trình công nghệ của phương pháp được trình bày trong sơ đồ 1.

I.2. Ưu, nhược điểm của phương pháp

Ưu điểm:

- Đây là loại quy trình tương đối tiên tiến.
- Có chu kỳ thô chế axit glutamic tương đối ngắn.
- Thiết bị ít tiếp xúc với môi trường axit mạnh.
- Dễ tổ chức trong một dây chuyền sản xuất kín, đảm bảo được vệ sinh thực phẩm và an toàn lao động.

Nhược điểm:

- Sản xuất cationit khó khăn, chưa có đủ phương tiện và điều kiện kỹ thuật ở tất cả các nước.

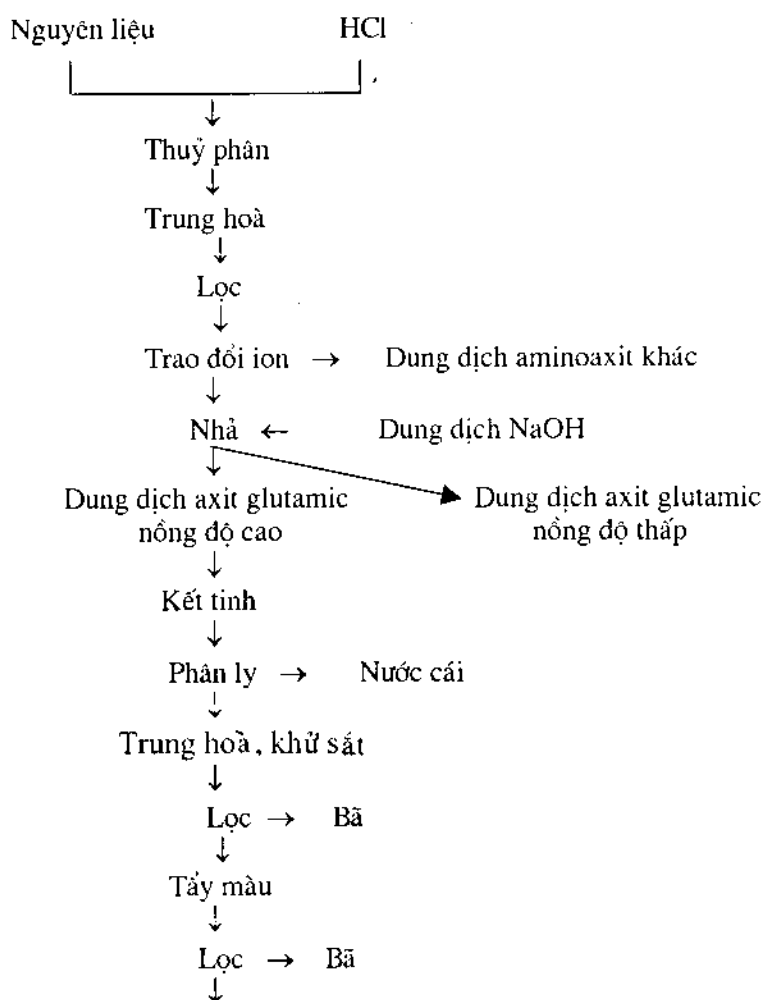
- Yêu cầu kỹ thuật sản xuất cao mới đảm bảo hiệu suất thu hồi axit glutamic cao.

Do vậy đối với nước ta hiện nay chưa có điều kiện áp dụng vào sản xuất công nghiệp. Phương pháp này đã được ứng dụng rộng rãi ở một số nước như Trung Quốc, Nhật Bản, được ứng dụng trong các nhà máy sản xuất bằng phương pháp hoá giải, nhất là trong phương pháp thối chế axit glutamic từ phương pháp sinh tổng hợp.

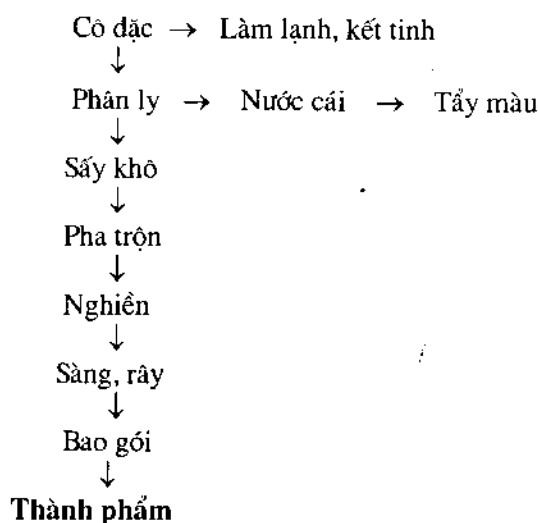
II. PHƯƠNG PHÁP MUỐI HYDRIC AXIT GLUTAMIC

Phương pháp này hiện nay đang ứng dụng ở nước ta để sản xuất mì chính từ các nguồn nguyên liệu protit của thực vật và tác nhân xúc tác là axit HCl.

Sơ đồ 1. Quá trình sản xuất bằng phương pháp trao đổi ion



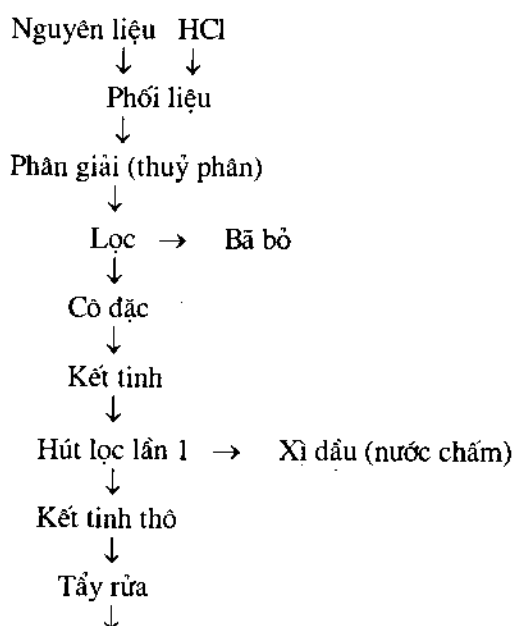
Sơ đồ 1 (tiếp theo)

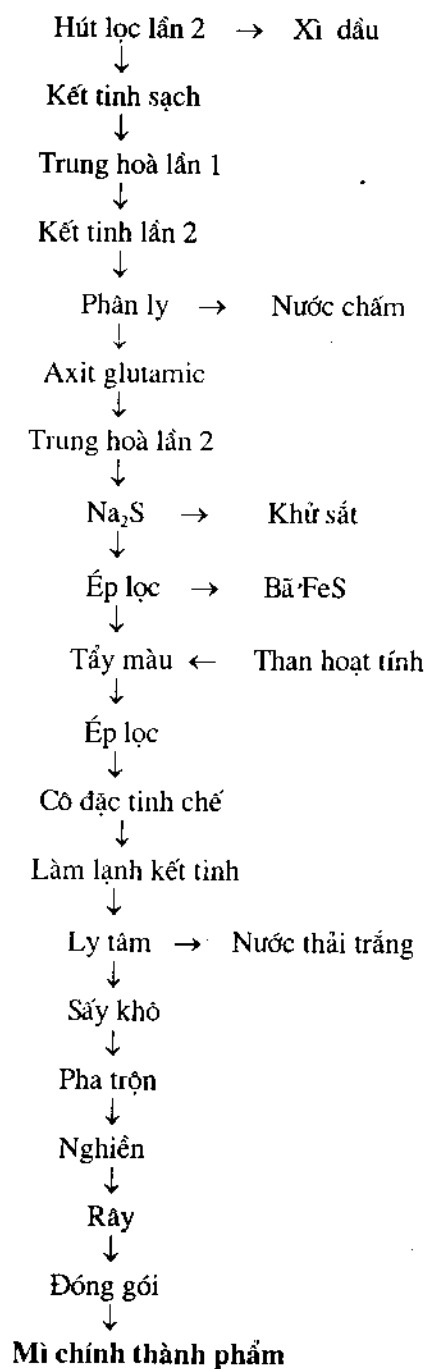


Thường hay dùng các nguyên liệu chủ yếu: protit đậu, khô lạc, gluten bột mì. Quá trình thủy phân cho một hỗn hợp khoảng 20 aminoaxit như: glixin, alanin, serin, treonin, methionin, valin, loxin, izoloxin, axit aspartic, glutamic, arginin, lysin, cystein, phenylalanin, tyrozin, histidin, tryptophan, prolin v. v...

Từ hỗn hợp các axit amin tách axit glutamic ra để sản xuất mì chính. Quy trình sản xuất được trình bày trong sơ đồ 2.

Sơ đồ 2. Quy trình sản xuất bằng phương pháp muối hydric axit glutamic





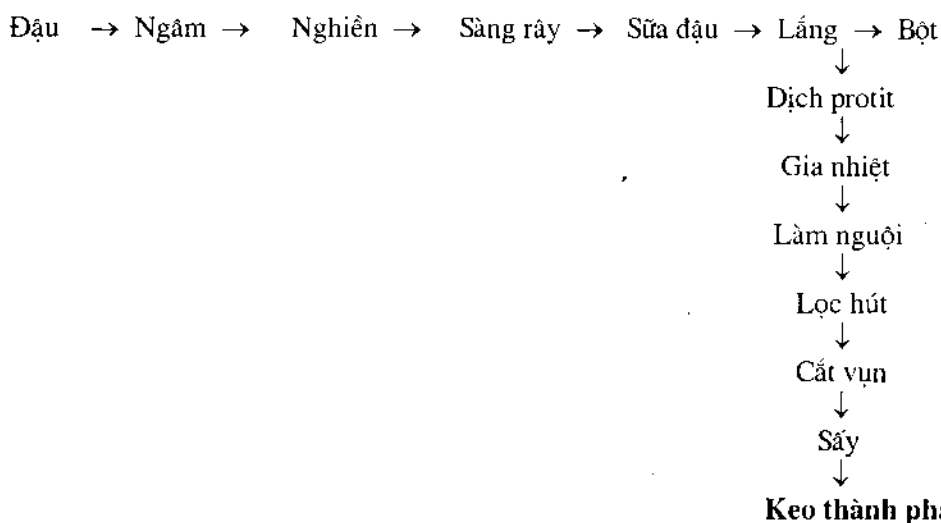
II.1. Giải thích các điều kiện kỹ thuật trong quy trình

II.1.1. Xử lý các nguyên liệu

II.1.1.1. Chế biến keo protit của đậu

Trong đậu có đủ các thành phần khác nhau, ngoài protit còn có glucit, sinh tố, khoáng v.v... nên để tận dụng các thành phần vào sản xuất và tách protit ra để sản xuất mì chính được tiến hành theo phương pháp:

Sơ đồ 3. Quy trình chế biến



Các loại đậu sau khi ngâm hút nước trương nở, các tế bào mềm rũ ra, qua khâu nghiền để phá vỡ các tế bào, giải phóng các phân tử tinh bột, protit ở dạng hoà tan và các chất hoà tan khác. Qua hệ thống rây, ở đây nghiền ở dạng ướt và cho lượng nước nhất định vào để sau khi nghiền được dịch đậu nghiền nhỏ. Lượng nước cho vào nghiền thường đảm bảo dịch ra có nồng độ $0,8 \div 1^0\text{Be}$.

Sau khi nghiền nhỏ xong dịch sữa cho qua hệ thống rây để tách hết các chất không hoà tan như: xenluloza, hemixenluloza, còn dịch sữa bột qua hệ thống máng lắng, tinh bột lắng xuống đáy, còn lại dịch protit.

Do dịch protit có nồng độ quá thấp, lợi dụng tính chất protit biến tính bởi nhiệt độ, bị vón tách ra. Tiến hành gia nhiệt dịch protit ở nhiệt độ $80 \div 100^0\text{C}$.

Trong quá trình ngâm và lắng thường cho thêm H_2SO_3 vào nhằm mục đích:

- Hạn chế vi sinh vật phân giải protit.
- Keo lắng nhanh.

Bảng 11. Thành phần dịch đậu sau khi tách ra

Thành phần Tên gọi	Nước %	% các chất khô				
		Protit	Lipit	Xenluloza	Tinh bột	Tro
Dung dịch protit	94,84	77,86	1,03	10,77	6,5	3,84

- Keo protit sau khi đông tụ, cho qua lọc hút chân không để tách nước ra được keo ẩm có độ ẩm $W = 70 \div 75\%$.
- Để lọc hút được tốt thường yêu cầu quá trình lọc có Độ chân không: $400 \div 500$ mmHg; chiều dày keo sau lọc: $2 \div 2,5$ cm.
- Sau khi lọc xong, cho keo qua hệ thống dao, cắt ra từng miếng nhỏ cho qua sấy để bảo quản keo được lâu.

Sấy xong hàm ẩm của keo thường giảm từ $65 \div 75\%$ xuống $12 \div 13\%$. Sấy theo kiểu đường hầm, nhiệt độ sấy khoảng $90 \div 95^\circ\text{C}$, trong thời gian khoảng $4 \div 5$ giờ. Keo này có thể sử dụng ngay ở dạng ẩm, còn ở dạng khô thì dễ bảo quản và vận chuyển.

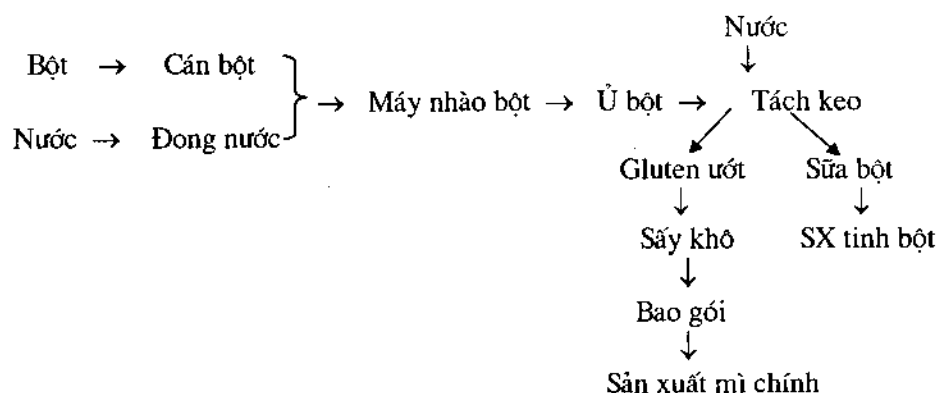
II.1.1.2. Chế biến keo protit của bột mì

Trong bột mì có hàm lượng protit nhất định như thành phần nguyên liệu đã giới thiệu. Protit bột mì khác các loại khác ở chỗ khi hút nước trương nở và keo dính thành một khối ta thường gọi là gluten. Gluten dùng để sản xuất mì chính còn tinh bột sử dụng sản xuất các mặt hàng khác như glucoza, rượu, mì chính theo phương pháp vi sinh vật.

Có nhiều phương pháp để chế biến keo protit bột mì (tách gluten).

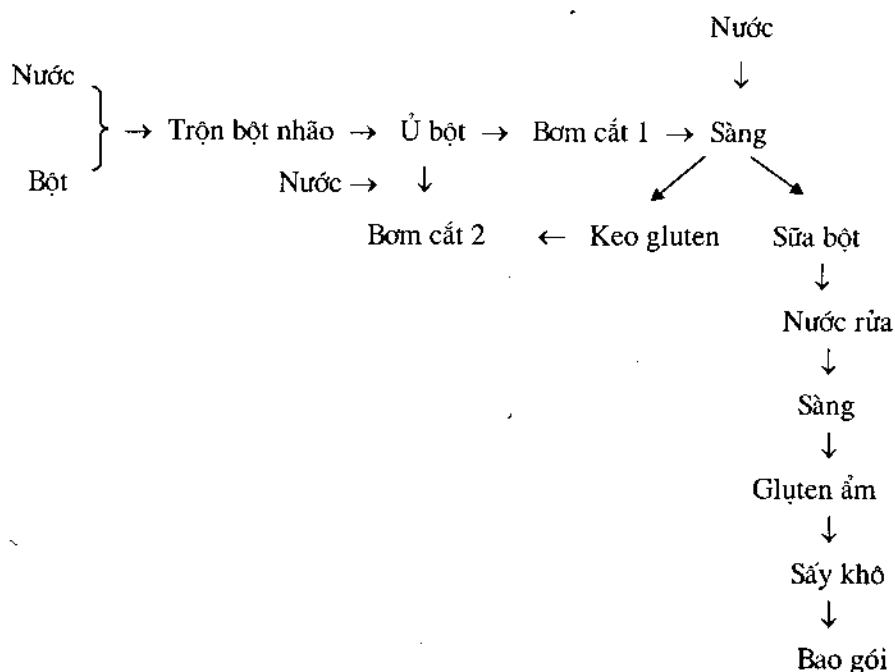
Phương pháp vật lý (Martin): Phương pháp này được ứng dụng rộng rãi ở các nước và ở nước ta.

Sơ đồ 4. Quy trình chính



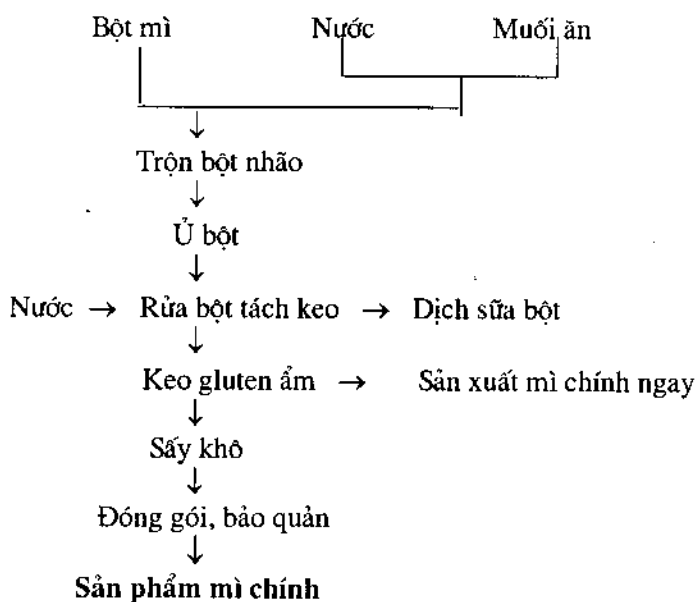
Phương pháp Battes: Phương pháp này khác phương pháp trên là dùng một máy bơm cát làm phân tán gluten thành những hạt nhỏ, sau đó tách gluten khỏi bột qua hệ thống sàng.

Sơ đồ 5



Phương pháp Martin cải tiến: áp dụng trong điều kiện nước ta

Sơ đồ 6.



Bột nhào kỹ với nước. Lượng nước cho vào thích hợp đảm bảo tách gluten dễ dàng và hiệu suất thu hồi cao.

Nếu lượng nước đưa vào quá cao, bột nhão, gluten dễ nát vụn, tỷ lệ thu hồi thấp, còn nếu nước ít quá bột sẽ khô, gluten chưa hút đủ nước trương nở keo tụ, khó nhào, tách khó. Để tách gluten được tốt và đủ nước trộn vào cho gluten hút nước trương nở, keo tụ thành một khối để tách khỏi các chất khác dễ dàng, thường lượng nước cho vào đảm bảo bột đạt độ ẩm $50 + 55\%$.

Muối ăn cho vào nhằm thêm ion kim loại để gluten biến tính keo tụ tốt và hạn chế một phần vi sinh vật phá huỷ gluten. Lượng NaCl cho vào tùy thuộc loại tinh bột tốt hay xấu. Bột xấu, gluten bị phân huỷ một phần do vi sinh vật, để keo tụ được tốt thêm lượng NaCl nhiều hơn. Lượng NaCl thêm vào thực tế khoảng $10 + 20\%$ số nước trộn vào bột.

Quá trình nhào bột bằng máy hoặc bằng tay. Yêu cầu nhào thật kỹ nhưng không quá mạnh làm gluten dễ nát vụn, hiệu suất thu hồi thấp. Sáu khi nhào kỹ, tiến hành ủ bột trong thời gian từ 30 phút + 1 giờ.

Ủ bột nhằm mục đích để đủ thời gian cho bột và gluten hút nước trương nở để tách gluten ra dễ dàng. Không nên ủ quá lâu làm mất thời gian, hiệu suất sử dụng thiết bị kém mà bột dễ bị chua, thối một phần do vi sinh vật phá huỷ. Ủ bột xong tiến hành tách gluten.

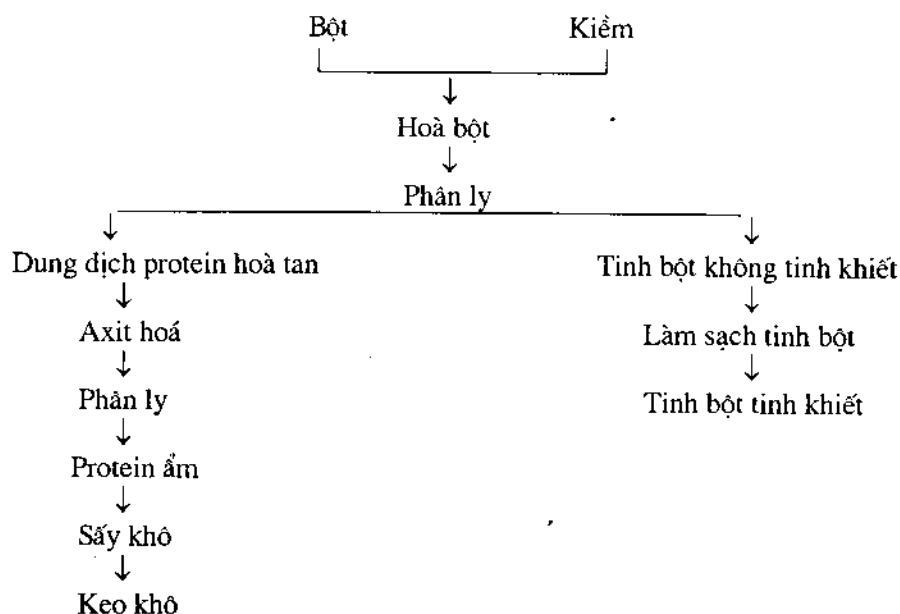
Rửa bột tách keo. Dùng hệ thống bơm cát hoặc máy sàng, rây. Do tác dụng lực cơ học và dòng nước xối qua rây, bột trôi theo dòng nước được dịch sữa bột, còn khối gluten được keo dính, giữ lại trên lưới. Tiến hành tách hết bột và rửa thật sạch các chất khác thu được khối gluten tương đối thuần khiết, dẻo dính, màu hơi vàng là tốt.

Keo gluten ẩm có thể đưa vào sản xuất mì chính ngay, nếu muốn vận chuyển và bảo quản lâu phải sấy keo vì keo ẩm có độ ẩm $65 + 70\%$ rất dễ bị vi sinh vật phá huỷ.

Tiến hành sấy keo trong những hệ máy sấy khác nhau để giảm độ ẩm của keo xuống khoảng $10 + 15\%$. Sấy xong được gluten khô thành phẩm, đóng bao vận chuyển dùng dự trữ trong sản xuất lâu dài.

Phương pháp hoá học: là phương pháp lợi dụng tính hoà tan của protein trong dung dịch kiềm. Kiềm hay sử dụng là NaOH. Qua thực tế thấy rằng muốn protein khuếch tán tốt, không bị lắng xuống thì pH của dung dịch là 11,5.

Sơ đồ 7 Dây chuyền sản xuất



Phương pháp này sản xuất được tinh bột tinh khiết, hiệu suất thu hồi gluten tương đối cao, gluten thu được dễ biến tính nhiều chỉ thích hợp cho sản xuất mì chính.

Phương pháp này tốn nhiều hoá chất, không kinh tế trong sản xuất lớn, chỉ ứng dụng khi cần sản xuất tinh bột có độ thuần khiết cao và nghiên cứu trong phòng thí nghiệm.

II.1.2. Chế biến nguyên liệu

Khô lạc, khô đậu: các loại này do các nhà máy ép lạc, đậu lấy dầu, còn khô của nó có hàm lượng protit tương đối cao được ứng dụng thích hợp trong sản xuất mì chính, nước chấm v.v...

* **Phối liệu:** Quá trình cho nguyên liệu, axit HCl và nước vào theo số lượng và tỷ lệ thích hợp để tiến hành thủy phân triệt để từ protit thành aminoaxit. Để tiến hành phối liệu được tốt phải tính toán và nghiên cứu các điều kiện cần thiết yêu cầu khi tiến hành thủy phân.

II.1.2.1. Thủy phân

Mục đích: tiến hành thủy phân protit thành aminoaxit nhờ chất xúc tác là HCl hoặc các hoá chất khác và nhiệt độ.

Qua nghiên cứu cho thấy quá trình thủy phân phụ thuộc vào nhiều điều kiện khác nhau, chủ yếu phụ thuộc vào: phương pháp thủy phân, lượng axit, nồng độ axit, thời gian thủy phân, nhiệt độ và áp suất quá trình thủy phân.

- Ảnh hưởng loại tác nhân (axit)

Muốn tăng nhanh quá trình thủy phân phải sử dụng các chất xúc tác mạnh như các axit có hoạt tính cao. Trong các điều kiện tiến hành, tốc độ của quá trình thủy phân phụ thuộc vào hoạt động của axit đem sử dụng.

Bằng các thí nghiệm cho thấy hoạt tính của các axit so với axit HCl như sau:

Axit	HCl	H ₂ SO ₄	HNO ₃	HCOOH	CH ₃ COOH
Hoạt tính	1	0,51	0,23	0,07	0,06

Vì vậy trong sản xuất hay sử dụng HCl làm chất xúc tác, không những do cường lực xúc tác của HCl cao hơn nhiều so với các axit khác mà khi lượng HCl dư được trung hoà bằng Na₂CO₃, NaOH tạo thành NaCl không độc với cơ thể con người. Dùng HCl chỉ có hại vì HCl ăn mòn thiết bị nhiều và dễ bay hơi gây độc hại cho người sản xuất nên khi sử dụng và thiết bị dùng phải đảm bảo chống ăn mòn và kín.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ

Quá trình thủy phân tăng lên cùng sự tăng nhiệt độ và áp suất hơi đưa vào. Qua nghiên cứu cho thấy trong giới hạn nhiệt độ từ 160 ÷ 200°C tốc độ của quá trình thủy phân tăng lên gấp 2 ÷ 2,5 lần khi nhiệt độ tăng lên 10°C, làm giảm thời gian thủy phân. Nhưng khi quá trình thủy phân thực hiện ở nhiệt độ $t^0 \geq 180^0 + 190^0\text{C}$, các hợp chất hữu cơ dễ bị phân huỷ, gây tổn thất aminoaxit nhiều và tổn thất hơi ở áp suất cao nhiều. Nhiệt độ thấp quá làm kéo dài thời gian thủy phân, tăng chu kỳ sản xuất và giảm hiệu suất sử dụng thiết bị. Vì vậy để đảm bảo yêu cầu của quá trình thủy phân, cho hiệu suất thu hồi aminoaxit cao nhất thường tiến hành thủy phân ở nhiệt độ trong khoảng 120⁰ ÷ 160⁰C.

- Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình thủy phân

Thời gian thủy phân được xác định bằng quá trình thủy phân triệt để ra aminoaxit, nên cố gắng giảm sự phân huỷ cuối cùng ra NH₃. Thời gian quá trình thủy phân chia làm 3 giai đoạn:

+ Dưới tác dụng của dung dịch axit các phân tử protit chuyển thành những phân tử aminoaxit. Biểu hiện ở các phản ứng hoá học. Trong quá trình thủy phân, tốc độ của chúng phụ thuộc vào nồng độ axit và nhiệt độ.

+ Các aminoaxit được tạo thành tách ra vào dung dịch xung quanh. Đó là quá trình khuếch tán aminoaxit. Tốc độ khuếch tán phụ thuộc vào nồng độ vật chất trong dung dịch và trong nguyên liệu, mức độ nghiền nhỏ nguyên liệu và nhiệt độ của quá trình.

Lượng aminoaxit chuyển từ phân tử nguyên liệu vào dung dịch bằng:

$$Q = K (C_1 - C_2) t_d$$

K - hệ số phụ thuộc mức độ nghiền nhỏ của nguyên liệu và nhiệt độ;

C₁- nồng độ aminoaxit trong chất lỏng thấm ướt nguyên liệu;

C₂- nồng độ aminoaxit trong chất lỏng xung quanh;

t_d - thời gian quá trình khuếch tán.

Hệ số K phụ thuộc vào mức độ nghiền nhỏ của nguyên liệu và nhiệt độ qua bảng 12.

Bảng 12

Dạng nguyên liệu	Kích thước phân tử (mm)	Hệ số K		
		160°C	170°C	180°C
Nhỏ như mặt cưa Nguyên liệu xốp	1 ÷ 2	6,0	7,0	8,0
Nhỏ	17 x 10 x 2	0,145	0,20	0,29
Trung bình	35 x 30 x 3	0,080	0,125	0,20
Lớn	50 x 30 x 6	0,050	0,088	0,15

+ Lượng aminoaxit chuyển từ nguyên liệu vào dung dịch tăng lên cùng sự tăng lên cùng sự tăng hiệu số nồng độ (C₁ - C₂) giữa chất xung quanh trong nguyên liệu và chất lỏng xung quanh. Hiệu số nồng độ tăng lên cùng sự tăng tốc độ ngâm ướt và giảm nồng độ chất lỏng xung quanh.

Qua trên ta thấy rằng thời gian khuếch tán được rút ngắn do tăng tốc độ khuếch tán. Tốc độ khuếch tán tăng lên đối với nguyên liệu loại bột 5 ÷ 10 lần so với loại nguyên liệu kích thước 30 ÷ 50 mm. Nhiệt độ tăng, tốc độ khuếch tán tăng. Khi nhiệt độ tăng lên 10°C tốc độ khuếch tán tăng 20%.

+ Lọc dung dịch aminoaxit khỏi các chất khác.

Để xác định thời gian thủy phân thích hợp phải tiến hành nghiên cứu và thí nghiệm các quá trình thủy phân khác nhau trong những điều kiện khác nhau và điều kiện thích hợp nhất.

Trong cùng một điều kiện, để thử thời gian kết thúc quá trình thủy phân thường dùng giấy axetat anilin thử hơi dung dịch thủy phân bay ra. Nghiên cứu cho thấy rằng quá trình thủy phân protit kèm theo các quá trình thủy phân tinh bột và các hợp chất cacbon khác nhau tạo ra nhiều khí furfural. Khí này có phản ứng với axetat anilin cho màu đỏ. Khi quá trình thủy phân

này kết thúc cũng là lúc thủy phân các protit tạo thành aminoaxit xong, lợi dụng tính chất này để dùng giấy lọc những dung dịch axetat anilin thử, khi thấy giấy lọc không có màu đỏ mà có màu trắng ngà vàng là được. Quá trình thủy phân kết thúc từ thời điểm ấy. Phương pháp này thường được ứng dụng trong sản xuất lớn công nghiệp cho kết quả nhanh, và tương đối chính xác.

Trong quá trình nghiên cứu và thực nghiệm, việc xác định thời gian thủy phân còn dựa vào sự xác định tỷ lệ α - aminoaxit tạo thành.

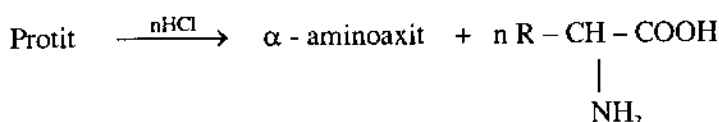
Bảng 13

Thủy phân protit hoàn toàn (%)	Tỷ lệ α - aminoaxit N chung (%)
57,3 ÷ 63,5	47 ÷ 52
85,5 ÷ 86,5	71 ÷ 72
91 ÷ 92	75 ÷ 76
100	82

Thấy rằng: Nếu trong protit thủy phân giải phóng ra các aminoaxit như arginin, histidin, lizin, tryptophan, xistin thì lượng N chung của chúng trong dung dịch tương đương lượng N aminoaxit và tỷ lệ $\alpha \equiv 100$, nếu hàm lượng các chất này quá lớn thì tỷ lệ của chúng < 100 . Trên thực tế quá trình thủy phân không hoàn toàn và có quan hệ thực nghiệm giữa α -aminoaxit/N chung như trình bày trong bảng 13.

Kết thúc thời gian thủy phân làm thế nào để hiệu suất thủy phân cao nhất. Thời gian kết thúc còn phụ thuộc chủ yếu vào lượng axit, nồng độ axit và nhiệt độ trong quá trình.

- Lượng axit: Lượng axit HCl cho vào thủy phân phụ thuộc hàm lượng N protit trong nguyên liệu. Quá trình thủy phân là quá trình thực hiện phản ứng:



Qua phản ứng trên ta thấy muốn tạo thành 1 phân tử aminoaxit, ứng với 14g N cần có 1 phân tử HCl xúc tác phản ứng, tương ứng 36,5 g. Vì vậy ứng lượng N trong nguyên liệu cần thủy phân ra bao nhiêu thì ta tính và được lượng HCl 100% cần cho vào. Thực tế HCl nồng độ khác nhau, từ HCl 100%, ta tính ra lượng HCl yêu cầu cho vào. Theo loại nồng độ từng nhà máy có, HCl tính phản ứng là lượng axit lý thuyết. Nhưng thực tế cần có thêm một lượng axit để

ngoài quá trình thủy phân protit nó còn tham gia thủy phân các hợp chất khác có trong nguyên liệu nữa như: gluxit, tinh bột,... và một phần hao hụt do bay hơi.

Lượng axit thực tế thường bằng lượng axit lý thuyết nhân thêm hệ số $K = 1,5 \div 1,8$.

Ví dụ: Tính lượng HCl cho vào để thủy phân 100 kg khô lạc. Biết hàm lượng protit trong khô lạc là 60%; nhà máy có loại HCl 31%.

- Hàm lượng protit 60%, trong 100 kg khô lạc có: $\text{Protit} = \frac{100 \times 60}{100} = 60 \text{ kg}$
- Tính lượng N dựa vào hệ số protit chung $5,7 \div 6,25$: $N = 60 / 6,25 = 9,6 \text{ kg}$
- Lượng HCl 100% tính theo lý thuyết: $\frac{9,6 \times 36,5}{14} = 25 \text{ kg}$
- Lượng HCl 100% thực tế: $25 \times 1,7 = 35,5 \text{ kg}$
- Lượng HCl 31% cần cho vào thủy phân theo lý thuyết: $X = 35,5 \times \frac{100}{31} = 114,5 \text{ kg}$
- Lượng HCl 31% thực tế: $114,5 \times 1,5 = 171,75 \text{ kg}$

Khi tính ra được lượng HCl cần thiết, muốn điều chỉnh nồng độ đạt yêu cầu thủy phân bao nhiêu, tính toán dựa vào phương trình cân bằng chất khô để thêm lượng nước đạt yêu cầu.

Khi lượng axit đạt yêu cầu cho quá trình thủy phân thì nồng độ axit bao nhiêu cũng rất quan trọng. Nếu nồng độ axit cao quá, dễ làm một số aminoaxit bị phân hủy (như tryptophan) gây tổn thất lớn. Đồng thời axit dễ bay hơi là hao tổn nhiều axit.

Ngược lại, khi nồng độ axit loãng quá sẽ kéo dài thời gian thủy phân, tốn nhiều thể tích thiết bị, gây hao tổn hơi và nhiệt mà hiệu suất thủy phân không cao.

Muốn xác định nồng độ axit bao nhiêu thích hợp, tiến hành nghiên cứu thực nghiệm cùng điều kiện nhiệt độ, áp suất thích hợp, với các nồng độ axit khác nhau, xem thời gian và hiệu suất thủy phân của quá trình để xác định.

Quá trình thủy phân ở $p = 2,5 \text{ atm}$ đối với gluten bột mì, thiết bị chịu áp lực ở bảng 14.

Qua trên ta thấy HCl 20% trong 5 giờ cho hiệu suất cao nhất, nhưng về mặt an toàn thiết bị và hao tổn axit nhiều, nên để ứng dụng trong công nghiệp vừa có hiệu suất cao và bảo đảm sản xuất lâu dài, dùng loại axit có nồng độ 15% để thủy phân.

Qua nghiên cứu trong điều kiện thủ công, thiết bị đơn giản và áp lực thường đối khô lạc cho thấy ở bảng 15. Quá trình ở áp suất 1 atm, thời gian cố định 48 giờ.

Bảng 14

Nồng độ axit	Thời gian thủy phân	Hiệu suất thủy phân
5	4	Thời gian đầu: 5 ÷ 7%
5	5	Dạng mạch gluten nhỏ
5	6	-
10	3	50
10	3	52
10	4	56
10	5	57
15	3	71
15	4	91
20	3	73
20	5	99

Bảng 15

Nồng độ axit (N)	Đạm toàn phần (g/l)	Đạm formol (g/l)	Đạm NH ₃ (g/l)	Đạm amin (g/l)	Hiệu suất thủy phân (%)
2	10,5	6,72	1,36	5,36	63
3	14,87	10,22	1,31	9,01	66,8
4	19,60	14,84	2,67	11,8	71,8
5	18,37	12,60	2,1	10,65	70,85
6	19,05	12,30	1,95	10,35	71,6

Qua đây ta thấy tỷ lệ đạm amin tạo thành và hiệu suất thủy phân cao nhất ở nồng độ axit 4N ÷ 5N ứng 14,6% ÷ 18%.

Vậy yêu cầu trong quá trình thủy phân bảo đạm nồng độ axit đạt yêu cầu: 15 ÷ 18%

Theo ví dụ trên, tính ra HCl 30% = 114,5 kg. Tính lượng nước cần thêm vào đạt nồng độ yêu cầu khi thủy phân:

- chọn nồng độ thích hợp (15% chẳng hạn);
- lượng nước cần cho vào thêm là: x, nước có trong nguyên liệu: y;
- phương trình cân bằng vật chất khô: $(x + y + 114,5) \times 18 = 114,5 \times 31$.

Tuỳ theo loại nguyên liệu khác nhau, có hàm lượng nước y khác nhau mà tính cả lượng nước hay lượng axit cần cho thêm vào trong quá trình thuỷ phân. Thường ứng dụng 2 loại keo khô và keo tươi.

Như vậy khi thuỷ phân với điều kiện bảo đảm đủ lượng axit, phản ứng dụng các phản ứng trên để xác định, nồng độ axit, nhiệt độ và áp suất đạt yêu cầu thì thời gian thuỷ phân.

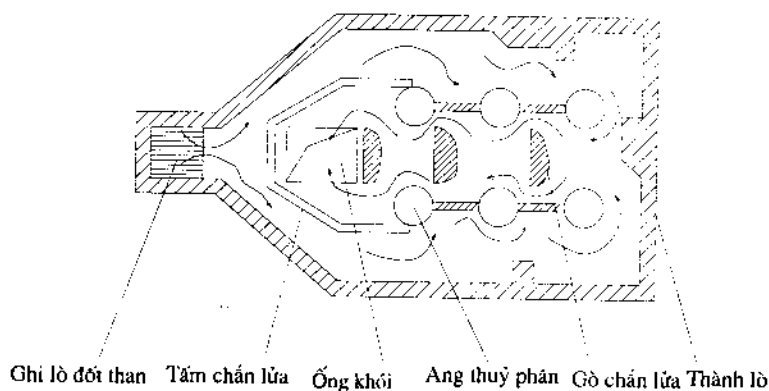
Thực tế cho thấy:

- đối với thiết bị hoàn toàn kín, chịu áp lực $3 \div 5$ giờ;
- thiết bị trung bình $14 \div 18$ giờ;
- thiết bị thủ công $24 \div 48$ giờ.

Các phương pháp thuỷ phân

- Điều kiện thủ công: dùng chum, ang sành gia nhiệt trực tiếp bằng những hệ thống lò than, ở nhiệt độ $105 \div 110^\circ\text{C}$.

Dùng chum, ang qua chất truyền nhiệt trung gian: dung dịch dầu, dung dịch nước muối, hay cách cát ở nhiệt độ $110 \div 120^\circ\text{C}$.



Hình 3.1.

Dùng hệ thống lò, có 1 hàng chứa hay 2 hàng chum, hoặc thiết bị, thùng chịu axit- sơ đồ 1 loại là thuỷ phân.

Bảng 16

Các chỉ số	Thể tích thiết bị m ³				
	18	30	37	50	70
<i>Kích thước</i>					
Xung quanh phần trên	940	913	886	990	850
Phần hình trụ	2302	3000	2786	2808	3688
Phần dưới	1050	730	886	1190	850
<i>Chiều dày (mm)</i>					
Thành thiết bị	26	34	18	29	34
Phần lót trong	125	125	125	125	125
<i>Góc tạo thành (độ)</i>					
Phần trên	90	90	60	60	90
Phần dưới	60	60	60	60	60
<i>Chiều cao (mm)</i>					
Phần trên	450	310	597		
Phần nắp ở trên	936	1660	1582	1717	1261
Phần hình trụ	4700	4150	6144	8492	5326
<i>Phần nón</i>					
Phía dưới	1243	1480	1582	1532	3125
Phần dưới	355	-	713	106	350
Phần chung	7684	8600	10,6	12,45	12,63
Tỷ lệ chiều cao trên đường kính	3,3	2,8	3,8	4,5	3,4
Trọng lượng	16,25	17,3	18,3	24,7	41

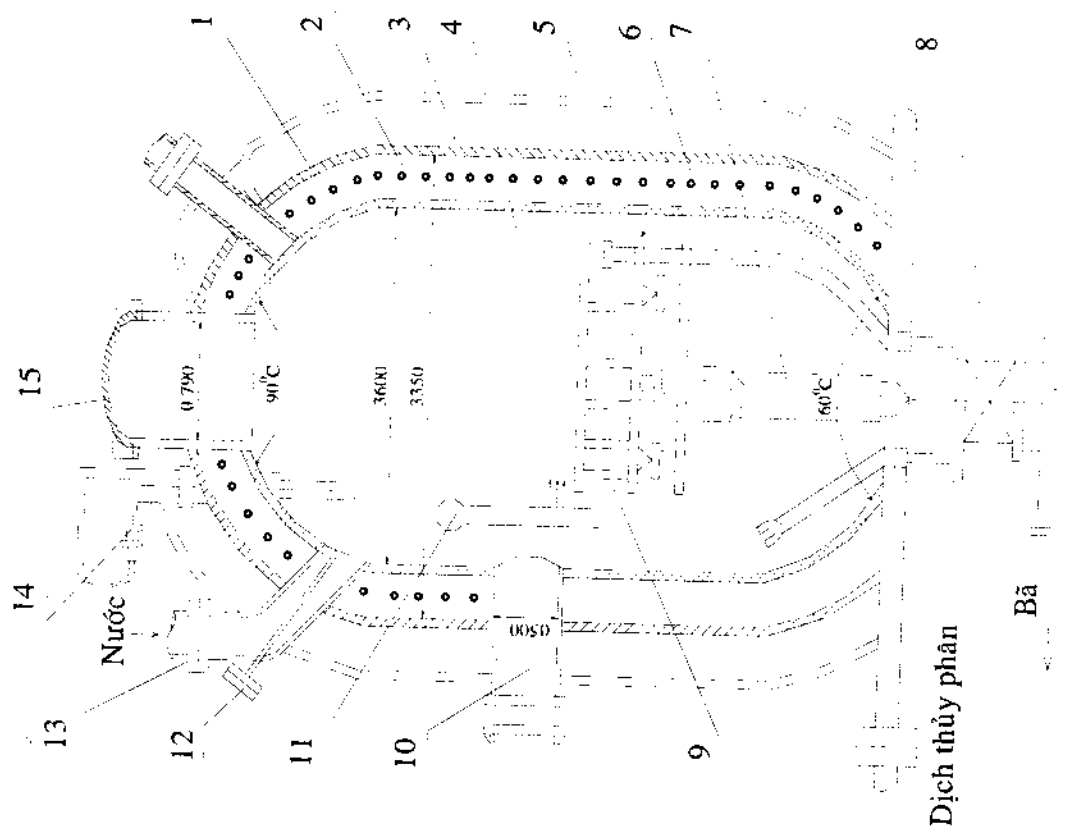
- Trong điều kiện thủ công, để giảm thời gian thủy phân và giảm bớt tiêu tốn lượng nhiên liệu quá lớn thường người ta cho nguyên liệu vào ngâm, trong axit trước một tuần, cho nguyên liệu ngâm ướt axit 1 phần liên kết protit bị yếu hoặc bị phân giải được. Khi cho nước và axit vào thiết bị thường cho nước sôi (thiết bị nấu nước đổ vào chóng hơn) rồi mới cho axit và nguyên liệu vào.

- Điều kiện công nghiệp:

Thủy phân thực hiện trong những thiết bị hoàn hảo hơn, thiết bị chịu áp lực gia nhiệt trực tiếp hoặc gián tiếp qua bao hơi và cá cánh khuấy. Phương pháp này bảo đảm:

Hình 3.2.

- 1- thùng bằng thép;
- 2- lớp bê tông;
- 3- lớp bê tông, axit;
- 4- gạch chịu nhiệt axit;
- 5- lớp chịu nhiệt;
- 6- ống đai tháo dịch thủy phân;
- 7- ống ngăn tháo dịch còn lại;
- 8- van tháo bã;
- 9- đo trọng lượng;
- 10- cửa quan sát;
- 11- ống cho thêm nước axit;
- 12- cửa cho axit;
- 13- ống cho nước;
- 14- đo mức nguyên liệu;
- 15- nắp cơ khí hoá.



- + kiểm tra thường xuyên sau khi phản ứng;
- + khuấy trộn hỗn hợp liên tục;
- + tỷ lệ axit và protit trong suốt thời gian thủy phân không bị thay đổi nhiều.

Các loại thiết bị thường hình trụ, ngoài bằng gang hoặc thép, trong lát gạch caosu chịu axit, tráng men chịu axit. Thể tích nổi khoảng $50 \div 5000 \text{ l}$. bao hơi thường cao tới 4/5 chiều cao thiết bị. Trên nắp có ống dẫn axit tới cửa cho nguyên liệu, axit, NaOH và kiểm tra lớp men bảo vệ. Mặt xung quanh thiết bị phủ lớp cách nhiệt.

Trong công nghiệp sử dụng một số thiết bị thủy phân có thể tích là 18; 30; 38; 40; 50; 70 m^3 , cấu tạo cơ bản loại thiết bị này (ví dụ loại $v = 70\text{m}^3$):

Thân bằng thép (CT_2 , CT_3 , CT_4 , 20K) chịu được áp suất $p = 12 \div 16 \text{ atm}$, bên trong có tráng lớp men chịu axit (keo phenol) trong thiết bị thường có lớp bê tông (gạch men) dày $90 \div 100 \text{ mm}$, tiếp đó có lớp sứ hoặc than graphit chịu nhiệt chịu axit. Để giữ các lớp đó thường có lớp matit chịu axit và gạch chịu nhiệt.

Phần trên thiết bị có cửa cho nguyên liệu vào, cửa cho nước và axit vào, cửa tách hơi nóng, cửa quan sát và kiểm tra. Phần dưới có cửa tháo dịch thủy phân và cửa tháo nước ngưng để giảm tổn thất nhiệt, thiết bị bọc lớp cách nhiệt, lớp này có thể giảm tổn thất nhiệt và môi trường xung quanh $90 \div 95\%$.

II.1.3. Lọc

II.1.3.1. *Mục đích*: hỗn hợp sau khi thủy phân gồm các axit amin, bã đen chủ yếu là hydratecarbon, muối vô cơ không tan, dẫn xuất tinh bột, xenluloza, muối khoáng, HCl và các thành phần khác. Lọc để tách dung dịch, axit amin hoà tan khỏi các chất khác (gọi chung là bã đen).

Dung dịch sau khi thủy phân ra thường có nồng độ $13 \div 18^\circ\text{C}$, nhiệt độ $\geq 100\%$ và còn lượng axit cao, dung dịch có màu nâu thẫm hoặc màu đen. Vì vậy để tiến hành lọc được tốt, lượng axit ít bay hơi ảnh hưởng đến sức khoẻ công nhân và môi trường axit ít ăn mòn thiết bị, phải làm nguội dung dịch đến nhiệt độ $\leq 50^\circ\text{C}$.

Nhiệt độ thấp quá, mất nhiều thời gian làm nguội, độ nhớt dung dịch tăng, tốn nhiều thời gian-lọc.

Để lọc được tốt dùng các phương pháp lọc khác nhau sau đây.

II.1.3.2. Các phương pháp lọc

Lọc tự nhiên: các cơ sở thủ công, chủ yếu dùng những thiết bị đơn giản, do chênh lệch áp suất lọc do trọng lượng dịch gây ra, nên thời gian lọc kéo dài, tốn nhiều diện tích, công kênh và có hại đối với công nhân và thiết bị.

Hút lọc: tạo độ chân không để có chênh lệch áp suất $\Delta p < 1 \text{ kg/cm}^2$. Tốc độ lọc phụ thuộc vào trở lực lọc của vật liệu, chênh lệch áp suất Δp , diện tích bề mặt lọc và chiều cao lớp nguyên liệu lọc. Tốc độ lọc xác định theo phương trình:

$$v = \frac{\Delta p \times f}{r \times h}$$

trong đó: v: tốc độ lọc;

f: diện tích bề mặt lọc;

Δp : chênh lệch áp suất;

r: trở lực riêng;

h: chiều cao lớp nguyên liệu.

Từ đây thấy, muốn tăng tốc độ lọc lên cần:

- tăng diện tích lớp nguyên liệu lọc;
- giảm chiều cao lớp nguyên liệu;
- tăng chênh lệch áp suất Δp , nhưng tăng theo tỷ lệ tùy theo loại nguyên liệu bị nén ép hay không. Nếu Δp tăng cao quá nguyên liệu bị nén ép thì tăng trở lực r đưa đến v không tăng. Thường $\Delta p = 500 \div 600 \leq 1 \text{ kg/cm}^2$.

Phương pháp này có nhược điểm: tốc độ lọc nhỏ, công kênh, chiếm diện tích, dịch lọc không trong lắm

Ly tâm lọc: dựa vào lực ly tâm, tránh ăn mòn cho thiết bị nên cũng bị hạn chế.

Ép lọc: dùng thích hợp và phổ biến nhất do:

- bề mặt lọc lớn;
- lọc nhanh, thiết bị gọn và dễ dùng những vật liệu chống ăn mòn ở môi trường axit (vải, gỗ...);
- tạo chênh lệch Δp , rút ngắn thời gian lọc.

Phương trình lý thuyết tốc độ lọc:

$$\frac{dv}{Fdr} = \frac{n \times \pi d^4 \times \Delta p}{12 \alpha \mu \gamma L}$$

trong đó: n : số ống mao dẫn có trong 1 m² bề mặt lọc (phụ thuộc độ xốp của bã);

d : đường kính ống mao dẫn; α : hệ số trở lực do ống mao dẫn;

Δp : chênh lệch áp suất;

L : chiều dày lớp bã;

μ : độ nhớt dung dịch.

Qua phương trình trên ta thấy tốc độ lọc không phụ thuộc vào bề mặt thiết bị lọc mà chất lượng bã cũng ảnh hưởng lớn. Bã xốp lọc nhanh (d lớn, α nhỏ), bã dính lọc chậm (do chất lượng nguyên liệu ban đầu). Nhiệt độ, áp suất và bề dày lớp bã cũng ảnh hưởng lớn.

Yêu cầu dung dịch sau khi lọc: màu nâu sáng, trong suốt, nồng độ càng cao càng tốt, thường $14 \div 18$ °Be. Hiện nay trong điều kiện của ta, tiêu chuẩn theo kinh nghiệm:

- áp lực lọc $p \leq 2 \text{ kg/cm}^2$;
- lượng dung dịch đưa vào 1 lần ép lọc $1400 \div 1800 \text{ l}$;
- nhiệt độ dung dịch lọc: 50°C .

Lọc bã 2 lần:

+ lần 1: dùng dung dịch aminoaxit loãng rửa;

+ lần 2: đưa dung dịch HCl $4 \div 8$ Be rửa để tách hết aminoaxit còn lại trong bã.

- thủy phân trong bã $\leq 70\%$;
- thành phần đạm còn lại $\leq 3\%$.

II.1.4. Cô đặc

Dung dịch lọc thu được chủ yếu các axit amin hoà tan ở dạng muối hydro clorua, axit glutamic và axit amin hoà tan và HCl còn lại sau thủy phân.

II.1.4.1. Mục đích

Cô đặc để loại đi phần lớn nước và HCl để dung dịch đạt tới trạng thái bão hoà ở nhiệt độ cô đặc, tiếp tục hạ nhiệt độ đến trạng thái quá bão hoà cho các hydroclo axit amin kết tinh tách ra.

II.1.4.2. Điều kiện kỹ thuật khi cô đặc

- Nồng độ khi cô đặc: ta biết nhiệt độ càng cao, độ hoà tan các chất càng tăng, cho nên tùy theo từng thời tiết và yêu cầu quá trình cô đặc mà khống chế nồng độ. Nồng độ quá nhỏ sẽ làm tăng độ hoà tan của axit glutamic, giảm hiệu suất thu hồi. Nồng độ quá lớn, độ nhớt dung

dịch sẽ tăng không những chỉ ảnh hưởng đến việc tách axit glutamic mà còn ảnh hưởng đến thao tác (do muối NaCl kết tinh theo, bề mặt tinh thể bị bao quanh một lớp dung dịch).

Nghiên cứu khả năng hoà tan các chất axit amin, axit glutamic ở các nhiệt độ khác nhau ta thấy ở bảng 17:

Bảng 17. Độ hoà tan (g/ 100ml)

Nhiệt độ (°C)	Độ hoà tan (g/100ml)	Nhiệt độ (°C)	Độ hoà tan (g/100ml)
0	31,5	60	57
10	34,5	70	62
20	38	80	67,5
30	42,5	90	74
40	47	100	81
50	52		

Quá trình cô đặc vừa bảo đảm nâng cao trình độ dung dịch vừa bảo đảm phẩm chất sản phẩm (các aminoaxit nhất là axit glutamic khỏi bị mất tính chất bởi tác dụng của nhiệt độ và môi trường axit) thường cô đặc ở điều kiện chân không ứng với nhiệt độ là $\leq 80^{\circ}\text{C}$.

Vì vậy trong cô đặc để đo nồng độ dung dịch ở các nhiệt độ khác nhau, ta lấy nồng độ dung dịch ở 80°C làm nồng độ tiêu chuẩn.

Phương trình tính nồng độ ở nhiệt độ bất kỳ: $n_{t^{\circ}\text{C}} = n_{(80^{\circ}\text{C})} - 0,05 (t^{\circ} - 80^{\circ}\text{C})$

+ Nồng độ khi cô đặc cần phụ thuộc nhiệt độ môi trường các tinh thể kết tinh. Vì vậy cần nghiên cứu để điều chỉnh nồng độ theo nhiệt độ đó.

Bảng 18. Bảng điều chỉnh nồng độ ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ không khí (°C)	<- 15	- 14 ÷ 5	4 ÷ 5	6 ÷ 15	16 ÷ 25	26 ÷ 35	≥ 36
°Be	29,95	30,45	30,95	31,45	31,95	32,45	32,95
Tỷ trọng	1,257	1,2675	1,272 5	1,2825	1,2825	1,2875	1,2945

Ở các nước trong điều kiện công nghiệp, khống chế nhiệt độ môi trường kết tinh mà ít phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên, đối với nước ta chủ yếu nhiệt độ 2 mùa hè và đông quá chênh

lệch nên chủ yếu thay đổi nồng độ theo 2 mùa và theo loại nguyên liệu khác nhau, (nồng độ các chất hoà tan khác nhau). kinh nghiệm thực tế cho thấy nồng độ ở 80°C là như ở bảng 19.

Bảng 19

Loại nguyên liệu	Mùa hè	Mùa đông
Keo đậu	31,5 ÷ 32°Be	31 ÷ 31,5°be
Khô lạc	32 ÷ 32,5°Be	31,5 ÷ 32°be
Gluten mì	30,5 ÷ 31°Be	30 ÷ 30,5°Be

Từ các quá trình cô đặc khác nhau ta có thể tính được lượng tinh thể tách ra và hiệu suất kết tinh. Ví dụ: tính toán có 500 g $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$ hoà tan trong 1000 ml dung dịch, cô đặc còn lại 300 ml, khối lượng tinh thể tách ra và hiệu suất kết tinh ở nhiệt độ 20°C.

Giải:

- Theo độ hoà tan ở 20°C là: 38 g/100 ml

- Lượng hoà tan trong 300 ml dung dịch là: $\frac{300 \times 38}{100} = 114$ g

Dung dịch có 500 g hoà tan quá bão hoà, lượng tinh thể tách ra: $500 - 114 = 386$ g

Hiệu suất kết tinh: $\frac{386 \times 100}{500} = 77,2\%$

- Lượng và nồng độ HCl cho vào:

Do đặc tính của hydroclorua axit glutamic dễ hoà tan trong nước nhưng khó hoà tan trong môi trường axit đặc so với các loại aminoaxit khác. lợi dụng tính chất này để khống chế nồng độ HCl cho vào để cô đặc xong, các tinh thể kết tinh tách ra dễ nhất. Để biết nồng độ và lượng HCl cho vào bao nhiêu là thích hợp, nghiên cứu khả năng hoà tan của nó với các loại nồng độ axit khác nhau thấy ở bảng 20.

Qua đây ta thấy HCl > 20% độ hoà tan rất ít, HCl < 20% độ hoà tan lớn. Trong kỹ thuật để bảo đảm tiêu hao ít axit, ít ăn mòn thiết bị và có độ hoà tan bé sử dụng thêm HCl vào dung dịch cô đặc để đạt nồng độ axit < 20% thích hợp nhất.

- Thời gian cô đặc:

Thời gian cô đặc nồng độ theo yêu cầu kỹ thuật, phụ thuộc vào thiết bị và phương pháp cô đặc. Nếu điều kiện thủ công: cô đặc trực tiếp hoặc gián tiếp trong những thiết bị đơn giản và

là thủ công, giữ nhiệt độ cô $\leq 80^{\circ}\text{C}$ khó khăn nên mất thời gian nhiều. Nếu điều kiện công nghiệp sẽ giảm thời gian cô.

Bảng 20

Nồng độ axit HCl (%)	Độ hoà tan (g/100ml)
5,36	16,14
10,73	7,2
13,41	4,38
16,09	3,32
18,11	2,44
22,30	1,36
23,83	1,10
25,75	0,9

Cô đặc chân không, bảo đảm nhiệt độ sôi $\leq 80^{\circ}\text{C}$, trong những thiết bị truyền nhiệt gián tiếp, thiết bị cô đặc tuần hoàn ngoài hoặc tuần hoàn trong (trong thiết bị có các lớp men chịu axit và chịu nhiệt). Do cô đặc trong điều kiện chân không nên rút ngắn được thời gian cô đặc nhiều. Tùy theo điều kiện từng cơ sở trong quá trình cô đặc lấy mẫu thử khi nào đạt nồng độ theo yêu cầu trên thì kết thúc.

II.1.5. Làm lạnh - kết tinh

II.1.5.1. Mục đích

Cô đặc đến nồng độ theo yêu cầu, cho đi làm lạnh kết tinh để tách các tinh thể hydroclorua axit glutamic và các aminoaxit khác ra khỏi dung dịch (phần quá bão hoà).

II.1.5.2. Điều kiện kỹ thuật

Có nhiều phương pháp kết tinh khác nhau như: đưa dung dịch đến trạng thái quá bão hoà cho các tinh thể tách ra, hoá công: tăng nồng độ bằng giảm dung môi, tạo dung môi thích hợp làm giảm độ hoà tan, sử dụng điểm đẳng điện, hạ thấp nhiệt độ v.v... ở đây sử dụng chủ yếu hai phương pháp:

- Dùng môi trường HCl 20% giảm độ hoà tan.
- Hạ thấp nhiệt độ dung dịch để tinh thể kết tinh.

Vì vậy khống chế sự giảm nhiệt độ và độ thuần khiết của dung dịch ảnh hưởng lớn đến tinh thể kết tinh và thời gian kết tinh. Thời gian quá ngắn, nhiệt độ giảm quá nhanh, nhiều tinh thể được tạo thành nhưng tinh thể lại nhỏ, dễ tan làm giảm lượng tinh thể ảnh hưởng hao hụt trong cả quá trình phân ly và lọc nên không có lợi.

Nhiệt độ giảm từ từ có lợi cho sự tạo thành và lớn lên của tinh thể nhưng không nên chậm quá ảnh hưởng lớn đến chu kỳ kết tinh và thời gian sử dụng thiết bị.

Thường khống chế nhiệt độ giảm trong khoảng thời gian khoảng bằng 1/3 thời gian kết tinh và tùy thuộc phương pháp giảm nhiệt độ khác nhau ở bảng 21.

Bảng 21

Loại nguyên liệu	Thời gian kết tinh	Thời gian giảm nhiệt độ
Keo đậu	17 ÷ 21 ngày	7 ngày
Khô lạc	17 ÷ 21 ngày	7 ngày
Gluten bột mì	5 ÷ 7 ngày	2 ÷ 3 ngày

Quan sát một quá trình kết tinh tốt ta sẽ thấy:

- Keo protit của đậu kết tinh dính như sáp, tinh thể nhỏ, nước cái dính ướt.
- Khô lạc: kết tinh lỏng hơn, tinh thể to nhưng ít dính, nước cái ít dính.
- Gluten bột mì: kết tinh từng văng lớn, gồm những hạt tinh thể to, xốp, ban đầu nổi lên trên mặt, nước cái không dính và lỏng, dễ tách ra.

Nhìn bằng mắt thấy màu sáng và xốp, dùng cây chọc vào nghe sào sạo. Dùng tay lấy một ít lên thấy dịch lỏng chảy ra từ từ rồi xuống từng giọt là tốt, ngược lại là xấu.

Để kết tinh được tốt, sử dụng các loại thiết bị làm lạnh kết tinh khác nhau, làm lạnh trực tiếp hoặc gián tiếp (thùng kết tinh, máng kết tinh, kết tinh kiểu phun v. v..)

II.1.5.3. Cơ sở quá trình kết tinh

Ta thấy vận tốc kết tinh tăng cùng với sự tăng khả năng quá bão hoà của dung dịch, dung dịch càng không tinh khiết, độ nhớt càng tăng làm giảm tốc độ kết tinh nhiều (chú ý nguyên liệu ban đầu). Ngoài ảnh hưởng của dung dịch, pH môi trường cũng ảnh hưởng lớn đến tốc độ kết tinh.

Để tăng độ quá bão hoà của dung dịch, người ta áp dụng phương pháp hạ nhiệt, thì tốc độ làm lạnh cũng ảnh hưởng lớn đến vận tốc kết tinh, thường khi thời gian hạ từ nhiệt độ 80°C đến 40°C thì tốc độ làm lạnh khoảng 1,7 °C/ giờ, như vậy thời gian làm lạnh tất cả:

$$T = (80 - 40) / 1,7 = 23,3 \text{ giờ}$$

Tuy thời gian như vậy nhưng quá trình làm lạnh trong thời gian đầu có thể làm lạnh nhanh hơn vì khi nhiệt độ còn cao hạ xuống, vận tốc kết tinh nhanh hơn, nên trong thời gian 16 đến 18 giờ có thể làm lạnh bằng phương pháp truyền nhiệt gián tiếp.

Trọng lượng tinh thể S_{mg} tạo thành theo thời gian làm lạnh, T (phút) có thể tính theo phương trình:

$$3 \times S^{1/3} = 4,12 \cdot 10^{-6} K \times T$$

trong đó: K: tốc độ kết tinh ban đầu trong dung dịch vật chất không tinh khiết. Tùy theo loại tinh thể, có K khác nhau, tính được trọng lượng tinh thể S. Ngoài ra lượng tinh thể S có thể biết được dựa vào lượng tinh thể mì chính hoà tan trong dung dịch. Nhiều tác giả đã nghiên cứu được phương trình động học tính độ hoà tan tinh thể phụ thuộc vào nhiệt độ, được biểu diễn ở đây:

$$P = 64,3702 + 0,08437 T + 0,00155885 T^2 - 0,000006007 T^3$$

trong đó: P: hàm lượng chất hoà tan (%) và T: nhiệt độ.

Như vậy khi được dung dịch đưa đi kết tinh, chủ yếu làm thế nào để có hiệu suất kết tinh cao nhất. Lượng tinh thể kết tinh nhiều và có kích thước đạt yêu cầu. Muốn đạt được các yêu cầu của quá trình kết tinh, chúng ta phải nghiên cứu một số tính chất vật lý của dung dịch kết tinh để có biện pháp khống chế thích hợp. Những tính chất vật lý cần chú ý của dung dịch kết tinh là:

- Trọng lượng riêng của dung dịch ở nhiệt độ 185°C theo phương trình thực nghiệm

$$\gamma = 0,003038665 z + 0,0000141 z^2 + 0,0000003 z^3 \text{ g/cm}^3$$

- z: lượng mì chính hoà tan trong dung dịch %, từ đây ta biết được sự thay đổi độ nhớt của dung dịch:

$$\sigma = \gamma / g$$

trong đó: γ : trọng lượng riêng và g: gia tốc trọng trường.

Như vậy, nhiệt độ càng cao, độ hoà tan càng cao (nồng độ cao) ảnh hưởng đến sức căng bề mặt theo phương trình: $\sigma = 73 + 0,089 c \text{ (}\gamma\text{H/cm)}$

Ở đây khi tính từ nhiệt độ hoà tan (0 ÷ 100°C) độ hoà tan mì chính (tinh thể) theo nhiệt độ xác định theo phương trình:

$$Y = 64,1835 - 0,13477 x - 0,0005987 x^2$$

trong đó: Y: độ hoà tan đường tương ứng nhiệt độ và x: nhiệt độ $^{\circ}\text{C}$.

Độ hoà tan tăng lên cùng với sự tăng nhiệt độ dung dịch muốn tách các tinh thể ra, dung dịch phải đạt đến trạng thái quá bão hoà. Để xác định mức độ quá bão hoà theo công thức sau:

$$\text{- Hệ số quá bão hoà} = \frac{\text{lượng kết tinh / nước trong dung dịch quá bão hoà}}{\text{lượng kết tinh / nước trong dung dịch bão hoà}}$$

ở cùng nhiệt độ

- Mức độ quá bão hoà đo được bằng hệ số quá bão hoà: $\alpha = H/H_1$.

$\alpha > 1$ dung dịch quá bão hoà.

$\alpha = 1$ dung dịch bão hoà.

$\alpha < 1$ dung dịch chưa bão hoà.

trong đó:

α : hệ số quá bão hoà;

H: hàm lượng tinh thể trong 1 đơn vị nước của dung dịch nghiên cứu;

H₁: độ hoà tan tinh thể trong dung dịch nước bão hoà ở cùng nhiệt độ với các điều kiện cụ thể, quá trình kết tinh có thể chia ra hai giai đoạn chính:

+ sự tạo mầm tinh thể;

+ sự lớn lên của tinh thể.

Sự tạo mầm tinh thể:

Tốc độ tạo mầm tinh thể được xác định bằng lượng mầm tinh thể được tạo thành trong 1 đơn vị thời gian ở trong 1 đơn vị thể tích dung dịch.

Dung dịch hydroclorua aminoaxit hoặc glutamat natri khi cô đặc đến nồng độ nhất định, tức đưa dung dịch đến trạng thái quá bão hoà thì có sự xuất hiện các tinh thể. Những tinh thể nhỏ xuất hiện đầu tiên gọi là mầm tinh thể hay nhân tinh thể.

Trong sản xuất, để tăng tốc độ tạo mầm tinh thể, dùng các phương pháp gây nhân tinh thể sau:

- Phương pháp gây nấm tự nhiên.

- Phương pháp kích thích.

- Phương pháp tính chủng.

** Phương pháp gây nấm tự nhiên*

Dung dịch đưa vào cơ thể không nhiệt độ $\leq 80^{\circ}\text{C}$ đến trạng thái quá bão hoà, có sự xuất hiện tinh thể. Những tinh thể nhỏ xuất hiện đầu tiên: gọi là mầm tinh thể, phương pháp này đã có từ lâu và nay vẫn được ứng dụng tuy nó có nhược điểm: thời gian gây nấm dài, khó khống chế số lượng mầm nên kích thích mầm khó đạt theo ý muốn con người.

** Phương pháp gây tính kích thích*

Có nhiều phương pháp gây tính kích thích như chấn động, khuấy trộn, sóng siêu âm, hoặc 1 lượng rất ít tinh thể...

Thực tế hay dùng phương pháp kích thích như sau: cho dung dịch cơ thể đến trạng thái quá bão hoà, xong cho dung dịch hạ đến nhiệt độ thấp, khuấy trộn và cho hạt tinh thể ở ngoài vào làm cho dung dịch ở trạng thái không ổn định, chịu sự kích thích mà xuất hiện tinh thể chóng hơn. Phương pháp này rút ngắn trước thời gian tạo mầm nhưng không khống chế lượng mầm nhiều hay ít, không ổn định.

** Phương pháp tính chủng*

Dùng phần kết tinh các đợt cho vào các dung dịch cơ thể để tạo mầm nhanh và kết tinh tinh thể nhiều, lớn hơn.

Sự lớn lên của tinh thể

Sau khi tinh thể hình thành tiếp tục cho tinh thể lớn lên tốc độ lớn lên của tinh thể được biểu diễn bởi tinh thể lớn lên trong 1 đơn vị bề mặt kết tinh 1 đơn vị thời gian tốc độ lớn lên của tinh thể phụ thuộc nhiều điều kiện khác nhau: nhiệt độ, nồng độ, tính chất vật lý của dung dịch. v.v..

Tốc độ lớn lên của tinh thể phụ thuộc nhiệt độ được biểu diễn theo phương trình Arrhenius:

$$K = K_0 C^{E/RT}$$

ở đây:

K_0 - hằng số của tốc độ phản ứng ;

R - hằng số khí;

E - năng lượng hoạt tính của quá trình tạo mầm ;

T - nhiệt độ tuyệt đối.

Ngoài yếu tố nhiệt độ, tốc độ, kích thước tinh thể được tạo thành phụ thuộc các điều kiện khác biểu diễn theo phương trình Gip-gip-tioncon

$$\frac{P}{P_{i\infty}} = RT \ln(L/L_{\infty}) = 2\sigma M / (R \cdot r \cdot d \cdot T)$$

trong đó:

$P, P_{i\infty}$: áp suất hơi của dung dịch quá bão hoà và bão hoà;

L, L_{∞} : độ hoà tan các phân tử mầm tinh thể tương ứng tinh thể có bán kính r , v. v.;

σ : sức căng bề mặt ; R : hằng số khí ;

d : tỉ trọng dung dịch ; T : nhiệt độ tuyệt đối;

M : trọng lượng phân tử.

Từ đây ta có thể tính được bán kính (kích thước) mầm tinh thể tạo thành đối với các hệ không đối sau:

$$r = \frac{2\sigma M}{dRt \ln(L/L_{\infty})} = \frac{2\sigma M}{dRT \ln(P/P_{\infty})}$$

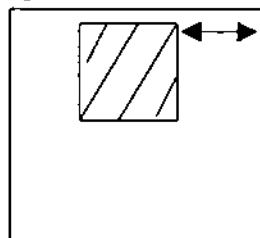
Như vậy, muốn tạo mầm tinh thể nhiều và làm cho các tinh thể đó lớn lên nhiều và nhanh ta phải chú ý đến tất cả các điều kiện $\sigma, d, t, P/P_{\infty}$ mà thực tế các yếu tố này thể hiện qua: nhiệt độ, nồng độ và các tính chất vật lý của dung dịch... Xilan đã từng nghiên cứu quá trình lớn lên của tinh thể, đó là quá trình khuếch tán phân tử.

Ở giai đoạn cô đặc, sau khi tinh thể hình thành, tinh thể bị bao quanh một lớp yên tĩnh có chiều dày d , đó là dung dịch bão hoà có nồng độ c . Vì lượng tinh thể hoà tan dư để được kết tinh trên bề mặt tinh thể. Cách giới hạn bề mặt tinh thể một khoảng d là dung dịch quá bão hoà nồng độ c . Hiệu số nồng độ $(c - c_1)$ là gradien nồng độ, là động lực khuếch tán phân tử qua khoảng cách d và kết tinh trên bề mặt tinh thể. Do đó tốc độ lớn lên của tinh thể là tốc độ khuếch tán kết tinh.

Theo định luật khuếch tán Flick, lượng chất khuếch tán s tỷ lệ với hiệu số nồng độ $(c - c_1)$, diện tích khuếch tán f , thời gian khuếch tán z và tỷ lệ nghịch với khoảng cách d .

$$S = K_1 \frac{(c - c_1) F Z}{d}$$

K_1 : hệ số khuếch tán.



Thể hiện tốc độ lớn lên của tinh thể qua tốc độ kết tinh, ở đây biểu diễn lượng chất kết tinh trong thời gian $Z = 1$ phút, diện tích kết tinh $F = 1 \text{ m}^2$. Thay vào ta có:

$$K = K_1 \frac{(c - c_1)}{d}$$

Theo Anhtanh (Einstein), hệ số khuếch tán phụ thuộc vào nhiệt độ và độ nhớt của môi trường.

$$K_1 = \frac{K_2 T}{\eta}$$

Thay vào ta có:
$$K = \frac{K_2 T(c - c_1)}{\eta d}$$

Như vậy các phương trình cho thấy tốc độ lớn lên của tinh thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố, chủ yếu quan sát quá trình: tốc độ khuếch tán phân tử từ dung dịch quá bão hoà đến giới hạn bề mặt tinh thể, tốc độ kết hợp phân tử lên bề mặt tinh thể kết tinh. Đây là giai đoạn chuyển tinh thể từ dạng hoà tan sang dạng kết tinh. Điều kiện khuấy trộn ảnh hưởng lớn đến tốc độ kết tinh. Khi tăng nhanh tốc độ khuấy trộn thì tốc độ kết tinh tăng và tiếp tục khuấy nhanh hơn thì tốc độ kết tinh cực đại và sau đó không tăng nữa. Do tác dụng khuấy trộn, lớp bao quanh tinh thể rất mỏng ($d = c$), hiện tượng khuếch tán xem như không đáng kể.

Mapk đã thực nghiệm chứng minh rằng tốc độ kết hợp phân tử trên bề mặt tinh thể tỷ lệ với $(c - c_1)^2$

$$K = K_1 (c - c_1)^2$$

Như vậy quá trình kết tinh chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố: quá bão hoà, độ nhớt, nhiệt độ, độ thuần khiết, khả năng khuấy trộn dung dịch t. Trong điều kiện nước ta do chưa có biện pháp chủ yếu khống chế các điều kiện trên nên hiện nay chủ yếu kết tinh theo dạng bột, độ thuần khiết không cao. Hướng nghiên cứu các điều kiện và yếu tố vật lý ảnh hưởng cả đến 2 quá trình: tạo mầm và lớn lên của tinh thể đạt yêu cầu thành phẩm: chủ yếu loại tinh thể.

II.1.6. Hút lọc

II.1.6.1. Mục đích

Lọc để tách tinh thể hydroclorur axit glutamic và một số aminoaxit kết tinh khác ra khỏi các chất hoà tan và tạp chất khác.

II.1.6.2. Phương pháp lọc

Có nhiều phương pháp khác nhau: lọc tự nhiên, hút lọc, lọc ép, lọc ly tâm v. v... thực tế sản xuất để đảm bảo có nhiều thiết bị đơn giản và dễ dàng, tùy thời gian lọc dài có thể dùng có thể dùng các loại hút lọc chân không trong những bể bằng đá hoa cương quét sơn chịu axit, vải lọc lụa chịu axit.

- bể dày kết tinh thường 10 ÷ 15 cm;
- độ chân không 600 ÷ 650 mmHg;
- tinh thể màu vàng.

Thời gian lọc cho mỗi loại: keo đậu: 40 ÷ 60 giờ; khô lạc: 20 ÷ 40 giờ; gluten của bột mì: 16 ÷ 20 giờ.

Để nâng cao hiệu suất lọc có thể dùng lọc ép khung bản hoặc ly tâm lọc...

II.1.7. Tẩy rửa

Sau khi hút lọc xong, còn một phần nước cái bám xung quanh tinh thể làm trở ngại cho quá trình chế tạo axit glutamic nên cần rửa sạch. Lợi dụng tính chất hoà tan của hydroclorua axit glutamic so với hydroclorua axit amin trong môi trường axit HCl đặc để rửa. Dùng HCl 31% để rửa, bảo đảm:

- hoà tan bớt các hydroclorua aminoaxit khác;
- không làm tan và làm hao hụt hydroclorua axit glutamic.

Để tẩy rửa được tốt thường rửa làm nhiều lần nhưng nếu nhiều quá thì sẽ làm mất nhiều thời gian và dễ gây tổn thất. Thực tế lượng axit HCl 31% cho vào theo tỷ lệ thích hợp và chia làm 3 lần bảo đảm yêu cầu kỹ thuật quá trình rửa đối các nguyên liệu khác nhau, lượng nước cái và tạp chất khác nhau nên lượng HCl 31% cho vào thường là:

- keo đậu: HCl 31% kết tinh tỷ lệ 1/l;
- khô lạc: HCl 31% kết tinh tỷ lệ 1/l;
- gluten mì: HCl 31% kết tinh tỷ lệ 0,5/l.

Chia rửa 3 lần:

- lần 1: 60% lượng axit cho vào;
- lần 2: 20% lượng axit cho vào;

- lần 3: 20% lượng axit cho vào.

Rửa xong, ly tâm sạch, qua các lần rửa được kết tinh có màu trắng ngà ngà, thủy phần còn lại khoảng $15 \div 20\%$ đạt yêu cầu, còn các nước cái tách ra chủ yếu là các hydroclorua aminoaxit khác, tận dụng sau sản xuất nước chấm hay các sản phẩm giàu đạm khác.

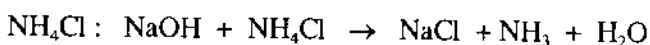
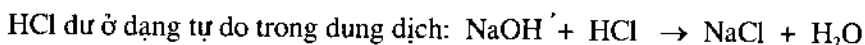
II.1.8. Trung hoà 1

II.1.8.1. Mục đích

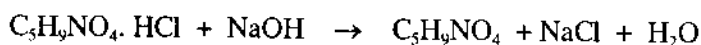
Kết tinh tách ra được qua trung hoà 1, tạo pH thích hợp để tạo thành axit glutamic kết tinh sạch tách ra khỏi các axit amin khác và các tạp chất.

II.1.8.2. Quá trình xảy ra

- Dùng NaOH hoặc Na_2CO_3 trung hoà các chất.



Hydroclorua axit glutamic và các axit amin khác:



II.1.8.3. Phương pháp trung hoà.

Để tách và tạo thành axit glutamic ra, lợi dụng điểm đẳng điện của axit glutamic khác các amin axit khác nên dùng NaOH trung hoà dung dịch đạt $\text{pH} = 2,9 \div 3,2$ thì axit glutamic đồng tự tách ra và kết tinh xuống.

Để quá trình trung hoà được tốt và axit glutamic tách ra được tinh khiết, tiến hành trung hoà làm hai lần:

- Lần 1: trung hoà đạt $\text{pH} = 1,2$ cho các aminaxit tan hết và tách khỏi các cặn bã không tan khác.
- Lần 2: trung hoà đến $\text{pH} = 2,9 \div 3,2$ để tách axit glutamic ra khỏi các aminoaxit khác.

II.1.8.4. Điều kiện kỹ thuật

- Nồng độ dung dịch sau khi trung hoà $\leq 23^\circ\text{Be}$ để dung dịch rửa không thấp quá ảnh hưởng đến quá trình chế biến sau và tổng những dụng cụ chứa đựng, đồng thời không nên lớn quá tránh NaCl bão hoà ở nồng độ $23 \div 24^\circ\text{Be}$ kết tủa theo bã tách.

- Nhiệt độ trong quá trình trung hoà $< 80^{\circ}\text{C}$, tránh mất nước của axit glutamic (chú ý phản ứng của quá trình có toả nhiệt) để nâng nhiệt độ dung dịch bảo đảm phản ứng nhanh mà không ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm, thường nâng nhiệt độ dung dịch ban đầu lên $50 \div 60^{\circ}\text{C}$.

- Nồng độ NaOH cho vào thường 30°Be .

- Thời gian trung hoà phụ thuộc phương pháp trung hoà, phải thử xem khi nào pH dung dịch đạt yêu cầu thì kết thúc quá trình.

Sau khi trung hoà xong, cho qua làm lạnh, kết tinh để các tinh thể axit glutamic tách ra, kết tinh vàng trắng, xốp, cho qua ly tâm tách hết nước cái. Nếu kết tinh chưa sạch, phải tiến hành rửa 3 + 4 lần bằng nước phun vào. Kết tủa tách ra sau khi ly tâm yêu cầu:

- thuần độ axit glutamic $\geq 80\%$;

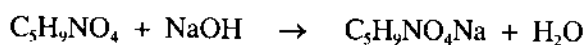
- độ ẩm $\leq 25\%$.

Phần nước cái ly tâm ra để sản xuất nước chấm.

II.1.9. Trung hoà 2 và khử tạp chất

II.1.9.1. Trung hoà 2

Dùng NaOH hoặc Na_2CO_3 để trung hoà axit glutamic tạo thành glutamat natri (mì chính).

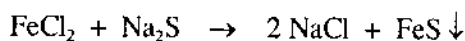


để quá trình trung hoà được tốt dùng nước nóng ở nhiệt độ $75 \div 80^{\circ}\text{C}$ để hoà tan tinh thể axit glutamic rồi trung hoà đến $\text{pH} = 7 \div 7,2$ ứng với nồng độ dung dịch $21 \div 22^{\circ}\text{Be}$. Phản ứng tốt ở nhiệt độ $\leq 80^{\circ}\text{C}$, bảo đảm phẩm chất và nồng độ NaOH $30 \div 36^{\circ}\text{Be}$ và Na_2CO_3 là $20 \div 25^{\circ}\text{Be}$.

II.1.9.2. Khử sắt

Trung hoà dung dịch đến pH và nhiệt độ trên, tiến hành khử sắt để tách hết các hợp chất sắt trong sản phẩm gây cho sản phẩm có mùi tanh và dễ bị oxy hoá thành Fe_2O_3 có màu nâu vàng.

Dùng Na_2S để khử sắt, phản ứng xảy ra:



kết tủa FeS đen được tách ra khỏi dung dịch qua lọc ly tâm. Quá trình khử sắt được tốt đạt yêu cầu:

- giữ nồng độ dung dịch $21 \div 22^\circ\text{Be}$ và nhiệt độ $65 \div 70^\circ\text{C}$;
- Na_2S được hoà tan đến nồng độ $15 \div 18^\circ\text{Be}$ thích hợp.

Để kiểm tra quá trình khử sắt tốt hay chưa, lấy mẫu dung dịch đang khử sắt, cho lọc qua giấy lọc, nhỏ thử Na_2S 10% vào dung dịch lọc, nếu dung dịch không còn kết tủa đen nữa là được, còn kết tủa FeS tiếp tục cho Na_2S vào khử tiếp. Lượng Na_2S cho vào tùy theo lượng sắt có trong nguyên liệu, hoặc trong các thiết bị bị hỏng, sắt bị hoà tan vào nên cần kiểm tra kỹ để khỏi ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm và có hại đối với cơ thể con người. Dung dịch khử sắt xong, để yên trong $2 \div 4\text{h}$ cho kết tủa lắng xuống để dung dịch lọc hết FeS .

II.1.9.3. Tẩy màu

Dung dịch sau khi khử sắt còn lẫn các hợp chất hữu cơ có màu vàng và các chất sắc tố khác hoà tan trong quá trình sản xuất tạo thành và một số tạp chất khác cần loại bỏ để thu được sản phẩm có màu trắng trong suốt và vì vậy dùng than hoạt tính để hấp thụ hết các màu và mùi đó. Nếu có điều kiện tốt nhất trung hoà làm 2 lần. Lần 1: trung hoà đến $\text{pH} = 5,6$ dung dịch có tính axit yếu thuận lợi cho tác dụng tẩy màu của than hoạt tính, đồng thời tại pH này, một số aminoaxit khác kết tủa được tách ra hết. Sau khi tẩy màu lần 1, lọc dung dịch cho trung hoà tiếp đến $\text{pH} = 7 \div 7,2$ mới cho Na_2S vào khử sắt, dung dịch còn lại tiếp tục cho than hoạt tính vào tẩy màu tiếp đến khi dung dịch có màu trắng nhạt mới thôi.

Muốn biết than hoạt tính cho vào bao nhiêu là thích hợp thì phải thử dung dịch: cho dung dịch lọc vào các ống nghiệm nếu khi dung dịch hết các chất màu thì thôi, còn các chất màu thì tiếp tục cho than hoạt tính vào.

Yêu cầu kỹ thuật khi tẩy màu:

- Nhiệt độ tẩy màu giữ khoảng: 60°C thích hợp bảo đảm phẩm chất sản phẩm và hiệu suất tẩy màu cao (do cấu tạo than hoạt tính: hình khối, dễ hấp thụ phân tử màu).
- Dung dịch ra màu trắng nhạt.
- Nồng độ dung dịch: khoảng 19°Be (nhiệt độ thường).
- pH dung dịch: $6,9 \div 7$.
- Độ nhớt thấp.

Dung dịch tẩy màu xong cho qua ép lọc, tách bã than, được dung dịch glutamat natri (mì chính) màu trắng.

II.1.10. Tinh chế

II.1.10.1. Mục đích

Giai đoạn này dung dịch glutamic natri được cô đặc bão ôn, kết tinh và phân ly tinh thể glutamat natri (tức mì chính ướt).

II.1.10.2. Cô đặc tinh chế

Dung dịch glutamat natri sau khi tẩy màu xong được đưa đi cô đặc chân không (nhiệt độ sôi bão hòa 80°C) đến trạng thái bão hòa. Để kết tinh được tốt, tiến hành cô đặc trong các thiết bị chân không, cô đặc tuần hoàn ngoài hoặc tuần hoàn trong, đạt nồng độ bão hòa ở 80°C. nồng độ glutamat natri bão hòa ở 80°C thường là 32,7°Be. nồng độ thực tế dung dịch cô đặc ở nhiệt độ khác nhau lấy ở nhiệt độ 80°C làm tiêu chuẩn tính theo:

$$d = 32,7 - 0,05 (t - 80)$$

Thực tế, thấy cứ kém 1°C nồng độ dung dịch kém 0,05°Be. nhiệt độ đo dung dịch tại điểm đang cô. Thiết bị cô phải yêu cầu sạch tuyệt đối, chế tạo bằng inox hoặc sắt tráng men để không có bất kỳ một tạp chất nào lẫn vào sản phẩm. Độ chân không trong quá trình cô khoảng 500 ÷ 550 mmHg.

II.1.11. Làm lạnh kết tinh

Dung dịch glutamat natri cô xong đạt nồng độ theo yêu cầu để quá trình làm lạnh kết tinh được cho tốt cho giảm nhiệt độ từ từ thời gian đầu: 1 giờ giảm khoảng 4,5°C dần dần tăng tốc độ giảm 1°C trong 1 giờ.

- Khi nhiệt độ giảm xuống 60 ÷ 70°C cho một ít hạt tinh thể natri glutamat khởi tinh làm tăng nhanh tốc độ kết tinh và có thể thu được kết tinh tương đối đều và tốt. Lượng tinh thể khởi tinh dùng khoảng 0,2% so với dung dịch cô đặc.

- Khuấy trộn: cần thiết khi làm lạnh kết tinh do ở nồng độ cao, tính lưu động của dịch thể giảm, kết tinh dễ bị vón lại thành cục. Khuấy trộn quá mạnh làm nát vụn tinh thể. Thường bảo đảm quá trình kết tinh tốt, cho khuấy tốc độ: 20 vg/ph, nếu mì chính có độ thuần khiết cao thiết bị làm lạnh kết tinh bảo đảm tạo tinh thể lớn thì ta được mì chính dạng tinh thể như hiện nay. Mổ số nhà máy trước đây cho mì chính dạng bột trắng có độ thuần khiết khoảng 80 %.

Quan sát quá trình kết tinh: lấy một ít kết tinh cho vào cốc thủy tinh kiểm tra, nếu hạt tinh thể quá nhiều mà hạt tinh thể to nhỏ không đều, cho ít nước sôi, nâng nhiệt độ của dung

dịch hoà tan bột tinh thể nhỏ, khi nhiệt độ dung dịch hạ xuống 50°C đủ bắt đầu kết tinh dạng sên sệt.

II.1.12. Ly tâm - rửa

Các tinh thể glutamat natri kết tinh xong, đem ly tâm vắt khô, loại bớt nước cái và chất không kết tinh khỏi tinh thể glutamat natri và tiếp tục phun nước rửa sạch các chất bám xung quanh bề mặt tinh thể. Dịch và nước rửa ly tâm ra gọi là nước thải trắng (nước cái trắng) đem tẩy màu và tinh chế lại để sản xuất mì chính. Mì chính kết tinh tách ra gọi là mì chính ẩm.

Thường dùng loại máy ly tâm với vận tốc $v = 960 \div 1500$ vg/ph.

Yêu cầu chất lượng mì chính ẩm:

- Ngoại quan: màu trắng nhạt;
- Độ ẩm: khoảng 10%;
- Độ lớn/1 mm: đại bộ phận là hạt tinh thể.

II.1.13. Sấy khô

II.1.13.1. Mục đích

Glutamat natri kết tinh sau ly tâm vẫn còn một phần nước (ngoài nước kết tinh), cần tách ra để bảo quản được lâu khỏi bị chảy nước và phân huỷ bởi vi sinh vật. Để loại phần nước ra khỏi mì chính phải tiến hành sấy khô.

II.1.13.2. Điều kiện sấy

- Nhiệt độ sấy < 80°C thường 70 - 80°C là thích hợp.
- Tiến hành sấy khô trong các thiết bị khác nhau: tủ sấy, hầm sấy, sấy thùng quay, sấy kiểu phun ... (phần hoá công) với các tác nhân sấy bằng hơi nóng hoặc bằng không khí nóng. Mì chính ẩm thường được để lên các khay bằng men, hoặc inox để tránh sự ăn mòn các thiết bị với các sản phẩm.

- Quá trình kết thúc khi mì chính chỉ còn độ ẩm khoảng 0,5 ÷ 1%.

Thường thường trong điều kiện các tủ sấy có role điều chỉnh nhiệt độ tự động thời gian sấy 45 ÷ 50 phút, còn trong điều kiện thủ công 2 ÷ 3 giờ.

II.1.14. Nghiền và rây

Sau khi sấy nếu mì chính kết tinh ở dạng bột trắng dễ bị vón cục lớn, để cho hạt mì chính được đồng nhất tiến hành nghiền và rây. Thường dùng hệ nghiền bi để nghiền mì chính, nghiền

xong cho qua hệ thống rây ống hoặc sàng thép không gỉ, có khoảng 93 lỗ/1 cm². Nghiền rây xong yêu cầu chất lượng:

- Ngoại quan: trạng thái bột hoặc tinh thể màu trắng do điều kiện kết tinh ở các nhà máy khác nhau mà có các loại khác nhau.

- Tinh thể trên 1mm, hạt đều nhau.

- Độ tinh khiết: 80 ÷ 98% tùy yêu cầu xuất xưởng từng cơ sở mà pha chế thêm 1 lượng NaCl tinh chế.

- Độ ẩm: < 1%.

- Chấm đen: mỗi gam không nhiều quá 2 điểm.

II.1.15. Đóng gói - bảo quản

Mì chính thành phẩm có tính chất dễ hút ẩm, dễ chảy rữa ra, vì vậy cần bao gói cẩn thận, tránh tiếp xúc với không khí và hơi nước. Bao gói với khối lượng 1 kg, 0,5kg, 200g, 100 g. Có hai loại bao bì thường dùng:

- loại 1kg: chai thủy tinh, hộp sắt tráng thiếc bên trong;

- loại 0,1 ÷ 0,5 kg: giấy chống ẩm, sơn vecni, túi polyetylen, lọ thủy tinh ...

Đóng gói xong, thành phẩm được bảo quản ở kho cao ráo, sạch sẽ, giữ ở kho trong khoảng 1 tháng.

Trong quá trình sản xuất mì chính thấy: gluten của bột mì dùng sản xuất tốt nhất, có tỷ lệ thu hồi cao, để không chế điều kiện kỹ thuật, chu kỳ sản xuất ngắn. Protein đậu có tỷ lệ thu hồi trung bình, chu kỳ sản xuất dài hơn, điều chỉnh kỹ thuật khó hơn. Khô lạc: tỷ lệ thu hồi thấp.

Dựa vào tỷ lệ thu hồi và chu kỳ sản xuất trong điều kiện thủ công bán cơ giới các đối nguyên liệu cho ta thấy ở bảng 22.

Bảng 22

Loại nguyên liệu	Chu kỳ sản xuất (ngày)	Tỷ lệ thu hồi nguyên liệu (%)	Tiêu hao 1 tấn mì chính
Protein đậu	40 ÷ 42	8,5%	18 tấn
Khô lạc	40 ÷ 42	6%	19 tấn
Gluten bột mì ướt	16 ÷ 18	9,1%	9 tấn

Sử dụng phế liệu

Dung dịch nước cái tách ra chủ yếu là các axit amin khác và một phần axit glutamic hoà tan. Các hợp chất hydrat cacbon trong môi trường HCl. Dùng Na_2CO_3 hoặc NaOH trung hoà hết HCl tự do, được 1 dịch đậm thuỷ phân thơm ngon, dùng làm nước chấm phục vụ nhu cầu của nhân dân rất tốt. Còn các sản phẩm khác từ nguyên liệu ban đầu như:

➤ Bột mì: phần dịch tinh bột để sản xuất đường glucoza, rượu, dấm, men và các sản phẩm thực phẩm khác.

➤ Tinh bột đậu: chủ yếu làm miến và một số mặt hàng khác.

Ưu nhược điểm chính của phương pháp muối hydro axit glutamic:

Phương pháp này được ứng dụng rộng rãi ở các nước và ở nước ta trong điều kiện cơ giới và thủ công cũng được vì điều kiện sản xuất tương đối dễ dàng, không chế và áp dụng ở những nước chưa có điều kiện kỹ thuật phát triển lắm.

Nhược điểm chính của phương pháp

- Các thiết bị luôn luôn tiếp xúc với môi trường HCl đặc nên dễ bị ăn mòn, yêu cầu chế tạo thiết bị phức tạp hơn và đắt hơn.

- Công nhân làm việc và tiếp xúc với môi trường HCl nếu bị hờ dễ gây độc hại và tai nạn lao động dễ xảy ra.

Để khắc phục nhược điểm chính trong phương pháp hoà giải nghiên cứu một số phương pháp thay thế ở Đức đang phát triển – phương pháp điểm đẳng điện.

III. PHƯƠNG PHÁP ĐIỂM ĐẲNG ĐIỆN

III.1. Nguyên lý chung

Đưa vào tính chất ở điểm đẳng điện khác nhau của các aminoaxit có điểm đồng tụ khác nhau để tách axit glutamic ra dễ dàng.

III.2. Quy trình sản xuất (sơ đồ 8)

III.2.1. Phối liệu và thủy phân

Giống như phương pháp trên.

III.2.2. Làm nguội

Hạ nhiệt độ dịch thuỷ phân từ 120°C đến 60°C nhiệt độ thích hợp cho quá trình trung hoà. Thường sau khi thuỷ phân: lợi dụng áp lực dư đẩy dung dịch vào các thiết bị làm nguội gián

tiếp (các kiểu khác nhau khi vận chuyển các đường ống đến thiết bị thường nhiệt độ giảm 120°C xuống 80°C từ thùng làm nguội theo độ cao chảy vào thùng trung hoà, tiếp tục được làm nguội đến 60°C .

Ở 60°C phản ứng trung hoà xảy ra nhanh nhưng không mạnh quá dễ bị trào ra ngoài do bọt CO_2 tạo thành quá nhiều.

III.2.3. Trung hoà 1

Trung hoà đến $\text{pH} = 5,6$ tạo ra điểm đẳng điện cho các axit amin khác kết tủa tách ra, làm tăng nồng độ axit amin trong dung dịch, đồng thời giảm bớt tính ăn mòn thiết bị ở môi trường axit sau khi thủy phân quá cao. Qua nghiên cứu thấy các axit amin khác có pI đẳng điện gần ở $\text{pH} = 5,6$ như xystein (5,07), isoloxin (5,95), loxin (5,96), metionin (5,74), serin (5,65).

III.2.4. Lọc

Sau khi trung hoà, dung dịch được lắng một thời gian $6 \div 7$ giờ rồi qua lọc bỏ bã các tạp chất và các aminaxit đông tụ ra và được dịch lọc. Quá trình lọc các thiết bị như phần trên (ít yêu cầu chống ăn mòn hơn) thường dùng bơm ly tâm chịu axit, bơm dung dịch vào máy ép khung bản bằng thép bọc vải, caosu... Quá trình lọc thường giữ nhiệt độ dung dịch $55 \div 60^{\circ}\text{C}$, áp suất: $1,5 \div 3 \text{ kg/cm}^2$. Bã lọc tháo ra có thể tận dụng lấy phần aminoaxit đông tụ hoà tan, trung hoà làm nước chấm.

III.2.5. Trung hoà 2

Mục đích tạo môi trường trung tính cho các quá trình cô đặc và chế biến sau không bị tiếp xúc với môi trường axit quá nhiều. Dùng hệ thống bơm ly tâm bơm dung dịch vào thùng trung hoà 2, mở cánh khuấy cho $\text{NaOH } 30 \div 60\%$ vào trung hoà đến $\text{pH} = 7 \div 7,2$. Trung hoà xong dùng hút chân không vào nồi cô đặc.

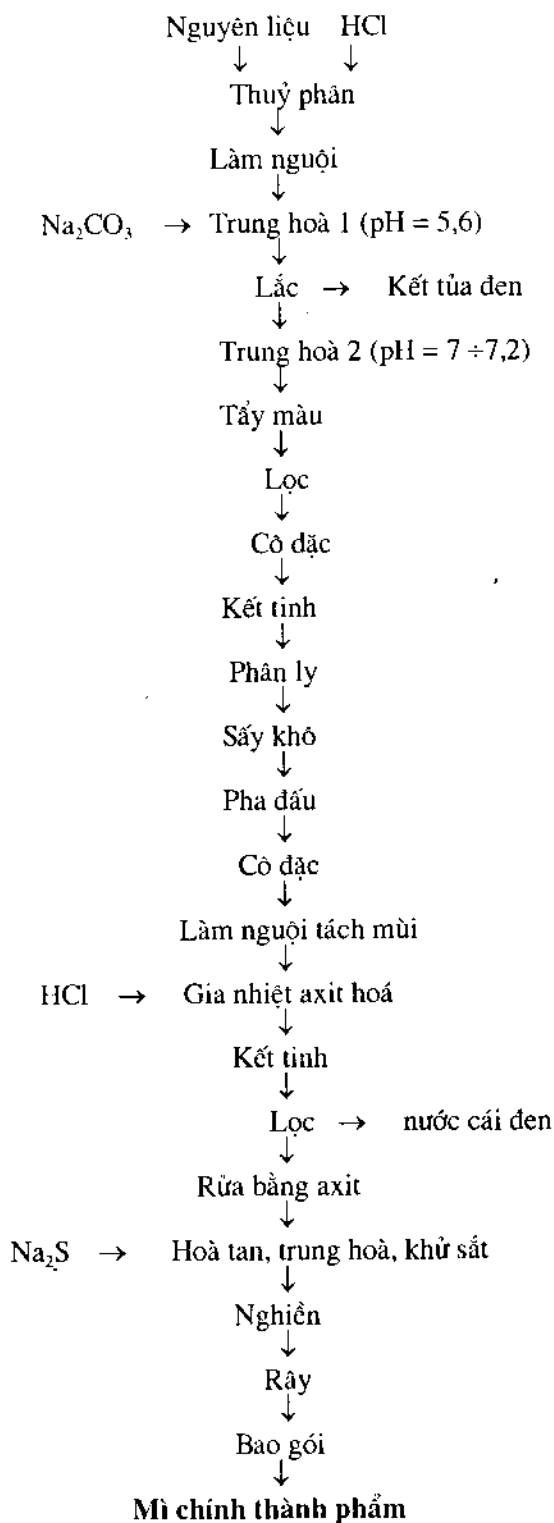
III.2.6. Cô đặc

Quá trình cô đặc giống quá trình trên nhưng thiết bị ít bị ăn mòn ở môi trường trung tính. Cô ở $p = 500 \div 550 \text{ mmHg}$, nhiệt độ $= 80^{\circ}\text{C}$, hơi đốt $= 2 \div 3 \text{ kg/cm}^2$. Thường cô đặc đạt được nồng độ cô 60% ; $d=1,27$.

III.2.7. Làm nguội

Mục đích của quá trình làm nguội là giảm độ hoà tan của NaCl , tách bỏ bớt phần muối này có trong dung dịch. Thường cho vào các thiết bị làm nguội gián tiếp để giảm nhiệt độ của dung dịch xuống 30°C là vừa.

Sơ đồ 8



III.2.8. Lọc

Lọc để tách bỏ phần muối đã kết tinh ra khỏi dung dịch. Lọc xong muối bị giữ lại trên máy lọc, cho nước nóng vào để hoà tan lượng muối đó, dung dịch chuyển vào bể trung gian đưa đi gia nhiệt axit hoá.

III.2.9. Gia nhiệt axit hoá

Đưa dung dịch vào thiết bị gia nhiệt vỏ kép có cánh khuấy để đun nóng dung dịch lên nhiệt độ khoảng 60°C thích hợp cho phản ứng giữa HCl và NaOH. Thời gian đun nóng khoảng 30 phút. Đun nóng đến nhiệt độ yêu cầu, cho HCl 31% vào axit hoá dung dịch đến $\text{pH} = 2,9 \div 3,2$, pH đẳng điện, axit glutamic kết tinh tách ra, để yên dung dịch trong 1 giờ, làm lạnh dung dịch đến nhiệt độ 30°C để kết tinh hoàn toàn trong khoảng 2 giờ. Tiếp tục cho nước muối lạnh hạ nhiệt độ dung dịch đến khoảng 10°C , giữ điều kiện này trong $20 \div 24$ giờ kết tinh tốt nhất.

III.2.10. Ép lọc

Sau khi kết tinh xong, dùng hệ thống máy nén khí ở $p = 2,5\text{kG/cm}^2$, đẩy hỗn hợp vào máy ép lọc khung bản, ép lọc hết nước cái (hoặc ly tâm lọc). Sau đó dùng nước máy, axit loãng để rửa tách hết nước cái. Kết tinh axit glutamic như phần trên. Tiếp tục các khâu sau như phương pháp muối hydroxit glutamic cho ta thành phẩm mì chính. Phương pháp này khắc phục được những nhược điểm của phương pháp muối hydric đối với việc sử dụng thiết bị và công nhân sản xuất. Tuy nó có nhược điểm tốn nhiều hoá chất hơn nhưng nó vẫn được phát triển và áp dụng dần ở các nước và cả ở nước ta nữa. Các ứng dụng trong sản xuất cũng nhiều và dễ hơn các chất chống ăn mòn và độc hại. Tuy vậy song song phương pháp hoà giải thì phương pháp sản xuất mì chính để có hiệu suất thu hồi cao, sản lượng nhiều, giá thành hạ, đang được nghiên cứu phổ biến và áp dụng ở các nước. Ngày nay là phương pháp lên men hay còn gọi là phương pháp sinh tổng hợp axit glutamic để sản xuất mì chính.

IV. PHƯƠNG PHÁP SINH TỔNG HỢP AXIT AMIN HOẶC PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN THỰC TẾ

IV.1. Tách chúng từ tự nhiên (đất, nước, không khí, thực phẩm khác) và xác định khả năng sinh tổng hợp axit amin của chúng.

Tách bằng phương pháp pha loãng đầu theo tỉ lệ 1/100 để các khuẩn lạc còn lại trong dung dịch rất ít, khi nuôi cấy thì dùng khuẩn lạc riêng lẻ, từ đây nghiên cứu chúng. Quá trình nuôi cấy sau khi pha loãng đạt yêu cầu tiến hành trên môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa. Thường sử dụng các môi trường nhiều đường, đậm vô cơ, ít đậm hữu cơ và các muối khoáng khác.

Để phân lập và nuôi cấy cơ thể sử dụng các môi trường sau:

Môi trường 1: Tính ra theo %

Glucoza:	2	MgSO ₄ .6H ₂ O:	0,05
Ure:	0,8	FeSO ₄ :	0,01
NH ₄ Cl:	1	Cao thịt:	0,2
KH ₂ PO ₄ :	0,05	Thạch:	2
K ₂ HPO ₄ :	0,05	pH	7 ÷ 7,2

Môi trường 2: Tính ra theo %

Glucoza:	2	MgSO ₄ 7H ₂ O:	0,05
NH ₄ Cl:	0,3	CaCO ₃ :	0,2
KH ₂ PO ₄ :	0,1	Thạch:	2

Môi trường 3: Tính ra theo %

Glucoza:	2	Cao nấm men:	0,2
Pepton:	1	FeSO ₄ :	0,25
Cao thịt:	0,5	Thạch:	2
		pH	7
Glucoza:	2	Dịch thủy phân casein:	0,02

Môi trường 4: Tính ra theo %

IV.2. Định tính và định lượng tạo thành

Dùng các phương pháp khác nhau để xác định số lượng các axit amin tạo thành

IV.2.1. Phương pháp vi sinh vật

Tuyển chọn xong cho lên men trên môi trường thích hợp (lồng).

IV.2.2. Dùng khoan giấy nhỏ

Dung dịch sau khi cấy khuẩn lạc vào nuôi cấy một thời gian, đun nóng và giết các tế bào. Cắt khoan giấy lọc nhỏ $d = 5$ mm nhúng vào dung dịch để thấm ướt axit amin tạo thành, sau đó đặt khoan giấy lên hộp petri có cấy vi sinh vật chỉ thị (chỉ phát triển khi có mặt một loại axit amin nào đấy), cường độ phát triển phụ thuộc đặc tính và hàm lượng axit amin đó từ đấy ta xác định được đó là loại axit amin gì được tạo thành.

IV.2.3. Phương pháp đo độ đục

Giữ vì sinh vật phát triển được làm đục môi trường chỉ thị qua đó vẽ đồ thị giữa độ đục và hàm lượng axit amin xác định được.

IV.2.4. Dùng phương pháp sắc ký lỏng hoặc điện di

Điện thế 1 chiều thường 200 ÷ 1000V đủ để tách axit amin để chọn giống bước 1 người ta dùng phương pháp lên men trong ống nghiệm (18 × 1,8 cm) để nghiêng cấu 35°÷45° trong máy lắc dùng 10 ml môi trường. Cho lên men ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ, thường xuyên lắc với tốc độ: 95 ÷ 100 vg/ ph.

IV.2.4.1. Chọn chủng bước 1

Có thể dùng các môi trường:

Môi trường 1: Tính ra theo %

Glucoza:	0,5	MgSO ₄ .6H ₂ O:	0,05
Ure:	0,8 ÷ 2	FeSO ₄ :	0,01
NH ₄ Cl:	1,0	Nước chiết cám:	7 ÷ 8
KH ₂ PO ₄ :	0,1	pH	7 ÷ 7,2

Môi trường 2: Tính ra theo %

Glucoza:	5	KH ₂ PO ₄ :	0,01 ÷ 0,05
Ure:	0,8	MgSO ₄ :	0,02 ÷ 0,05
Cao thịt:	0,2	pH	7,2
Pepton:	0,05		

Môi trường 3: Tính ra theo %

Glucoza:	5	KH ₂ PO ₄ :	0,05 ÷ 0,1
Ure:	0,8	MgSO ₄ :	0,02 ÷ 0,05
Cao thịt:	0,2	pH	7,2
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	0,2		
Pepton:	0,05		

Môi trường 4: Tính ra theo %

Glucoza:	5	KH ₂ PO ₄ :	0,05 ÷ 0,1
Ure:	0,8	MgSO ₄ :	0,02 ÷ 0,05
Cao thịt:	0,2	pH	7,2

Như vậy khi chọn giống bước 1 thường dùng các môi trường có hàm lượng đường glucoza 0,5% nguồn nitơ là muối amoni hoặc nitơ hữu cơ...

Sau khi lên men tiến hành định lượng theo các phương pháp trên nhưng chủ yếu là phương pháp sắc ký hay điện di và giữ lại tất các chủng có hàm lượng axit glutamic $\geq 2,5\text{mg/ml}$.

IV.2.4.2. Chọn chủng bước 2

Thường sử dụng các môi trường có hàm lượng đường 10%, nguồn nitơ hữu cơ thường dùng là: khô lạc hay khô đậu tương, khống chế lượng N tổng số $1,9 \div 2\%$ có thể dùng nước chiết cám. Nguồn N vô cơ, ure hay amoni.

Các loại muối khoáng tương tự chọn chủng bước 1. Có thể chọn chủng bước 2 dùng môi trường như môi trường lên men công nghiệp. Cố gắng giữ và chọn các loài có khả năng tạo lượng axit glutamic từ 30 mg/ml trở lên.

Có thể chọn giống bước 3 bước 4 để chọn được những nòi cho hiệu suất lên men cao nhất.

IV.3. Kết quả nghiên cứu trên thế giới

Qua nghiên cứu cho thấy các chủng vi sinh vật tách ra từ tự nhiên có khả năng sinh tổng hợp axit glutamic cao có thể chia hai nhóm chính theo Kinoshita và Tanaka (1972):

- a. Loại vi khuẩn có khả năng tạo bào tử.
- b. Loại vi khuẩn không có khả năng tạo bào tử.

Nhóm thứ nhất chỉ có các vi khuẩn thuộc loài *Bacillus*, trong đó ở nhóm thứ hai thuộc các loài: *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* và *Microbacterium*.

Trong công nghiệp quan trọng nhất là các vi khuẩn quan trọng thuộc nhóm thứ hai có khả năng tạo ra axit glutamic từ 30 ÷ 50 g/l axit glutamic từ 100g glucoza. Các loại vi khuẩn này có đặc điểm sau:

- Vi khuẩn gram dương.
- Các vi khuẩn không có khả năng tạo bào tử.
- Các vi khuẩn không chuyển động.
- Các vi khuẩn có tế bào hình que hay hình cầu.
- Có khả năng oxy hoá axit glutamic ra ketoglutarat thấp nhất.
- Có hoạt tính gluco hydrogenaza cao.
- Các vi khuẩn phát triển trên môi trường cần biotin.

Qua nghiên cứu thấy rõ tất cả các vi khuẩn hay vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp axit glutamic đều cần biotin trong môi trường để phát triển. Kanzaki và các cộng sự (1969) đã nghiên cứu khả năng thay biotin bằng axit oleic hoặc bằng axit béo bão hoà.

Bảng 23. Những loại vi khuẩn có khả năng và có triển vọng sản xuất ra axit glutamic

Loài	Chủng
1) <i>Corynebacterium</i>	<i>Coryn. Glutamicum</i> ; <i>Coryn. Lilium</i> ; <i>Coryn. Celunac</i> ; <i>Coryn. Hercules</i>
2) <i>Microbacterium</i>	<i>M.. Salicinovolum</i> ; <i>M.. Flavus var glutamicum</i> ; <i>M. Ammonisphilum</i>
3) <i>Arthrobacter</i>	<i>A. globifortamic</i> ; <i>A. aminofosciens</i>
4) <i>Brevibacterium</i>	<i>Brev. clivaricatum</i> ; <i>Brev. aminogenos</i> ; <i>Brev. flavum</i> ; <i>Brev. lactofermentum</i> ; <i>Brev. saccharoralyticum</i> ; <i>Brev. ammoniagenes</i> ; <i>Brev. alanicum</i> ; <i>Brev. thiogenitalis</i>

Trong nhiều loại vi sinh vật đó có khả năng sinh tổng hợp axit glutamic cao chủ yếu là loại *Corynebacterium* được lập ra từ nhóm Kinoshita năm 1957.

Hiệu suất tổng hợp axit glutamic của một số loài vi sinh vật được ghi rõ trong bảng 24.

Kết quả ngày nay, thế giới hiện đại nghiên cứu tìm được các loài vi sinh vật có khả năng tổng hợp axit amin cao, ngoài ra còn có các loài vi sinh vật khác có khả năng sinh tổng hợp axit glutamic như: *Ercherichia coli*, *Bacillus megeterium*, *Sarsina lutes*, *Streptomyces sp*; *Aspergillus oryzae*, *Pennicillium chrsegenum* và *Rhodotorula glutinil* (được mô tả theo Kinoshita và cộng sự năm 1958), 6 chủng vi khuẩn *Streptomyces* (*S. semilatus*, *S. aureofasciens*, *S. griscus*, *S. olivaceul* và *S. rimetus*), theo Brien (1958), 3 chủng *Cephalosporium* theo Kitem(1957).

Các chủng *Bacillus circulans* và *Bacillus lentus*, theo Tanaka (1960), có thể phát triển cho hiệu suất axit glutamic cao trong môi trường không cần biotin và tạo ra 10-15 g/l axit glutamic trong môi trường. Năm 1971, Nand và cộng sự đã tách được một số chủng từ đất, nước thải, rau quả, thịt, cá có khả năng tạo ra một lượng lớn axit glutamic, alanin và prolin thuộc loài *Bacillus*, *Rhodotorula* và *Streptomyces*.

Nói chung, các chủng vi sinh vật có khả năng phát triển và tích lũy lượng axit glutamic trong môi trường lên men từ 20 ÷ 40 g/l thì có thể đưa vào sản xuất công nghiệp được.

Bảng 24. Hiệu suất tổng hợp axit amin glutamic của một số loài vi sinh vật

Vi sinh vật	Hiệu suất chuyển hoá (%)	Hàm lượng A. glutamic (mg/ml)	Tài liệu công bố
<i>Cephalosporium</i>		1,5	U. Spat. 2,481,522 1957
<i>A. sremnomen</i>		3,5	
<i>Penecillium Julthinellum</i>		9,6	Nhật Bản chuyên san 347/1961
<i>A. stinomyces A</i>	37 ÷ 40		Công học tạp chí TV/ 100b 38,288/60
<i>Micrococus glutamicus</i>	30	33	Nhật Bản chuyên san 8,698 6, 499/60
<i>Micrococus lysodrikty-Cub</i>		32	
<i>Micrococus và vians</i>	28	16,8	Hiệp hội chỉ 15,731/77
<i>Bac.megatheriemvar-N1066</i>	30	-	Nhật Bản chuyên san 10/69
<i>Bac. Corolens</i>	-	20,5	2,8977/60
<i>Bac. gigan fens</i>	301,4	-	-nt- 12,643 / 60
<i>Micro bact Salicinoim</i>	40	-	Nhật Bản Nông hoá 34/8630
<i>Brevibact aminogencs</i>	43	-	Công học tạp chí 37,261/89
<i>Brevibact- divaricatum</i>	45	45 ÷ 60	Báo cảnh 24,1/69
<i>Brevibact- divaricatum NRRLB</i>	231,3	26,2	Nôpat -2, 978, 384
<i>Prebret: lastopetamen</i>	49,7	45,3	Brutihpat - CN 55/61
<i>Erevibacerium - N-1942</i>		35 ÷ 38	Công học tạp chí 37 295/59
<i>Brevibactertimen saccaroly - ticum N 1288</i>		80,9	26,946/63 Nhật Bản chuyên san
<i>Brevibacterium rotmin</i>	55-60	52,8	Nhật Bản chuyên san
<i>N - 425 - 40</i>	25-88	10 ÷ 80	- 6,889/63
<i>Brevibacterium favum</i>		40	Tài liệu trao đổi Xí nghiệp Mĩ chính Thượng Hải, Thẩm Dương (ép 1966)

Trong thời gian hiện nay, người ta còn nghiên cứu phát hiện ra hàng loạt các chủng gây đột biến có khả năng tạo ra một lượng axit glutamic cao từ các cơ chất khác nhau, chủ yếu từ n-parafin và axetic.

Naka và cộng sự (1972) thu được chủng đột biến *Corynebacterium alkanolyticum* 314, nó cần thiết glycerin cho quá trình phát triển tạo ra 40mg/ml axit glutamic từ n-parafin và 0,01% glycerin trong môi trường. Chủng này năm 1972 được Kikuchi và cộng sự nghiên cứu trong điều kiện bán sản xuất đã đạt được 74g/l axit glutamic trong môi trường có nồng độ biotin cao và axit oleic.

Kanzani và cộng sự (1967) gây đột biến bằng tia tử ngoại được chủng *Brevibacterium thioigenitalis* D-248 trên môi trường axit oleic nồng độ 100µg/l biotin.

Người ta tiếp tục nghiên cứu những chủng đột biến khác nhau và chia ra làm ba nhóm chính là:

- Nhóm các chủng bền vững đối với các chất kháng sinh.
- Nhóm các chủng bền vững đối với nồng độ của sản phẩm cuối (ở đây là nồng độ axit glutamic).
- Nhóm các chủng bền vững đối với fage.

Hirose và cộng sự (1967) đã tạo ra chủng đột biến *Brevibacterium lastofumentum* bền vững với môi trường có nồng độ *Streptomyces* 100 µg/ml.

Năm 1971, Kobayashi và cộng sự tạo ra được chủng *Corynebacterium hydrocarboelastus Rhodotorula-7* có khả năng tạo ra axit glutamic cao ở nồng độ penicilin cao.

Ngoài ra một số chủng *Micrococcus glutamicus* ATCC-13032 (ký hiệu hiện nay là *Corynebacterium glutamicum*) khi nuôi cấy trên môi trường rượu etylic. Chủng này có khả năng phát triển trên môi trường có nồng độ axit glutamic cao. Ngoài ra chủng *Corynebacterium glutamicum* 490 theo phát minh của Liên Xô (cũ) SU 328164 có thể phát triển trên môi trường có nồng độ biotin cao. Ngoài ra còn có một số chủng động *Microbacterium ammonisphillum* và *thioigenitalis* cũng có tính chất như trên.

Cuối cùng là các nhóm vi khuẩn bền vững pha. Nghiên cứu các quá trình lên men trong các môi trường nhạy cảm với pha còn ít nhưng chủ yếu nghiên cứu những chủng bền vững đối với một loại hay một số loại pha.

Hiện nay, các nhà máy mì chính lên men của Việt Nam sử dụng chủ yếu các chủng vi khuẩn từ một nguồn gốc xa nhau nhưng nói chung chúng thuộc cùng một giống

Corynebacterium và ký hiệu thông dụng là 1, 2 hay A và B. Ngoài ra còn sử dụng thông dụng chủng *Micrococcus glutamicus*.

Sau khi tìm ra một số chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp axit glutamic cao, ta phải nghiên cứu các điều kiện cần thiết để nuôi cấy chúng đó để cho hiệu suất thu hồi axit glutamic cao nhất.

IV.4. Nghiên cứu sinh lý các chủng hoạt động

Thành phần môi trường và điều kiện kỹ thuật khi nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến quá trình tích lũy axit glutamic. Ở đây, ta tiến hành nghiên cứu các chủng *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* trên môi trường chủ yếu sau đây:

Glucoza	10%	MgSO ₄	0,02
K ₂ HPO ₄	0,03	NaCl	0,01
KH ₂ PO ₄	0,02	CaCl ₂	0,01

Quá trình nuôi cấy tiến hành trong bình thể tích 250ml (25ml chất đối tượng), trên máy lắc 200 vg/ph, nhiệt độ 28°C trong 10 ngày đêm. Môi trường dinh dưỡng được phân tích qua 3, 6, 10 ngày nuôi cấy với các nguồn chất khác nhau. Thành phần aminoaxit xác định bằng phương pháp sắc ký trên giấy trên dung môi hệ: H. butanol : axit axetic : nước = 4 : 1 : 5, số lượng axit amin tính theo đồ thị tiêu chuẩn các aminoaxit tinh khiết.

IV.4.1. Nguồn cacbon

Nồng độ nguồn C là 10% so thể tích. Qua bảng 25 ta thấy nguồn C tốt nhất: glucoza đến glycerin, manit đạt cực đại sau 6 ngày nuôi cấy. Thực tế thường sử dụng dịch thủy phân tinh bột (bằng KOH, enzym...) cho dịch đường glucoza ứng dụng sản xuất.

Ngoài sử dụng 1 nguồn C ra, người ta còn có thể sử dụng một lúc 2 nguồn C gồm những nguồn cho hiệu suất lên men cao (bảng 26).

Chọn được 3 nguồn chính: glucoza, manit, glycerin, tiến hành xem trong quá trình lên men. Ứng với nồng độ bao nhiêu thích hợp nhất cho quá trình tích lũy axit glutamic (bảng 27).

Qua quá trình nghiên cứu trên ta thấy: Với cả 3 chất, nồng độ C thích hợp nhất là 10%. Với hàm lượng lớn hơn, không những hao tổn lượng hợp chất C mà còn làm hiệu suất lên men giảm đi nhiều. Nguồn C sử dụng chủ yếu hiện nay: glucoza, dịch thủy phân tinh bột với nồng độ khoảng 10%. Các nguồn đường thích hợp cho sản xuất axit glutamic là glucoza, sacaroza, fructoza, maltoza, riboza và xitoza, các dịch thủy phân của các polysacarit khác nhau hoặc rỉ đường mía, rỉ đường củ cải.

Bảng 25. Sự tạo thành axit L -glutamic phụ thuộc nguồn C khác nhau (mg/ml)

Nguồn cacbon	Thời gian nuôi cấy (giờ)		
	72	144	240
Glucoza	3,2	3,8	2,7
Frutoza	1,5	1,7	1,3
Sacaroza	1,4	1,6	1,0
Lactoza	2,3	2,6	1,4
Galactoza	0,3	1,4	1,2
Arabinoza		0,3	0,4
Maltoza	1,4	1,2	1,0
Mannit	2,7	6,3	0,2
Glyxerin	6,0	7,0	11,0
Tinh bột hoà tan	0,0	0,8	0,7
Dunxit	0,0	0,0	0,0
Inozit	0,0	0,0	0,0
Sacbit	0,0	0,0	0,0
Rafinoza	0,0	0,0	0,0

Bảng 26. Tạo thành axit glutamic trên một môi trường chứa 2 nguồn cacbon mg/ml

Nguồn cacbon	Nồng độ (%)	Thời gian nuôi cấy (giờ)		
		72	144	240
Glucoza và glyxerin	5 và 5	0,5	3,4	5,2
Mannit và glyxerin	5 và 5	3,1	4,8	7
Mannit và glucoza	5,5	2,2	3,0	2,7

Bảng 27

Nồng độ nguồn C (%)		Thời gian nuôi cấy (giờ)	
		72	144
Glucosa:	8	3	3
	10	3,2	3,8
	12	3	3,5
	15	1,1	3,4
	20		1,5
Manit	5	1,5	5,1
	8	2,0	5,3
	10	2,7	6,3
	12	2,2	6,1
	15	0,9	5,9
	20	0,1	1,2
Glycerin (%)	Thời gian nuôi cấy (giờ)		
	72	144	240
1	2,4	3,8	3,1
3	5,1	5,6	7,4
5	5,0	6,8	9,3
8	5,2	6,8	9,7
10	6,0	7,0	11
12	6,0	6,9	7,0
15	4,1	5,1	7,1
18	4,1	5,3	5,1
20		1,0	1,5

IV.4.2. Nguồn nitrogen

Có nhiều hợp chất N vô cơ ứng dụng vào sản xuất nhưng cũng có những loại cho hiệu suất lên men cao nhất. Nghiên cứu các hợp chất N với hiệu suất lên men cho thấy ở bảng 27.

Qua nghiên cứu ta thấy: nguồn N có ảnh hưởng lớn đến quá trình lên men. Trong sản xuất ứng dụng nguồn N nhiều nhất là ure (cao hơn cả) ngoài ra còn dùng axetat amon, oxalat amon, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$.

Bảng 28. Tạo thành L - axit glutamic phụ thuộc nguồn N (mg/ml)

Nguồn nitơ	Thời gian nuôi cấy (giờ)		
	72	144	240
NH_4OH	1,0	1,2	1,8
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,8	0,2	-
$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	1,6	1,4	1,1
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	1,5	1,8	1,6
Citrat amoni	4,3	5,3	5,3
Axetat amoni	4,2	3,5	3,1
Tactrat amoni	2,7	3,4	3
Oxalat amoni	6,0	0,5	-
Ure	0,6	7,0	11,0
NH_4NO_3		0,7	0,6

Ngoài ứng dụng một nguồn N, có thể ứng dụng 2 nguồn N để nâng cao hiệu suất sử dụng các nguồn khác nhau cho hiệu suất lên men cao qua nghiên cứu ta thấy:

Bảng 29. Sự tạo thành axit L-glutamic trên môi trường chứa 2 nguồn N (mg/ml)

Nguồn N 1/1	Thời gian nuôi cấy (h)		
	72	144	240
Ure axetat amonium	4,8	5,3	4,1
Ure citrat amonium	3,8	5,3	4,7
Ure $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	1,5	4,1	3,8
Ure NH_4Cl	2,1	3,5	3,7

Nguồn N ứng dụng chủ yếu là ure. Vậy yêu cầu nồng độ ure cho vào thích hợp bảo đảm hiệu suất lên men cao nhất ở bảng 30.

Nồng độ ure thích hợp cho quá trình lên men là $1 \div 3\%$.

Bảng 30

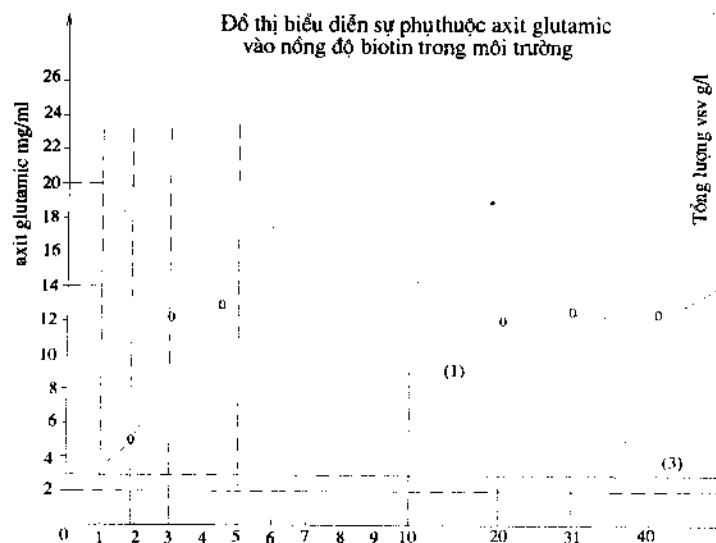
Nồng độ ure (%)	Thời gian nuôi cấy tạo axit glutamic (mg/ml)		
	72 giờ	144 giờ	240 giờ
0,5	1,0	1,6	2,4
0,8	3,7	5,5	7,7
1,0	6,0	7,0	11,0
1,3	5,9	-	-
1,5	6,9	8,2	12,8
1,8	6,0	9,6	13,0
2,0	6,2	9,8	13,6
2,5	6,8	7,4	14,0
2,8	-	7,3	14,5
3,0	6,0	7,3	14,1
3,2	6,8		
7,5	4,7	7,8	6,5
3,8	-	7,0	3,1

IV.4.3. Các chất sinh trưởng

Đặc biệt chú ý biotin (sinh tố H) có ý nghĩa rất lớn trong việc tạo thành axit glutamic. Lượng biotin nhiều quá sẽ tạo ra một lượng lớn vi sinh vật chứ không có tác dụng làm tích lũy nhiều axit glutamic. Bảng 30 nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ biotin đến quá trình tạo axit glutamic.

Nghiên cứu trong điều kiện nuôi cấy *Brevibacterium* SP₃₇ trên môi trường nguồn ure (2%) glycerin (10%) cho biotin với lượng khác nhau, nuôi trên máy lắc (220 vg/ph), hiếu khí và các lượng dung dịch: (10; 15; 50ml). Lên men 10 ngày, xác định qua các thời điểm trên có ảnh hưởng biotin đến quá trình tổng hợp axit 1- glutamic ở bảng 30.

Qua trên ta thấy được biotin cho vào thích hợp là 2 + 5 µg/l sau 10 ngày đêm nuôi cấy tạo ra lượng axit glutamic cực đại (20,5 mg/ml). Biểu diễn trên đồ thị sự phụ thuộc đó.



(1) Axit glutamic.

(2) Tổng lượng vi sinh vật .

(3) Kiểm tra vi sinh vật .

Có thể thay biotin tinh khiết bằng cao ngô, rỉ đường mía (nhiều biotin).

Bảng 31

Biotin (μg/l)	Aminoaxit tạo thành trong dung dịch lên men (mg/ml)			
	Axit L- glutamic			Tổng lượng vi sinh vật (g/l)
	3 ngày đêm	6 ngày đêm	10 ngày đêm	
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Kiểm tra không có biotin	6,2	9,8	13,6	1,504
1	6,5	11,6	13,8	1,568
2	10,8	15,3	20,3	2,680
3	12,0	17,5	20,4	6,004
4	11,5	17,6	20,5	6,440
5	10,1	17,4	20,3	6,520
6	6,6	13,2	17,2	6,080
7	6,4	13,0	14,6	6,456
8	6,4	10,0	10,1	6,560
9	6,2	8,3	9,4	6,864
10	4,0	7,0	7,9	6,880
15	4,0	5,6	6,6	7,000
20	3,2	3,4	4,2	7,240

Bảng 31 (tiếp theo)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
25	3,0	3,4	3,5	7,240
30	2,8	3,0	3,5	7,36
35	2,0	2,4	3,3	7,68
40	0,7	1,0	3,0	7,68
45			3,3	7,842
50			2,2	7,888

IV.4.4. Các muối khoáng

Thường hay sử dụng và thích hợp các muối K, photphat, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, ... rất cần thiết, tùy hàm lượng ít và tùy các loại môi trường khác nhau mà ứng dụng các muối khoáng cho thích hợp quá trình lên men (tùy môi trường) bằng 30 chỉ rõ.

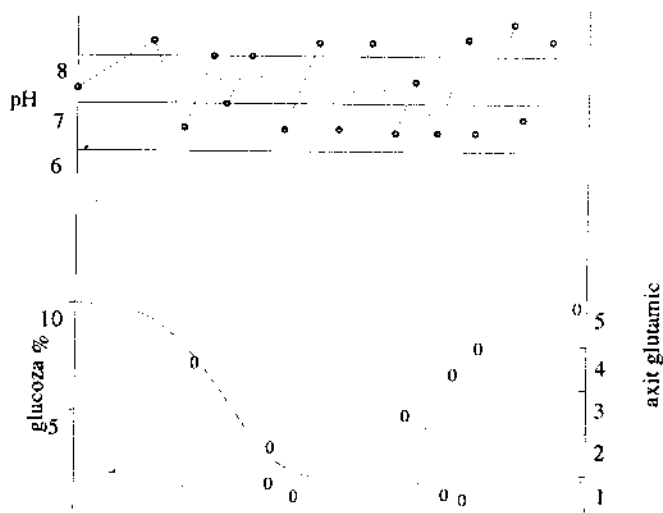
IV.4.5. Nhiệt độ nuôi cấy:

Có thể nuôi cấy ở nhiệt độ trong khoảng $20 + 40^\circ C$ thích hợp nhất $28 + 30^\circ C$.

IV.4.6. pH môi trường

pH đóng vai trò quan trọng trong quá trình lên men thích hợp hiệu ứng pH trung tính hoặc kiềm yếu - pH = 7 + 8,2. Để bảo đảm pH trong suốt quá trình lên men ít thay đổi duy trì pH thích hợp, thực hiện bằng cách bổ sung nguồn ure vào làm nhiều lần.

Nghiên cứu trạng thái tích lũy axit glutamic ở thùng lên men 5000 l ta vẽ được đồ thị biểu diễn ảnh hưởng các chất khoáng và nồng độ thích hợp cho quá trình tích lũy axit glutamic.



Ở đây nồng độ K_2HPO_4 trong môi trường có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sản xuất axit glutamic. Lượng này thích hợp trong môi trường là 0,2%.

Nồng độ ion K^+ thích hợp cho quá trình tạo axit glutamic là 0,01% K^+ và cho quá trình tới trong khoảng là 0,02 ÷ 0,1%.

Bảng 32. Nồng độ các muối vô cơ thích hợp cho quá trình sản xuất axit glutamic (theo bảng phát minh của Nhật Bản số 35-15848)

Các muối	Nồng độ (%)
KH_2PO_4	0,05 ÷ 0,2
K_2HPO_4	0,05 ÷ 0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,025 ÷ 0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0005 ÷ 0,1
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0005 ÷ 0,005
K_2SO_4	0,01 ÷ 0,3
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,0005 ÷ 0,001
$CaCO_3$	0,5 ÷ 4,0

Trong sản xuất axit glutamic người ta hay đưa vào những nguyên tố vô cơ như trên và các dạng như S ở dạng SO_4^{2-} , K^+ , Mn^{+2} , PO_4^{3-} , Mn^{+2} , Fe^{+2} và tác dụng chủ yếu của nó như:

- Lưu huỳnh là nguyên tố cần thiết để tổng hợp nên các axitamin chứa S để tổng hợp nên photit của nguyên sinh chất. Ngoài ra nó còn tổng hợp nên KoA là loại cofecmen hoạt hoá axit axetic.

- Photpho: Là nguyên tố quan trọng tham gia vào tổng hợp ATP, là chất tham gia vào quá trình phân giải đường theo các chu trình Embden Mayerhof hay hexo monophotphat.

- Và các men cofecmen thiaminpiro photphat, cofecmen A và nhiều men khác. Nó tham gia vào thành phần của ADN, ARN, nucleoprotit. Nồng độ P thích hợp là 0,1 ÷ 0,18%.

- Magie: Là nguồn tham gia vào hệ hoạt hoá nhiều men của sơ đồ Embden Mayerhof và chu trình Krebs. Người ta không thấy trường hợp nào Mg^{2+} là chất kìm hãm. Hàm lượng $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp dao động trong khoảng 0,045 ÷ 0,075%.

- Sắt có ảnh hưởng đến quá trình lên men là Fe^{2+} , nó có tác dụng hoạt hoá nhiều men của chu trình Krebs. Thiếu Fe sẽ làm giảm hoạt tính của men ciconitaza và izocitrat dehydrogenaza, điều đó dẫn đến giảm sự tích tụ axit glutamic, nồng độ tối thích là 0,25% (2 v/l).

- Mangan: Thường Mn^{2+} làm xúc tác cho phản ứng men photphatglicerokinaza, thiếu Mn^{2+} men decarboxylaza của axit oxalosuccinic sẽ bị kìm hãm, nồng độ tối thích là 0,25%.

- Kẽm: ở dạng ion hoá trị 2 nói chung nhiều tài liệu nghiên cứu và thực nghiệm cho thấy Zn^{2+} tham gia vào thành phần của men glutamat dehydrogenaza. Thiếu Zn^{2+} có thể hạn chế sự chuyển hoá axit pyruvic thành axit limonic và cả sự chuyển hoá axit limonic qua α -ceto glutaric để tạo thành axit glutmic.

IV.4.7. Ảnh hưởng của penicilin và các chất tương tự

Penicillin đóng vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất axit glutamic. Sau một số giờ nuôi cấy hay lên men, người ta thêm một lượng nhỏ penicilin vào môi trường nuôi cấy giàu biotin làm thế nào lượng penicilin trong môi trường nuôi cấy khoảng một số đơn vị trên 1 lít. Thêm lượng penicilin mục đích chính để điều chỉnh sự phát triển của vi khuẩn tạo sinh khối và đạt đến một mức nhất định trong môi trường lên men để tạo ra axit glutamic.

Những kết quả thu được theo một số phát minh và của một số tác giả khác nhau thu được ở bảng 33.

Ngoài penicillin ra, người ta còn nghiên cứu sử dụng các chất kháng sinh khác nữa như: cephalosporin C, oxamycin, novobiocin, tetracylin, bacitracin, cloramfenicol, streptomycin và dextromycin.

Bảng 33. Sự thay đổi tỷ lệ axit glutamic được tạo thành và axit glutamic trong tế bào khi không sử dụng penicillin và khi có sử dụng penicillin. (Theo bảng phát minh của Mỹ số 30-80279)

Không dùng penicillin					
Thời gian nuôi cấy (giờ)	Lượng chất khô (mg)	pH	Lượng axit glutamic bên trong tế bào ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Lượng axit glutamic tạo ra ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Tỷ lệ axit glutamic tạo thành so với axit glutamic bên trong tế bào
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
8	0,44	8,1	17,2	40	5,3
10	1,32	8,1	21,4	58	2,06
12	1,77	8,1	23,4	69	1,66
14	7,79	7,6	25,9	91	0,44

Bảng 33 (tiếp theo)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
16	10,3	6,7	29,6	129	0,39
18	9,82	5,7	27,2	237	0,89
20	5,92	5,3	8,5	194	3,86
22	10,9	5,2	12,5	333	2,46
Thêm penicillin sau 12 giờ lên men					
8	0,75	8,35	20,0	35	1,67
10	2,22	8,25	30,0	35	0,52
12	3,68	8,15	34,0	73	0,58
14	2,96	7,8	6,2	641	36,00
16	2,54	8,00	2,7	1580	220,00
18	2,81	7,4	3,8	3110	280,00
20	2,17	7,65	6,2	3680	280,00
22	2,22	7,5	6,1	4790	340,00
24	2,62	6,0	10,0	6970	270,00

IV.4.8. Lượng oxy hoà tan

Nếu lượng oxy hoà tan quá lớn làm giảm quá trình phát triển tạo thành sinh khối của vi khuẩn, giảm yêu cầu sử dụng đường và kết quả làm giảm quá trình tạo axit glutamic. Yêu cầu lượng oxy và các giá trị của nó dưới mức tiêu chuẩn của quá trình hô hấp và phụ thuộc các pha phát triển. Thêm oxy chủ yếu ở pha phát triển mạnh của vi khuẩn và tạo điều kiện cho sự tạo thành axit glutamic ở mức cao nhất mà không có tác dụng ức chế.

Lượng oxy hoà tan trong môi trường lại rất nhỏ, bên cạnh đó tế bào lại sử dụng làm cho nồng độ oxy hoà tan giảm liên tục, nó chỉ được bù lại khi thông khí liên tục, thiếu oxy thì quá trình trao đổi chất bị phá vỡ. Quá trình nuôi cấy hiếu khí được thực hiện dưới các hình thức :

- Nếu là môi trường đặc ở các ống nghiệm hoặc hộp petri thì không khí được khuếch tán qua nút bông hoặc qua khe hở của hộp và nắp của nó.

- Nuôi cấy trên các máy lắc hoặc thiết bị có sục khí và khuấy trộn: vừa bảo đảm cung cấp oxy cho quá trình nuôi cấy vi khuẩn và tạo axit glutamic vừa làm cho sản phẩm trao đổi chất nhanh chóng tách khỏi bề mặt tế bào. Ngoài ra khuấy còn có tác dụng làm cho không khí phun vào môi trường tạo thành những bọt nhỏ do đó làm tăng bề mặt tiếp xúc giữa không khí và môi

trường tức là làm tăng tốc độ hoà tan của oxy vào môi trường. Theo F.C.Webb: nếu tốc độ khuấy 300 vg/ph sẽ tạo bọt khí nhỏ có đường kính 1mm và trong 1cm³ môi trường có 350 bọt khí, chúng chiếm diện tích 12cm². Ngoài ra, những chất hoà tan trong nước còn làm giảm nồng độ oxy hoà tan. Nếu trong nước có 3,4% chất tan thì lượng oxy hoà tan chỉ bằng 80% so với độ tan trong nước ở cùng nhiệt độ. Độ hoà tan của oxy còn phụ thuộc vào nhiệt độ. Trong giới hạn nhiệt độ từ 5 ÷ 30°C có thể xác định nồng độ oxy hoà tan vào môi trường theo hệ thức gần đúng:

C_{O_2} : biểu thị phần oxy hoà tan trong một phần môi trường;

T : nhiệt độ môi trường (°C).

- Độ hoà tan của oxy không khí vào môi trường còn phụ thuộc vào áp suất riêng phần của không khí ở thể khí và tăng khi áp suất tăng. Trong quá trình lên men luôn giữ ở áp suất 2 atm, vì theo Henry áp suất không khí tăng gấp đôi có nghĩa là nồng độ oxy hoà tan vào môi trường cũng tăng gấp đôi so với nồng độ oxy hoà tan ở p = 1 atm.

$$C_{O_2} = \frac{475}{3,35 T}$$

Ngoài các điều kiện trên thì trạng thái tế bào hay bề mặt tế bào có ảnh hưởng đến quá trình hấp thụ oxy. Khi tế bào bị vón cục lại, bề mặt tự do của chúng bị giảm đi do đó mức độ oxy hấp thụ cũng bị giảm đi.

Để xác định tốc độ oxy hoà tan trong môi trường lên men, phương pháp đơn giản nhất là phương pháp sunfit. Phương pháp như sau: Rửa sạch thiết bị cho vào đó một thể tích xác định Na₂SO₃ có nồng độ biết trước. Khi có mặt vết muối đồng hay coban thì sunfit bị oxy hoá tức thời đến sunfat. Nếu thay khí vào môi trường theo một tỷ lệ xác định, cứ sau giờ lấy mẫu ra, xác định lượng sunfit còn lại bằng chuẩn với dung dịch iot. Từ lượng sunfit bị mất ta suy ra lượng oxy hoà tan trong nước. Qua thực nghiệm người ta xác định được tốc độ oxy hoà tan theo công thức :

$$M = K.S.(CH - C_{nb})$$

ở đây : M - lượng oxy hoà tan (mol/giờ) ; K - hệ số chuyển khối (mol/cm²);

S - diện tích bề mặt phản chia (cm²);

CH - nồng độ oxy ở bề mặt phản chia nó chính bằng oxy ở trạng thái bão hoà đối với hệ không khí - nước ở nhiệt độ đã cho; phân số mol;

C_{nb} - nồng độ oxy ở trong dung dịch sunfit do tốc độ phản ứng giữa oxy và sunfit rất lớn nên ta có thể coi nồng độ oxy trong dung dịch sunfit bằng không.

- Khi khuấy mạnh thì trị số: $K_s = 400$.

- Thông khí không khuấy thì $K_s = 70$.

Bằng phương pháp này ta có thể xác định được tốc độ oxy hoà tan ở mọi tỷ lệ thông khí. Lượng oxy được cung cấp vào môi trường lên men là đưa không khí vào môi trường. Không khí thổi vào được bảo đảm vô trùng tuyệt đối, cho qua chất liệu lọc là bông thủy tinh. Yêu cầu thông khí suốt quá trình lên men khác nhau. Ở một số nhà máy lượng gió cấp cho 1m^3 dịch lên men phụ thuộc vào thời gian theo phương trình:

$$y = \frac{a}{x}$$

Ở một số nhà máy việc thông khí chia làm hai giai đoạn: từ 0 ÷ 6 giờ đầu, lượng không khí cấp cho 1m^3 dịch lên men phụ thuộc vào thời gian theo phương trình $y = a.x^2$ phù hợp với giai đoạn phát triển logarit của sinh khối, từ 5 ÷ 6 giờ trở đi là phương trình:

$$y = \frac{a}{x}$$

Thông thường ở giai đoạn cao nhất có thể cung cấp 30m^3 không khí/ 1m^3 môi trường trong 1 giờ lên men.

IV.4.9. Ảnh hưởng của dầu phá bọt

Do khuấy trộn, sục khí và lên men thải CO_2 ra nên tạo bọt khá nhiều, chúng làm giảm trao đổi chất trong quá trình lên men và làm giảm hiệu suất sử dụng thiết bị. Do đó, phá bọt có tác dụng tốt cho quá trình lên men. Song có nhiều dầu quá cũng gây nên những ảnh hưởng có hại, dầu bám vào bề mặt tế bào do đó ngăn cản quá trình trao đổi chất. Để phá bọt kịp thời và đúng lúc ta dựa vào các kinh nghiệm:

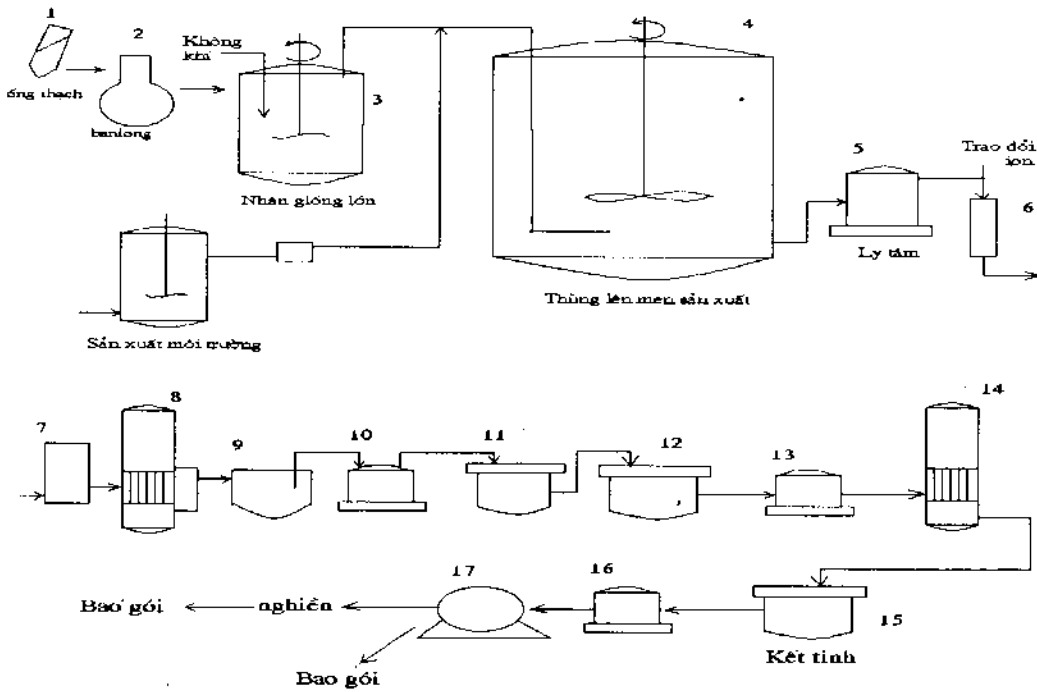
- Khi bọt xốp, to dễ vỡ khi va chạm vào cái gạt bọt thì chưa cần cho.

- Bọt nhỏ, mịn và dai thì cần cho dầu vào phá bọt, lượng dầu cho vào vừa đủ để bọt tan, thông thường với thiết bị lên men 50m^3 thì cho vào chừng 3 lít.

- Các loại dầu phá bọt có thể dùng là: dầu lạc tinh chế, dầu đậu, dầu trẩu, axit oleic, dầu ôliu,...

Để tránh cho môi trường lên men khỏi bị nhiễm trùng do dầu mang vào, dầu trước khi cho vào phá bọt phải được thanh trùng và làm nguội, thường thanh trùng dầu nhiệt độ $120 + 140^\circ\text{C}$ trong 120 phút.

Sơ đồ khái quát dây chuyền sản xuất



Hình 3.3. Sơ đồ khái quát dây chuyền sản xuất:

- | | |
|--|--|
| 1: ống giống; | 12: trung hoà tẩy màu; |
| 2: nhân giống nhỏ (ballon - bình tam giác); | 13: ly tâm, lọc; |
| 3: nhân giống lớn (thùng 1 lít, 2 lít, ...); | 14: cô đặc chân không (tinh chế); |
| 4: thùng lên men sản xuất; | 15: kết tinh mì chính; |
| 5: ly tâm tách cặn bã; | 16: ly tâm; |
| 6: trao đổi ion (tách ion glutamat); | 17: sấy khô (dạng bột - nghiền, tinh chế - bao gói); |
| 7: nhà (nhà glutamat và tạo thành glutamatnatri); | 18: pha chế môi trường. |
| 8: cô đặc chân không (nồng độ 55 - 60%); | |
| 9: axit hoá kết tinh (pH kết tinh axit glutamic
tinh khiết - pH = 2,9 - 3,2); | |
| 10: ly tâm ; | |
| 11: trung hoà khử sắt; | |

Nói chung khi thực hiện các khâu đầu để lên men sản xuất ra một lượng lớn axit glutamic và tiến hành tách tinh thể axit glutamic ra. Kết tinh mì chính có thể áp dụng các phương pháp khác nhau kế tiếp (như phần mì chính hoá giải) chỉ khác chủ yếu cơ chế tạo ra axit glutamic và quá trình chế biến từ nguyên liệu ban đầu mà có.

Trong sản xuất có thể sau lên men để tận dụng hết nguồn đạm do sinh vật tạo ra, có thể thủy phân nguồn đạm đó, cho tỷ lệ axit glutamic tương đối cao.

Các quá trình giống nhau của hai phương pháp có thể cụ thể sau:

V. QUY TRÌNH SẢN XUẤT AXIT GLUTAMIC TẠI HAI NHÀ MÁY THẨM DUƠNG-THƯỢNG HẢI, TRUNG QUỐC

V.1. Giống vi khuẩn và cách giữ giống

Sử dụng giống *Brevibacterium flavus* N-617 tự phân lập lấy, giữ trong môi trường thạch nghiêng có thành phần (%): pepton: 1; cao thịt: 1; NaCl: 0,5; thạch: 2,0; pH= 7,2

Ổng bảo quản trong tủ lạnh, 2 tháng cấy lại một lần, 6 tháng phân lập và tuyển chọn lại nòi có hiệu lực cao.

V.2. Nhân giống cấp 1

Thành phần môi trường (%):

Đường (Dịch thủy phân tinh bột):	2	Ure:	0,5
K_2HPO_4 :	0,3	Dịch thủy phân đậu tương:	1
Cao ngô:	0,5	Dịch thải đậm:	1
pH = 7, 2			

Điều kiện nhân giống: Bình tam giác V= 1 lít đựng 250ml môi trường. Nuôi trên máy lắc, $t^0 = 30 \div 35^0C$ trong thời gian: 16 ÷ 18 h.

V.3. Nhân giống cấp 2

- Môi trường: giống nhân giống cấp 1.

- Điều kiện nhân giống: Dùng nổi lên men V = 50l, đựng 35 l môi trường được thanh trùng ở $120^0/ 20$ phút. Thanh trùng thiết bị ở $130^0/ 30$ phút. Lượng giống cấy 2%, nhiệt độ nuôi cấy $31 \div 32^0C$. Thông khí 1/0,5 (1 phút đưa 0,5 l không khí vào trong 1 l môi trường). Khuấy trộn đều 340vg/ ph. Thời gian nhân giống: 8 ÷ 9 h.

V.4. Nhân giống cấp 3

- Môi trường: giống nhân giống cấp 1.

- Điều kiện nuôi cấy: Thùng lên men V = 1200 l đựng 800 l môi trường. Lượng giống cấy 2%. Thanh trùng môi trường ở $120^0/ 20$ phút, thanh trùng thiết bị ở $130^0/ 30$ phút. Thông khí 1/ 0, 25, khuấy trộn: 165vg/ ph. Nhiệt độ nuôi cấy $31 \div 32^0C$ trong thời gian 8 ÷ 9 h.

V.5. Lên men công nghiệp

Bảng 34. Môi trường lên men công nghiệp

Môi trường	Thẩm Dương	Thượng Hải
Đường (Dịch thủy phân tinh bột ngô)	10,0	10,5
Cao ngô	0,5	0,6
Dịch thủy phân khô đậu tương	0,5	-
Nước thải đen	0,5	0,75
K_2HPO_4	0,1	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3	0,03
Ure (khử trùng riêng)	1,0	0,8

- Điều kiện nuôi cấy: Thùng lên men 5000 l, đựng 3500 l môi trường. Lượng cấp giống 1 ÷ 2%. Thông khí 1/0,12 ÷ 1/0,2, khuấy trộn 110 ÷ 180 vg/ph. Nhiệt độ lên men 32 ÷ 34°C trong thời gian 30 ÷ 34 giờ. Bổ sung ure 6 lần với tổng lượng 3%.

V.6. Cô đặc

Dịch sau lên men cô đặc nồng độ từ 4,5°Be đến 20°Be ở P = 550 ÷ 600 mmHg.

V.7. KẾT TINH AXIT GLUTAMIC VÀ CHẾ TẠO MÌ CHÍNH (tiếp tục các công đoạn như phương pháp hoá học hoặc thủy phân từ sau khi thu được dịch đậm thủy phân bằng xit như ở chương 3)

Qua trên ta thấy sử dụng vi sinh vật trong sản xuất mì chính và sản xuất công nghiệp nói chung rất cần thiết, có lợi cho đời sống nhân dân và có thể đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng và giá thành hạ. Điều kiện nước ta thuận lợi cho vi sinh vật phát triển, đó là nguồn vi sinh vật phong phú cho ta chọn, phân lập, thuần hoá, nuôi cấy chúng để thu được những chủng có khả năng sinh tổng hợp axit amin cao và ngày càng phát triển mạnh mẽ khắp nơi. Các nhà máy sản xuất mì chính ở nước ta và trên thế giới hiện nay đều dùng phương pháp sinh tổng hợp hay phương pháp lên men là chính. Chỉ còn lại một số cơ sở tận dụng nguồn gluten của bột mì hay của đậu sau khi sử dụng nguồn tinh bột của nó vào các mục đích khác nhau thì dùng phương pháp hoá học hay thủy phân bằng xit để thu hồi mì chính và sản xuất nước chấm từ dịch thải các axit amin khác còn lại hay dùng phương pháp hoá học để sản xuất nước chấm hoá giải hay magi, xì dầu từ nguyên liệu khô lạc hay khô đậu tương sau khi ép dầu lạc hay dầu đậu tương... tương tự như quá trình thủy phân ở trên.

CHƯƠNG 4

NGHIÊN CỨU HOÀN CHỈNH SẢN XUẤT MÌ CHÍNH THEO PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN

I. QUÁ TRÌNH LÊN MEN L-AG

I.1. Các vi sinh vật có khả năng sinh L-AG

I.1.1. Các vi sinh vật có nguồn gốc tự nhiên

Then chốt của quá trình lên men L-AG công nghiệp là vấn đề giống vi sinh vật. Sau hơn 40 năm liên tục phấn đấu, các nhà khoa học Nhật và nhiều nước khác đã tạo ra cho nhân loại hàng loạt chủng vi sinh vật quan trọng có khả năng sinh lượng lớn axit amin nói chung và cho axit glutamic nói riêng từ nhiều loại nguyên liệu để kiểm, rẻ tiền như đường thủy phân tinh bột, ri đường, *n*-parafin, axit hữu cơ và cồn. Ứng với mỗi loại nguyên liệu có một hoặc nhiều giống sinh L-AG thích hợp với hiệu suất 53 g/l từ cồn và axit axetic, 82÷84 g/l từ *n*-parafin và 100÷108 g/l từ glucoza và sacaroza. Hiện nay các giống dùng trong sản xuất có thể đạt năng suất tới 120 g/l và kho tàng giống sinh L-AG rất phong phú, tăng cả về chất lượng và số lượng. Các nhà khoa học đã áp dụng nhiều phương pháp từ đơn giản đến phức tạp, từ tuyển lựa giống thiên nhiên đến đột biến, lai tạo, tái tổ hợp AND, dung hợp (fusion) tế bào để có các chủng mới đáp ứng yêu cầu của thực tế sản xuất. Nhìn lại quá khứ ta càng trân trọng việc làm của các nhà khoa học trong lĩnh vực mà khó khăn rất to lớn tựa như "đãi cát lấy vàng".

Kihoshita và các cộng sự đã thử 175 chủng nấm mốc 468 chủng nấm men, 372 chủng xạ khuẩn và 650 chủng vi khuẩn, thấy rằng chỉ có 22% trong số đó có khả năng sinh axit amin. Các chủng này phân bố cả trong 4 nhóm sinh vật, ít nhất là nấm mốc (10%), nhiều nhất là xạ khuẩn (30%), trung bình là vi khuẩn (20%). Các axit amin do vi khuẩn tiết vào môi trường là axit glutamic, aspactic, alanin, glyxin và loxin. Hiệu suất lên men L-AG rất thấp, chỉ đạt khoảng 1÷2 g/l. Tuy vậy có rất ít vi khuẩn cho hiệu suất lên men cao trong đó có *Micorococcus glutamicus*, sau đó là *Corynebacterium glutamicum*, cho sản lượng 30g L-AG trong một lít môi trường gồm glucoza và NH_4^+ dưới điều kiện thông gió và được đưa ngay vào sản xuất công

nghiệp. Asai và cộng sự cũng tìm ra chủng vi khuẩn có khả năng sinh nhiều L-AG từ glucoza và amoni.

Ogawa, Shinmogi và Yamamoto đã thông báo và đăng ký nhiều phát sinh về các khả năng sinh L-AG khác: *Brevibacterium lactofermentum* 2256, *Corynebacterium lilium* NRRL-B2243, *Corynebacterium callunae* NRRL-B2244, *Brevibacterium flavum* ATTC 14068.

Qì và Lin-ge cho biết đã phân lập từ nước cống Bắc Kinh và Quảng Châu được hai chủng *Corynebacterium* sp. AS1299 và *corynebacterium* AS1542 có khả năng tạo $35 \div 45$ gam L-AG trong một lít môi trường glucoza và NH_4^+ . Hai chủng này đều cần biotin cho sinh trưởng. Yamada và Seto (1993) phân lập từ hoa quả 4 chủng *Corynebacterium thermoaminogenes* (AJ. 12308, AJ. 12310 và AJ. 12340) cần biotin cho sinh trưởng, phát triển tốt ở 45°C , chết ở $60 \div 65^\circ\text{C}$ trong vòng 10 phút và tạo lượng lớn L-AG ở 43°C với tốc độ cao: $38 \div 40$ g/l trong $16 \div 19$ giờ lên men.

Chao, Foster và Tsunoda cho biết *Bacillus megaterium* và *Bacillus pumillus* có khả năng sinh L-AG, nhưng với lượng nhỏ chưa đưa vào sản xuất được.

Oki và cộng sự đã thử khả năng đồng hoá ethanol của 1150 chủng vi sinh vật, chọn được 119 chủng có khả năng phát triển trong ethanol và 29 chủng sinh L-AG với lượng đáng kể. Số vi sinh vật này thuộc *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Alcaligenes* và *Arthrobacter*. Trong đó duy nhất có chủng *brevibacterium* sp. B136 là có giá trị. Chủng này cần biotin và B_1 cho sinh trưởng, có thể tạo ra 53,1 g/l L-AG từ etanol, có khả năng oxy hoá *n*-propanol, polyetylglycol, axetaldehyt, etylacetat và metylxeton, nhưng không có khả năng đồng hoá *n*-parafin.

Kishimoto và cộng sự sử dụng chủng *B.divaricatum* NRRL 2311 lên men L-AG từ etanol theo phương pháp bổ sung cơ chất, nhưng hiệu suất lên men không vượt quá 26 g/l mặc dầu các tác giả đã áp dụng biện pháp tăng đột ngột nồng độ cồn kích thích tạo L-AG ở chủng này. Một vài chủng *Brevibacterium* đòi hỏi tamin hoặc biotin và sinh ra sản phẩm phụ là o-ethylhomoserin. Năm 1993, Motoyama và cộng sự đã tìm ra giống *Methylhomoserin glucogenes* lên men L-AG từ metanol.

Tsunoda và Shioo đã chọn *B.flavum* làm giống lên men L-AG từ axit axetic, nhưng hiệu suất còn thấp. Năm 1964, Kimura sử dụng *M. glutamicus* No 560, nhưng hiệu suất lên men chỉ đạt được 21 g/l. Chín năm sau đó, nhờ có giống *Brevibacterium thiogenitalis* D248 cải tạo từ *B.thiogenitalis* no 653 và đưa Cu^{2+} đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy phản ứng photophoryl hoá hiệu khí của quá trình hô hấp làm tăng khả năng sinh L-AG của giống.

Phần lớn các giống vi sinh vật sản sinh L-AG từ axit axetic cần biotin để sinh trưởng, nhưng thêm tiamin hoặc cao ngô làm tăng đáng kể hiệu suất lên men. Nồng độ biotin tối ưu cho tạo L-AG từ axit axetic chỉ bằng 10% lượng cần thiết khi dùng glucoza, *n*-parafin và cacbohydro thơm là sản phẩm phụ của công nghiệp chế biến dầu mỏ. Sử dụng để chế tạo L-AG theo phương pháp lên men là một hướng được nhiều người ủng hộ vì làm được điều đó vừa có ý nghĩa kinh tế vừa có ý nghĩa bảo vệ môi sinh. Yamada và cộng sự đã thử khả năng đồng hoá *n*-parafin của 127 chủng vi khuẩn, 16 chủng nấm men và 24 chủng nấm mốc phân lập từ đất và nước quanh giếng dầu, nhà máy chế biến dầu mỏ, công viên đường phố. 55 trong đó có khả năng phát triển và sinh L-AG với lượng nhỏ. Số vi sinh vật này thuộc về *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* và *Arthrobacter* và phần lớn chúng đòi hỏi tiamin hoặc biotin cho sinh trưởng.

Iguchi và cộng sự đã thêm PG vào quá trình lên men *n*-parafin và nâng cao được nồng độ L-AG thêm một chút. Imada và cộng sự dùng chủng *Corynebacterium catabolus* S10B₁ và đạt được hiệu suất $5 + 6$ g/l L-AG nhờ chủng S10 B₁ và thêm penixilin vào thời điểm thích hợp của quá trình lên men. Tanaka và cộng sự sử dụng chủng *Corynebacterium* sp. KY 4439 lên men *n*-parafin và đạt 14 g/l L-AG.

Suzuki và cộng sự dùng chủng *Arthrobacter parafinicus* KY 4303 kết hợp thêm penicilin và Cu²⁺ có tác dụng thúc đẩy việc tạo trehaloza, một loại đường không có tính khử, và trehalozalipit, đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn đầu của oxy hoá parafin. Penicilin cải tạo có tính bán thấm của màng tế bào tạo thuận lợi cho L-AG nội bào thẩm ra ngoài môi trường.

Yamamoto và cộng sự đã thử khả năng hấp thụ của 400 chủng vi sinh vật đối với benzoat và salicylat. Trong đó 97 chủng có khả năng phát triển và tạo L-AG. Các vi sinh vật này đều là Gram dương, không tạo bào tử, cần biotin và thuộc về *Brevibacterium* và *Micrococcus*. Trong đó chủng *Brevibacterium* sp. No 6 nổi bật hơn cả. Chủng này sinh ra 72 gam L-AG trong một lít môi trường chứa benzoat với hiệu suất chuyển hoá 85% (lý thuyết 120%).

Kawai và cộng sự dùng *Bacillus megatherium* sp. 6126 và *Pseudomonas alcaligenes* ATCC 12815 lên men trong môi trường axit DL- pyrolidoncacboxylic khi có mặt glucoza thu được hiệu suất lên men L-AG tốt, đạt hiệu suất chuyển hoá 90% khi dùng 2% axit DL- pyrolidoncacboxylic 0,05% cao nấm men và muối khoáng. Một số tác giả tìm ra *Bacillus pumilus* lên men hỗn hợp glucoza, axit fumaric hay axit γ - aminobutyric hoặc giống *Bacillus brevis* ATCC 8185 lên men axit DL - hydrantoin - 5 - propionic nhưng nồng độ L-AG sinh ra còn rất thấp. Ogbadu và cộng sự phát hiện ra *Bacillus* từ protein rau quả Nigeria có khả năng tạo L-AG.

Các chủng vi sinh vật sinh L-AG quan trọng nêu ở trên (trừ *Bacillus*), tuy khác nhau về tên tuổi, nguồn gốc, màu sắc và hình dạng khuẩn lạc, kích thước tế bào và tính chất sinh lý nhưng giống nhau ở nhiều điểm. Chúng đều là các vi khuẩn hình tròn đến que ngắn, Gram dương, không tạo bào tử, không vận động, sinh catalaza, ít khả năng oxy hoá L-AG và axit. α -Xetoglutaric, sinh nhiều ureaza, L-AG- dehydrogenaza, đòi hỏi biotin cho sinh trưởng, hiệu suất tích lũy lượng lớn L-AG với hiệu suất chuyển hoá cao. Các vi sinh vật này thuộc về *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* và *Microbacterium*, Yamada và cộng sự xác nhận rằng các vi sinh vật này đều có quan hệ gần gũi với nhau. Trong đó *Micrococcus* và *Brevibacterium* thường được chọn làm giống gốc cho công việc đột biến tạo giống mới.

1.1.2. Các vi sinh vật đột biến

Các phương pháp gây đột biến bằng tia cực tím, tia phóng xạ và hoá chất hay tái tổ hợp ADN các tế bào đã tạo ra các chủng mới có nhiều đặc tính quý mà các chủng gốc không có được như tạo L-AG trong môi trường giàu biotin mà không cần thêm các chất "kháng" biotin, tạo L-AG ở nhiệt độ cao và áp suất cao, chịu đựng được nồng độ NaCl cao, hiệu suất lên men L-AG cao và hiệu suất chuyển hoá cơ chất thành L-AG cao, bền vững với các kháng sinh hay tác nhân ức chế hệ enzym có hại và kích thích hệ enzym có lợi cho quá trình tổng hợp L-AG.

Kinoshita đã tập hợp một số kết quả của mấy tác giả về vấn đề trên. Năm 1967 Kanzaki và cộng sự đã thu được thể đột biến từ *Brevibacterium thiogenitalis* đòi hỏi axit oleic cho sinh trưởng có thể tạo L-AG ở trong môi trường giàu biotin khi hạn chế việc cung cấp axit oleic. Quan hệ giữa oleic và tích lũy L-AG tương tự quan hệ giữa biotin và L-AG ở chủng gốc. Một số tác giả đã tạo được thể đột biến đòi hỏi adenin từ *Corynebacterium glutamicum*, purin hoặc histidin từ *Microbacterium ammoniaphilum* sinh nhiều L-AG trong môi trường giàu biotin khi không chế adenin, purin hoặc histidin ở giá trị tối ưu.

Kikuchi và cộng sự, Nakao và cộng sự tạo được thể đột biến *Corynebacterium No 314* đòi hỏi glyxerin cho sinh trưởng và tạo nhiều L-AG. Hiệu suất lên men L-AG tăng từ 60 g/l (chủng gốc) lên 72 g/l (thể đột biến) trong cùng điều kiện.

Qì và cộng sự thông báo tạo được thể đột biến sinh nhiều L-AG từ AS 1542. Tosaka và cộng sự tạo ra thể đột biến từ *Brevibacterium* và *Corynebacterium* đòi hỏi axit axetic cho sinh trưởng, tạo lượng lớn L-AG khi môi trường dùng hỗn hợp sacharit và rượu no hoặc axit làm nguồn cacbon.

Monosem và Takgi tạo được thể đột biến sinh L-AG trong môi trường giàu biotin từ *B.lactofermentum* 2256. Thể đột biến này tạo L-AG ở 40°C với hiệu suất chuyển hoá 55%.

Katsumata và cộng sự tạo được *Corynebacterium glutamicum* KY.9703 bền vững với lizozym, tích lũy lượng lớn L-AG trong môi trường giàu biotin.

Fuji và cộng sự tái tổ hợp ADN của các vi khuẩn dạng chùy nhờ enzym đặc biệt thu được chủng *Corynebacterium melassecola* 801 sinh lượng lớn L-AG trong môi trường giàu biotin. Murakami và cộng sự tạo được hai thể đột biến *B.lactofermentum* AJ 12300 và *C. glutamicum* AJ 2301 có thể sinh trưởng ở nồng độ NaCl cao mà chủng mẹ không sinh trưởng được, có thể tạo L-AG từ môi trường giàu hoặc nghèo biotin của hydrat cacbon và axit axetic.

Azuma và Kuratsu đột biến các chủng thuộc *Brevibacterium* và *Corynebacterium* tạo được hai thể đột biến *B.flavum* H.7685 và *C.glutamicum* H.7684 miễn cảm với penicilin sinh ra $34 \div 50$ g/l L-AG trong môi trường 10% rỉ đường, tính theo nồng độ glucoza, trong khi 2 chủng mẹ không tạo được tí nào.

Kobayashi và cộng sự tạo được thể đột biến *Corynebacterium hydrocabcoclastus* UVPG-R10 từ *C. hydrocabcoclastus* R-7 bền vững với penicilin tích lũy 84 g/l L-AG từ x-hexadecan, trong khi nguyên chủng chỉ tích lũy có 26 g/l.

Murakami và cộng sự tạo thể đột biến từ *Brevibacterium* và *Corynebacterium* bền vững với các kháng sinh ức chế phản ứng tạo màng tế bào, sinh trưởng được trong môi trường áp suất thẩm thấu cao và tạo L-AG bình thường. Tomita tạo được các thể đột biến từ *C.ammoniagenes* có đặc tính quý là hàm lượng L-AG nội bào không bị ảnh hưởng bởi áp suất thẩm thấu của môi trường sản xuất.

Ozaki và Nakanishi tạo được thể đột biến *C.glutamicum* H-4520 sinh trưởng và tạo L-AG bình thường ở áp suất cao và nhiệt độ 41°C. Hiraga tạo được thể đột biến bền vững với tubersidin.

Hattori và Kotani tạo được thể đột biến *C. glutamicum* COM-53 và *B. lactofermentum* BOM-419 bền vững với tác dụng của các kháng sinh ức chế hệ thống chuyển dịch điện tử (antimyxin A), phòng ngừa photphoryl hoá ADP (gramixidin, valinomycin) và tạo hiệu suất chuyển hoá cơ chất thành L-AG cao hơn chủng mẹ từ 6 ÷ 8 %.

Tsuchida và cộng sự tạo được thể đột biến bền vững với prumixin làm tăng hiệu suất chuyển hoá đường thành L-AG và đạt 48÷58% đối với *C. glutamicum* và 54 ÷ 62% đối với *B.lactofermentum* và thể đột biến bền vững với hợp chất peptit của L-AG và axit aspactic làm tăng hiệu suất lên men L-AG khi có mặt các hợp chất này trong môi trường.

Furnkawa và cộng sự tạo được thể đột biến bền vững với prumixin phòng ngừa quá trình photphoryl hoá ADP làm tăng hiệu suất lên men L-AG. Nhiều công trình tái tổ hợp mang thông

tin di truyền tổng hợp nhiều enzym xitric-synthetaza, photphofructo-kinaza và photphoenolpyruvic - cacboxylaza. Yoshimura và cộng sự tạo được giống có khả năng tổng hợp nhiều superoxyt - dismutaza. Việc tăng hoạt lực các enzym vừa nói rất có lợi cho quá trình tổng hợp L-AG trong tế bào.

Nhân đây xin nhắc tới một số công trình khác của Yoshimura và cộng sự; Tosaka và cộng sự và Araki và cộng sự. Các tác giả tạo được các chủng *Corynebacterium* AJ11440 bền vững với tác nhân ức chế hô hấp hoặc ức chế photphoryl hoá ADP; *B. lactofermentum* AJ11516 và AJ11518 sinh ít izoxytrat-lyaza và *C. glutamicum* G-41 sinh ít enzym α -xetogutaric-dehydrogenaza và izoxytrat-lyaza. Việc giảm hoạt lực các enzym nêu trên có lợi nhiều cho hiệu suất lên men và hiệu suất chuyển hoá.

Ngoài ra Tsuchida và các cộng sự đã chú ý nhiều đến *Escherichia coli* và tiến hành nhiều thí nghiệm tái tổ hợp ADN của chúng hoặc của *E. coli* và các vi sinh vật sinh L-AG khác tạo nên các chủng mới bền vững với *p* - fluorophenylalanin, amino-etyl-xixtin, 2- tiazolalanin và 1, 2, 4 - triazolalanin, sinh lượng lớn L-AG trong môi trường.

Tujimoto và cộng sự tạo được thể đột biến từ *E. coli* mang ký hiệu AJ12628 và AJ12624 không có hoặc có ít enzym α -xetoglutamic - dehydrogenaza, ít có khả năng phân giải L-AG và sinh được $18,5 \pm 20$ g/l L-AG trong 16 ÷ 17 giờ trong khi chủng gốc chỉ sinh được vài gam mà thôi.

I.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành L-AG

I.2.1. Nguồn cacbon

Nguồn cacbon cung cấp chẳng những các đơn vị bộ khung cacbon của L-AG mà còn cung cấp năng lượng cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp của chúng. Có bốn dạng nguồn cacbon đã được dùng để lên men L-AG. Đó là cacbon hydrat, cacbua hydro, cồn và axit hữu cơ. Trong đó cacbon hydrat được dùng rộng rãi nhất. Trong phòng thí nghiệm có thể dùng glucoza, fructoza, sacaroza, mantoza, riboza, và xyloza. Đối với mục đích công nghiệp người ta thường dùng đường glucoza thuỷ phân từ tinh bột, xenluloza bằng axit hay enzym, rỉ đường mía và rỉ đường củ cải đường. Khi dùng giống thiên nhiên lên men rỉ đường cần thêm một số chất "kháng" biotin như penicilin, axit béo no C_{14} - C_{18} với liều lượng và thời gian thích hợp. Nếu dùng giống đột biến không bị giới hạn bởi biotin thì điều hoà liều lượng các chất sinh trưởng thứ hai đạt giá trị tối ưu cho từng giống tương ứng.

Nồng độ cơ chất ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất sinh tổng hợp L-AG của giống. Kinato và cộng sự đã khảo sát kỹ vấn đề này. Các tác giả chỉ ra rằng trong phạm vi từ 10 ÷ 21%, nồng

độ glucoza càng cao, hiệu suất lên men L-AG càng thấp, hàm lượng L-AG nội bào càng cao, hoạt lực các enzym cần cho oxy hoá glucoza và α -xetoglutaric decarboxylaza càng cao. Đối với các cơ chất khác như *n*-parafin, cồn và axit hữu cơ là những chất ức chế vi sinh vật ở nồng độ cao, người ta cho vào môi trường ban đầu một lượng nhỏ, sau bổ sung dần. Nhờ vậy người ta đạt được hiệu suất lên men cao khi dùng etanol, benzoat, và *n*-parafin.

1.2.2. Nguồn nitơ

Cung cấp nitơ cho quá trình lên men L-AG là rất quan trọng bởi vì nitơ cần cho việc tổng hợp protein tế bào và chiếm tới 9,5% trọng lượng phân tử axit glutamic. Người ta thường dùng các loại muối chứa NH_4^+ như NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4OH hay khí NH_3 hoặc ure làm nguồn cung cấp nitơ. Dĩ nhiên lượng lớn ion NH_4^+ có trong môi trường là cần thiết, nhưng lại không có lợi cho sự phát triển của vi khuẩn cũng như việc tích lũy L-AG. Vì thế người ta để nồng độ amoni thấp ở giai đoạn đầu và thêm dần về sau. Trong công nghiệp người ta thường dùng NH_3 dưới dạng nước, khí hoặc ure. Khi dùng ure cần quan tâm tới nồng độ ban đầu và khả năng chịu đựng ure của mỗi giống mỗi khác.

1.2.3. Nguồn muối vô cơ khác

Các ion vô cơ cần cho sinh trưởng và tích lũy L-AG. Sự có mặt của các ion sau đây là cần thiết: K^+ , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , PO_4^{-3} , và SO_4^{-2} . Liều lượng thường được dùng như sau:

K_2HPO_4 : 0,05 ÷ 0,2%

FeSO_4 : 0,0005 ÷ 0,01%

KH_2PO_4 : 0,05 ÷ 0,2%

MnSO_4 : 0,0005 ÷ 0,005%

MgSO_4 : 0,025 ÷ 0,1%

Trong đó Fe^{+2} , K^+ và đặc biệt Mn^{+2} là quan trọng để thu được lượng lớn L-AG. Ion K^+ cần cho tích lũy L-AG nhiều hơn là cho sinh trưởng. Ví dụ 0,02 ÷ 0,1% K_2SO_4 cần cho tích lũy L-AG, trong khi đó chưa đến 0,01% K_2SO_4 cần cho sinh trưởng. Trong khoảng nồng độ 0,02 ÷ 0,1% K_2SO_4 , L-AG sinh ra tỷ lệ thuận với L-AG nhờ *B. flavum* vì K^+ thúc đẩy sự tái hấp thụ L-AG vào tế bào. Hiện trạng này bị giảm bớt nếu nồng độ ion NH_4^+ trong môi trường giảm xuống. Khi nghiên cứu tác dụng của Fe^{+2} , Mn^{+2} , FeCl_3 , axit amin và một vài hợp chất đến sinh trưởng của *M. glutamicus*. Nakayama và cộng sự chỉ ra rằng trong môi trường cơ bản, tác dụng của Fe^{+2} là đặc biệt không kim loại nào có thể thay thế vai trò của nó. Một lượng rất nhỏ Mn^{+2} cạnh tranh với Fe^{+2} trong việc hỗ trợ vi khuẩn phát triển. Lượng lớn Fe^{+2} vượt qua tác dụng cạnh tranh của Mn^{+2} hỗ trợ tích cực cho sinh trưởng của các vi khuẩn. Nhờ phản ứng tạo phức càng của với các chất có trong môi trường mà Fe^{+2} phát huy được tác dụng. Thêm hỗn hợp các axit

amin và clorua sắt vào môi trường có lợi cho vi khuẩn phát triển. Nhưng khi nồng độ Fe^{+2} quá cao và môi trường có L-AG, glucoza và axit hữu cơ của chu trình tricarboxylic thì L-AG sẽ bị *B. flavum* 2297 đồng hoá và tiêu hao dần. Hiện tượng tiêu hao L-AG còn được thúc đẩy nhờ nồng độ cao của biotin và $MgSO_4$. Song nếu có mặt $(NH_4)_2SO_4$ với nồng độ cao hiện tượng tiêu hao L-AG sẽ bị ức chế.

Sự có mặt của Cu^{+2} rất có ý nghĩa tới sự tổng hợp L-AG nhờ vi sinh vật khi dùng *n*-parafin và axit axetic làm nguồn cacbon. Cu^{+2} có nhiều tác dụng khác nhau tùy theo loại cơ chất. Đối với axetat, Cu^{+2} có tác dụng đáng kể đến hoạt lực hô hấp và hệ thống chuyển dịch điện tử ở vi sinh vật sinh L-AG. Sự có mặt của Cu^{+2} làm tăng hoạt lực photophoryl hoá hiếu khí và do vậy làm tăng sự đồng hoá axetat và tăng hiệu suất lên men L-AG. Đối với quá trình lên men L-AG từ *n*-parafin nhờ *Arthrobacter paraffinicus* KY4303 thì Cu^{+2} đóng vai trò khác. Suzuki và cộng sự chỉ ra rằng Cu^{+2} làm tăng sinh trưởng tế bào, tăng tích lũy trehaloza, trehalolipit và tăng tích lũy L-AG. Trehalolipit là một hợp chất hoạt động bề mặt phân bố trên bề mặt tế bào và có ái lực cao đối với các nguồn cacbon lipophile, do đó làm tăng sinh khối và tăng L-AG của các vi sinh vật phát triển trên môi trường *n*-parafin.

1.2.4. Nguồn các chất điều hoà sinh trưởng

Chất điều hoà sinh trưởng quan trọng bậc nhất trong môi trường lên men L-AG nhờ các giống thiên nhiên là biotin. Để có hiệu suất lên men L-AG cao, nồng độ biotin phải nhỏ hơn nồng độ tối ưu cần thiết cho sinh trưởng. Nồng độ biotin tối ưu cho lên men L-AG phân biệt rõ rệt cho từng loại giống, nhưng nói chung vào khoảng từ 2 đến 5 $\mu g/l$ môi trường. Cá biệt có giống cần đến 10 $\mu g/l$. Biotin có một vai trò rất đặc biệt trong lên men L-AG. Biotin quyết định sự tăng trưởng tế bào, quyết định cấu trúc màng tế bào, cho phép L-AG thẩm ra ngoài môi trường hay không và có vai trò quan trọng trong cơ chế oxy hoá cơ chất tạo nên L-AG.

Biotin được cung cấp dưới dạng hoá chất tinh khiết hay nguyên liệu giàu biotin như cao ngô, rỉ đường củ cải đường và rỉ đường mía. Ngoài biotin, một số chủng đòi hỏi tiamin (B_1), ximin hay hỗn hợp 5 axit amin gồm xistin, sistein, histidin, loxin và một số axit amin thơm nào đó cho sinh trưởng của chúng.

1.2.5. Nguồn các chất khác

Axit xitric, axit oxalic, tri- hoặc tetra-poliphosphat là 4 hoá chất ở nồng độ 0,05 ÷ 0,1% ức chế 100% thể thực khuẩn của *Microbacterium ammoniaphilum*. Vì vậy người ta thường cho vào môi trường lên men L-AG một trong 4 hoá chất kể trên để phòng ngừa thực khuẩn thể. Thực tế sản xuất cho thấy các hoá chất này có thể ức-chế phần lớn thực khuẩn thể của nhiều loại giống

sinh L-AG có nguồn gốc thiên nhiên. Oki và cộng sự cho biết colramphericol, tetracilin, một số hoá chất có tác dụng ức chế hoàn toàn việc hấp thụ thực khuẩn thể. Trong đó sự có mặt của ion Mg^{2+} hoặc Ca^{2+} là cần thiết. Tuy vậy người ta chưa đưa vào ứng dụng thực tế loại hoá chất kể trên.

Adia và cộng sự khuyên các nhà sản xuất L-AG trong môi trường giàu biotin nên cho vào môi trường phụ gia, gồm một mạch polioxyethylen và ít bã của axit béo bão hoà để tăng hiệu suất lên men L-AG.

Gần đây Masanaka và cộng sự chế tạo được một hợp chất polyglyxerin đặc biệt từ glyxerin và polyoxyalkylen và đưa hợp chất này vào môi trường lên men làm cho *Corynebacterium glutamicum* tích lũy được một lượng lớn L-AG trong một thời gian ngắn, khoảng 18 giờ.

Yoshihara và cộng sự phát hiện ra tác dụng của N-metylglixin (MG), N,N-dimetylglixin (DNG); N,N,N-trimetylglixin (TMG) và [2-hydroxyetyl]-trimetyl ammoni (HETMA) khi lên men L-AG từ rỉ đường mía, từ sacaroza hoặc từ glucoza nhờ các chủng *Brevibacterium glavum* ATTC 14067, *B. divaricatum* ATCC 14020, *B. lactofermentum* Ajl1360 và *B. lactofermentum* ATCC 13869; khi cho 1% TMG vào môi trường rỉ đường mía có thiamin, dịch thuỷ phân protein đậu nành và polyoxytylen sorbitan monpalmitat (thêm vào thời điểm thích hợp thì *B. lactofermentum* ATCC 13869 sau 40 giờ lên men có thể cho 108 g/l L-AG.

1.2.6. Ảnh hưởng của pH

pH tối ưu cho sinh trưởng và tạo L-AG của các vi khuẩn sinh L-AG là trung tính hoặc hơi kiềm. Khi dùng môi trường sacarit người ta phải điều chỉnh pH suốt quá trình lên men vì môi trường luôn có xu hướng trở nên axit do sự hình thành L-AG và các axit hữu cơ khác gây nên. Liên tục bổ xung NH_4^+ để thực hiện hai chức năng cơ bản là điều chỉnh pH và cung cấp NH_3 cho việc tổng hợp phân tử L-AG. Có thể thay nhóm amôn bằng ure vì phần lớn ta có thể đưa NH_3 dưới dạng khí hoặc nước vào lên men để điều chỉnh pH trong khoảng 7 ÷ 8 giờ, tối ưu cho sinh trưởng và tạo L-AG.

1.2.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Đa số vi khuẩn sinh L-AG sinh trưởng và tạo L-AG tốt ở 30 ÷ 35°C, số ít ở 35 ÷ 37°C, cá biệt ở 41 ÷ 43°C. Khi tiến hành quá trình nuôi dưỡng chính ở 37°C và nuôi dưỡng phụ ở 30°C thì hiệu suất chuyển hoá là 15% và kéo theo sự chuyển hoá của axit lactic. Người ta biết có thể thay đổi nhiệt độ nuôi dưỡng khi thay đổi môi trường dinh dưỡng. Thêm xistin vào môi trường

có thể nuôi *B. divaricatum* ở 37°C ở cả giai đoạn chính và giai đoạn phụ mà vẫn tạo được hiệu suất lên men cao, trong khi nếu không thêm chỉ có thể nuôi cấy được ở 30°C.

I.2.8. Ảnh hưởng của hệ thống gió và khuấy

Thông gió và khuấy trong lên men L-AG có ý nghĩa vô cùng quan trọng. Nó nhằm hai mục đích: Thứ nhất duy trì nồng độ oxy hoà tan ở mức trên giá trị tối hạn; Thứ hai khống chế nồng độ CO₂ ảnh hưởng rất lớn tới sinh trưởng và tích lũy L-AG của các vi khuẩn.

Trong những năm 1965 - 1973, Hirose và cộng sự; Okada và Tsunoda; Ishizaki và cộng sự đã công bố nhiều công trình nghiên cứu về lĩnh vực này.

Theo Okada và Tsunoda, hệ số hấp thụ oxy (Kd) tối ưu cho lên men L-AG nhờ chủng *B.lactofermentum* No 2256 ở bình lắc là 7×10^{-6} [mol/ml.ph.atm] và nhìn chung nếu tăng hoặc giảm ngoài giá trị tối ưu thì hiệu suất lên men giảm, đặc biệt là lên men trong bình lắc.

Hirose và cộng sự chứng minh rằng khi cung cấp đủ oxy (ứng với tốc độ chuyển dịch oxy $r_{al} = 10,5 \times 10^{-7}$ [mol/ml.ph]) quá trình lên men diễn ra đều đặn, trơn tru, hoạt lực hô hấp của các tế bào cao, tiêu thụ đường nhanh, thời gian tạo L-AG dài (4 + 24 giờ), tốc độ tạo L-AG và hiệu suất lên men tốt, còn khi cung cấp thiếu oxy ($r_{ab} = 2,3 \times 10^{-7}$ [mol/ml.ph]), nhu cầu oxy không được đảm bảo thì sau 10 giờ lên men, tốc độ sinh trưởng và tốc độ tiêu thụ đường chậm, thời gian tạo L-AG ngắn (4 + 16 giờ), hiệu suất lên men L-AG kém nhưng lại tạo ra một lượng lớn axit lactic và axit succinic. Khi cung cấp dư thừa oxy ($r_{ab} = 68,1 \times 10^{-7}$ [mol/ml.ph]) thì sự sinh trưởng và tiêu hao đường bị ức chế mạnh mẽ, hoạt lực hô hấp của các tế bào thấp, chỉ có một lượng cực kỳ nhỏ L-AG được tạo thành và thay vào đó là axit α - xetoglutaric. Như vậy cung cấp ít hoặc dư thừa oxy đều không tốt: cung cấp ít oxy làm hại cho sinh trưởng, cung cấp thừa oxy làm hại cho sự tạo L-AG. Các tác giả còn quả quyết rằng, cung cấp ít oxy ở pha sinh trưởng còn có thể cứu vãn được bằng cách cung cấp đủ hoặc thừa oxy ở pha sản xuất. Ngược lại, cung cấp thừa oxy ở pha sinh trưởng thì không có cách gì cứu vãn được.

Hirose và cộng sự xác nhận mức oxy hoà tan trong dịch lên men ở hai điều kiện không và có khống chế áp suất oxy hoà tan là cực kỳ thấp, xấp xỉ bằng không và hiệu suất lên men L-AG là giống nhau. Nếu khống chế áp suất oxy hoà tan (P_L) thì phải làm sao cho áp suất đo lớn hơn 0 và nhỏ hơn 0,35 atm bởi vì trong phạm vi này hiệu suất lên men L-AG đạt giá trị cực đại và nếu để P_L lớn hơn 0,35 atm thì tốc độ hao đường và tạo L-AG đều giảm.

Hirose và cộng sự còn chứng minh thêm nồng độ CO₂ trong dịch có ảnh hưởng nhất định đến khả năng sinh L-AG của giống. Sự ảnh hưởng này phụ thuộc vào áp suất oxy hoà tan (P_L). Thông thường trong hệ thống lên men chìm, P_L tỉ lệ với áp suất riêng của CO₂ trong pha khí thải

và chỉ hơi phụ thuộc vào pH dịch men. Nếu lên men trong bình lắc mà không khống chế P_L thì hiệu suất lên men L-AG phụ thuộc vào hệ số hấp thụ oxy (K_d) và giảm rất mạnh khi nồng độ CO_2 trong dịch tăng lên, nếu P_L được cố định 0,21 atm thì tốc độ hao đường và tạo L-AG chỉ giảm đôi chút và không bị thay đổi theo K_d khi nồng độ CO_2 tăng lên.

1.2.9. Ảnh hưởng của việc cung cấp điện tử

Hongo và Iwahara đã làm các thí nghiệm cung cấp điện tử cho quá trình lên men L-AG từ glucoza nhờ *B. flavum* No2247 bằng cách thêm thuốc nhuộm mang tính khử hoặc oxy hoá vào môi trường ngay từ đầu hoặc dẫn dòng điện yếu một chiều qua dịch trong quá trình lên men và thấy rằng đồ trung tính nồng độ 0,01 mM có tác dụng rất tốt; dòng điện $200 + 300 \mu A/cm^2$ ở điện thế 1,5V khi được dẫn qua dịch có tác dụng làm tăng hiệu suất lên men L-AG từ 44,3 g/l lên 51g/l, tức là tăng khoảng 15%. Năm 1982, hai tác giả khẳng định bản chất của hiệu ứng trên là ở chỗ khi có dòng điện chạy qua các tế bào hấp thụ nhiều ion kali hơn và do vậy, màng tế bào có tính bán thấm tốt hơn đối với L-AG. Trong trường hợp lên men trong môi trường giàu biotin, chế độ cung cấp điện tử làm thay đổi thành phần axit béo tế bào và cấu trúc bề mặt tế bào dẫn tới tế bào giàu biotin tương tự tế bào nghèo biotin và để cho L-AG nội bào thấm ra ngoài môi trường.

1.2.10. Ảnh hưởng của thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể là kẻ thù không đội trời chung của các vi khuẩn được ứng dụng trong sản xuất công nghiệp. Oki và cộng sự đã có nhiều công trình nghiên cứu về các thực khuẩn thể của *B.lactofermentum* No2256, một chủng đang được dùng trong các nhà máy sản xuất L-AG tại Nhật. Kể từ 1964, năm đầu tiên phân lập ra thực khuẩn thể P61 từ dịch lên men bất thường tới 1967, số lượng thực khuẩn thể của chủng này đã lên tới 21, phân loại làm 4 nhóm, trong đó các thực khuẩn thể nhóm I là thể đột biến của P61. Hầu hết các thực khuẩn thể phân lập được đều rất nhạy cảm với các tác nhân vật lý và hoá học, dễ bị bất hoạt trong $5 + 10$ phút ở $75^\circ C$, khá bền ở pH $6 + 9$, sống hàng tháng ở trạng thái ẩm 10% và chết nhanh chóng ở độ ẩm 90%. Độ đục sinh khối vi khuẩn và hiệu suất lên men L-AG phụ thuộc thời điểm xâm nhập vào thời điểm $0 + 8$ giờ sau khi bắt đầu lên men. Ngược lại độ đục dịch men không thay đổi nếu sau 12 giờ vi khuẩn mới bị các thực khuẩn thể tấn công. Vi khuẩn vẫn phát triển bình thường. Thời kỳ làm quen của các thực khuẩn thể rất ngắn, chỉ khoảng $30 + 50$ phút. Sau đó các thực khuẩn thể sinh sản theo hàm số logarit. Để an toàn sản xuất, người ta cho các chất giống thực khuẩn thể vào môi trường ngay từ đầu và không bao giờ hy vọng chọn được một chủng vi khuẩn mãi mãi bền vững với thực khuẩn thể bởi vì các thực khuẩn thể có đặc tính đột biến chuỗi, tức là luôn tự biến đổi để thích

ngiht với vi khuẩn chủ mới ra đời. Ngoài ra phải tiến hành biện pháp "luân canh", 2 ÷ 3 tháng đổi giống sản xuất một lần.

I.3. Các yếu tố điều hoà quá trình lên men

I.3.1. Biotin

I.3.1.1. Sự hấp thụ biotin của tế bào

Takinami và cộng sự đã nghiên cứu chi tiết về sự hấp thụ biotin ở các tế bào của *B.lactoferrmentum* N2256 và xác nhận rằng nồng độ biotin tế bào phụ thuộc vào nồng độ biotin trong môi trường. Người ta phân biệt ba loại môi trường tùy theo nồng độ biotin: nghèo biotin (3 µg/l), giàu biotin (20 µg/l) và dư thừa biotin (300 µg/l). Khi được nuôi dưỡng trong môi trường nghèo và giàu biotin, các tế bào vi khuẩn hấp thụ toàn bộ biotin ở giai đoạn tiềm phát và ở thời kỳ đầu của giai đoạn phát triển logarit. Lúc này nồng độ tế bào đạt tới mức cao nhất và giảm dần về lượng theo sự gia tăng của sinh khối. Mức cuối cùng của biotin tế bào ở môi trường nghèo biotin là 0,5 µg/g tế bào khô và ở môi trường giàu biotin là 1,5 µg/g tế bào khô. Khi được nuôi dưỡng trong môi trường thừa biotin, các tế bào vi khuẩn không hấp thụ hết số biotin có trong môi trường mà để lại 50 µg/l. Lúc này các tế bào đã bão hoà biotin và dừng sinh trưởng khi môi trường không còn cơ chất. Trong trường hợp này, cơ chất khống chế sinh trưởng chứ không phải là biotin khống chế sinh trưởng như ở trong môi trường nghèo biotin. Mức biotin bão hoà của tế bào là 20 µg/g tế bào khô.

Dựa vào phân tử lượng của biotin (244,3) và trọng lượng của 1 tế bào khô ($1,07 \times 10^{-12}$ gam ở môi trường nghèo và $7,77 \times 10^{-13}$ ở môi trường giàu biotin) người ta tính được mức tối thiểu của biotin trong tế bào là $1,3 \times 10^3$ phân tử (0,5 µg/g) và mức bão hoà là $3,8 \times 10^4$ phân tử (20 µg/g). Nồng độ biotin môi trường 3 µg/l là tối ưu tạo L-AG và 20 µg/l cần thiết cho sinh trưởng tối đa và 300 µg/l cần thiết để bão hoà vi khuẩn. Trong đó mức sau cùng ít ai quan tâm tới.

Nếu cấy truyền các tế bào bão hoà biotin vốn không có khả năng sinh L-AG vào môi trường không có biotin thì các tế bào vẫn sinh trưởng và tích lũy L-AG bởi vì qua sinh trưởng biotin tế bào giảm dần về lượng cho tới khi đạt mức thấp nhất là 0,5 µg/g tế bào khô, mức sản sinh L-AG của tế bào. Nồng độ tế bào tối ưu cho việc tạo L-AG là 0,2 µg/l hoặc ít hơn.

Như vậy giảm nồng độ biotin nội bào của các tế bào giàu biotin xuống mức tối thiểu qua sinh trưởng là biện pháp hữu hiệu chuyển sang trạng thái sinh L-AG. Sau này ta sẽ thấy đây chưa phải là biện pháp duy nhất.

1.3.1.2. Tác dụng của biotin

Biotin kích thích vi khuẩn sinh trưởng và tích lũy L-Ag. Khi đủ biotin vi khuẩn sinh trưởng vừa phải, diễn biến lên men êm dịu và L-Ag tạo được nhiều. Khi thừa biotin vi khuẩn sinh trưởng rất mạnh mẽ, tiêu hao đường nhanh, sinh rất ít L-Ag, thay vào đó là nhiều axit lactic, α -xetoglutaric, succinic, aspactic và alanin. Khi thiếu biotin vi khuẩn sinh trưởng và tạo L-Ag kém. Dù sinh trưởng trong môi trường giàu hay nghèo biotin vi khuẩn sinh L-Ag không đồng hoá L-Ag hay α -XG. Đây là tính chất quan trọng quyết định sản lượng L-Ag tích lũy được trong môi trường.

Nồng độ biotin tối ưu cho sản sinh L-Ag thay đổi theo nguồn cơ chất và nồng độ cơ chất trong môi trường. Khi dùng glucoza với nồng độ 10% làm cơ chất thì nồng độ biotin tối ưu là 3 $\mu\text{g/l}$. Nếu hạ thấp nồng độ glucoza thì nồng độ biotin tối ưu cũng giảm xuống và đạt giá trị cực kỳ nhỏ. Nếu thay thế glucoza bằng axit axetic thì nồng độ biotin tối ưu chỉ bằng 1/10 nồng độ biotin tối ưu khi dùng glucoza.

1.3.1.3. Biotin và con đường trao đổi glucoza

Như đã trình bày ở trên, lên men L-Ag bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như nồng độ biotin, nồng độ oxy hoà tan, nồng độ muối amoni và pH. Nồng độ biotin và oxy hoà tan là hai yếu tố chủ yếu điều khiển sự trao đổi glucoza, xác định loại và lượng sản phẩm của quá trình lên men. Khi thừa biotin vi khuẩn không tích lũy L-Ag mà tích lũy lượng lớn axit lactic ở ngoài môi trường. Từ đây người ta suy ra rằng biotin có tầm quan trọng nào đó trong việc khống chế tỉ lệ phần trăm oxy hoá glucoza của HMP và EMP. Kinoshita và các cộng sự đã dự đoán rằng phần lớn glucoza được tế bào vi khuẩn đặc biệt là tế bào giàu biotin, oxy hoá qua HMP. Thực tế chứng minh không phải là như vậy. Dù được nuôi trong môi trường giàu hay nghèo biotin, các tế bào vi khuẩn sinh L-Ag vẫn oxy hoá phần lớn glucoza qua EMP, chỉ có một lượng nhỏ qua HMP. Oishi và Aida xác nhận rằng ở *C. glutamicum* 38% glucoza được oxy hoá qua chu trình HMP nhờ tế bào giàu biotin và 26% glucoza qua EMP nhờ tế bào nghèo biotin. Số liệu này quá cao so với số liệu Ishino công bố mới đây.

Biotin có ảnh hưởng nhất định đến sự hình thành một số enzym trong các tế bào vi khuẩn sinh L-Ag. Shiio và các cộng sự (1959) cho rằng ở *B. flavum* biotin không ảnh hưởng đến nồng độ các enzym L-glutamat-dexhydrogenaza (GAD, izoxytrat-dehydrogenaza (IXD), tranzaminaza (TA) và izoxytrataza (IXT) khi nuôi trong môi trường glucoza nhưng có ảnh hưởng tới enzym IXT khi nuôi ở trong môi trường axetat. Trong trường hợp này tế bào giàu biotin có ít enzym IXT và tế bào nghèo biotin thì có nhiều enzym IXT và tích lũy nhiều L-Ag.

Kimura nuôi *M. glutamicus* trên hai loại môi trường giàu và nghèo biotin, xác định thành phần enzym của dịch chiết tế bào và cho biết khi nuôi trong môi trường nghèo biotin các tế bào không có enzym IXT, ngược lại các tế bào nuôi trong môi trường giàu biotin thì có rất nhiều IXT. Sự có mặt của IXT đã làm xitrat biến đổi hoàn toàn qua glucolyaza và gây tổn thương đến sinh tổng hợp L-AG.

Otsuka, và cộng sự đã nuôi *M. glutamicus* và *B. flavum* trong cùng một loại môi trường ở hai trạng thái giàu và nghèo biotin, xác định thành phần enzym của các dịch chiết tế bào và phát hiện ra nhiều điều lý thú. Trong khi các enzym khác như GAD, XGD (α -xetoglutar-dehydrogenaza), SCK (succinic-tiokinaza) và IXL (izoxytrat-lyaza) không bị ảnh hưởng bởi nồng độ biotin thì 3 enzym khác bị ảnh hưởng rất lớn. Tế bào nghèo biotin có rất ít IXL (izoxytrat-lyaza) và IXD (izoxytrat-dehydrogenaza) nhưng lại có rất nhiều TA (trazaminaza).

Ngược lại tế bào giàu biotin lại có rất nhiều IXL và IXD nhưng rất ít TA. Có lẽ sự có mặt của IXL và IXD làm cho glucoza bị oxy hoá hoàn toàn với tốc độ cao thành CO_2 và H_2O đưa tới tình trạng không tích lũy L-AG ngoại bào ở các tế bào giàu biotin. Điều này một lần nữa được xác định qua sự khác nhau về tốc độ thu nhận O_2 của 2 loại tế bào. Tế bào giàu biotin hấp thụ O_2 với lượng gấp đôi tế bào nghèo biotin trong môi trường glucoza dưới cùng điều kiện.

1.3.1.4. Biotin và chu trình glyoxylat

Người ta thấy khi thừa biotin, tốc độ phân giải glucoza tăng lên rõ rệt, tạo ra rất nhiều pyruvat và một lượng đáng kể pyruvat đã bị biến đổi thành lactat và được thải vào môi trường. Hơn thế biotin còn điều chỉnh tốc độ oxy hoá hoàn toàn cơ chất cacbon và xác định hiệu suất tăng thu hồi trong sinh tổng hợp L-AG.

Trong điều kiện yếm khí, tế bào giàu và nghèo biotin đều tổng hợp L-Ag từ xitrat và NH_4^+ với tốc độ như nhau. Nếu dùng succinat, fumarat hay axetat làm cơ chất thì tốc độ oxy hoá của tế bào giàu biotin cao hơn tế bào nghèo biotin nhiều lần. Nếu thêm NAD^+ thì tốc độ oxy hoá của tế bào nghèo biotin sẽ được cải thiện một bước bởi vì thành phần NAD và NADH của tế bào nghèo biotin rất thấp, chỉ bằng khoảng 25 ÷ 50% của tế bào giàu biotin. Do vậy chắc chắn là sự yếu kém của tế bào nghèo biotin là sự thiếu hụt NAD và NADH trong tế bào gây nên.

Người ta đề nghị dùng chu trình dicarboxylic làm chu trình oxy hoá hoàn toàn axetat ở *Corynebacterium glutamicum* để giải thích sự oxy hoá axetat của các tế bào giàu và nghèo biotin, mặc dầu tốc độ oxy hoá của tế bào nghèo biotin cực kỳ thấp. Nhưng thực tế không xác nhận sự đúng đắn của đề nghị trên. Sự oxy hoá axetat không bị monofloraxetat ức chế nhưng bị malonat ức chế bởi vì nó tích tụ succinat. Hiện tượng này có thể giải thích được bằng chu trình

glyoxylat vốn rất phổ biến trong các vi sinh vật. Vì vậy sẽ rất hợp lí nếu coi chu trình glyoxylat bao gồm các giai đoạn khử cacbon hiệu quả các hợp chất oxaloacetat, malat và pyruvat là hệ thống oxy hoá hoàn toàn cơ chất ở các vi sinh vật sinh L-AG. Chu trình này là một hệ thống luôn được bổ sung các axit dicarboxylic C_4 cần thiết cho việc sinh tổng hợp L-AG và hoạt động tốt nhờ có mặt của axetat.

Trong môi trường glucoza nghèo biotin, *Corynebacterium glutamicum* hầu như không có IXL, một enzym then chốt của chu trình glyoxylat. Có hai nguyên nhân gây nên hiện tượng này: Một là sự thiếu hụt axetat do giảm oxy hoá pyruvat ở tế bào nghèo biotin làm giảm tổng hợp cảm ứng enzym IXL, hai là sự tăng tích tụ succinat thường thấy trong tế bào nghèo biotin làm ức chế IXL. Do vậy chu trình glyoxylat phải chuyển hướng và dòng trao đổi chất phải chuyển từ izoxytrat sang α -XG và L-AG làm lợi cho tích tụ L-AG.

Ta biết rằng chu trình lyoxylat có hai vai trò quan trọng phụ thuộc vào mức độ phân giải malat và oxaloacetat. Thứ nhất, hoạt động của nó như là một hệ thống oxy hoá hoàn toàn đối với axetat và thứ hai củng cố và tăng cường hệ thống sinh tổng hợp L-AG. Thông thường khi có mặt của IXD và IXL với số lượng lớn thì cơ chất bị oxy hoá hoàn toàn và không có L-AG sinh ra. Các tế bào nghèo biotin có rất ít IXL và IXD và chúng tạo L-AG tốt.

Người ta thấy khi lên men L-AG từ nguồn cacbon duy nhất là axetat thì cả hai chu trình trao đổi chất glyoxylat và TCA đều hoạt động cùng hai enzym then chốt của hai chu trình này là IXL và OXD. Cả hai enzym đều thể hiện tác dụng khi có mặt izoxytrat là chất khởi đầu chung cho cả hai chu trình. IXL xúc tác tạo glyoxylat, còn IXD xúc tác tạo NADPH từ izoxytrat.

IXD đặc trưng bởi NADP bị hỗn hợp axaloacetat và glyoxylat ức chế rất mạnh mẽ ngay khi ở nồng độ thấp và không bị các sản phẩm trung gian khác của chu trình TCA ức chế. Ngược lại IXL thì bị các sản phẩm trung gian của chu trình TCA ức chế mạnh mẽ, mạnh nhất là oxalat, sau đó là glucoxytrat rồi đến malat, oxaloacetat, và α -XG, đặc biệt khi các chất này có mặt cùng một lúc. Các sản phẩm trung gian của chu trình TCA ức chế IXL mạnh hơn là IXD.

Khi nồng độ các sản phẩm trung gian của chu trình TCA ở mức thấp thì chu trình glyoxylat nhanh hơn là vào chu trình TCA. Tuy vậy ở nồng độ thấp izoxytrat bước vào chu trình TCA dễ dàng hơn chu trình glyoxylat bởi vì ái lực của enzym IXD đối với izoxytrat cao hơn hẳn ái lực của IXL đối với izoxytrat. Khi IXL hoạt động được nhờ nồng độ các chất trung gian của TCA giảm xuống thì các glyoxylat tăng lên và cùng với lượng ít ỏi oxaloacetat tồn trữ trong tế bào ức chế IXD. Kết quả là hoạt động của chu trình TCA bị xuống thấp làm cho một lượng đáng kể izoxytrat bị trao đổi qua chu trình glyoxylat. Mặt khác khi chu trình glyoxylat hoạt động mạnh lên, tạo ra nhiều axit hữu cơ của chu trình TCA thì những chất này lại kìm hãm trở lại

IXL và do vậy nồng độ glyoxylat xuống thấp sẽ giải thoát IXD khỏi bị ức chế bởi hỗn hợp glyoxylat-oxaloaxetat. Như vậy ở nồng độ cao của các axit hữu cơ, con đường tổng hợp theo chu trình glyoxylat bị đình trệ và chỉ có hệ thống tái tạo năng lượng của chu trình TCA hoạt động làm tăng α -XG và cuối cùng là L-AG.

Người ta phát hiện thấy sự điều hoà hai loại enzym photpho enolpyruvat -cacboxylat và pyruvat-kinaza. Enzim thứ nhất được hoạt hoá ở axetyl-CoA và fructo-1-6-diphosphat và bị ức chế bởi aspartat. Enzim thứ hai được AMP hoạt hoá và bị ATP ức chế. Sự kiểm chế này là rất quan trọng để giữ thăng bằng cho việc tạo axetyl-CoA và oxaloaxetat là những chất không thể thiếu glucoza nhanh và tạo ra nhiều L-AG từ glucoza. Khi có mặt của NH_4^+ tế bào nghèo biotin tiêu thụ phạm vi axit, tốc độ tiêu hao glucoza thấp, không sinh L-AG mà sinh nhiều pyruvat, axetat, succinat và α -XG; khi có NH_4^+ tỉ số giữa lượng O_2 hấp thụ và glucoza tiêu hao gần bằng 1. Trong khi thiếu NH_4^+ thì tỷ số đó lớn hơn 2. Điều đó cho thấy ở *Corynebacterium glutamicum* sự amin hoá khử hầu như không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của oxy và diễn ra với tốc độ gần tốc độ hô hấp hiếu khí.

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của NH_4^+ đến sự oxy hóa glucoza bằng cách đo lượng CO_2 phóng xạ giải phóng ra từ glucoza có C_6 đánh dấu đã chỉ rõ, ở tế bào giàu biotin, NH_4^+ không có ảnh hưởng lớn tới sự oxy hoá hoàn toàn cơ chất. Như vậy sự trao đổi chất của các hợp chất cacbon sau pyruvat được điều khiển một cách chuẩn xác bởi nồng độ biotin lẫn nồng độ NH_4^+ cũng như tỷ số của hai con đường oxy hóa hoàn toàn tổng hợp L-AG. Dưới điều kiện giàu biotin con đường thứ nhất chiếm ưu thế và không sinh L-AG, trong khi dưới điều kiện nghèo biotin thì con đường thứ hai chiếm ưu thế bởi vì các bước oxy hoá succinat, izocitrat, khử CO_2 của malat và oxaloaxetat bị chậm trễ nhường bước cho việc biến đổi xitrat thành L-AG diễn ra thuận lợi.

1.3.1.5. Các chất thay thế biotin

Các chất thay thế biotin có một vai trò rất quan trọng trong lên men L-AG. Tuy vậy có nhiều hợp chất khác có thể thay thế một phần hay thay thế hoàn toàn biotin trong môi trường lên men. Chẳng hạn có thể thay thế một phần biotin bằng axit aspartic, nhưng không thể thay thế bằng vitamin nhóm B hoặc ion kim loại. Khi dùng chủng đột biến thì thiamin và riboflavin có tác dụng khống chế sản lượng L-AG. Nếu lượng thiamin hoặc riboflavin bị giới hạn thì cả sinh trưởng lẫn tạo L-AG đều giảm. Nhiều chất tương tự biotin hay tiền chất của biotin có thể thay thế hoàn toàn biotin nhưng hoạt lực thấp và đôi khi làm giảm cả hiệu suất sinh L-AG (bảng 35). Dù sử dụng chất nào đi nữa thì các tế bào thu được cũng chứa đựng biotin như khi sinh trưởng trên môi trường có nồng độ biotin tối ưu. Trong số các tiền chất, axit oleic là đáng chú ý vì nó có

thể thay thế hoàn toàn biotin cả trong kích thích sinh trưởng lẫn tích lũy L-AG của các chủng *Micrococcus glutamicus* và *B. flavum*.

Bảng 35. Tác dụng của các chất thay thế biotin trong lên men L-AG

Các chất thay thế biotin	Lượng dùng [µg/l]	Tỷ lệ hoạt lực [%]	L-AG [g/l]
<i>Các chất tương tự biotin</i>			
D-biotin	6	100,0	43,7
Biotin-D-sulfoxyt	8	80,8	45,1
Bioxystin	10	91,5	43,1
DI-destiobiotin	10	52,5	46,1
<i>Các tiền chất của biotin</i>			
Axit biotin diamino cacboxylic	1 600	0,34	39,4
Axit 7,8-diaminopelargonic	200	3,10	48,1
Axit 7-xeto-8 aminopelargonic	600	0,92	51,3
Axit 7-amino-8 xetopelargonic	4 000	0,14	44,5
Axit 7,8-dixetopelargonic	25 000	0,018	43,1
Axit 7-amino 8-hydroxy-pelargonic	400 000	0,001	37,2
Axit oleic	500 000	0,0014	36,2

Các chất hoạt động bề mặt chứa axit oleic như sorbitanmonooleat hoặc sorbitantriolate ở phạm vi nồng độ 400 ÷ 600mg/l có thể thay thế biotin khi lên men nhờ chủng *M.ammoniaohilium*, trong đó chất sau có tác dụng tốt nhất. Những chất khác như Tween 80 (polythylen sorbitan monooleat) có thể thay thế biotin khi dùng *B. divaricatum* và *B. lactofermentum*. Các axit béo không no C₁₈ như axit elaidic, vaccenic, linoleic và 12-hydroxyoleic cũng có thể thay thế biotin cho sinh trưởng của vi khuẩn ở nồng độ thấp nhưng ức chế sinh trưởng ở nồng độ cao. Một số hoocmon thực vật như axit indol-acetic và 2,4-diclorophenoxy-acetic có khả năng thay thế biotin khi lên men L-AG nhờ *B.lactorementum*.

1.3.2. Các chất kháng biotin

1.3.2.1. Penicilin G (PG)

Biết được nồng độ biotin trong môi trường có ảnh hưởng mạnh mẽ đến quá trình lên men L-AG, người ta đã tìm biện pháp sử dụng một cách tốt nhất các nguyên liệu thô chứa đường

và lượng lớn biotin. Vấn đề đã được giải quyết khi Sommerson, N.L và Phillip; Matsuo và cộng sự; Shio và cộng sự; Nara và cộng sự; Takashi và cộng sự; và Shibukawa và cộng sự phát hiện ra rằng khi thêm PG vào quá trình lên men làm cho các vi khuẩn *M. glutamicus*, *B. glauum* No2247, *B. amoniagenes* ATCC 6871 và *Microbacterium ammoniophilum* ATCC 15354 tích lũy một lượng lớn L-AG và ngay khi môi trường dư thừa biotin. Về sau nhiều tác giả còn xác định điều vừa nói cũng đúng với trường hợp dùng giống khác lên men trên môi trường đường hay phi đường, kể cả các giống không đòi hỏi biotin cho sinh trưởng và tích lũy L-AG trên môi trường hydrocacbon. Chẳng hạn như đối với *Corynebacterium hydrocaccoboclastus* M-104, để thu được hiệu suất lên men cao, thì trong pha sinh trưởng thường là vài giờ sau khi lên men bắt đầu, người ta phải bổ sung PG với lượng và thời điểm thích hợp. Nồng độ PG tối ưu là $4 \div 5$ đơn vị/ml môi trường. Do thêm PG vi khuẩn bị hạn chế ở mức có thể so sánh được với môi trường nghèo biotin. Quá trình lên men diễn ra bình thường và lượng lớn L-AG được tích lũy. Sau khi thêm PG, tế bào tiếp tục sinh sản một thời gian nữa mới ngừng. Các tế bào phồng to và dài ra, có lẽ là việc tổng hợp không hoàn toàn đối với màng tế bào. Phân tích L-AG nội và ngoại bào ở các giai đoạn khác nhau của quá trình lên men trong môi trường thêm và không thêm PG, người ta thấy khi không thêm PG, L-AG nội bào cao hơn hẳn L-AG ngoại bào, khi thêm PG, L-AG nội bào thấp hơn L-AG ngoại bào rất nhiều. Như vậy thêm PG làm cho L-AG dễ thấm từ trong tế bào ra ngoài môi trường qua màng tế bào.

1.3.2.2. Các chất có tác dụng tương tự PG

Người ta đã thử tác dụng của các chất kháng sinh khác như cephalosporin C, novobioxyn, tetracylin, clortetracylin, xyetetracylin, baxitraxin, cloramphenicol, streptomycin và dextromycin và thấy rằng chúng đều có tác dụng nhưng hoạt lực thấp không thể nào so sánh với PG được. Vì PG có hoạt lực mạnh nhất nên suy ra rằng tác dụng của kháng sinh trong sản xuất L-AG có thể liên quan tới việc loại trừ sự ngăn cản của màng tế bào đối với việc thấm L-AG nội bào ra ngoài môi trường.

Các chất hoạt động bề mặt mang ion dương, ion âm hay không ion hoá đều có tác dụng tương tự PG. Oshima và cộng sự, Shio và cộng sự, Takinamim và cộng sự đã thêm một lượng nhất định Tween 60 (polyoxyetylen-sorbitan-monostearat) hay CTAB (Cetyltrimethyl ammoniumbromit) vào thời điểm thích hợp trong pha sinh trưởng của các giống *M. glutamicus*. *B. glauum* No 2256 đã làm cho chúng tích lũy một lượng lớn L-AG ngay trong môi trường giàu biotin. Hai hoạt động bề mặt S_1 và S_2 chính xác vào thời điểm của pha chỉ số, kết hợp bổ sung ri đường củ cải đã đạt được hiệu suất lên men L-AG 100 g/l. S_1 là polyetylen glycol được acyl hoá bằng axit stearic và palmitic. S_2 là laurylamin. Các kết quả trên chứng tỏ các chất hoạt động bề

mặt có ảnh hưởng nào đó đến cấu trúc màng tế bào của các giống tạo thuận lợi cho L-AG dễ thấm qua.

Giữa các Tween 40; 60 và Tween 20; 80 khác nhau ở chỗ hai chất đầu là este của axit béo no còn hai chất sau là este của axit béo không no (lauric, oleic). Hai chất đầu có tác dụng tương tự PG, còn hai chất sau không có tác dụng. Từ đó người ta suy ra rằng điểm tác dụng của các chất hoạt động bề mặt nằm ở phần axit béo no. Thục nghiệm cho thấy đúng là như vậy bởi vì thêm các axit béo no tự do vào hệ thống lên men giàu biotin thì một lượng lớn L-AG đã được sinh ra. Trong đó đáng kể là những axit béo no có C_{14} - C_{18} như myristic C_{14} , palmitic C_{16} đặc biệt là margaric C_{17} và stearic C_{18} . Ngoài ra este của các axit này với đường sacaroza thể hiện hoạt tính tương tự PG.

Este của polyetylen với các axit béo no đã được dùng trong khi lên men L-AG ở môi trường rỉ đường mía. Người ta cho rằng phần có hiệu lực là phần axit béo no palmitic, stearic và tỉ số giữa hai axit này từ $(100:0) \div (30:70)$.

Nhiều loại rượu có tác dụng tương tự PG, đặc biệt là isobutanol. Resorcinol, Na-propionat và pentachlorophenol và cũng có hoạt lực tương tự PG. Nhiều chất mang tính chất bề mặt, nhưng cũng có một số chất không có hoạt tính hoạt động bề mặt. Do vậy không thể chỉ giải thích hiệu quả nâng cao tích lũy L-AG trên cơ sở cải tạo tính chất thấm thấu của tế bào.

1.3.3. Điều chỉnh khả năng bán thấm của tế bào

1.3.3.1. Sự giải phóng axit amin tự do nội bào

Có thể nói rằng mỗi tế bào vi khuẩn sinh L-AG là một nhà máy sản xuất L-AG siêu nhỏ. Tế bào hấp thụ các chất dinh dưỡng và tổng hợp L-AG ở trong tế bào. Tuỳ theo điều kiện sinh trưởng trong môi trường giàu biotin hay môi trường nghèo biotin hoặc môi trường giàu biotin cố thêm penicilin hoặc các chất hoạt động bề mặt mà L-AG nội bào được giải phóng ra ngoài ít hoặc nhiều. Các tế bào sinh trưởng trong môi trường nghèo biotin cho phép L-AG ra khỏi tế bào khi rửa bằng đệm photphat. Ngược lại các tế bào sinh trưởng trong môi trường giàu biotin thì không giải phóng trong điều kiện tương tự. Tuy nhiên nếu rửa các loại tế bào này với CTAB thì L-AG được đưa ra ngoài. Từ đó có thể suy ra rằng sự khác nhau về khả năng sinh L-AG giữa có tế bào giàu và nghèo biotin là do sự khác nhau ở độ thấm thấu tế bào đối với L-AG gây nên; hơn thế nữa độ thấm thấu ấy là do bản chất cấu tạo của màng tế bào quyết định. Nói một cách khác màng tế bào của tế bào giàu biotin đã được cấu tạo cân chắc, ngăn cản không cho L-AG nội bào thấm ra ngoài. Do vậy nếu bóc bỏ màng tế bào, gạt bỏ vật cản trở thì L-AG nội bào của cả hai loại tế bào giàu và nghèo biotin sẽ dễ dàng thoát ra ngoài. Điều này được Shibukawa và cộng sự

chứng minh từ năm 1967. Các tác giả đã lột bỏ màng tế bào bằng lizozym lòng trắng trứng và dùng phần còn lại để tổng hợp L-AG từ glucoza và NH_4^+ dưới điều kiện thông gió và rút ra kết luận là sau khi bóc vỏ màng các tế bào giàu hay nghèo biotin đều có khả năng sinh L-AG như nhau dưới điều kiện áp suất thẩm thấu thấp. Như vậy hiển nhiên là sự khác nhau và khả năng sinh L-AG của tế bào giàu và nghèo biotin là khác nhau và tính tự nhiên của màng tế bào.

Gần đây, Neubecke và cộng sự đã tiến hành xác định khả năng tích lũy L-AG của dịch màng nguyên sinh chất ở tế bào *Brevibacterium* ATCC-13869 nuôi dưỡng trong hai điều kiện giàu và nghèo biotin và nhận thấy khả năng ấy là giống nhau và không đổi suốt trong thời gian từ sau tiếp giống đến giai đoạn cân bằng của sự phát triển. Điều này một lần nữa chứng minh sự khác nhau và khả năng tích lũy L-AG ngoại bào của các vi khuẩn sinh L-AG chính là sự khác nhau và tính chất thẩm thấu của màng tế bào đối với L-AG gây ra.

1.3.3.2. Biến tính tế bào dẫn đến khả năng sinh L-AG

Các tế bào sinh trưởng trong môi trường giàu biotin không có khả năng sinh L-AG ngay sau khi được thêm PG, Tween 60 hay chất hoạt động bề mặt hữu hiệu nào khác mà phải trải qua một hay nhiều chu kỳ sinh trưởng để có các biến đổi nào đó thật cơ bản, tế bào giàu biotin mới trở thành tế bào có khả năng sinh L-AG. Thêm PG hay các chất hoạt động bề mặt với lượng tối ưu vào thời điểm thích hợp ở pha sinh trưởng đều có tác dụng chung là làm cho vi khuẩn sinh trưởng trong môi trường giàu biotin có khả năng sinh L-AG, tức là làm cho màng tế bào của chúng có tính thẩm thấu tốt đối với L-AG. Tuy vậy bản chất tác dụng của mỗi loại môi khác.

Penicilin có tác dụng ức chế quá trình sinh tổng hợp màng, làm cho màng không được hình thành một cách trọn vẹn, gây tổn thương cơ học cho màng và do vậy làm giảm trở lực thẩm thấu đối với L-AG. Thêm các chất hoạt động bề mặt hoặc các axit béo no bậc cao làm cho trở lực thẩm thấu tế bào bị mất đi, nhưng không gây ra những thay đổi mạnh mẽ đối với cấu trúc màng như khi thêm PG. Tác dụng của các chất hoạt động bề mặt không phụ thuộc vào áp suất thẩm thấu. Ngược lại PG chỉ thể hiện tác dụng ở áp suất thẩm thấu còn ở áp suất thẩm thấu cao PG mất tác dụng hoàn toàn. Mặt khác, các chất hoạt động bề mặt gây ra sự biến đổi thành phần hoá học của màng làm cho sự thẩm thấu tế bào tăng lên. Ngược lại PG không làm thay đổi thành phần axit béo ở màng tế bào.

1.3.3.3. Sự thay đổi lipid ở màng tế bào

Trong lên men L-AG cấu trúc của màng tế bào rất quan trọng vì nó quyết định tính bán thấm của màng tế bào đối với L-AG. Màng tế bào chiếm tỉ lệ khá lớn trong trọng lượng tế bào khô. Gần 40% trọng lượng tế bào là màng, trong đó 7 ÷ 10% là lipid và 65% lipid là các axit béo

no hoặc không no. Phân tích thành phần axit béo, loại và lượng photpholipit của màng tế bào *B.ammoniaphilum* ATCC 15354 sinh trưởng trên môi trường rỉ đường mía dưới các điều kiện khác nhau, tỷ số axit béo no/không no, loại và lượng photpholipit thay đổi theo trạng thái tế bào sinh hay không sinh L-AG.

Khi không được thêm chất hoạt động bề mặt POEFE vi khuẩn không có khả năng sinh L-AG ngoại bào. Lúc này thành phần lipid khá cao, chiếm 9,24% trọng lượng màng tế bào. Tỷ số axit béo no (C_{16} , C_{18}) / axit béo không no (C_{18}) là 0,86 (<1); axit photphatidic (có nhiều trong axit béo không no) tăng lên và cardiolipin (có nhiều trong axit béo no) giảm xuống.

Ngược lại khi thêm chất hoạt động bề mặt POEFE với lượng 0,15% vào thời điểm thích hợp trong pha sinh trưởng thì vi khuẩn tích lũy 73,7g/l L-AG. Màng tế bào có thành phần lipid thấp, khoảng 7% trọng lượng màng, thành phần axit béo no tăng lên, axit béo không no giảm xuống và cardiolipin tăng lên. Một điểm nữa là lipid trung tính chiếm gần 47% lipid toàn phần, cao hơn hẳn trường hợp không có POEFE (35%).

Khi lên men L-AG trong môi trường nghèo biotin ta cũng nhận được thành phần màng tế bào và khả năng sinh L-AG tương tự như khi lên men rỉ đường mía có thêm chất hoạt động bề mặt POEFE. Cần nói thêm rằng biotin đóng vai trò quan trọng trong việc tổng hợp axit béo tế bào, chủ yếu là axit oleic và palmitic. Trong đó oleic là thành phần không thể thiếu được của màng tế bào và tham gia quyết định tính thẩm thấu đối với L-AG.

Khi thay POEFE bằng PG tế bào vi khuẩn có khả năng tạo được một lượng lớn L-AG nhưng màng tế bào có thành phần cấu tạo vẫn tương tự như màng tế bào vi khuẩn nuôi trong môi trường giàu biotin. Ví dụ tỷ số axit béo no/không no vẫn <1 và thành phần photpholipit là 3,2mg/g tế bào khô (khi có PG) và 24,5mg/g tế bào khô (khi không có PG). Điều này cho thấy kỹ thêm về cơ chế tác dụng lên cấu trúc màng tế bào của PG không giống của POEFE và ta dễ dàng nhận thấy điều đó khi dùng NaNO_3 để thay đổi áp suất thẩm thấu của môi trường. Trong phạm vi nồng độ NaNO_3 từ 0 ÷ 1,25M, NaNO_3 không hề ảnh hưởng tới khả năng tích lũy L-AG khi có mặt POEFE. Ngược lại đưa một lượng nhỏ NaNO_3 (0,25M) vào môi trường đã làm khả năng sinh L-AG của giống giảm xuống khoảng 15% khi có mặt PG. Như vậy rõ ràng PG chỉ có tác dụng ở áp suất thẩm thấu thấp và mất tác dụng ở áp suất thẩm thấu cao.

1.4. Cơ sở khoa học của sự hình thành L-AG

1.4.1. Từ đường glucoza

Nhiều nhà khoa học đã quan tâm nghiên cứu con đường phân giải glucoza trong lên men L-AG nhờ vi sinh vật. Nhưng kết quả thu được không giống nhau về tỷ lệ % của các con đường

đã tham gia vào việc oxy hoá glucoza. ở *B. flavum* chỉ có 10% được oxy hoá qua con đường hexoza-monophotphat (HMP), số còn lại qua con đường Embden-Mayerhof-Partnas (EMP) cho tới photpho-enolpyruvat và pyruvat.

Oishi và Aida (1965) nghiên cứu tác dụng của biotin lên chu trình EMP và HMP ở vi khuẩn *B. ammoniagenes* No 317-1 bằng kỹ thuật đo hoạt lực phóng xạ của CO_2 từ glucoza có nguyên tử cacbon đánh dấu ở vị trí số 1 và số 6 cho biết, ở môi trường nghèo biotin, 26% glucoza được phân giải qua HMP và 74% qua EMP.

Cùng năm 1965, Otsuka và cộng sự đã nghiên cứu con đường tạo L-AG từ glucoza ở *B. flavum* và *M. glutamicus*. Các tác giả dùng glucoza đánh dấu bằng ^{14}C ở vị trí số 1 và số 6 và thêm arsenit để ức chế sự phân giải tiếp theo của pyruvat. Một mol pyruvat được tạo nên từ 1 mol glucoza kèm theo 1 mol O_2 thu vào và 1 mol CO_2 thải ra. Kết quả cho thấy chỉ có khoảng 15% glucoza được phân giải qua HMP và 85% qua EMP.

Walker và cộng sự cho lên men tạo L-AG từ glucoza đánh dấu bằng ^{13}C tại vị trí C_1 khi lên men bằng vi khuẩn *M. ammoniaphilum*, đo hoạt lực phóng xạ của các chất tạo thành và tính ra tỷ lệ tham gia của các con đường vào việc oxy hoá glucoza các tác giả kết luận: chỉ có khoảng 13% glucoza được oxy hoá qua HMP. Trong thực tế có thể hơn 13% vì một số pentoza được tạo ra dùng cho tổng hợp nucleotit chứ không sản sinh ra pyruvat và phần lớn glucoza được phân giải qua EMP.

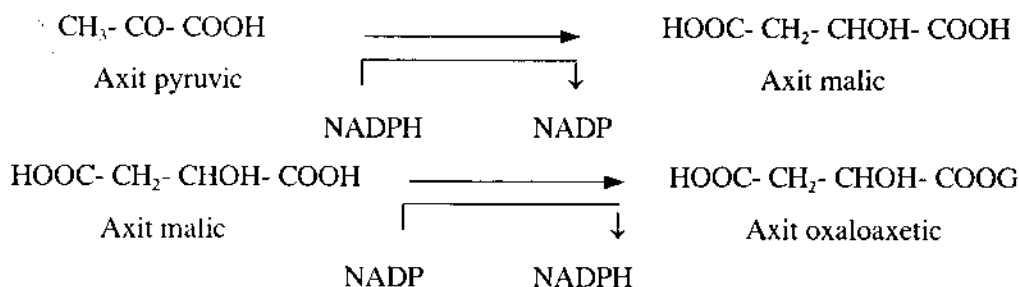
Gần đây, Ishino và cộng sự đã lập lại thí nghiệm kiểu Walker, nhưng dùng chủng *Corynebacterium glutamicum* KY9908 cho sinh L-AG và *Corynebacterium glutamicum* No544 cho sinh lizin và thấy rằng tỷ lệ % giữa HMP và EMP ở vi khuẩn sinh L-AG là 20/80 và ở vi khuẩn sinh lizin là 62/38.

Như vậy mỗi tác giả đưa ra một số liệu về tỷ lệ giữa hai con đường EMP và HMP. Nhưng họ đều thống nhất cao ở một điểm là phần lớn glucoza tiêu hao qua con đường EMP chứ không qua con đường HMP như Kinoshita và cộng sự dự đoán. Trong điều kiện thông khí, glucoza bị oxy hoá thành pyruvat rồi qua chu trình axit tricacboxylic (TAC) tạo nên α -XG khi thiếu NH_4^+ và L-AG khi đủ NH_4^+ . Sự tham gia của cả EMP lẫn HMP thể hiện qua nhiều bằng chứng. Trước hết là sự hoạt động của 2 enzym glucoza-6-phosphat-dehydrogenaza và 6-phospho-gluconat-dehydrogenaza. Cả hai enzym này đều sinh ra NADPH rất cần thiết cho quá trình amin khử α -XG để tạo thành L-AG. Mặt khác trong điều kiện yếm khí các vi khuẩn sinh L-AG phân giải 1 mol glucoza thành 2 mol lactat và 1 mol riboza thành 1,7 mol malat.

Phần lớn các enzym có mặt trong con đường EMP, đặc biệt là photphohexo-kinaza và aldoza đều thấy ở *B. flavum*, các enzym khác như glutamat-dehydrogenaza (GAD), izoxytrat-dehydrogenaza (IXD), l-aspartat, α -xetoglutarat-transaminaza (XGTA) và malat-enzim (ME) có khá nhiều ở dịch chiết tế bào *B. flavum* và *M. glutamicum*. Hai enzym GAD và IXD cũng được tìm thấy ở *Brevibacterium* sp. Hoạt lực của chúng không thay đổi trong suốt quá trình lên men và rất bền với nhiệt độ ở $30 \div 40^{\circ}\text{C}$, thậm chí cả 50°C trong 15^{h} đầu lên men. GAD xúc tác phản ứng thuận nghịch $\text{L-AG} \leftrightarrow \alpha\text{-XG}$. Tốc độ xúc tác của GAD theo chiều nghịch đảo cao gấp 6 lần theo chiều thuận. pH tối ưu của các phản ứng lần lượt là 8 và 9. Điều này hỗ trợ cho việc tích lũy L-AG hơn là phân giải L-AG.

Các tế bào của *M. glutamicus* có thể oxy hoá dễ dàng succinat, fumarat, malat, oxaloaxetat, pyruvat và axetat, nhưng không oxy hoá $\alpha\text{-XG}$. Dịch chiết tế bào của *B. flavum* có aconitaza, ozoxytrat-dehydrogenaza, succinat-dehydrogenaza, fumarat, oxaloaxetat-carboxylaza, xitrat-dehydrogenaza, pyruvat-oxydaza và malat-dehydrogenaza nhưng không chứa $\alpha\text{-XG-dehydrogenaza}$ (XGD). Điều này chứng tỏ sự hoạt động của chu trình TCA trong lên men L-AG. Một điều đáng lưu ý là vi khuẩn sinh L-AG đều không có chứa men phân giải $\alpha\text{-XG}$ và không có khả năng oxy hoá L-AG mặc dù chúng có NADP-glutamat-dehydrogenaza. Có lẽ nhờ vậy mà khả năng siêu tổng hợp L-AG ở các vi khuẩn này được khẳng định.

Trong lên men L-AG, việc glutamic axit gắn CO_2 không cân đối vào pyruvat có ý nghĩa vô cùng quan trọng cho chu trình glyoxylat để cung cấp axit dicarboxylic C_4 rất cần cho việc tổng hợp L-AG và ảnh hưởng mạnh mẽ đến sản lượng cuối cùng của L-AG. Điều này có thể thực hiện được bằng hai phản ứng theo kiểu Ochoa hoặc Wood-Werkman. Phản ứng Ochoa xảy ra dưới tác dụng của malat-enzim và NADPH. CO_2 gắn vào nhóm $-\text{CH}_3$ của pyruvat ($\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$) để tạo thành axit oxaloaxetic ($\text{HOOC-CH}_2\text{-CO-COOH}$)

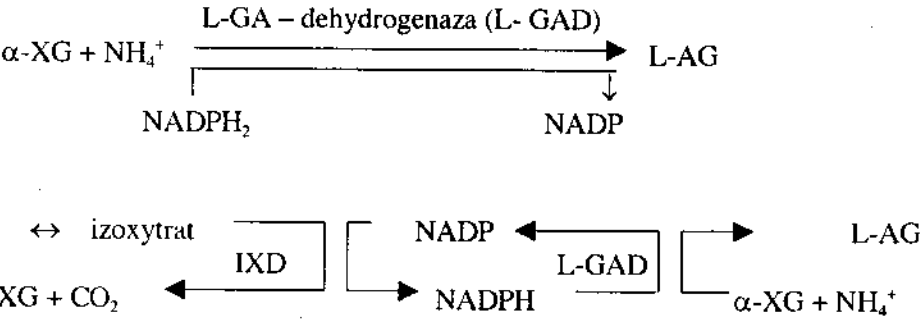


Phản ứng Wood-Werkman xảy ra dưới tác dụng của biotin-enzim. Trước tiên CO_2 tác dụng với biotin-enzim hình thành nên phức CO_2 biotin-enzim. Sau đó phức này tác dụng với axit pyruvic tạo thành axit oxaloaxetic. Trong phản ứng này có sự hỗ trợ đặc lực của ATP. Nghiên

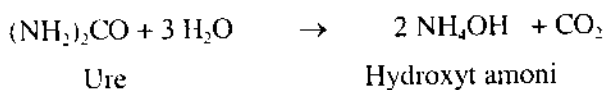
cứu về *B. flavum*, Shiio và cộng sự chỉ rõ CO₂ không chỉ gắn vào pyruvat mà còn gắn cả vào oxaloaxetic lẫn L-malat. Trong đó có vai trò xúc tác của Mn⁺² và NADP.

Người ta biết rằng, *Corynebacterium glutamicum* oxy hoá yếu ớt các axit tricacboxylic là vì có khuyết điểm ở khả năng thẩm thấu của màng tế bào đối với các axit này và thiếu hẳn hệ thống enzym tái oxy hoá NADPH. Nó trao đổi glucoza qua xitrat và tổng hợp L-AG qua amin hoá khử. Sự oxy hoá xitrat ở dịch chiết tế bào chỉ xảy ra khi thêm xanh metylen, một chất oxy hoá. Như vậy xitrat tạo nên ở trong tế bào không bị oxy hoá và không được giải phóng ra khỏi tế bào. Nó tích tụ lại và cuối cùng làm cho sự tự phân tế bào tăng lên. Khi có mặt của NH₄⁺, xitrat bị oxy hoá và amin hoá khử thành L-AG là chất có thể thẩm qua màng ra ngoài môi trường. Hiện tượng tích lũy L-AG có thể coi là cơ chế tự bảo vệ và giải độc xitrat đã bị sản sinh quá mức.

Bước tiếp sau của quá trình tạo axit oxaloaxetic là quá trình tạo α-XG .Việc này diễn ra qua nhiều giai đoạn: Giai đoạn đầu hình thành nên axit axetic hoạt hoá hay axetyl-CoA từ axit pyruvic dưới sự xúc tác của thiamin-pyrophotphat (TPP), axit liponic và coenzim A (CoA. Giai đoạn thứ hai là gắn axit axetic hoạt hoá vào axit oxaloaxetic để tạo thành axit xitric. Giai đoạn thứ ba chuyển axit xitric thành izoxytric nhờ xúc tác của enzym aconitaza. Giai đoạn thứ tư hình thành α-XG qua việc khử CO₂ và H₂ của axit xitric dưới tác dụng của enzym izoxytrat-decacboxylaza (IXDH).Bước cuối cùng của chuỗi phân giải glucoza để tạo thành L-AG là amin hoá khử α-XG nhờ xúc tác của enzym glutamat- dehydrogenaza. Phản ứng này được biểu diễn qua các phương trình:



Muốn cho hệ thống tạo L-AG từ α-XG hoạt động được ngoài L- GAD phải có enzym tranzaminaza (TA) và lượng tối ưu ion NH₄⁺ . Enzim TA đã được tìm thấy ở *B. flavum*, *M.glutamicus* và có lẽ ở các vi khuẩn sinh L-AG khác nữa. Ion NH₄⁺ được cung cấp từ các nguồn nitơ như muối khoáng chứa NH₄⁺, NH₃ , khí hoặc nước và ure. Dưới tác dụng của enzym ureaza, ure bị phân huỷ thành NH₄⁺ và CO₂ theo phương trình:



Người ta nhận thấy ở các vi khuẩn sinh L-AG hai enzym alanin-dehydrogenaza và loxin-dehydrogenaza có vai trò không rõ rệt trong cơ chế thu nhận NH_4 . Các nghiên cứu của Nakanishi và cộng sự cho biết, khi cung cấp dư thừa NH_4^+ thì L-AG biến đổi thành glutamin nhờ phản ứng của enzym glutamin-synthetaza ở pH tối ưu là $5,5 \div 6,5$ và trong cùng điều kiện ấy N-axetyl-L-glutamin cũng được hình thành. Zn^{+2} có vai trò rất lớn. Cùng với kẽm, ion Ni^+ , Cr^+ và Cl^- cũng có tác dụng thúc đẩy việc tạo glutamin. Ngoài ra không có ion nào có tác dụng ấy. Ở điều kiện nồng độ Zn^{+2} tối ưu, dư thừa NH_4^+ và thuận lợi về biotin, quá trình lên men L-AG sẽ chuyển thành quá trình lên men glutamin và hiệu suất sinh glutamin có thể đạt tới 40 g/l nhờ *C. glutamicum* KY9609.

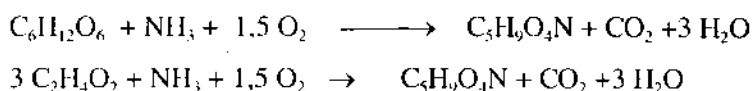
1.4.2. Từ axetat

Người ta thấy nhiều chủng vi khuẩn có thể lên men L-AG từ axetat nhiều đặc điểm khác nhau. Kimura thông báo có thể dùng *M. glutamicus* No560 lên men L-AG từ axetat và xitrat, đồng thời nhấn mạnh về sự tổng hợp cảm ứng một số enzym quan trọng. Các tác giả đi sâu xem xét hiện tượng tế bào nguyên chỉ oxy hoá cơ chất chừng nào trước đó chúng được nuôi dưỡng trên chính cơ chất ấy. Ví dụ chỉ khi cấy trên môi trường chứa xitrat *M. glutamicus* No560 mới có khả năng oxy hoá xitrat. Đối với axetat thì hơi khác một chút. Chỉ khi được nuôi cấy trên glucoza hoặc axetat, *M. glutamicus* mới có khả năng oxy hoá axetat và lên men tạo L-AG từ axetat. Vi khuẩn này oxy hoá axetat nhanh hơn oxy hoá glucoza. Tế bào của chúng chứa lượng IXT vì IXT xuất hiện chậm và khi tiếp xúc với axetat thì mới tăng được về số lượng. Tác giả giải thích, sở dĩ *M. glutamicus* No560 tạo L-AG từ axetat là vì các tế bào vi khuẩn này có chút ít hoạt lực enzym IXT. Enzym này gây nên sự ngừng trệ việc biến đổi xitrat trong chu trình glyoxylat, thay vào đó là chu trình TCA hoạt động tích cực hơn và sinh ra L-AG từ α -XG và NH_4^+ .

Otsuka và cộng sự đã phát hiện một chủng *Micrococcus* khác là *M. glutamicus* No534 không có khả năng sinh L-AG từ axetat nhưng chủng *B. flavum* No2247 thì sinh được một lượng lớn L-AG từ axetat trong môi trường có biotin làm chất sinh trưởng, mặc dù nhu cầu của chúng đối với biotin rất thấp, chỉ bằng 1/10 nhu cầu khi lên men từ glucoza. Sự oxy hoá axetat của *B. flavum* No2247 bị ammoniumfloaxetat ức chế ở nồng độ 0,5M.

Ozaki và Shiio cho biết trong lên men L-AG từ axetat cả hai chu trình glyoxylat và TCA đều hoạt động, nhưng TCA chiếm ưu thế và tạo thuận lợi cho tích lũy L-AG ở *B. flavum* No2247. Kanzaki và cộng sự phát hiện ra một trường hợp đặc biệt: chủng đột biến *B. thiogenitalis* D-248 cần axit oleic cho sinh trưởng và oleic cùng với Cu^{+2} cho tích lũy L-AG từ

axetat. Các tác giả cho biết, khi thiếu Cu^{+2} hoạt lực các enzym của chu trình TCA như photphat-acetyl-tranzferaza, aconitat-hydraza, fumarat-hydraza, xitrat-synthetaza, izoitrat-dehydrogenaza, succinat- dehydrogenaza và malat-dehydrogenaza tăng lên rất nhiều; chỉ số hô hấp Q_{O_2} và hệ thống oxy hoá NADH cũng tăng từ $20 \div 37\%$. Điều này gợi cho ta suy nghĩ về sự điều hoà của Cu^{+2} không trực tiếp qua TCA hay hệ thống sinh tổng hợp L-AG. Hơn thế sự có mặt của Cu^{+2} làm tăng hoạt lực hô hấp và hệ thống chuyển dịch điện tử ở vi sinh vật này và khả năng sinh L-AG của chúng tăng theo khả năng photphoryl hoá hiếu khí. Trong điều kiện bình thường quá trình tạo L-AG từ glucoza và axetat có thể biểu diễn bằng hai phương trình dưới đây:



1.4.3. Từ benzoat

Yamamoto và cộng sự đã nghiên cứu cơ chế lên men tạo L-AG từ benzoat ở *Brevibacterium* sp. No6. Các tác giả cho biết vi khuẩn sinh trưởng trong môi trường này có hoạt lực oxy hoá cao đối với benzoat, catechol và oxy hoá yếu *m*-và *p*-hydroxy-benzoat, protocatechol và genstat. Trong đó các sản phẩm oxy hoá của benzoat lần lượt là catechol, *cis*-muconat và β -xetoadipat tiếp đến là axetat và succinat. Như vậy quá trình tạo L-AG từ benzoat có thể chia làm hai giai đoạn: Giai đoạn một oxy hoá benzoat thành axetat và succinat, giai đoạn hai biến đổi hai axit hữu cơ này thành α -XG và cuối cùng thành L-AG. Giai đoạn sau có lẽ diễn ra tương tự như trường hợp lên men axetat.

1.4.4. Từ *n*-alkan

1.4.4.1. Từ *n*-dodecan

Imada và cộng sự đã tìm hiểu con đường sinh tổng hợp L-AG từ *n*-dodecan ở vi khuẩn *Corynebacterium hydrocycloclastus* S10B và cho biết chủng này rất giàu enzym oxygenaza. Nhờ vậy oxy phân tử từ không khí được kết hợp vào phân tử *n*-dodecan một cách nhanh chóng tạo nên $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_2-^{18}\text{O}-^{18}\text{OH}$ và qua một chuỗi phản ứng tiếp theo hình thành $\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$ và $\text{CH}_3\text{-C}^{18}\text{O-S-CoA}$. Hai hợp chất này cùng đi vào một chu trình khép kín tạo nên L-AG. Do hoạt lực phóng xạ ^{18}O ở phân tử L-AG người ta thấy ^{18}O được gắn vào cả hai nhóm cacboxyl của L-AG với tỷ lệ ngang nhau.

1.4.4.2. Từ *n*-tetradecan

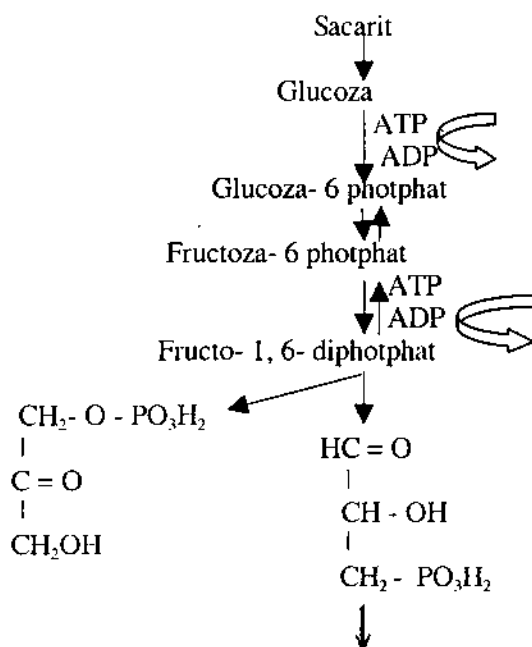
Nhiều vi sinh vật có khả năng sinh trưởng và tích lũy L-AG từ hợp chất này trong môi trường nghèo thiamin và có mặt của Fe^{+2} . Fe^{+2} rất cần cho enzym oxygenaza trong quá trình oxy

hoá *n*-tetradecan thành cồn tạo thuận lợi cho các phản ứng tiếp theo và thiamin cấu tạo nên TPP, một cofactor quan trọng không thể thiếu được trong phản ứng khử CO₂ hiệu khí của pyruvat và α-XG. Nồng độ B₁ trong môi trường quyết định trạng thái sinh hay không sinh L-AG, tức là quyết định hướng trao đổi chất và hình thành các loại sản phẩm. Vi khuẩn S10B1 không có khả năng tổng hợp B₁. Đưa B₁ vào môi trường bù đắp sự thiếu hụt đó. Dưới điều kiện nghèo B₁ (<3 µg/l) hai enzym pyruvic và α-XG không hoạt động được vì thiếu TPP, do đó dẫn tới tích tụ nhiều pyruvic và α-XG thuận lợi cho việc hình thành alanin và L-AG. Trong điều kiện giàu B₁ không xảy ra hiện tượng đình trệ hoạt động của pyruvat và α-XG – dehydrogenaza (AGD) vì rất dồi dào TPP. Do vậy pyruvat và α-XG tiếp tục bị oxy hoá cho tới CO₂ và H₂O mà không đi qua con đường tạo L-AG và analin. Vi khuẩn S10B1 có cả L-AG-dehydrogenaza (AGD) và L-amino-tranzaminaza khi sinh trưởng trên môi trường *n*-alkan. AGD có pH tối ưu ở 8,4; loxin-α-XG-tranzaminaza và L-aspartat-α-XG-tranzaminaza cùng hoạt động tốt ở pH 7,5. Trong đó, loxin-α-XG-tranzaminaza có hoạt lực khá hơn. Có lẽ vì cả L-AG-dehydrogenaza và α-XG-tranzaminaza đều hoạt động mạnh nên dẫn tới tích tụ nhiều L-AG ở trong môi trường. Trong điều kiện tối ưu vi khuẩn *Corynebacterium hydrocycloblastus* S10B1 tạo khá nhiều α-XG, L-AG và DL-alanin từ *n*-Tetradecan.

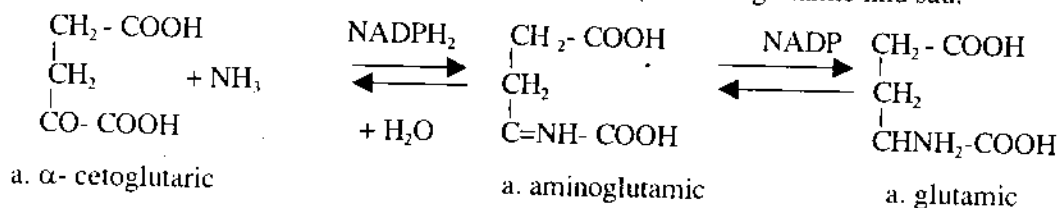
I.5. Cơ chế tạo axit glutamic của chủng *Micrococcus glutamicus*

Sơ đồ sinh tổng hợp axit glutamic và các aminoaxit khác từ môi trường nuôi cấy vi khuẩn tạo chủ yếu axit glutamic:

I.5.1. Từ nguồn cacbon là sacarit theo chu kỳ Embden- Mayerhaf



Tất cả các loại sacarit đều cho ta sản phẩm phản ứng là axit α -cetoglutaric. Từ đó trong môi trường có nguồn N thì xảy ra phản ứng bởi các men để tạo ra axit glutamic như sau:

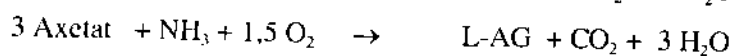
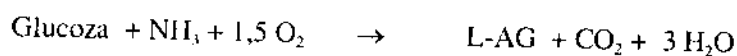


Ngoài ra một số axit amin khác cũng được tạo thành từ các sản phẩm trung gian của quá trình phân huỷ đường và là sản phẩm phụ của dung dịch lên men.

1.5.2. Các sản phẩm của quá trình lên men L-AG

1.5.2.1. Sản phẩm chính

Phương trình tổng quát của quá trình tạo L-AG từ glucoza hay axetat và NH_3 được biểu diễn như sau :



Theo phương trình này thì sản phẩm chính là L-AG và CO_2 . Trong đó chỉ có L-AG là được quan tâm vì ý nghĩa kinh tế lớn lao của nó. Ở đây theo lý thuyết, hiệu suất chuyển hoá (HSCH) glucoza hay axetat thành L-AG đều là 81,66%. Thực tế nghiên cứu và sản xuất chưa bao giờ đạt được giá trị này phần vì cơ chất còn dư lại trong môi trường, phần vì phải dùng cho tăng sinh khối và tạo các sản phẩm không mong muốn ngoài L-AG. Theo Kinoshita và cộng sự, HSCH có thể chấp nhận được khi đưa phương pháp lên men L-AG từ glucoza vào sản xuất công nghiệp là 30%. Ngày nay, tùy theo điều kiện sản xuất và phương tiện quá trình lên men người ta đã đạt được HSCH đường thành L-AG là 45 ÷ 50 % trong sản xuất và 55 ÷ 57% giống tự nhiên hay 61 ÷ 62% từ giống đột biến trong nghiên cứu ở phòng thí nghiệm. Như vậy so với HSCH lý thuyết, HSCH thực tế ở phòng thí nghiệm mới đạt được 76% từ glucoza và 70% từ benzoat. Người ta đang tìm mọi biện pháp để rút ngắn khoảng cách giữa HSCH lý thuyết và HSCH thực tế.

1.5.2.2. Sản phẩm phụ

1.5.2.2.1. Axit lactic

Trong điều kiện tối ưu, L-AG sinh ra là chủ yếu. Nếu chệch khỏi điều kiện này thì *Corynebacterium glutamicum* sẽ tạo axit lactic thay vì tạo L-AG. Có hai lý do cơ bản dẫn tới tình trạng này, hoặc là quá dư thừa biotin hoặc là quá ít oxy hoà tan. Đôi khi sự thay đổi nhiệt độ

đốt ngọt từ 30 đến 37 °C cũng dẫn tới việc biến quá trình lên men L-AG thành quá trình lên men axit lactic như đã xảy ra với *B. divaricatum*.

1.5.2.2.2. Axit succinic

Tương tự như axit lactic, axit succinic được sinh ra với số lượng lớn khi cung cấp thừa biotin hoặc cung cấp ít oxy hoà tan, đặc biệt nhiều khi vừa thừa biotin vừa thiếu oxy hoà tan. Nguồn gốc của sự tích tụ axit succinic là do axit fumaric bị khử bởi coenzim NADH là chất cho hydro. Vì vậy cần phải cung cấp đủ oxy hoà tan và giới hạn nồng độ biotin để phản ứng vừa nói ít có cơ hội diễn ra.

1.5.2.2.3. Axit α -xetoglutaric

Mọi quá trình sinh tổng hợp đều có phản ứng tạo L-AG từ α -XG nhờ xúc tác của hai hệ thống enzym transaminaza và L-AG – dehydrogenaza. Phản ứng này thực hiện được hoàn toàn khi môi trường có dư NH_4^+ và pH từ trung tính đến kiềm yếu. Nếu môi trường thiếu NH_4^+ và pH ở phạm vi axit yếu thì phản ứng trên không thực hiện được. Kết quả là α -XG bị tích tụ ngày một nhiều trong môi trường thay vì L-AG. Người ta thấy α -XG được hình thành chủ yếu từ axit xitric và trong tế bào dưới điều kiện hạn chế nồng độ biotin và NH_4^+ rồi mới thải ra ngoài môi trường. Trong trường hợp lên men L-AG từ *n*-alkan nhờ chủng *Corynebacterium hydrocycloclastus* S10B1 α -XG sinh ra nhiều nhờ hạn chế nồng độ B_1 của môi trường. Việc này gây nên thiếu hụt TPP cần cho hoạt động của enzym, xitrat-decarboxylaza, hạn chế izoxytrat đi vào chu trình glyoxylat, thúc đẩy izoxytrat đi vào chu trình TCA và sản sinh ra α -XG.

1.5.2.2.4. Glutamin và sản phẩm khác

Người ta nhận thấy trong tất cả các quá trình lên men sản xuất L-AG đều có glutamin (GM), L-acetylglutamin (L-AGM), alanin và aspartic ở trong dịch men với số lượng khác nhau tùy thuộc vào loại giống và điều kiện nuôi dưỡng chúng hoặc thay đổi cấu tạo môi trường đều có thể chuyển quá trình sản xuất L-AG thành quá trình sản xuất glutamin nhờ cùng một giống.

Trong điều kiện bình thường glutamin được tổng hợp nên nhờ enzym glutamin-synthetaza. Enzym này hoạt động tốt ở pH axit và không bị kìm hãm bởi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở nồng độ cao. Một loại enzym khác cũng xúc tác quá trình tạo glutamin, đó là glutaminaza. Nhưng enzym này hoạt động tốt ở pH kiềm và ở nồng độ thấp của $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nhưng bị kìm hãm bởi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ở nồng độ cao. Nakanishi và cộng sự cho biết chủng *Corynebacterium glutamicum*.

KY9609 sinh lượng lớn GM và L-AGM bên cạnh L-AG dưới điều kiện môi trường có nồng độ biotin, NH_4Cl và ion Zn^{+2} thích hợp. Ở đây cả GM lẫn L-AGM đều tăng lên và L-AG giảm xuống khi môi trường có pH axit yếu sau giai đoạn sinh trưởng. Nếu dùng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ với

nồng độ 4% làm nguồn cung cấp NH_3 ngoài ure thì lượng glutamin sinh ra bằng lượng L-AG. Nếu thay $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bằng NH_4Cl với cùng nồng độ thì lượng GM sinh ra áp đảo lượng L-AG và quá trình lên men L-AG hoàn toàn chuyển thành quá trình lên men GM. Hiệu suất lên men GM càng tăng cao khi môi trường được thêm ion Zn^{+2} hoặc Zn^{+2} cùng với Ni^{+2} và Cr^{+6} với nồng độ thích hợp và có thể đạt tới 40g từ 133g glucoza (HSCH là 30%).

Yoshihaza, và cộng sự phát hiện ra rằng nếu thêm vào môi trường một trong bốn chất MG, DMG, TMG và HETMA và đặc biệt thêm cả chất thải stephen, một sản phẩm phụ ở các công đoạn sản xuất đường từ củ cải đường, thì hiệu suất lên men các axit amin và 5-inosinic tăng lên rất nhiều và có thể sản xuất cả L-AG lẫn GM nhờ cùng một chủng *C. acetoacidophilum* ATCC 13870 [224]. Gần đây, Tsuchida và cộng sự đã tạo được giống *B. flavum* AJ 12418 hoặc *C. acetoacidophilum* AJ 12419 bền vững với các dipeptit (tyrosin-glutamic hoặc alanin-glutamic) có khả năng tổng hợp một lượng lớn GM khi có mặt của một trong bốn dipeptit nói trên. Suzuki và cộng sự đã tìm thấy sự có mặt của trehaloza và glucoza trong dịch men của chủng *Athrobacter parafineus* sinh trưởng trong môi trường *n*-parafin $\text{C}_{13}\text{-C}_{21}$ khi được thêm PG vào giai đoạn đầu của quá trình sinh trưởng. Ở đây tổng lượng đường tăng liên tục theo thời gian lên men nhưng đường khử glucoza tăng rất ít. Như vậy số còn lại là đường không có tính khử, đường trehaloza.

Suzuki và cộng sự cho biết việc bổ sung Cu^{+2} vào môi trường với lượng 1,26 mg/l và bổ sung PG vào giai đoạn đầu sinh trưởng của *Athrobacter parafineus* KY 4303 trên môi trường parafin $\text{C}_{13}\text{-C}_{21}$ làm tăng tích lũy L-AG theo thời gian. Gần đây, Yoshii, H. và cộng sự đã thông báo rằng có thể điều tiết sự tích lũy trehaloza để làm tăng sản lượng L-AG trong lên men.

Okazaki và cộng sự đã khẳng định có tới $35 \div 45\%$ axit oleic đưa vào môi trường đã được *B. thioenitalis* No 653, một thể đột biến vốn đòi hỏi axit oleic cho sinh trưởng và tích lũy L-AG, lợi dụng để tạo thành hợp chất đường - lipid.

Nakao và cộng sự cho biết nếu thêm PG hoặc cephaloridin vào các tế bào *C. alkanolyticum* No 314 sinh trưởng trên *n*-parafin thì sẽ gây nên sự tích tụ đồng thời ba sản phẩm photpholipit, dẫn xuất *N*-acetyl-hexoamin, (một hợp chất trung gian tạo nên thành tế bào) và L-AG trong đó giữa L-AG và photpholipit ngoại bào có mối tương quan chặt chẽ: L-AG tỉ lệ thuận với photpholipit ngoại bào. Kikuchi và cộng sự nghiên cứu tiếp vấn đề này và xác nhận các axit béo $\text{C}_{14}\text{-C}_{18}$ cũng được tích tụ ngoại bào cùng với photpholipit; thành phần cấu tạo của photpholipit ngoại bào và nội bào đều giống nhau. Việc tích lũy *N*-acetyl hexozamin ngoại bào có liên quan với bản chất của chất kháng sinh đưa vào tế bào. Tất cả các kháng sinh ức chế tổng hợp màng tế bào đều thúc đẩy việc bài tiết các chất cấu tạo nên tế bào vào trong môi trường. Trong số 7 kháng sinh đem thử D-cycloserin có tác dụng mạnh nhất. *N*-acetyl hexozamin là

những sản phẩm trung gian cấu tạo nên thành tế bào. Người ta biết hợp chất này bao gồm ba thành phần là axit *N*-acetylmuramic, *N*-acetylhexozaminuronic và *N*-acetylglucosamin .

1.5.2.3. Sự chệch hướng tạo sản phẩm chính

Trong điều kiện bình thường sản phẩm chính của mọi quá trình sinh tổng hợp L-AG là L-AG và CO₂ như đã nói ở trên. Nhưng khi thay đổi điều kiện lên men thì sản phẩm chính không phải là L-AG mà là các sản phẩm khác.

Takamura và cộng sự cho biết thay đổi lượng cao nấm men và cao ngô giữ cho nồng độ photphat vô cơ trong môi trường ở phạm vi trên dưới 0,0129% sẽ làm cho vi khuẩn *Acetobacter aerogenes* không sản sinh L-AG mà sản sinh valin với số lượng lớn. Asaki và cộng sự khẳng định có thể hạn chế nồng độ photphat vô cơ bằng cách thêm 6-mercaptapurin để cho quá trình lên men L-AG ở vi khuẩn trên chuyển thành quá trình lên men valin. Kinoshita S. và cộng sự đã gây đột biến các giống sinh L-AG tạo ra giống mới có thể sinh lizin ở môi trường giàu biotin.

Nara và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng của PG lên việc chuyển sản phẩm chính ở các chủng sinh homoserin, lizin hay valin và thấy rằng nếu thêm 4 đv/ml PG vào giờ thứ 7 ÷ 9 sau khi bắt đầu lên men nhờ chủng sinh homoserin *M. glutamicus* 534 - Co147 thì quá trình lên men homoserin sẽ chuyển thành quá trình lên men L-AG. Hiện tượng tương tự cũng xảy ra đối với giống sinh lizin và valin. Các giống này tích lũy L-AG thay vì lizin hay valin khi được thêm PG với lượng và thời điểm như đã nói ở trên .

Gần đây, Shiratsuchi và cộng sự đề xuất một quy trình lên men mới biến quá trình lên men lizin thành quá trình lên men cả lizin lẫn L-AG. Nguyên tắc của phương pháp này rất đơn giản: các tác giả sử dụng giống sinh lizin lên men trong môi trường giàu biotin kết hợp bổ sung chất hoạt động bề mặt hoặc PG (tương tự khi lên men bằng giống sinh L-AG) và điều bất ngờ đã xảy ra: cả lizin và L-AG đều được tích tụ với số lượng lớn tới mức có thể áp dụng tốt trên quy mô công nghiệp. Phương pháp mới đã mang lại hiệu quả trên 2 phương diện. Một là tổng lượng lizin và L-AG sinh ra đều nhiều gấp 1,3 ÷ 1,45 lần phương pháp cũ, hai là pH môi trường ít bị thay đổi nhờ sự kết hợp giữa lizin (mang tính kiềm) và L-AG (mang tính axit).

1.6. Các phương pháp vận hành quy trình lên men L-AG

1.6.1. Phương pháp lên men

1.6.1.1. Phương pháp lên men gián đoạn

Dựa vào chế độ cung ứng cơ chất người ta chia lên men gián đoạn thành hai loại: Lên men gián đoạn không bổ sung cơ chất và lên men gián đoạn có bổ sung cơ chất. Ở phương pháp thứ nhất, người ta cho toàn bộ cơ chất và hoá chất cần dùng một lần ngay từ ban đầu vào các

thiết bị lên men. Chỉ có NH_3 , dầu phá bột hay các chất “kháng” biotin như PG và các chất hoạt động bề mặt là được bổ sung theo nhu cầu trong quá trình lên men. Lượng môi trường ban đầu thường chiếm 60 ÷ 65% thể tích thùng. Khoảng trống còn lại của thùng dành cho bọt hoạt động. Nếu lên men trong bình lắc thì thay đổi lượng môi trường để có lượng oxy hoà tan lớn nhất thích hợp cho sinh tổng hợp L-AG của mỗi loại dưới điều kiện lắc nhất định. Phương pháp này thích hợp đối với cơ chất ít có tác dụng ức chế vi sinh vật ở nồng độ 10 ÷ 12% như các loại đường chẳng hạn. Ở phương pháp thứ hai, người ta không cho toàn bộ cơ chất vào thiết bị lên men ngay từ đầu mà chia làm hai khối: Khối nhỏ ($\approx 15 \div 20\%$) cùng các hoá chất được đưa vào môi trường ban đầu, khối lớn còn lại ($\approx 80 \div 85\%$) được bổ sung dần trong quá trình lên men. Phương pháp này đặc biệt thích hợp đối với các loại cơ chất có khả năng ức chế sự phát triển của các loại vi sinh vật ở nồng độ cao như cồn, axit hữu cơ và *n*-parafin. Tuy vậy lên men trong môi trường ri đường người ta cũng áp dụng phương pháp lên men gián đoạn có bổ sung cơ chất. Lượng môi trường ban đầu chiếm 40 ÷ 45% thể tích hữu dụng của thiết bị. Thể tích còn lại dành cho khối lượng cơ chất và nguồn NH_3 bổ sung sau này.

Khi lên men trong bình lắc hoặc thiết bị nhỏ cơ chất và các hoá chất cần dùng được thanh trùng chung hay riêng cho từng loại sau hỗn hợp lại trước khi tiếp giống lên men. Khi lên men trong các thiết bị lớn ở quy mô sản xuất các hoá chất cần dùng được thanh trùng gián đoạn ở từng thiết bị riêng biệt sau đó phối trộn lại theo tỷ lệ cần dùng. Cơ chất được thanh trùng liên tục theo chế độ nhiệt độ thấp thời gian dài hay nhiệt độ cao thời gian ngắn và được đưa vào môi trường theo tính chất của từng phương pháp lên men. Tỷ lệ giống tiếp vào môi trường thường là 1 ÷ 5% ở phương pháp không bổ sung cơ chất và 15 ÷ 16% ở phương pháp có bổ sung cơ chất.

Các thùng lên men được trang bị cánh khuấy để khuấy trộn môi trường. Không khí trước khi đưa vào môi trường được xử lý vô trùng một cách nghiêm ngặt và khống chế ở mức có hệ số oxy hoà tan phù hợp với yêu cầu của từng giống ứng với chế độ khuấy nhất định để có hiệu suất sinh L-AG cao nhất.

1.6.1.2. Phương pháp lên men liên tục

Người ta phân biệt nhiều loại hình lên men liên tục tùy theo tính chất của hệ thống thiết bị và trạng thái tế bào tự do hay cố định trong chất mang. Wu Wy và Wu, W.T. cho biết có thể lên men liên tục L-AG bằng chủng *B. divaricatum* trong thiết bị hình ống đảo trộn nhờ sức nâng của không khí. Gebrike và cộng sự so sánh hiệu quả lên men L-AG của phương pháp lên men liên tục hai hoặc một giai đoạn với lên men gián đoạn thông thường và chỉ ra rằng hiệu suất lên men L-AG đạt cao nhất ở phương pháp 2 giai đoạn, trung bình ở một giai đoạn và thấp nhất ở

lên men gián đoạn. Tuy vậy lên men liên tục kiểu này được áp dụng vào thực tế có lẽ vì khó đảm bảo vô trùng trong quá trình lên men.

Đã có nhiều thông báo về lên men L-AG theo phương pháp cố định tế bào. Ngay từ năm 1973 Slowinski và cộng sự đã tiến hành lên men L-AG-gián đoạn trong bình lắc bằng *C. glutamicum* MB-1382 cố định trong gel polyacrylamit và đạt được khoảng 15g L-AG trong một lít môi trường sau 144 giờ lên men.

Constantinides và cộng sự đã cố định tế bào *B. flavum* trong collagen, tiến hành lên men L-AG theo phương pháp gián đoạn và nhận thấy rằng phương pháp này có nhiều nhược điểm, hiệu suất lên men chỉ đạt không quá 9 g/l. Các tác giả đã cải tiến phương pháp định hình chất mang tự tạo hạt theo phương pháp thông thường sang tạo màng collagen thấm định ở pH 7,0 cuộn tròn các màng này đưa axit vào thùng lên men kiểu ống và tiến hành lên men liên tục trong 5 ÷ 10 ngày. Kết quả đưa lại khá khả quan.

Henkel và cộng sự đã cố định tế bào *C. glutamicum* ATCC 13058 trong thủy tinh xốp và tiến hành lên men liên tục L-AG ở thiết bị kiểu FBR đạt được tốc độ sinh L-AG là 0,3 g/l.h (ở thùng khuấy lên men gián đoạn là 0,33g/l.h).

Amini và cộng sự đã khảo sát động thái lên men L-AG nhờ *C. glutamicum* cố định trong chất mang để ở bình phản ứng và nhận thấy các axit lactic, succinic, alanin và aspartic được tạo nên sớm trong lên men và trong pha sinh L-AG. Trong khi axit gluconic, α -XG và prolin được sinh ra sau và trong pha tổng hợp L-AG; tốc độ chuyển dịch oxy trong lên men có tác dụng tới hiệu suất lên men L-AG. Dưới điều kiện tối ưu hiệu suất lên men L-AG đạt tới 58,5 g/l và hiệu suất chuyển hoá đạt 74,6% so với lý thuyết; tốc độ tạo L-AG là 6 g/l.h.

Amin cố định tế bào *C. glutamicum* trong bột polyurethan và tiến hành lên men liên tục trong thùng khuấy kiểu đứng. Tác giả xác nhận tốc độ khuấy, tốc độ chuyển dịch oxy và tốc độ pha loãng có ảnh hưởng đến hiệu suất lên men L-AG; khi lên men dài ngày biotin và PG được tích tụ lại ở bên trong tế bào; nồng độ của các chất này cần phải khống chế ở mức tối ưu cho hoạt động lâu dài của dây chuyền.

1.6.2. Lên men trong môi trường nghèo biotin không bổ sung cơ chất dưới điều kiện bình thường

Nguyên tắc phương pháp: Lên men trong môi trường nghèo biotin không bổ sung cơ chất dưới điều kiện bình thường có nghĩa là quá trình lên men được tiến hành ở điều kiện tối ưu nhất về nhiệt độ, pH, lượng gió, thành phần môi trường, lượng giống và nồng độ. NH_3 trong dịch. Không bổ sung cơ chất nghĩa là đường được đưa vào ban đầu với toàn bộ lượng cần thiết do đó,

lượng dịch đưa vào ban đầu cũng phải đạt trị số tối đa cho phép, thường là chiếm $60 \div 70\%$ thể tích thiết bị lên men.

Khống chế các điều kiện kỹ thuật: Khi sử dụng *Corynebacterium* phải chú ý tới đặc điểm sinh lý và nhu cầu dinh dưỡng của nó mà để ra các điều kiện kỹ thuật cần khống chế nghiêm ngặt để diễn biến lên men xảy ra theo ý muốn. Những điều kiện kỹ thuật đó là: thành phần và tỷ lệ môi trường, điều kiện khử trùng môi trường: pH đầu tiên, trạng thái sinh lý và chất lượng giống cấp I, nhiệt độ lên men, cường độ thông gió, tính chất vô trùng trong lên men, kỹ thuật phá bọt... Nếu các điều kiện trên được khống chế tốt thì diễn biến lên men (OD, RG, L-AG) bao giờ cũng xảy ra theo quy luật và đạt hiệu quả kinh tế cao.

Môi trường: Nói chung sử dụng *Corynebacterium* ta có thể dùng cao ngô hay rỉ đường mía kết hợp với thiamin và đạm thủy phân làm nguồn cung cấp biotin, thiamin và đạm axit amin. Nhưng dù dùng nguyên liệu nào đi chăng nữa cũng phải đảm bảo yêu cầu về biotin, thiamin là $2,5\gamma/\text{lít}$ biotin, $150\gamma/\text{lít}$ thiamin và một số axit amin chủ yếu như xystein hay xystin, loxin, histidin và phenylalanin hoặc tyrosin hoặc tryptophan. Trong đó cần chú ý rằng xystin và xystein có thể thay thế cho nhau, nhưng xystin có hiệu ứng mạnh hơn là xystein. Sử dụng một trong những axit amin thơm kể trên và loxin, tirosin, xystin hay xystein có thể thay thế được cả hỗn hợp 21 axit amin thường có keo mỳ hay casein.

Nồng độ đường ban đầu thường từ $10 \div 14\%$. Đó là đường glucoza thủy phân từ tinh bột ngô, khoai, sắn, mỳ, dịch đường phải có nồng độ glucoza cao, ít nhất cũng phải đạt trên 90% tổng lượng hydrat cacbon. Nếu trong dịch đường ít glucoza, nhiều maltoza hay dextrin thì lên men sẽ chậm và hiệu suất chuyển hoá đường thành L-AG thấp. Dịch đường không được lẫn than hoạt tính, chứa ít sắt và muối ăn. Hàm lượng cho phép là $\text{Fe}^3 < 50\gamma/\text{ml}$ và $\text{NaCl} < 0,4\%$.

Ure ban đầu phải khống chế ở tỷ lệ $1,7 \div 1,8\%$. Cho ure nhiều hơn tỷ lệ này sẽ tác hại lớn. Tổng lượng ure đưa vào khoảng $3 \div 3,6\%$. Nồng độ ure ban đầu thấp quá cũng có hại.

Ion kali được cho với lượng cần thiết, thường là $0,017\%$. Ion photphat cho dưới dạng muối photphat Na_2HPO_4 ($0,17 \div 0,20\%$), K_2HPO_4 ($0,12 \div 0,15\%$) hay $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ ($0,08 \div 0,1\%$). Nếu nồng độ K_2HPO_4 cao hơn $0,25\%$ sẽ làm đường hao nhanh và L-AG tạo ít.

Môi trường có thể thanh trùng theo phương pháp gián đoạn hoặc liên tục. Thanh trùng theo phương pháp nào cũng phải đảm bảo hiệu quả diệt trùng tối đa và không làm ảnh hưởng tới chất lượng môi trường. Nếu thanh trùng theo phương pháp gián đoạn tại nổi cỡ $5000 \div 6000$ lít thì để ở nhiệt độ 115°C trong 15 phút và khống chế thời gian tăng nhiệt tới 113°C và giảm nhiệt

tới 60°C không quá 30 phút là tốt. Nếu thanh trùng theo phương pháp liên tục thì thời gian giải nhiệt ở 110°C + 115°C dài nhất là 15 phút.

pH môi trường ban đầu phải là $6,7 \pm 6,9$. Trường hợp pH ban đầu dưới 6,2 hay trên 7,5 đều làm cho quá trình lên men diễn ra bất thường.

Giống vi sinh vật: Giống được nuôi dưỡng trong bình tam giác 1000 ml, bảo quản trong tủ lạnh 5°C trong 24 giờ chờ kết quả kiểm tra vô trùng. Sau đó tiếp vào giống cấp II, nuôi dưỡng 9 ÷ 10 giờ rồi tiếp ngay vào lên men. Tỷ lệ giống tiếp vào lên men là $0,5 \div 2,0\%$, tùy theo nồng độ tế bào trong dịch giống là 10 g/l thì chỉ cần $0,5 \div 1\%$ là đủ. Cho nên khi dùng môi trường nhân giống giàu đường và nhiều biotin (4% glucoza, 5 γ/l biotin) ta chỉ cần nổi nhân giống cấp II có dung tích hữu dụng 140 lít cũng đủ giống tiếp vào 35 000 lít môi trường lên men.

Tiêu chuẩn quan trọng nhất đối với giống cấp II là thuần khiết, đủ sinh khối không bị tác dụng nhiệt và đang ở thời kỳ sinh sản logarit. Sau khi đạt tiêu chuẩn về sinh khối, xem xét các tiêu chuẩn khác, tiếp ngay sang lên men, không bảo áp ở áp lực trên 2 kG/cm² trong thời gian lâu ở nhiệt độ thường. Vì làm như vậy sẽ làm thay đổi diễn biến quá trình lên men bình thường. Nếu phải chờ môi trường hay vì lý do nào đó phải bảo áp giữ giống thì phải bảo áp ở áp suất $p \leq 2 \text{ kG/cm}^2$ và nhiệt độ $5 \div 10^\circ\text{C}$, nhưng không quá $5 \div 8$ giờ.

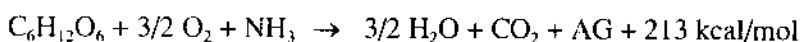
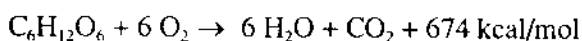
Thông gió và khuấy: Khuấy làm môi trường đồng đều, thay đổi nồng độ sản phẩm trao đổi chất trên màng tế bào vi khuẩn và làm tăng độ hoà tan của oxy vào môi trường. Thông gió để cung cấp oxy cho vi sinh vật và đuổi CO₂ ra khỏi dịch men. Giữa khuấy và thông gió có mối liên hệ mật thiết ảnh hưởng tới tốc độ hoà tan oxy. Đối với nổi lên men nhỏ 5000 ÷ 6500 lít người ta để tốc độ khuấy 175 ÷ 200 vg/ph, đối với 50 ÷ 65 m³ tốc độ khuấy là 110 vg/ph, tỷ lệ thông gió là 1: 0,15 ÷ 0,11 v/v.ph (thể tích môi trường/thể tích không khí trong một phút). Nếu giữ nguyên cường độ thông gió mà thấy tốc độ khuấy hay giữ nguyên tốc độ khuấy mà thay đổi cường độ thông gió thì ảnh hưởng tới lượng oxy hoà tan, tác hại lớn cho sản xuất. Thường thì ứng với mỗi thiết bị nhất định đã có tốc độ khuấy nhất định. Nhưng do quá trình vận hành, giây curoa bị dẫn ra làm cho tốc độ khuấy giảm, do vậy tỷ lệ oxy hoà tan ít mặc dầu lượng gió đưa vào là không đổi. Một nguyên nhân khác, làm khuấy chậm là số lượng đai curoa không đủ hay cho cánh khuấy tước bin quay ngược. Cả hai hiện tượng vừa nói trên đều làm giảm oxy hoà tan. Trong thực tế, ta điều chỉnh cường độ thông gió bằng cách lấy tay vận van không khí vào và ra, điều chỉnh sao cho có lượng gió nhất định đi qua dịch lên men. Việc này không phải bao giờ cũng thực hiện được theo ý muốn, áp suất không khí nên không phải cố định mà thay đổi luôn luôn tùy theo lượng dùng trong mỗi thời gian ở cả nhà máy. Cho nên lượng gió thổi qua dịch men không giá trị cố định mà dao động theo hình sin với chu kỳ phụ thuộc vào sự thay đổi áp lực khí

nén và sự điều chỉnh van gió. Trong sản xuất thường gặp hiện tượng oxy hoà tan hơn là thừa oxy hoà tan.

Như ở phần trên đã phân tích về nhu cầu oxy của vi khuẩn trong suốt giai đoạn sinh trưởng và giai đoạn sản xuất cũng như đặc điểm tế bào sống dưới điều kiện thông gió khác nhau. Nói chung ở giai đoạn sinh sản vi khuẩn có thể cung cấp đủ hay thiếu oxy, ở giai đoạn sản xuất phải cung cấp đủ hay thừa oxy thì hiệu quả lên men không thay đổi nhiều. Song nếu làm ngược lại thì hậu quả xảy ra không lường được, bởi vì vi khuẩn nuôi dưới điều kiện sinh sản thừa oxy thì hầu như không có khả năng tạo AG. Bởi thế cần đặc biệt chú trọng điều chỉnh lượng gió sao cho phù hợp với từng giai đoạn và để dễ dàng khống chế công nghệ người ta thông gió với tỷ lệ trung bình để không ảnh hưởng tới đặc tính tế bào, nhằm tạo ra lượng AG cao nhất.

Nhiệt độ: Trong quá trình nuôi dưỡng nhiệt độ môi trường lên men tăng lên do ba nguyên nhân: nhiệt cơ học, nhiệt hô hấp và nhiệt lên men. Trong đó nhiệt cơ học do khuấy trộn sinh ra là không đáng kể, quan trọng nhất là nhiệt hô hấp và nhiệt lên men.

Ta biết quá trình hô hấp và lên men ở trong tế bào giải phóng nhiều năng lượng như sẽ chỉ rõ ở hai phương trình dưới đây:



Như vậy để oxy hoá hoàn toàn 1 kg glucoza tạo thành H_2O và CO_2 thì giải phóng 3744 kcal và tạo ra L-AG thì giải phóng 1183 kcal. Cho nên nếu trong 1 giờ trung bình nồng độ đường giảm 0,5% (175 kg ở nồi 35 000 lít dịch hay 17,5 kg ở nồi 3 500 lít dịch) thì lượng nhiệt toả ra ở nồi lớn là 655 200 kcal và nồi nhỏ là 65 520 kcal (nếu oxy hoá hoàn toàn thành H_2O và CO_2) và 204 025 kcal hay 20 402 kcal (nếu oxy hoá thành glutamic). Nếu 50% số đường tiêu hao để tạo AG còn 50% nữa tiêu hao do hô hấp thì trong mỗi giờ lượng nhiệt toả ra là 429 612 kcal ở nồi lớn và 42 961 ở nồi nhỏ. Lượng nhiệt đó đủ làm cho nhiệt độ môi trường tăng lên khoảng $12^\circ C$ nếu ta khống chế không cho nhiệt tải đi theo bất kỳ hình thức nào. Trong thực tế nhiệt nồi lên men không tăng đến nỗi ghê gớm như vậy mặc dù không có nước làm lạnh. Nguyên nhân của vấn đề này là ở chỗ, dù không có nước làm lạnh thì nhiệt sinh ra vẫn được tải đi do môi trường trao đổi nhiệt với không khí thổi qua và qua bức xạ nhiệt của vỏ thiết bị. Cũng cần nhấn mạnh rằng tỷ lệ đường tiêu hao cho hô hấp và tạo AG không phải luôn có trị số không đổi. Ban đầu giống sinh sản nhiều, đường tiêu hao chủ yếu cho quá trình hô hấp nên nhiệt toả ra nhiều, nhiệt độ của môi trường tăng lên dữ dội. Khi vi sinh vật tạo L-AG thì nhiệt sinh ra ít hơn nên nhiệt độ môi trường tăng lên nhưng không nhanh như giai đoạn đầu. Tới thời kỳ sản xuất vi

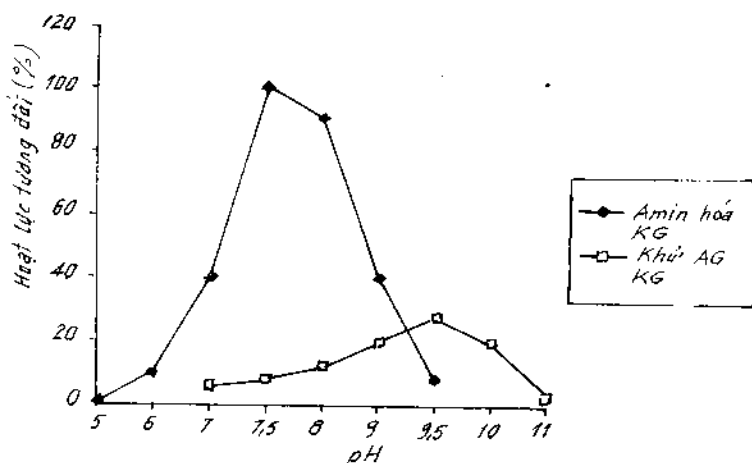
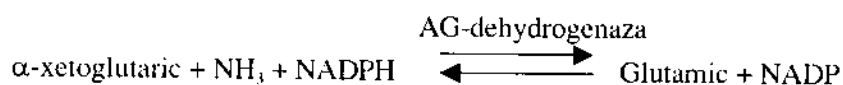
khuẩn sinh AG là chủ yếu thì nhiệt độ môi trường tăng lên lại ít hơn so với các thời gian về trước. Trong thực tế mất nước làm lạnh thì cứ 10 phút thì nhiệt độ môi trường lại tăng lên 1°C . Cần điều khiển sao cho nhiệt độ ở giai đoạn sinh sản là $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ là thích hợp nhất. ở giai đoạn sản sinh L-AG, nhiệt độ cần là $34 \div 35^{\circ}\text{C}$ nhưng cũng có thể lên đến $37 \div 38^{\circ}\text{C}$ vẫn không ảnh hưởng lớn tới sản lượng AG cuối cùng.

Phá bọt: Trong quá trình lên men, môi trường sinh ra rất nhiều bọt. Độ nhớt của môi trường càng cao, bọt càng quánh, càng khó phá. Người ta dùng dầu lạc, dầu hướng dương hay dầu khoáng để phá bọt. Các loại dầu này như con dao hai lưỡi, vừa có hại lại vừa có lợi. Dùng ít dầu với kỹ thuật phá bọt tốt sẽ có lợi. Kỹ thuật phá bọt kém, phải dùng nhiều sẽ làm quá trình lên men bị ảnh hưởng. Chỉ khi nào bọt bắn tung toé lên mặt kính mới cho một chút dầu cho xẹp bọt xuống. Chú ý cùng lượng dầu tiêu hao, ta chia làm nhiều lần để phá thì hiệu quả hơn là chia làm ít lần. Tổng lượng dầu đem dùng không được vượt quá 1% so với dịch men. Người ta cần bố trí những thiết bị tự động để phá bọt. Dầu gây tác hại nhiều nhất ở giai đoạn sinh trưởng. Bởi thế cần hết sức tiết kiệm dầu ở thời kỳ này. Đã cho nhiều dầu vào giai đoạn đầu lên men thì khó lòng còn hy vọng đạt kết quả tốt.

pH trong quá trình lên men: Vi sinh vật sinh sản nhờ các quá trình trao đổi chất. Sản phẩm chủ yếu của các vi khuẩn sinh L-AG tiết ra môi trường là các axit hữu cơ và axit amin, trong đó có succinic, α -xetoglutaric, glutamic, alanin, các sản phẩm này sinh ra càng nhiều thì pH môi trường càng giảm. Song pH chỉ giảm xuống tới $5 \div 5,5$ là dừng lại bởi vì pH này ức chế mọi hoạt động của vi khuẩn sinh L-AG.

Hoạt lực men ureaza ở vi khuẩn sinh L-AG khá mạnh. Nó phân huỷ ure thành NH_3 và CO_2 . NH_3 trung hoà các axit hữu cơ và các axit amin làm cho pH môi trường hiện ở dạng kiềm yếu chừng nào NH_3 vẫn còn dư. Nhưng vi sinh vật phải lợi dụng NH_3 để tổng hợp L-AG và protit tế bào cho nên nồng độ NH_3 sẽ tăng tới mức nào đó rồi sẽ giảm. Nếu không bổ sung thêm NH_3 dưới dạng ure thì pH môi trường tiếp tục giảm cho tới khi vi khuẩn ngừng tiết axit amin và axit hữu cơ ra ngoài. Cần khống chế pH môi trường ở trong khoảng nhất định, từ $7 \div 7,5$ là tốt. Điều này có lý do chính đáng của nó, liên quan tới mọi hoạt động sống của tế bào vi khuẩn sinh L-AG và hoạt tính của các enzym, đặc biệt là men L-AG-dehydrogenaza (hình 4.1).

Ta biết rằng, mọi biến đổi nhịp nhàng trong tế bào sống gắn liền với hoạt động của hệ men hô hấp và hệ men tổng hợp L-AG. ở phần cơ chế đã trình bày rõ, vi khuẩn biến đổi glucoza theo nhiều cách để thành α -xetoglutaric và từ đây nhờ quá trình amin hoá khử với NH_3 mà tạo thành axit glutamic. Phản ứng hoá học này được biểu diễn dưới phương trình sau:



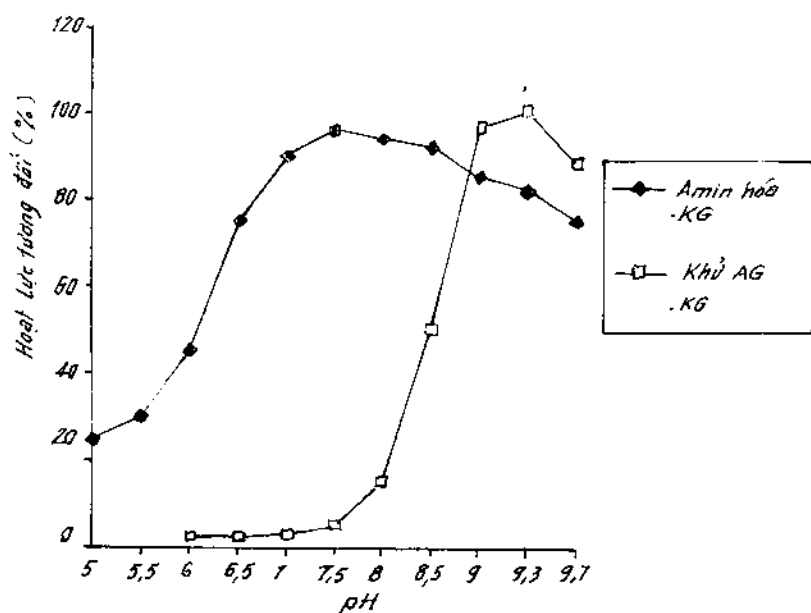
Hình 4.1. Ảnh hưởng của pH lên hoạt lực glutanat-dehydrogenaza.

Phản ứng thuận nghịch trên, dưới xúc tác của enzym glutamic-dehydrogenaza, phụ thuộc rất nhiều vào pH và nhiệt độ của môi trường. Theo Grevovich, pH tối ưu cho phản ứng tạo L-AG là 7,5. Khi nghiên cứu về bản chất tác dụng của glutamat-dehydrogenaza, E.L. Winnaker và H.A. Backer đã thấy rằng pH tối ưu cho phản ứng thuận (biến α -KG thành L-AG) là 7,5 và cho phản ứng nghịch (biến L-AG thành α -KG) là 9,5. H. Singu và cộng sự cũng đã thu được kết quả tương tự. Khi nghiên cứu men glutamat-dehydrogenaza ở vi khuẩn *Brevibacterium sp.*, các tác giả này thấy rằng hoạt lực enzym này không thay đổi theo thời gian lên men, lớn gấp hàng ngàn lần hoạt lực của các enzym khác và điều quan trọng nữa là tốc độ phản ứng thuận cao gấp 6 lần tốc độ phản ứng nghịch. pH tế bào chuyển dần từ axit (pH = 6,3 ÷ 6,6) sang trung tính (pH = 6,9 ÷ 7,0) khi tế bào chuyển từ sinh sản sang tạo L-AG. (hình 4.1; 4.2)

Do sự khác nhau về pH tối ưu kể trên ta cần phải tạo pH thích hợp cho phản ứng tạo L-AG, tăng tốc độ phản ứng này làm lợi cho sản xuất cho nên bổ sung ure (nguồn NH_3) sao cho pH dịch men luôn ở khoảng 7,5 và nói chung toàn bộ lượng ure cần dùng nên đưa vào môi trường trước giờ thứ 24 của quá trình lên men.

Các đường cong cơ bản: Khi mọi điều kiện kỹ thuật đã được khống chế nghiêm ngặt đúng theo yêu cầu để ra và quá trình lên men không bị nhiễm trùng thì sự phát triển sinh khối, tốc độ hao đường, tốc độ tạo L-AG bao giờ cũng biến thiên theo quy luật ổn định. Theo dõi hàng trăm mẻ lên men sản xuất ở các hệ lên men khác nhau ta đều thấy các đường cong có dạng như

hình 4.1. Qua hình này ta thấy vi sinh vật phát triển khá nhanh trong môi trường glucoza: Ngay từ giờ thứ năm đã bắt đầu vào giai đoạn phát triển logarit để rồi đến giờ 16÷20 bước vào giai đoạn cân bằng và từ đó OD không thay đổi nữa. *Corynebacterium* tạo L-AG khá sớm với tốc độ khá nhanh và không đổi suốt từ giờ thứ 12 đến giờ thứ 28, sau đó có chậm dần cho tới khi trong môi trường không còn đường nữa. Song song với việc phát triển sinh khối và tạo L-AG, đường (RG) cũng hao chậm ở 9 giờ đầu, sau đó hao nhanh để đến giờ 30 trở đi đường hao chậm dần và dừng hẳn khi còn khoảng 1%. Giao điểm đường cong RG và L-AG tương ứng với giờ thứ 21÷22 của quá trình lên men. Nếu nồng độ đường ban đầu là 11,5% thì diễn biến đường cong RG và L-AG cũng tương tự như ở môi trường có nồng độ đường cao, nhưng nồng độ L-AG cuối cùng của dịch men thấp hơn nồng độ L-AG cuối cùng của môi trường đường nồng độ cao.

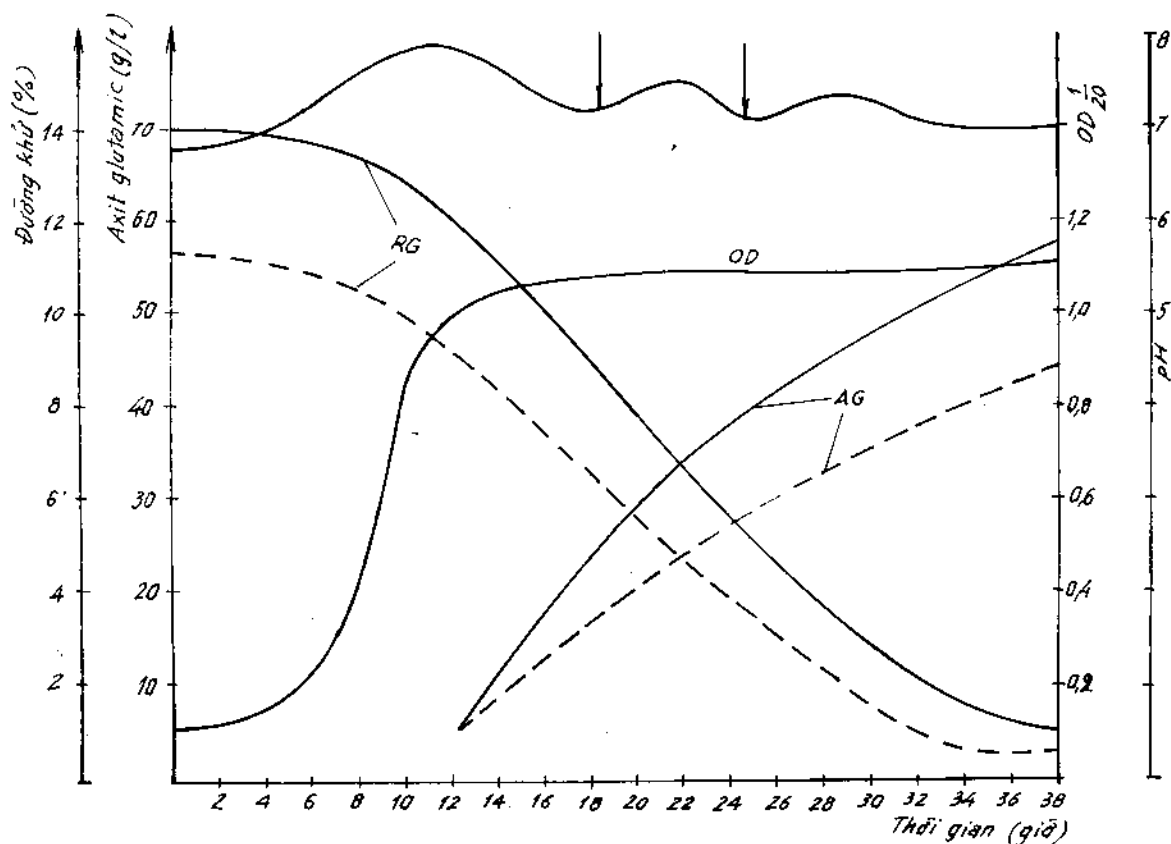


Hình 4.2. Ảnh hưởng của pH lên hoạt lực men L-AG-dehydrogenaza ở *Brevibacterium sp* (theo H. Slingu và cộng sự, 1971).

pH môi trường sau khi tiếp giống tăng dần theo thời gian nuôi dưỡng đạt tới giá trị cực đại pH = 7,5 ÷ 8,0 ở giờ 12 và giảm dần xuống 7,2 ÷ 7,3 ở giờ 23 ÷ 25. Ở đây tiếp thêm ure pH tăng lên rồi lại giảm cho tới khi đường còn khoảng 1% và L-AG không tạo nữa thì lại tăng lên hay giữ nguyên với giá trị nào đó. Như vậy là giữa độ biến thiên pH cuối cùng, nồng độ đường cuối cùng và hàm lượng L-AG sinh ra cuối cùng có mối liên hệ chặt chẽ, căn cứ vào mối liên hệ đó để kết thúc lên men cho đúng lúc.

Khi nồng độ L-AG trong dịch không tăng nữa thì quá trình lên men đã kết thúc. Nếu không có số liệu về L-AG thì có thể căn cứ vào đường còn lại và sự biến đổi pH dịch men mà kết thúc lên men. Khi đường còn dưới 1%, pH đang giảm bỗng tăng lên hay dừng lại không giảm nữa thì việc tạo L-AG cũng không xảy ra nữa và có thể kết thúc lên men.

Nguyên nhân của hiện tượng pH đang giảm bỗng dừng lại hay tăng lên chủ yếu là do việc tạo L-AG dừng lại. Ở đây nếu còn ure, men ureaza phân huỷ ure thành NH_3 , và NH_3 không được sử dụng để tạo L-AG hay protein tế bào thì tồn tại ở trong dịch làm pH dịch men tăng lên. Nếu ure đã dùng hết thì không còn nguồn tạo NH_3 nữa, số NH_3 còn dư sẽ không bị sử dụng tiếp nên môi trường có pH không đổi.



Hình 4.3. Diễn biến các đường cong cơ bản trong men ở môi trường nghèo biotin không bổ sung cơ chất bằng chủng *Conynebacterium*.

1.6.3. Lên men dưới điều kiện nghèo amoniac

Nguyên lý phương pháp: Có nhiều quan niệm khác nhau về vai trò của NH_3 trong sinh tổng hợp L-AG từ glucoza. Điều rõ ràng nhất là NH_3 cung cấp nitơ cho vi sinh vật tổng hợp

protit tế bào, axit glutamic, duy trì pH môi trường ở giá trị nhất định. Một số tác giả cho rằng cần phải có NH_3 với nồng độ cao thì việc tích lũy L-AG mới được tốt vì NH_3 có tác dụng quan trọng trong sự thẩm thấu tế bào, tạo điều kiện thuận lợi cho L-AG thoát ra ngoài màng tế bào vi khuẩn. Có tác giả cho rằng NH_3 không có quan hệ đến sự thẩm thấu tế bào. Ngoài chức năng chính là cung cấp nitơ và nhóm NH_2 cho quá trình sinh tổng hợp, NH_3 chỉ đóng vai trò trung hoà axit hữu cơ và axit amin, duy trì pH ở phạm vi có lợi cho sự hoạt động của vi sinh vật. Đương nhiên cần phải có một nồng độ NH_3 giới hạn nào đó để cho phản ứng amin hoá khử xảy ra được hoàn toàn, tức là nồng độ NH_3 tức thời phải lớn gấp nhiều lần nồng độ α -xetoglutaric.

Nếu không có đủ NH_3 thì chuỗi phản ứng từ pyruvic $\rightarrow \alpha$ -XG $\rightarrow$ glutamic không thể luôn xảy ra theo chiều thuận, dẫn tới việc ứ đọng pyruvic và hậu quả là việc tạo ra axit lactic từ pyruvic. Kết quả thực nghiệm cũng đã xác minh điều vừa nói ở trên.

Nếu cho *Corynebacterium* lên men trong môi trường có 12% glucoza, có nồng độ ure ban đầu là 1,8% và bổ sung lượng ure khác nhau từ 0,2 + 1,2% khi pH giảm xuống 7,2 và dùng CaCO_3 hoặc Na_2CO_3 để điều chỉnh pH và giữ pH ở phạm vi 7,5 thì lượng L-AG, axit lactic, aspartic sinh ra phụ thuộc vào tổng lượng ure đem dùng (bảng 36; 37).

Bảng 36. Ảnh hưởng của tổng lượng ure trong môi trường đến chất lượng dịch men của *Corynebacterium* khi có mặt CaCO_3 với lượng 2%

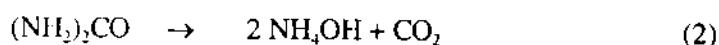
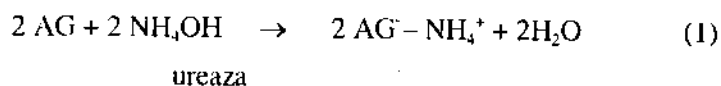
Tổng số ure (%)	Thành phần hoá học của dịch men giờ 44					
	pH	α -KG	lactic	aspartic	AG (g/l)	NH_4^+ (g/l)
3,0	8,0	-	-	-	48,6	8,0
2,4	6,8	-	-	-	54,6	5,42
2,2	6,6	+	-	+	53,4	3,20
2,0	6,5	++	++	++	47,2	2,89
1,8	6,4	+++	+++	+++	47,2	1,97

Bảng 37. Ảnh hưởng tổng cộng của ure đưa vào môi trường đến nồng độ L-AG sinh ra dùng chủng *Corynebacterium* khi có mặt Na_2CO_3 với lượng 0,8 + 1,4%

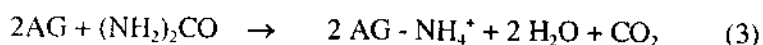
Tổng số ure (%)	Tổng số Na_2CO_3 (%)	Nồng độ L-AG trong dịch (g/l)		
		Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3
3,0	-	50,0	50,5	49,9
2,2	0,8 - 1,0	55,4	53,2	54,0
2,0	1,2 - 1,4	51,6	49,1	49,2

Các số liệu trên cho thấy có thể dùng Na_2CO_3 và CaCO_3 thay thế chức năng của NH_3 để trung hoà axit hữu cơ và axit amin. Lượng dùng của hai loại hoá chất này phụ thuộc vào nồng độ của axit hữu cơ và axit amin, chủ yếu là axit glutamic sinh ra. Trong trường hợp các thí nghiệm trên là 0,2% CaCO_3 và 0,8 ÷ 1% Na_2CO_3 . Có một nồng độ tối hạn của NH_3 trong môi trường không chế bởi tổng lượng ure đưa vào để cho phản ứng tạo L-AG xảy ra được hoàn toàn. Trong các thí nghiệm trên, tổng lượng ure đưa vào phải là 2,2% và nồng độ NH_4^+ trong môi trường phải lớn hơn 3,2 g/l. Nếu tổng lượng ure ít hơn 2,2% thì L-AG sinh ra ít, thay thế vào đó là α -KG, lactic và aspartic mà chủ yếu là lactic. Việc dùng CaCO_3 và Na_2CO_3 vào mục đích trung hoà làm cho sinh men có hàm lượng ion NH_4^+ thấp dưới 5 g/l cho phép ta sử dụng trực tiếp dịch men để sản xuất mỳ chính dưới dạng nước, nếu thêm NaCl ta được “nước chấm mì chính”.

Tiến hành lên men: Tính toán lượng ure có thể thay thế được bằng CaCO_3 và Na_2CO_3 . Vì pH môi trường nuôi cấy giảm chủ yếu do AG sinh ra do vậy ta tính lượng NH_4^+ cần dùng để trung hoà AG thành amoni glutat sẽ được gần đúng về số lượng ure có thể thay thế được. Phản ứng trung hoà L-AG và phân giải ure như sau:



Cộng (1) với (2) ta được phương trình:



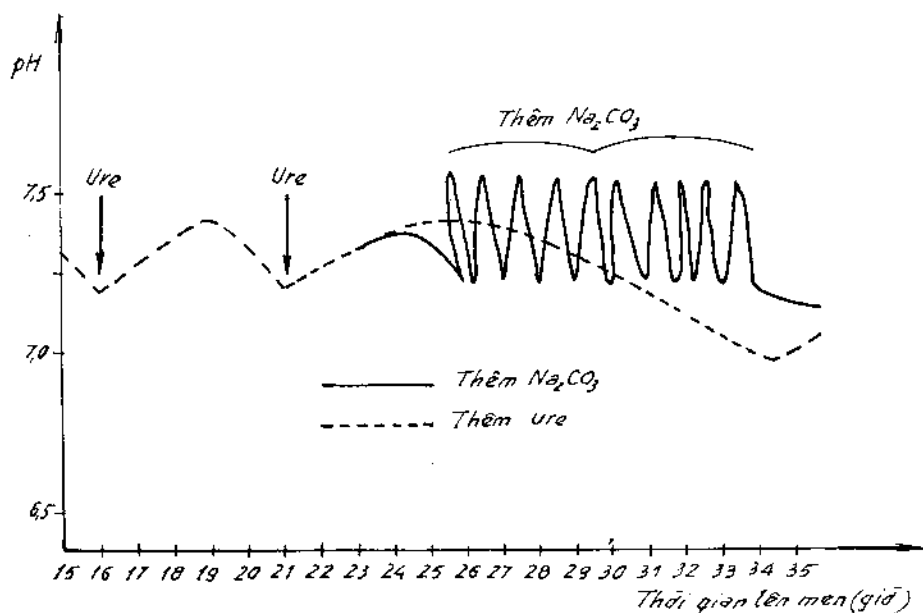
Giả thiết rằng trong môi trường có 5% L-AG, dựa vào phương trình (3) ta tính sẽ được lượng ure X tối đa cần cho trung hoà hết L-AG đó:

$$X = \frac{60 \times 5}{294} = 1,02 [\%]$$

Mặt khác trong dịch quả phải có nồng độ dư NH_4^+ nhất định để không ảnh hưởng đến tạo L-AG, lượng đó được xác định ít nhất là 0,197%. Lượng ure Y cung cấp 0,197% NH_4^+ được tính theo phương trình:

$$Y = \frac{0,197 \times 60}{36} = \frac{11,82}{36} = 0,33\%$$

Như vậy nếu chú ý tới lượng NH_4^+ dư cần có trong dịch thì lượng ure có thể thay thế được bằng Na_2CO_3 là: 1,02% - 0,33% = 0,69%.



Hình 4.4. Diễn biến pH trong quá trình lên men trong môi trường nghèo biotin không bổ sung cơ chất bằng corynebacterium khi giàu và nghèo Na_2CO_3 .

Nói một cách khác, không phải dùng CaCO_3 , Na_2CO_3 để trung hoà toàn bộ L-AG sinh ra mà chỉ được phép trung hoà tới khoảng 65% số L-AG sinh ra mà thôi. Thời điểm bổ sung Na_2CO_3 lần đầu có thể xê dịch tùy theo lên men diễn ra nhanh hay chậm song nói chung phải chờ tới khi pH giảm và nồng độ đường chỉ còn ít hơn 3% mới được phép bổ sung lần đầu. Trường hợp điều kiện trên chưa đạt thì phải cho thêm lượng ure nào đó bởi vì có thể do sai số phân tích hoặc do lượng nền tổng ure đưa xit vào còn chưa đủ 2,2% so với dịch.

1.6.4. Lên men trong môi trường giàu biotin

1.6.4.1. Kỹ thuật điều khiển sinh khối trong môi trường giàu biotin

Ta biết rằng các giống sinh L-AG sinh trưởng trên môi trường giàu biotin có khả năng tích lũy L-AG ngoại bào. Ở đây vi khuẩn liên tục hấp thụ biotin, liên tục phân cắt và tăng lên về khối lượng và chỉ dừng lại chừng nào trong môi trường không còn nguồn cacbon nữa. Muốn cho các giống sinh L-AG có khả năng tạo L-AG trên môi trường giàu biotin phải sử dụng các chất kháng biotin như đã nêu ở phần trên. Các chất đó khác nhau về thành phần và cấu tạo hóa học, khác nhau về cơ chế tác dụng nhưng giống nhau ở một điểm cơ bản là làm hạn chế tác hại của

biotin dư tạo nên màng tế bào vi khuẩn có đặc tính như vi khuẩn sinh trưởng trên môi trường nghèo biotin, cho phép L-AG nội bào dễ dàng thoát ra ngoài môi trường.

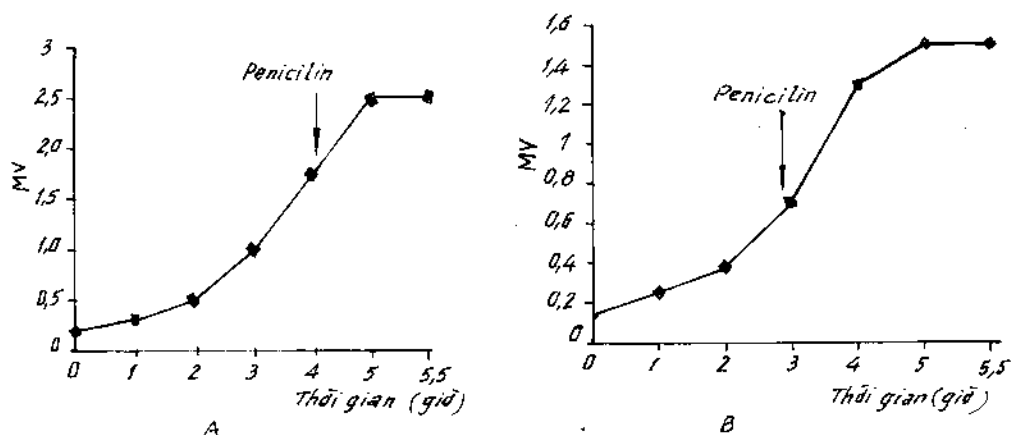
Cấu trúc các loại màng tế bào như vậy được quyết định bởi kỹ thuật sử dụng các chất kháng biotin. Kỹ thuật đó phải dựa vào đặc tính của từng loại giống và từng loại chất kháng biotin. Đối với mỗi loại giống nhất định, liều lượng, thời điểm bổ sung, số lần bổ sung có ý nghĩa quyết định. ở điều kiện thích hợp, giống sinh ra có giá trị ổn định về khối lượng và tính chất đáp ứng nhu cầu tạo nhiều axit glutamic ở ngoài tế bào.

Muốn cho *Brevibacterium lactofermentum* sinh trưởng trên môi trường $20 \div 500 \gamma/\text{lít}$ biotin có khả năng tạo nhiều axit glutamic nhất thì phải cho Tween 60 vào lúc mà OD dịch lên men = 0,21 (pha loãng 26 lần, đo ở $\lambda 562 \mu\text{m}$) và tới số lượng ít nhất là 0,1% trở lên. Trong trường hợp này dịch men giờ kết thúc có OD = 0,4 và hàm lượng axit glutamic là 50 g/l (theo Takinami và cộng sự).

Lẽ dĩ nhiên cũng có thể dùng penicilin với liều lượng và thời điểm thích hợp để đạt được kết quả trên. Trong thực tế sản xuất, người ta thường bổ sung penicilin làm nhiều lần, trong đó lần đầu là quan trọng nhất. Lượng penicilin bổ sung lần đầu, nhiều ít khác nhau tùy theo từng loại giống, nhưng thông thường cho đến lượng $4 \div 5 \text{ đv/ml}$ môi trường là đủ. Thời điểm bổ sung penicilin lần đầu sớm hay muộn cũng tùy thuộc vào từng loại giống. Nhưng nói chung thường ở giai đoạn đầu của thời kỳ phát triển logarit, nếu tỉ lệ giống tiếp ít hay ở giai đoạn giữa của thời kỳ phát triển logarit nếu tỉ lệ giống tiếp nhiều. Để tiện lợi theo dõi trong sản xuất người ta thường căn cứ vào sự phát triển sinh khối tế bào (OD hay MV) để quyết định thời điểm thêm lần đầu. Cần nhớ rằng sau khi thêm penicilin lần đầu, sinh khối vẫn tiếp tục tăng lên gấp rưỡi hay gấp đôi sinh khối lúc mới tiếp penicilin vào. Nếu giống tiếp vào lên men phát triển chậm, thời kỳ tiềm phát kéo dài thì phải thêm penicilin vào đầu thời kỳ sinh sản logarit. Ngược lại nếu giống sinh sản sớm thời kỳ làm quen ngắn thì cho penicilin vào giờ thứ $3 \div 4$. Hai đồ thị hình 4.5 cho thấy hai ảnh hưởng bổ sung penicilin ở hai giống khác nhau. Đối với *M-glutamin*, cho penicilin lần đầu vào giờ thứ 4 khi MV=1,8. Đối với *Brevibacterium devaricatum* cho lần đầu vào giờ thứ 3 khi MV= 0,7. Sau khi thêm, MV còn tăng lên được gấp 1,4 lần (ở M-glutamic) hay 2 lần ở *B. devaricatum*.

Do có sự tăng sinh khối sau lần thêm penicilin lần thứ nhất, người ta phải tiến hành tiếp penicilin lần thứ hai và các lần khác nữa nếu cần. Lượng penicilin tiếp lần 2 bằng nửa lượng tiếp lần đầu, tức là 2 đv/ml môi trường. Penicilin thêm lần 2 vào lúc mà MV đạt giá trị cực đại sau $2 \div 3$ giờ vẫn không giảm. Thường chỉ cần thêm hai lần là đủ, nhưng có loại giống cần phải thêm đều đặn trong quá trình lên men với khoảng thời gian cách nhau $5 \div 10$ giờ. Có hai quan niệm về

bổ sung penicilin lần hai và các lần về sau. Bổ sung theo cách phòng ngừa tức là cứ sau khoảng thời gian nhất định nào đó lại thêm một ít penicilin để phòng vi khuẩn tiếp tục phát triển. Theo cách này, khi thấy MV tăng thì cho penicilin vào. Cách này tiết kiệm được penicilin nhưng phải hết sức thận trọng, cho đúng lúc mới đạt kết quả tốt.



Hình 4.5. Thời điểm bổ sung penicilin lần đầu cho M-glutamic (A) và Brev-devaricatum (B).

Như vậy kỹ thuật lên men trong môi trường giàu biotin tự trung lại là kỹ thuật sử dụng các chất kháng biotin để điều khiển quá trình sinh trưởng của tế bào sao cho đủ về số lượng và tốt về cấu trúc màng tế bào, làm cho L-AG tích lũy được dễ thải ra ngoài môi trường. Còn các mặt kỹ thuật khác như điều kiện pH, thông gió, phá bọt và khống chế nhiệt độ cũng tương tự như ở lên men trong môi trường nghèo biotin có hay không bổ sung cơ chất.

1.6.4.2. Kỹ thuật lên men bổ sung cơ chất

Khác với kỹ thuật lên men không bổ sung cơ chất, kỹ thuật lên men bổ sung cơ chất mang lại hiệu quả lớn về mặt kinh tế: tiết kiệm hóa chất, hơi điện, nước, thiết bị và nồng độ L-AG trong dịch cao, thuận lợi cho thu hồi. Khi áp dụng phương pháp lên men bổ sung cơ chất cần quán triệt mấy vấn đề cơ bản sau:

- ♦ Tạo ra lượng giống lớn trong thời gian ngắn.
- ♦ Giữ nồng độ đường thấp trong suốt thời gian lên men .

- ♦ Thay đổi cường độ thông gió cho phù hợp với yêu cầu ở từng giai đoạn .

- ♦ Ổn định pH môi trường trong phạm vi tối ưu cho tạo L-AG nhưng không để tồn tại lượng lớn ure ở bất cứ thời điểm nào.

Đó là những vấn đề kỹ thuật có tính nguyên tắc phải đảm bảo đủ lên men có bổ sung cơ chất trong môi trường nghèo hay giàu biotin.

1.6.4.3. Lên men bổ sung cơ chất trong môi trường giàu biotin

Phương pháp tạo giống nồng độ cao trong thời gian ngắn: khi lên men trong môi trường nghèo biotin không bổ sung cơ chất, người ta tiếp giống vào lên men với tỉ lệ 0,5 ÷ 2%. Lượng giống đó sinh trưởng từ từ và đạt trị số cực đại vào giờ thứ 20 ÷ 24. Khoảng thời gian này quá dài so với tổng số thời gian lên men là 38 ÷ 40 giờ. Trong lên men bổ sung cơ chất ta muốn trong vòng 5 ÷ 6 giờ đầu giống phải đạt trị số cực đại để từ đó trở đi giống vẫn làm nhiệm vụ sinh L-AG, tức là nếu chu kỳ lên men là 38 giờ thì thời gian chuyên tạo L-AG của giống sẽ là 32 giờ. Đó là khoảng thời gian rất quý cho phép giống sinh L-AG tạo trên 70 g/l AG trong dịch. Muốn có lượng giống lớn trong thời gian ngắn, phải tiến hành mấy biện pháp sau:

➤ Dùng giống đang có sức sống tốt: Như ta đã biết khi chuyển từ môi trường này sang môi trường khác bất kỳ vi sinh vật nào cũng có thời gian làm quen. Thời kỳ này dài hay ngắn tùy thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có trạng thái sinh lý của giống. Nếu lấy giống đang sinh sản logarit ở môi trường này tiếp sang môi trường khác có cùng nhiệt độ và đầy đủ nhu cầu dinh dưỡng thì giống sẽ tiếp tục sinh trưởng. Thời kỳ làm quen sẽ rất ngắn. Lợi dụng đặc điểm này, trong kỹ thuật lên men, người ta bố trí kế hoạch sát sao, để kết thúc nuôi dưỡng ở giai đoạn này, chuyển ngay giống sang nuôi dưỡng ở công đoạn khác có cùng nhiệt độ .

➤ Tiếp giống với tỉ lệ cao: ở đây phải tiến hành nhân giống nhiều cấp, chẳng hạn 3 cấp, mới có đủ giống tiếp vào lên men. Người ta thường áp dụng tỉ lệ 10 ÷ 15% tính theo thể tích dịch giống / thể tích môi trường. Ví dụ, để có giống tiếp vào lên men ở nồi 60 m³ với tỉ lệ 15% người ta bố trí thiết bị như sau:

Công đoạn sản xuất	Cấp I	Cấp II	Cấp III	Lên men
Dung tích thiết bị (lít)	6	600	6000	60 000
Thể tích môi trường sau tiếp giống (lít)	1,3	375	375	25 000
Tỉ lệ giống (%)	-	0,4	10,0	15,0

Áp dụng chế độ nhân giống nhiều cấp không lợi lắm vì tổn thất bị, môi trường và nhất là tăng cơ hội nhiễm trùng.

➤Tạo giống bão hòa biotin: Một trong những đặc tính của vi khuẩn sinh L-AG là khi nuôi trong môi trường biotin nó sẽ hấp thụ biotin tới mức bão hòa. Nồng độ biotin tế bào giảm mỗi khi phân cắt và tế bào con lại hấp thụ biotin nếu như trong môi trường còn biotin. Những tế bào như vậy luôn ở tư thế sẵn sàng phân cắt ngay cả trong trường hợp môi trường không có biotin.

Dựa vào đặc tính này ta có thể dùng giống tỉ lệ thấp với các tế bào bão hòa biotin. Làm theo cách này có thể bỏ được một giai đoạn nhân giống ngoài sản xuất, lúc đó sơ đồ bố trí thiết bị sẽ là: Muốn có nồng độ giống cao mà thiết bị nuôi dưỡng bé ta có thể nâng cao thành phần dinh dưỡng và các chất sinh trưởng, đặc biệt là biotin.

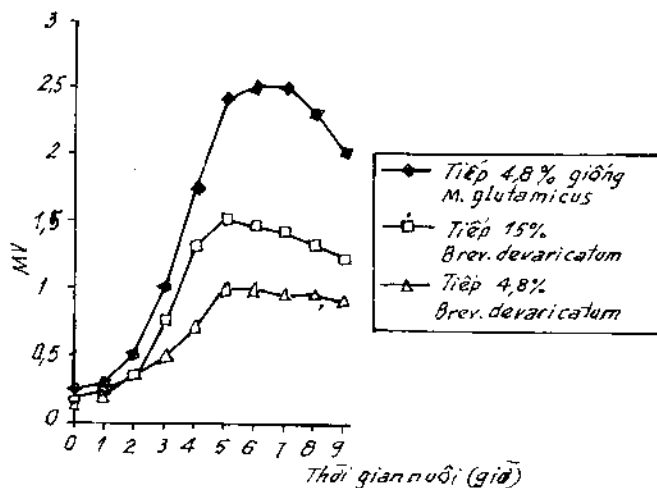
Công đoạn sản xuất	Cấp I	Cấp II	Lên men
Dung tích thiết bị (lít)	6	200	50 000
Thể tích môi trường sau tiếp giống (lít)	1,2	1 200	25 000
Tỉ lệ giống (%)	-	0,10	4,8

Kết quả nghiên cứu cũng như thực tiễn sản xuất cho thấy tiếp giống tỉ lệ cao mà sinh khối thấp cũng như tiếp giống tỉ lệ thấp mà sinh khối cao vẫn cho ta thời gian đạt tới nồng độ sinh khối cực đại giống nhau, thường là sau 5 giờ (hình 4.6).

Như vậy là áp dụng đồng thời các biện pháp đã mô tả trên ta tạo ra được lượng giống lớn trong thời gian ngắn. Lượng giống đó đã sẵn sàng ở trạng thái tạo L-AG, nếu ta dùng các chất kháng biotin để không chế sinh khối và điều chỉnh việc tổng hợp photpholipit màng tế bào (xem phần trên).

➤Giữ nồng độ đường thấp trong quá trình lên men: Sinh trưởng trong môi trường nồng độ thấp vi khuẩn dễ phát triển và lợi dụng triệt để đường để tạo sinh khối và L-AG. Bởi thế trong lên men bổ sung cơ chất người ta cho đường ban đầu tương đối thấp, từ 5 ÷ 7,5%. Khi sinh sản vi khuẩn lợi dụng đường, nên nồng độ đường dư giảm nhanh chóng tới 1,5%. Lúc này sinh khối đã đạt tới giá trị cực đại và chuyển sang tạo L-AG. Dùng đường bổ sung để nồng độ tăng lên. Tùy theo loại giống và tác dụng ức chế của cơ chất mà nâng cao nồng độ cơ chất tới mức có lợi cho tạo L-AG và không ảnh hưởng tới hoạt động của vi khuẩn. Đối với đường glucoza hay

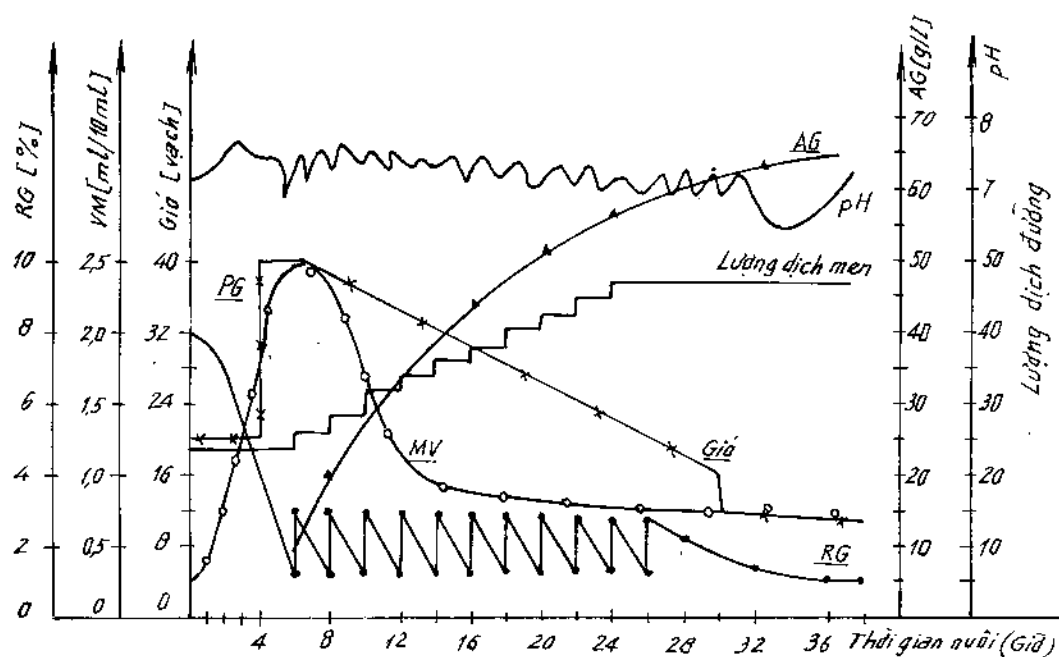
sacaroza, có thể để nồng độ lên tới 2 ÷ 3,5%. Khi đường giảm tới 1,5% ta lại bổ sung thêm. Nói khác đi là luôn khống chế nồng độ đường ở khoảng 1,5 ÷ 3% là có lợi. Nhịp độ bổ sung là 1,5 ÷ 2 giờ một lần là vừa. Nếu như có bộ phận điều chỉnh tự động để nồng độ đường trong dịch là 2% thì tốt hơn. Toàn bộ lượng đường cần dùng thường được chia làm 10 ÷ 12 lần để bổ sung trong khoảng thời gian từ 6 ÷ 26 giờ của quá trình lên men.



Hình 4.6. So sánh sự phát triển sinh khối khi tiếp giống với lượng khác nhau.

➤ Thông gió: Trong lên men bổ sung cơ chất thời gian sinh sản rất ngắn, thời gian sinh L-AG rất dài và lượng môi trường luôn tăng theo thời gian. Người ta phải tính toán cung cấp oxy cho giống theo nhu cầu ở từng giai đoạn. Ở giai đoạn sinh sản, giống cần những oxy ta thông gió với tốc độ lớn và tăng dần theo sự phát triển logarit của giống. Người ta thường thông gió thấp ở giai đoạn trước khi thêm penicilin. Khi sinh sản đạt trị số cực đại người ta giảm lượng gió dần dần theo chiều cao cột dịch men tăng lên do bổ sung cơ chất và khi lượng dịch men không tăng nữa thì để ở giá trị không đổi. Giá trị đó thường bằng 33% lượng giá tối đa.

➤ Nồng độ ure và pH môi trường: khả năng chịu đựng ure của mỗi loại giống khác nhau. *Brevibacterium devaricatum* phát triển và tạo L-AG tốt ở nồng độ 9,5% của ure. *Micrococcus* có thể sinh trưởng và phát triển tốt ở nồng độ cao hơn 0,4% tạo điều kiện thuận lợi cho giống sinh AG. Việc giữ ure tức thời ở nồng độ thấp còn một lý do khác nữa là nồng độ đường tức thời cũng thấp, thường không quá 3% và phải giữ cho tỉ lệ giữa đường và ure có trị số không đổi nhất định, khoảng 7/1.



Hình 4.7. Các đường cong cơ bản biểu diễn quá trình lên men trong môi trường giàu biotin có bổ sung cơ chất.

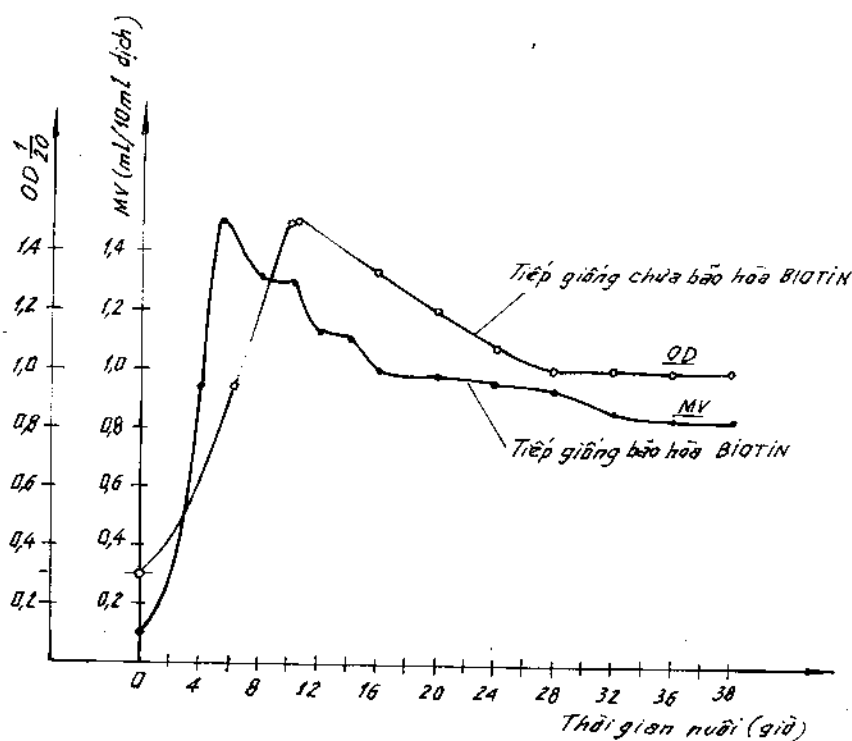
Ure bị phân hủy tạo thành NH_4^+ trung hòa L-AG, cung cấp NH_2 cho quá trình amin hóa khử, pH dịch lên men thích hợp để cho AG-dehydrogenaza hoạt động có lợi cho tạo AG là 7,5. Trong thực tiễn người ta khống chế pH môi trường khoảng $7 \pm 0,5$. Người ta chia tổng số ure ra làm những lần để bổ sung, thường mỗi giờ một lần với lượng không quá 0,4% so với dịch. Nói chung nên tập trung bổ sung trong giai đoạn từ 6 ÷ 26h, tức là song song với quá trình bổ sung đường. Toàn bộ diễn biến của quá trình lên men trong môi trường giàu biotin bổ sung cơ chất thể hiện ở hình trên.

Cần nhấn mạnh rằng, phương pháp kỹ thuật trên thích hợp cho mọi nồng độ biotin và với các nguồn nguyên liệu khác nhau, dù là rỉ đường hay đường thủy giải. Có điều phải lưu ý là nếu dùng đường thủy giải thì thêm biotin và các loại môi trường với nồng độ ít nhất là 10 g/l.

I.6.5. Kỹ thuật lên men bổ sung cơ chất trong môi trường nghèo biotin

Khi lên men trong môi trường nghèo biotin mà muốn bổ sung cơ chất ta cũng phải tuân theo các nguyên tắc cơ bản đã nêu trên. Song ở đây nguyên tắc tạo giống nồng độ cao có hơi khác một chút. Đối với trường hợp lên men trong môi trường giàu biotin, có thể dùng toàn bộ rỉ đường làm nguồn cung cấp cacbon và biotin cho vi khuẩn sinh trưởng mà không cần lưu ý tới

việc giống có hay không bão hòa biotin hay lượng biotin còn dư trong môi trường, bởi vì bước sang giai đoạn lên men đã có các chất “kháng biotin” hỗ trợ. Nhưng khi lên men trong môi trường nghèo biotin ta muốn tránh sử dụng các chất kháng biotin để tránh phiền phức và tiết kiệm hóa chất. Bởi thế không thể tùy tiện sử dụng biotin trong môi trường nhân giống. Cần phải tính toán phối hợp sao cho giống có trị cực đại trong thời gian ngắn nhưng lại có đặc tính cấu trúc màng tế bào như khi nuôi dưỡng trong môi trường có nồng độ biotin tối ưu cho tích lũy AG ngoại bào. Việc này đạt được nhờ việc điều chỉnh hàm lượng biotin môi trường lên men và hàm lượng biotin môi trường nhân giống theo hướng làm giàu biotin môi trường giống và làm nghèo biotin ở môi trường lên men, đồng thời kết hợp tạo điều kiện tiếp giống với tỉ lệ tương đối cao. Chẳng hạn khoảng 5% so với môi trường lên men.



Hình 4.8. So sánh tốc độ sinh trưởng của giống bão hòa và chưa bão hòa biotin.

Khi tiếp giống chưa bão hòa biotin sang môi trường mới dù với tỉ lệ cao cũng không thể rút ngắn quãng thời gian để giống đạt trị số cực đại như khi tiếp giống bão hòa biotin. Hình trên cho thấy tiếp giống chưa bão hòa biotin thì tốc độ sinh trưởng chậm và lâu đạt giá trị cực đại, mặc dầu tỉ lệ tiếp khá cao, khoảng 15%. Thời gian đạt OD cực đại là 9 ÷ 10h, trong khi đó tiếp

giống cũng với tỉ lệ đó nhưng giống bão hòa biotin thì tốc độ sinh trưởng nhanh và đạt tới giá trị cực đại nội trong 5 ÷ 6h là cùng.

Khi lên men bổ sung cơ chất, lưu ý dùng nguồn cơ chất với nồng độ cao, tránh hiện tượng pha loãng dịch không cần thiết. Ví dụ: ure pha với nồng độ 50% đường thủy giải cần có hàm lượng đường khử là $27 \div 30\%$, mật rỉ cũng cần có đường tổng số từ $27 \div 30\%$. Chế tạo đường glucoza thủy giải từ tinh bột với nồng độ CaO cần dùng H_2SO_4 làm chất cung cấp H^+ và $CaCO_3$ hay CaO làm chất khử SO_4^{2-} .

1.7. Phương pháp nâng cao hiệu suất lên men L-AG

Cải tạo giống vi sinh vật: nhiều tác giả đã đạt được kết quả trong việc cải tạo giống để nâng cao hiệu suất lên men L-AG. Công việc này nhằm vào các hướng có lợi cho sinh tổng hợp L-AG như: sinh ít hoặc không sinh α -XG-dehydrogenaza, giảm hoạt lực izoxytrataza, bền vững với tác dụng của Gramixizin làm giảm bớt quá trình phosphoryl hóa hiếu khí vốn tiêu hao rất nhiều năng lượng của vi sinh vật, có khả năng chống chịu với nhiều loại kháng sinh ức chế quá trình trao đổi năng lượng, chuyển điện tử trong hệ hô hấp tế bào, phòng ngừa việc tạo ATP từ các sản phẩm trung gian, ức chế phản ứng tổng hợp màng tế bào làm cho màng tế bào cấu tạo thiếu hoàn chỉnh để dễ thâm nhập với L-AG có khả năng.

1.8. Một số hiện tượng bất thường trong lên men axit glutamic và biện pháp xử lý

Trong thực tế lên men axit glutamic (AG), do điều kiện sản xuất có khó khăn, do kỹ thuật thao tác có sơ suất, đôi khi xảy ra hiện tượng bất thường làm cho diễn biến lên men không thuận lợi. Trong những trường hợp này nếu có biện pháp để phòng xử lý kịp thời thì vẫn có khả năng hoặc là phục hồi diễn biến lên men trở lại bình thường hoặc là vẫn đạt được hiệu suất lên men, bảo đảm có thể thu hồi được mẻ chính.

Các hiện tượng bất thường trong lên men axit glutamic ở nước ta và một số kinh nghiệm xử lý như sau:

1.8.1. Thời kỳ tiềm phát kéo dài

Trong diễn biến lên men bình thường, thời kỳ tiềm phát (pha lag) của giống là 8 đến 12 giờ. Nếu sau 12 giờ lên men mà sinh khối vẫn tăng chậm, đường hao không rõ rệt... thì thời kỳ tiềm phát của giống đã kéo dài. Điều này thường có hai nguyên nhân chính:

1.8.1.1. Giống quá già

Do thời gian nuôi giống cấp hai quá dài, giống đã chuyển sang giai đoạn cân bằng (pha đã định) mà không còn ở giai đoạn bình thường (pha logarit) cũng làm giống phát triển chậm

trong môi trường lên men. Nhưng đáng chú ý nhất là có thể do giống đã bị bảo áp lâu trong nhiệt độ thường dưới áp suất cao. Hiện tượng này thường xảy ra do bố trí sản xuất chưa chặt chẽ, nuôi giống đã đủ thời gian mà môi trường lên men chưa chuẩn bị xong, nên bắt buộc phải bảo áp giống ở áp suất 2kG/cm² và nhiệt độ thường.

Các nghiên cứu cho thấy, nói chung nếu thời gian bảo áp ngắn, trong vòng 3 ÷ 4 giờ, thì ảnh hưởng đến thời kỳ tiềm phát không nhiều. Song nếu thời gian bảo áp càng dài thì thời gian để giống làm quen với môi trường lên men càng dài. Nếu thời gian bảo áp kéo dài đến 8 ÷ 10 giờ thì tới giờ lên men thứ 38 mới đạt được chỉ số sinh khối (OD) tối đa, trong khi đó bình thường thì giống đạt chỉ số sinh khối tối đa ở giai đoạn giờ thứ 20 ÷ 24. Nếu bảo áp dài tới 20 giờ thì mãi tới giờ thứ 40, chỉ số sinh khối vẫn chưa đạt được trị số cực đại. Các nghiên cứu có kết quả ở bảng 38.

Bảng 38. Ảnh hưởng của thời gian bảo áp tới phát triển sinh khối (OD) của chủng *Corynebacterium* (số liệu trung bình của 5 đợt lên men khác nhau)

Thời gian lên men (giờ) Điều kiện	0	6	12	18	24	30	6	38	40
Không bảo áp	0,04	0,2	0,76	1,0	1,15	1,20	1,20	1,20	1,20
Bảo áp 8 ÷ 12 giờ	0,05	0,07	0,35	0,67	0,83	1,09	1,12	1,20	1,20
Bảo áp 20 ÷ 22 giờ	0,03	0,04	0,15	0,01	0,70	0,75	0,79	0,83	0,86

Giống bị bảo áp lâu không chỉ chậm thích nghi với môi trường mới mà còn "uể oải" trong hoạt động sống. Bằng chứng là sau khi sinh sản tới mức tối đa thì tốc độ oxy hoá đường cũng rất thấp, đường hao chậm, không tiêu hao triệt để, khả năng sinh AG kém, làm cho NH₄⁺ (từ ure) ứ đọng, pH môi trường tăng tới 8,5 ÷ 9.

Muốn khắc phục tình trạng trên, điều quan trọng là phải tổ chức sản xuất chặt chẽ, hợp lý hoá các khâu để không bao giờ bị bảo áp giống quá lâu.

1.8.1.2. Thanh trùng môi trường không tốt

Thanh trùng môi trường lên men nhằm diệt hết các loại vi sinh vật nhiễm tạp, tạo điều kiện thuận lợi cho giống sinh trưởng và tích lũy nhiều AG. Việc thanh trùng môi trường cần được làm thận trọng, đúng nhiệt độ và thời gian quy định. Thanh trùng ở nhiệt độ cao quá, thời gian kéo dài quá mức quy định sẽ làm cho đường bị caramen hoá, melanoit hoá, một số axit amin bị phân huỷ, một số chất sinh trưởng bị mất mát... dẫn đến giảm chất lượng môi trường

kéo dài thời kỳ tiềm phát của giống, giảm hiệu suất chuyển hoá đường ra AG ở giai đoạn sau. Nói chung, môi trường thanh trùng ở nhiệt độ càng cao, thời gian càng dài thì màu càng đậm, OD ban đầu càng cao, thời kỳ tiềm phát càng kéo dài.

Muốn khắc phục tình trạng này, trước khi thanh trùng môi trường lên men, người thao tác cần phải kiểm tra kỹ khả năng làm việc của van hơi (vào ruột và vào vỏ nổi lên men). Nếu các van này không tốt sẽ làm cho áp lực và nhiệt độ thanh trùng tăng lên rất nhanh quá mức quy định, làm "cháy" môi trường. Mặt khác sau khi thanh trùng đúng nhiệt độ và thời gian quy định, cần phải làm nguội môi trường càng nhanh càng tốt. Làm nguội môi trường quá chậm cũng sẽ dẫn tới giảm chất lượng môi trường.

1.8.2. Quá trình lên men chậm chạp do môi trường chứa nhiều sắt

Các tài liệu đều cho rằng, với nồng độ nhất định trong môi trường lên men, ion sắt có tác dụng kích thích vi khuẩn tạo AG phát triển. Song khi có mặt ion sắt quá nồng độ quy định thì ảnh hưởng của Fe^{++} đến việc tích lũy AG rất đáng kể, mặc dù Fe^{++} không kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn.

Theo dõi nhiều đợt lên men môi trường có nồng độ $Fe^{+2} = 0,0120 \div 0,0125\%$ nhận thấy sinh khối vi khuẩn vẫn tăng bình thường, thậm chí ở các giờ lên men cuối cùng còn tăng cao hơn các đợt lên men trong môi trường ít sắt. Song ở các đợt lên men ở môi trường nhiều sắt, lượng đường do môi trường đồng hoá rất ít, đường hao rất chậm chạp và không triệt để, mãi sau 40 giờ lên men, đường vẫn còn trên 1%. Ở các đợt lên men này, pH dịch men tăng cao, kéo dài thời gian ở trị số pH > 7,6 và giảm pH rất chậm chạp, đồng thời khi bổ sung ure vào môi trường, pH lại đột ngột tăng lên. Hiện tượng này chứng tỏ NH_4^+ sinh ra từ ure với tốc độ lớn hơn tốc độ lợi dụng ure của giống. Quan sát màu dịch men qua quá trình lên men thường có màu đỏ gạch hoặc xanh (trong khi lên men bình thường, dịch men có màu vàng và nhạt dần). Quan sát hình thái giống qua các giờ lên men thấy giống vẫn phát triển (tăng OD) nhưng hình dáng nhỏ ovan, có xu hướng chuyển thành tròn và xếp thành chuỗi dài khi nồng độ sắt lên tới $0,1 \div 0,2\%$ (bình thường tế bào vi khuẩn có hình bầu dục, xếp hình chữ V)

Nguyên nhân chính của việc tăng nồng độ sắt trong môi trường lên men là do đường thủy phân đưa vào. Đường được sản xuất bằng cách dùng axit vô cơ (HCl , H_2SO_4) để thủy giải tinh bột trong các thiết bị tráng men hay dán lót cao su và được lọc bằng máy ép lọc khung bản. Khi nồng độ sắt trong dịch đường tăng thì chỉ có thể là các thiết bị lên men đã bị axit ăn mòn do lớp men hay lớp cao su đã bong, tróc, máy ép lọc đã han gỉ.

Muốn khắc phục tình trạng nhiều sắt trong dịch đường cần phải kiểm tra sắt trong dịch đường trước khi phá môi trường bằng dung dịch natri sunfua. Nếu thấy có nhiều kết tủa xanh hoặc đen của sunfua sắt thì cần quyết loại bỏ dịch đường này. Nếu muốn sử dụng dịch đường này thì phải cho dịch đường chảy qua cột trao đổi ion chứa các cationit như K.732, KY₂... Các nghiên cứu cho thấy rằng khử sắt bằng nhựa K.732 (H⁺) rất tốt, dịch đường dùng cho lên men để hiệu suất lên men cao.

Bảng 39. Diễn biến lên men môi trường đường thủy giải có 0,123g Fe³⁺/lít

Thời gian lên men (giờ)	0	6	9	12	16	20	24	28	32	36
Chỉ tiêu										
pH	6,8	7,2	7,7	7,7	7,7	7,3	7,5	7,6	7,4	7,4
OD	0,10	0,39	0,57	0,73	0,96	1,12	1,19	1,30	1,40	1,40
Đường (%)	10	0,9	9,1	8,5	7,5	6,9	3,8	2,9	1,4	1,4
AG (g/l)										24,1
Dịch thải đã khử Fe ³⁺ bằng K.732(H ⁺)										
pH	6,8	7,7	7,7	7,5	7,3	7,5	7,2	7,5	7,4	7,4
OD	0,05	0,22	0,56	0,66	0,80	0,99	1,08	1,1	1,25	1,22
Đường (%)	11	10,1	9,2	8,2	7	5,5	4	1,6	1,2	0,86
AG (g/l)										46,3

1.8.3. Sử dụng ure không đúng mức

Ure là nguồn rất tốt để cung cấp nitơ cho vi khuẩn tổng hợp protein tế bào, tích lũy AG, giữ pH môi trường ở trung tính hay kiềm yếu. Khi thiếu ure, các cơ chế sinh tổng hợp AG bị đảo lộn dẫn tới việc tạo ra axit hữu cơ khác thay cho axit glutamic. Khi dư ure cũng làm giảm hiệu suất tạo AG. Bảng số cho thấy với chủng *Corynebacterium*, nồng độ ure ban đầu khoảng 1,7 ÷ 1,8% là tối thích.

Bảng 40. Ảnh hưởng của nồng độ ure ban đầu trong môi trường lên men tới khả năng tích lũy AG của *Corynebacterium*

Nồng độ ure ban đầu (%)	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2
Khả năng tạo AG	48	22	54,1	47,5	33,6

1.8.3.1. Dư ure ban đầu

Nói chung lượng ure ban đầu cao hơn 1,8% thì dịch men có pH >8, đường hao chậm.

Khắc phục: giảm lực thông gió ban đầu để hạn chế phân huỷ ure ban đầu, giữ pH <8, thường giảm lượng gió bằng 1/2 lượng gió bình thường.

1.8.3.2. Thiếu ure ban đầu

Biểu hiện của thiếu ure ban đầu là pH dịch lên men không tăng hoặc tăng chậm rồi giảm rất nhanh, OD tăng chậm, thời kỳ tiềm phát kéo dài.

Biện pháp: Theo dõi sát sao diễn biến lên men các giờ đầu, bổ sung sớm ure lần 1. Tốt nhất là ngay từ trước khi cho ure ban đầu vào môi trường, cần phân tích chính xác nồng độ dịch ure đã pha và kiểm tra kỹ các van của nồi ure để tránh rò chảy ure.

1.8.4. Môi trường thiếu biotin

Ta đã biết các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp AG rất cần biotin để sinh trưởng và tích lũy AG. Các nhà máy mì chính của ta thường dùng rỉ đường mía làm nguồn cung cấp biotin với tỷ lệ $0,25 \div 0,5\%$ (tùy độ loãng của rỉ đường) so với khối lượng môi trường lên men, giống vẫn phát triển nhưng rất chậm, chỉ đạt trị số cực đại OD < 0,55 trong khoảng 20 giờ. Sở dĩ giống còn phát triển được là trong tế bào đã có sẵn biotin, khi sang môi trường lên men, giống tiếp tục phát triển theo sự kích thích của biotin nội bào và của vitamin B₇ đã đưa vào môi trường lên men. Biểu hiện khác nhau của sự thiếu biotin là pH dịch men cứ tiếp tục tăng mãi theo các giờ lên men, đường hao rất chậm.

Muốn khắc phục tình trạng này, tốt nhất là phải kiểm tra chặt chẽ khi pha vào môi trường, có sổ ghi rõ và đánh dấu từng loại hoá chất đã pha để tránh "quên" rỉ đường. Nếu sớm phát hiện quên rỉ đường, có thể khắc phục bằng cách pha loãng rỉ đường với nước, thanh trùng và tiếp vào môi trường lên men càng sớm càng tốt.

1.8.5. pH ban đầu thấp

Corynebacterium sinh trưởng và tích lũy AG tốt ở khoảng pH = 7,2 đến 7,5, sinh trưởng được trong khoảng pH = 6 đến 8. Vì vậy theo quy định thì nên pha môi trường có pH = 6,5 đến 6,7 (để sau khi thanh trùng, pH có giảm xuống chút ít và sau khi tiếp ure, pH sẽ tăng dần tới trị số tối ưu: 7,3 đến 7,5). Song trong thực tế sản xuất hiện nay ta phải dùng các loại giấy thử pH có sai số khá lớn với máy đo pH, dẫn tới tình trạng là sau khi đo và cùng giấy pH, ta yên trí là đã đạt yêu cầu mà thực tế lại quá thấp (<6). Mặt khác ta thường dùng lượng dịch đường khá lớn để

pha dịch men, dịch đường sau khi lọc có pH = 4,5 đến 5 nhưng lại quên điều chỉnh pH môi trường sau khi pha, làm pH rất thấp (<6).

Biên pháp: phải dùng loại giấy thử pH đã được hiệu chỉnh trị số máy đo pH, sau đó phải kiểm tra chặt chẽ việc điều chỉnh pH môi trường trước khi bơm vào nổi lên men. Bất đắc dĩ lắm, nếu sau khi thanh trùng, môi trường lên men vẫn có pH<6 thì phải lập tức pha loãng natri hydroxyt, thanh trùng và bơm vào nổi lên men để điều chỉnh pH.

1.8.6. Thiếu oxy hoà tan

Vì khuẩn sinh AG là loại rất cần oxy hoà tan trong môi trường để sinh trưởng và tích lũy AG. Tuy từng giai đoạn lên men nhu cầu này có khác nhau chút ít. Một trong những yếu tố làm giảm oxy hoà tan vào môi trường là tốc độ cánh khuấy. Theo nhiều tài liệu, hàm lượng oxy hoà tan vào môi trường phụ thuộc vào tốc độ khuấy theo hàm số lũy thừa. Vì vậy tốc độ khuấy giảm chút ít sẽ làm cho lượng oxy hoà tan giảm rất nhanh.

Nếu môi trường thiếu oxy hoà tan: tốc độ phát triển sinh khối của giống vẫn tăng bình thường, tốc độ hao đường vẫn tăng bình thường ở các giờ đầu, gần về cuối có giảm chút ít. Về hình thái vi khuẩn, tế bào vẫn có hình dạng bình thường ở các giờ đầu, mãi sau giờ thứ 20 trở nên gầy và rời rạc. Thiếu oxy hoà tan biến đổi pH dịch men cũng vẫn diễn ra bình thường nên thời điểm bổ sung ure lần 1 và lần 2 vẫn tương tự như khi khuấy trộn bình thường, nhưng có nét đặc biệt là, sau khi bổ sung ure lần 2 ở các đợt bình thường thì pH tăng lên >7,5 và giảm xuống từ từ nhưng không bao giờ xuống thấp dưới 6,4. Ngược lại, thiếu oxy hoà tan thì sau khi bổ sung lần 2, pH chỉ tăng ít mà lại giảm mạnh xuống dưới 6 ở giờ kết thúc. Theo dõi sự tạo thành axit lactic bằng sắc ký giấy, thấy khi thiếu oxy hoà tan, axit lactic xuất hiện sớm vào giờ thứ 12 và liên tục tăng theo thời gian lên men. Do vậy không khí từ dịch men ra lúc đầu có mùi dịu dịu của axit cacbonic thoát ra, nhưng càng về sau mùi chua ủng (của axit lactic) càng rõ rệt. Lên men trong điều kiện thiếu oxy hoà tan, hiệu suất tạo AG rất kém.

Những hiện tượng bất bình thường do thiếu oxy hoà tan chỉ thể hiện rõ rệt ở các giờ gần về cuối quá trình lên men, cho nên có phát hiện ra thì cũng đã quá muộn. Do vậy muốn khắc phục tình trạng thiếu oxy hoà tan thì chủ động nhất và có hiệu quả nhất là phải thường xuyên theo dõi tốc độ cánh khuấy và có biện pháp khôi phục tốc độ khuấy trở lại bình thường.

1.8.7. Nhiều dầu phá bọt

Trong quá trình lên men axit glutamic, phá bọt là việc làm cần thiết. Dùng lượng dầu quá lớn và thời điểm cho dầu không đúng lúc (như phần trên đã giới thiệu) ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của vi khuẩn và sinh tổng hợp AG.

Kinh nghiệm thực tế còn cho thấy rằng, dầu lạc để phá bột là loại dầu đã qua tinh luyện, có chỉ số axit càng thấp càng tốt. Cũng có khi dùng loại dầu đỗ tương màu nhạt có chỉ số axit thấp và không đục để thay thế dầu lạc. Song nhìn chung hiệu quả phá bột của dầu đậu tương hơi thấp.

1.8.8. Giống chết hoặc kém phát triển

Trong thực tế sản xuất, đôi khi do sơ ý để giống cấp II bị tác dụng của nhiệt làm cho giống bị chết hoặc yếu, nhưng sau khi đã tiếp vào môi trường lên men mới phát hiện ra. Biểu hiện của tình trạng này là trong 10 ÷ 14 giờ lên men đầu tiên, pH dịch men không tăng, chỉ số sinh khối (OD) không hề tăng hoặc ít tăng, đường không hao.

Biện pháp: tốt nhất là nếu có sẵn nồi giống cấp II thì tiếp ngay vào nồi lên men (tất nhiên là nếu không có thì ngừng khuấy, bảo áp môi trường, chờ nuôi giống mới) rồi cho chạy như thường. Hiện nay các nhà máy của ta theo phương pháp không bổ sung cơ chất, thường nuôi trong 2 nồi giống cấp II để chọn 1 nồi tiếp vào lên men (tỷ lệ giống là 1%). Song trên thực tế, nhiều khi hai nồi giống đều phát triển tốt, đạt các chỉ tiêu chất lượng thì nên tiếp cả hai nồi vào lên men. Vì tỷ lệ giống vẫn cho phép dùng là 2%. Mặt khác đây cũng là một biện pháp để phòng theo phương châm "thừa hơn thiếu".

1.8.9. Tập trùng trong lên men axit glutamic và biện pháp phòng chống

Các vi khuẩn sinh axit glutamic (AG) chỉ tích lũy lượng lớn AG trong điều kiện lên men không bị nhiễm trùng. Số liệu thống kê cho thấy, tỷ lệ phần trăm các mẻ nhiễm trùng ở các nhà máy mì chính tương đối cao, làm giảm hiệu quả kinh tế và giảm tổng lượng thu hồi axit glutamic. Công suất thiết kế hiện nay ở các nhà máy sản xuất mì chính là 6000 tấn/năm. Giả sử 3% số mẻ lên men bị hỏng vì nhiễm trùng thì tổng sản lượng mì chính đã giảm 300 tấn/năm. Vì vậy, cần có các biện pháp phòng, chống chúng trong công nghiệp.

1.8.9.1. Đặc điểm một số tạp khuẩn

1.8.9.1.1 Vi khuẩn sinh bào tử

Baccillus subtilis, *Baccillus mycoidis*, *clostridium butirium* và *clostridium putrium* là những loại vi khuẩn sinh bào tử rất nguy hiểm cho quá trình lên men AG. Chúng nguy hiểm không chỉ vì khả năng chịu nhiệt cao, khó bị diệt, mà còn vì phản ứng đặc biệt của bào tử trong môi trường, khiến ta khó biết được quá trình lên men bị nhiễm trùng hay không.

Các nghiên cứu cho thấy dù là môi trường cấp II hay môi trường lên men, dù thanh trùng dài hay ngắn ở 115°C hay 120°C mà sau khi thanh trùng, lấy mẫu cấy lên đĩa thạch thì đều

có kết quả âm tính, nghĩa là thanh trùng như vậy đã đạt hiệu quả tốt. Ngược lại, nếu sau khi thanh trùng đem lắc 1 thời gian trên máy lắc ở 32°C rồi mới cấy trên đĩa thạch thì kết quả có khác nhau: thời gian thanh trùng càng ngắn, tạp trùng càng sớm phát triển. Thời gian thanh trùng càng dài tạp trùng càng chậm phát triển, và có một khoảng thời gian tối hạn thích hợp cho từng loại môi trường, ở đó sau khi lắc 48 giờ vẫn không có tạp trùng nào phát triển. Đó là 25 phút đối với môi trường cấp II và 35 phút đối với môi trường lên men.

Một số vi khuẩn sinh bào tử khi phát triển trong môi trường dịch thể lại có hình thái tương tự hình thái vi khuẩn AG. Bởi vậy, rất khó khăn phân biệt chúng với giống sản xuất và sai sót khi thanh trùng môi trường rất khó nhận biết, nếu chỉ soi hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi và nhìn màu sắc khuẩn lạc trên đường cấy của đĩa thạch. Trong trường hợp này nếu cấy mẫu trên đĩa thạch để trong tủ âm 24 ÷ 48 giờ rồi lấy mẫu soi dưới kính hiển vi phóng đại 1350 lần, ta phân biệt được giống sản xuất với các vi khuẩn sinh bào tử qua hình thái của chúng. Vi khuẩn sinh AG thì xếp hình V và nhỏ, còn vi khuẩn sinh bào tử thì có nhiều hình dạng khác nhau: bầu dục, quả tạ hoặc hình thoi...

1.8.9.1.2. Thực khuẩn thể (*Bacteriophage* hay *phage*)

Thực khuẩn thể là siêu vi trùng ký sinh trong tế bào vi khuẩn đã được Twost và D'felle phát hiện từ năm 1915. Thực khuẩn thể cấu tạo bởi protein và axit desoxyribonucleic. Khi gặp vi khuẩn thích hợp, thực khuẩn thể tự lột bỏ vỏ protein, tiết men liozin phá huỷ màng tế bào vi khuẩn, tiết ra Adenozin-triphosphatase, làm co tế bào đẩy ADN vào tế bào vi khuẩn, điều khiển hệ men trong vi khuẩn, tổng hợp ADN và protein cho mình.

Có hai loại thực khuẩn thể: ôn hoà và ác tính. Thực khuẩn thể ác tính sau khi xâm nhập vào vi khuẩn thì phát triển tới mức nhất định thì phá vỡ màng tế bào vi khuẩn; ngược lại, thực khuẩn ôn hoà thì cộng sinh với vi khuẩn. Ở đây không có sự thay đổi về hình dạng và hoạt động sinh lý của tế bào vi khuẩn, chỉ có điều khác là nó chứa trong mình thể tiền thực khuẩn thể. Loài vi khuẩn như thế gọi là loài vi khuẩn sinh tan. Tất cả các thực thể dù ôn hoà hay ác tính đều có tính chất đột biến chuỗi, tức là tính biến dị thích ứng với vi khuẩn tiếp nhận để biến dị do nguyên nhân nào đó. Nhiều tác giả đã quan tâm nghiên cứu thực khuẩn thể của các vi khuẩn công nghiệp, trong đó có thực khuẩn thể cùng các vi khuẩn sinh AG.

Seto và Oki và nhiều tác giả khác cho biết nhiều loại thực khuẩn thể cùng tác dụng lên 1 loại vi khuẩn (*Microbacterium ammoniaphilum*, hoặc *Brevibacterium lactofermentum* No.2256 là loại sinh lớn AG đang được dùng rộng rãi ở các nhà máy mì chính lên men của nhiều nước). Trong đó riêng *Brevi. Lactofermentum* đã bị hơn hai mươi loài thực khuẩn thể khác nhau xâm nhập.

Sử dụng *Corynebacterium* trong công nghiệp sản xuất AG thấy có nhiều loài thực khuẩn thể tác dụng lên chủng vi khuẩn này, ở đây có hai loài: ác tính và ôn hoà.

Loài ác tính là loại xâm nhập vào *Corynebacterium* dù ở giai đoạn nhân giống cấp II hay cấp III hoặc ở giai đoạn lên men đều gây nên hiện tượng phân giải tế bào, làm đình trệ hoạt động sống của vi khuẩn. Khi bị nhiễm thực khuẩn thể ác tính, độ đục của môi trường giảm dần, đường không hao, không hao AG, pH tăng vọt do ít động NH_3 (sinh ra từ ure dưới tác dụng của men ureaza). Dưới kính hiển vi ta thấy vi khuẩn mất hình dáng đặc trưng. Lên men bị nhiễm thực khuẩn thể ác tính rất nguy hiểm, không có gì có thể cứu vãn nổi.

Thực khuẩn thể ôn hoà xâm nhập vào *Corynebacterium* có gây tác hại nhưng mức độ tác hại nhiều hay ít phụ thuộc vào thời điểm nhiễm.

Nếu lấy loại thực khuẩn thể xâm nhập lên vi khuẩn *Corynebacterium* gây nhiễm lên giống sinh AG trong bình lắc vào các thời điểm khác nhau. Theo dõi độ đục dịch giống (OD), hình thái vi khuẩn, hàm lượng đường dư (RG), khả năng sinh trưởng tiếp theo trên môi trường thạch hay môi trường lỏng, khác cũng như số lượng playco hình thành, thấy có một số đặc điểm sau:

- Gây nhiễm ngay sau khi tiếp giống thì vi khuẩn không phát triển được, ở đây OD không tăng, tế bào vi khuẩn nhỏ vụn, xếp chuỗi.

- Gây nhiễm sau khi tiếp giống 5 giờ, vi khuẩn vẫn tiếp tục phát triển bình thường, giữ nguyên hình thái đặc trưng, đường hao, pH giảm tương tự như mẫu đối chứng (không bị lây nhiễm). Vi khuẩn chứa thực khuẩn thể trong mình (vi khuẩn sinh tan) không thể sinh sản khi chuyển tiếp sang môi trường mới.

- Cấy các dịch giống bị gây nhiễm từ giờ thứ 5 sau khi tiếp giống lên các đĩa thạch, để 24 giờ trong tủ ấm, thấy mỗi loại thực khuẩn thể cho đặc điểm đặc trưng: vi khuẩn không mọc hay mọc yếu khi gây nhiễm nhưng trên đường cấy có nhiều playco. Số lượng playco tăng tỷ lệ thuận với thời gian tiếp xúc giữa vi khuẩn và thực khuẩn thể. Nghĩa là gây nhiễm càng sớm thì trên đường cấy có nhiều playco.

Nếu lấy các thực khuẩn thể kể trên gây nhiễm vào quá trình lên men. Ta thấy rõ số liệu trình bày ở bảng 39, cũng như khi gây nhiễm vào giống cấp II, ở đây gây nhiễm ngay sau khi tiếp giống 6 giờ thì chẳng những vi khuẩn phát triển mà còn tạo AG nữa. Khả năng tích lũy AG của vi khuẩn sinh tan này phụ thuộc vào thời điểm gây nhiễm. Gây nhiễm sớm thì tạo ít AG, gây nhiễm muộn thì tạo nhiều AG, gây nhiễm sau giờ thứ 9 thì không ảnh hưởng tới việc tích lũy AG của vi khuẩn.

Như vậy, khác hẳn với thực khuẩn thể ác tính, thực khuẩn thể ôn hoà chỉ gây hại lớn khi chúng xâm nhập vi khuẩn ở giai đoạn nhân giống và giai đoạn lên men thời kỳ tiềm phát, không ảnh hưởng tới diễn biến lên men nếu xâm nhập ở thời điểm từ đầu thời kỳ phát triển logarit về sau.

Bảng 41. Ảnh hưởng của thời điểm gây nhiễm thực khuẩn thể tới khả năng sinh AG của vi khuẩn *Corynebacterium*

Gây nhiễm vào các giờ	Nồng độ AG (g/l)	Hình thái vi khuẩn trong dịch	Sự phát triển trên đĩa thạch
Không gây nhiễm	42,0	Xếp V, khá đều	Phát triển tốt
0 giờ	0,0	Nhỏ, vụn	Không phát triển
6 giờ	37,6	Xếp V, tương đối đều	Phát triển khá, có nhiều khuẩn lạc.
9 giờ	41,6	Xếp V, tương đối đều	
14 giờ	42,7	Xếp V, tương đối đều	
24	42,2	Xếp V, tương đối đều	

Cũng như các loại thực khuẩn thể khác, thực khuẩn thể của vi khuẩn sinh AG, dù là *Corynebacterium*, hay *Microbacterium* hay *Brevibacterium*, đều rất nhạy cảm với nhiệt độ, hoá chất, độ ẩm, ánh sáng và pH môi trường. Các thực khuẩn thể của vi khuẩn sinh AG đều mau chóng bị ngừng hoạt động ở nhiệt độ $80 \div 100^{\circ}\text{C}$. Sức chịu nhiệt của thực khuẩn thể giảm khi độ ẩm tăng. Điều này giải thích rõ ở vùng nắng ẩm, nồng độ thực khuẩn thể rất thấp. Dưới tác dụng của tia tử ngoại, hồng ngoại, tác dụng của hoá chất như chất kháng sinh, chất hoạt động bề mặt.... thực khuẩn thể mau bị diệt.

1.8.9.2. Một số biện pháp phòng, chống nhiễm trùng

Vi khuẩn sinh bào tử và thực khuẩn thể đi vào môi trường sản xuất qua nhiều con đường: không khí, thiết bị rò rỉ, và môi trường chưa được diệt trùng triệt để. Muốn chống hay hạn chế tới mức thấp nhất thiệt hại do tạp trùng gây nên, có nhiều biện pháp. Trong đó đáng chú ý là biện pháp thiết bị, công nghệ và sử dụng các hoá chất. Mỗi biện pháp kể trên có ý nghĩa tác dụng riêng nhưng đều hỗ trợ cho nhau tạo nên tác dụng tổng hợp ngăn chặn tác hại của tạp trùng.

1.8.9.2.1. Biện pháp thiết bị

Quan tâm đầy đủ vấn đề phòng chống nhiễm trùng, ngay từ khi lựa chọn địa điểm xây dựng, thiết kế chế tạo, lắp ráp thiết bị có ý nghĩa rất quan trọng. Tỷ lệ nhiễm trùng tăng theo

nồng độ tạp trùng nơi xí nghiệp được xây dựng, nên đặt địa điểm ở nơi cao ráo, thoáng mát, xa chuồng trại gia súc, xa nhà máy vi sinh vật là điều cần thiết. Mặt khác, các tạp trùng sinh bào tử đi vào dây chuyền chủ yếu là ở góc sâu thiết bị, ở những nơi này tạp trùng rất khó bị diệt, dù có kéo dài thời gian tác dụng nhiệt hay đưa nhiệt độ lên cao. Cho nên khi chế tạo cần chọn loại thép ít bị ăn mòn, không đặt các van kim loại ở điểm “chết” của thiết bị, đặc biệt là những đường ống liên quan tới việc vận chuyển giống, ure, chất dinh dưỡng, dầu phá bọt...

Đặc biệt, cần quan tâm tới các thiết bị lọc khí, bởi vì không khí được sử dụng trong toàn bộ hệ thiết bị lên men. Không khí nhiễm sẽ gây nhiễm tất cả hệ thống và do vậy nhiễm không khí là vô cùng nguy hại, khó khắc phục nhất. Muốn có không khí vô trùng cần thoả mãn 2 điều kiện: một là vật liệu lọc phải khô ráo, luôn bảo đảm hiệu suất lọc cao. Hai là không khí qua lớp lọc phải sạch, không có dầu, không có nước.

Vì vậy ngay từ khi thiết kế cần tính toán cho đúng diện tích làm lạnh không khí nén sao cho nhiệt độ không khí đi vào thiết bị lọc không quá 25°C và do đó độ ẩm tương đối của không khí nén không quá 30%. Hàm lượng dầu trong khí nén phụ thuộc vào việc lựa chọn loại dầu cho thích hợp với công suất máy và cấu tạo các thiết bị tách dầu. Nói chung công suất máy lớn, tốc độ nhanh thì dầu càng phải đặc và có nhiệt độ bốc hơi cao. Nếu dầu loãng, nhiệt độ bốc hơi thấp thì dầu đi theo không khí và len vào lớp lọc làm mất hoạt lực loại tạp trùng của vật liệu lọc. Ngoài ra cần định kỳ xả dầu, nước ở các van đáy thiết bị phân ly, làm lạnh, chứa và thiết bị lọc.

Cần xác định vật liệu lọc để bố trí dây chuyền cho thích hợp. Nếu dùng bông thủy tinh thì áp dụng phương pháp lọc 2 lần, nếu dùng bông mở và than hoạt tính thì bố trí dây chuyền gồm lọc chung và lọc phụ. Cần nắm chắc đặc tính, khả năng lọc của các vật liệu đem dùng, trên cơ sở đó chủ động kiểm tra, thay thế sao cho hệ thống lọc khí luôn có hiệu lực cao.

1.8.9.2.2. Phương pháp công nghệ

Quá trình lên men AG cần vô trùng tuyệt đối cho nên lên men gián đoạn là có lợi nhất. Ở đây vì lý do nào đó mà một mẻ bị nhiễm thì không lây lan sang mẻ khác, tác hại sẽ ít hơn và cũng dễ dàng loại trừ vi khuẩn sinh bào tử. Cần định kỳ lại chế độ thanh trùng cho thích hợp với từng loại nguyên liệu, đặc biệt là nguyên liệu dùng làm nguồn cung cấp hydrat cacbon. Nói chung nguyên liệu nhiều tạp trùng, cần thanh trùng nghiêm ngặt, nguyên liệu ít tạp trùng, thanh trùng ở điều kiện vừa phải. Dịch đường thủy giải đã qua tác dụng nhiệt dưới áp suất trong môi trường axit, nên ít tạp trùng, thanh trùng ở điều kiện vừa phải, nhiệt độ thấp. Thời gian ngắn và pH trung tính. Ngược lại dùng rỉ đường mía, phải hết sức cẩn thận. Theo một số tác giả thì Ig rỉ đường có từ 1 vạn đến 5 triệu tế bào vi sinh vật. Vì vậy trước khi dùng cần xử lý trong môi

trường axit ở nhiệt độ tối thiểu $90 \pm 100^{\circ}\text{C}$, sau đó khử trùng ở nhiệt độ cao và thời gian tương đối dài hơn so với thanh trùng thủy giải.

Về mặt giống vi sinh vật, nên có hai, ba giống khác nhau để luân canh. Điều này có gây khó khăn cho sản xuất, đòi hỏi người sử dụng phải thuần thực, hiểu rõ từng đặc điểm và tính cách của mỗi loại giống có lợi và để phòng được tính đột biến chuỗi của thực khuẩn thể nảy sinh khi chuyển dùng một giống trong suốt thời gian dài.

1.8.9.2.3. Sử dụng hoá chất

Nhiều tác giả nghiên cứu hạt giống bền vững đối với tạp chủng, nhưng không đạt kết quả, phải chuyển sang nghiên cứu dùng hoá chất để chống nhiễm trùng. Hàng trăm các hoá chất đã được thử, trong đó có chất hoạt động bề mặt, kháng sinh, axit hữu cơ, vô cơ v.v... Nhưng chỉ có rất ít chất có thể ứng dụng được trong công nghiệp và cũng chỉ ứng dụng để phòng ngừa thực khuẩn thể chứ không có tác dụng phòng ngừa vi khuẩn. Vì yêu cầu đặt ra trong việc lựa chọn hoá chất rất cao: không ức chế vi khuẩn, không ảnh hưởng tới quá trình tích lũy AG, không gây khó khăn cho giai đoạn thu hồi và giá thành không cao.

Theo Seto và một số tác giả đưa xitrat, oleat, natri hay tetrapoliphosphat với tỷ lệ thích hợp, có tác dụng phòng ngừa thực khuẩn thể. Tỷ lệ thích hợp là 0,05M đối với xitrat hay oleat và 0,1% đối với Natri hay tetrapoliphosphat. Theo một số tác giả dùng Cloranphenicol với tỷ lệ $0,5 \div 1 \text{ g/mol}$, có thể ức chế hoàn toàn sinh trưởng của thực khuẩn thể, tác dụng lên *Brevibacterium lactofermentum* N_o 2256 mà không ảnh hưởng gì đến vi khuẩn này. Các tác giả cho biết, nếu môi trường chứa Tetraxylín với nồng độ 2,5 g/ml thì việc tạo thực khuẩn thể nội bào bị ức chế hoàn toàn. Ngoài ra các chất chelat như axit phytic, các chất hoạt động bề mặt như PEG-monoester và POE-allylester, có tác dụng ức chế chọn lọc lên thực khuẩn thể ở nồng độ $0,1 \div 0,2\%$ có tác dụng mạnh nhất và ứng dụng được trong lên men với các chủng *Brevibacterium lactofermentum* 2256. Các chất hoạt động bề mặt không ion hoá cũng có tác dụng ức chế mạnh lên thực khuẩn thể như polyoxyetylen steadyester, polyoxyetylen glycol monooleat, poloxyetylen solitan monostearat. Các chất này có tác dụng tập trung vào sự hấp thụ đầu tiên của quá trình nhiễm thực khuẩn thể và không tác dụng lên các thực khuẩn thể đã bị hấp thụ vào trong tế bào vi khuẩn. Riêng Tween 60 không những có thể ức chế sự hấp thụ thực khuẩn thể mà còn ức chế cả việc tăng lên của chúng khi đã bị hấp thụ. Sự ức chế này xảy ra trên vi khuẩn nhiều hơn là trên thực khuẩn thể.

Tóm lại trong lên men AG thường gặp các loại tạp chủng như vi khuẩn sinh bào tử và thực khuẩn thể, chúng gây tác hại to lớn cho sản xuất. Muốn phòng chống chúng cần chọn địa điểm xây dựng xí nghiệp thích hợp, thiết kế chế tạo lắp ráp thiết bị đúng yêu cầu kỹ thuật, quan

tâm dây đủ đến hệ thống lọc khí, luân canh giống, lên men gián đoạn và đưa hoá chất sát trùng với nồng độ thích hợp vào môi trường. Các hoá chất được tuyển chọn hiện nay là: tetraxyclin, cloramphenicol, axit xitric, axit oxalic, axit phytic, natri hay tetrapolyphosphat, 1w60 (polyoxyetylen glycol monostearat), PEG-Mo (polyoxyetylen glycol monooleat) và POE-SE (polyoxyetylen stearyl eter).

Mỗi loại hoá chất có tác dụng đặc hiệu riêng: Các axit xitric, oxalic, và natri hay tetrapolyphosphat ức chế thực khuẩn thể của hai chủng vi khuẩn :

Microbacterium ammoniaphilum và *brevibacterium lactofermentum ammoniaphilum* N₀2256, còn các chất kháng sinh (tetraxyclin, cloramphenicol) và các chất hoạt động bề mặt (PEG-MO), (POE-SE, tween60) chỉ tác dụng với thực khuẩn thể của *Brevibacterium lactofermentum* N₀2256.

1.8.10. Các yếu tố ảnh hưởng tới tác dụng của hoá chất

1.8.10.1. Nồng độ

Bảng 42. Ảnh hưởng của các chất ảnh hưởng tới sinh trưởng của thực khuẩn thể và *Microbacterium ammoniaphilum*

Tên hoá chất	Nồng độ	Sinh trưởng của vi khuẩn	Sản lượng thực khuẩn thể
Axit xitric	10^{-1} mol	Tốt	0
	$5 \cdot 10^{-2}$	Tốt	0
	$5 \cdot 10^{-3}$	Tốt	100
Axit oxalic	10^{-1} mol	Tốt	0
	$5 \cdot 10^{-2}$	Tốt	0
	$5 \cdot 10^{-3}$	Tốt	100
Natri-troplyphosphat	100 mg/dl	Tốt	0
	10	Tốt	100
	1	Tốt	100
Natri – tetrapolyphosphat	100 mg/dl	Tốt	0
	10	Tốt	100
	1	Tốt	100

Theo các tài liệu cho biết thì điều kiện nhiệt độ, pH, thành phần dinh dưỡng tối ưu cho vi khuẩn sinh trưởng cũng đồng thời là điều kiện tối ưu cho sự phát triển của thực khuẩn thể của chúng. Bởi thế, trong khi sử dụng hoá chất phòng ngừa thực khuẩn thể ta không thể thay đổi các điều kiện đó mà chỉ thay đổi nồng độ đem dùng và thời điểm hoá chất sao cho chất đó phát huy hiệu lực cao nhất. Bảng số 40 đến số 42 ghi lại ảnh hưởng của nồng độ các chất đến sự sinh trưởng của vi khuẩn và thực khuẩn thể. Số liệu cho thấy mỗi hoá chất có một giới hạn nồng độ, ở đó vi khuẩn không thể bị ức chế nhưng thực khuẩn thể bị ức chế hoàn toàn.

Điều kiện thí nghiệm: gây nhiễm bằng thực khuẩn thể P₁ trên chủng tiếp nhận có nồng độ ban đầu 10⁸ tế bào/ml cho hoá chất vào lúc gây nhiễm đầu tiên.

1.8.10.2. Thời điểm bổ sung hoá chất

Bổ sung hoá chất đúng lúc có ý nghĩa vô cùng quan trọng, quyết định tính hiệu lực của hoá chất đem dùng. Ví dụ cho thêm tetracylin vào hỗn hợp vi khuẩn thực khuẩn thể ngay từ đầu hay chậm lắm là 90 phút sau khi xảy ra sự hấp thụ thì tetracylin sẽ ức chế rất mạnh sự phát triển của thực khuẩn thể *Brevibacterium lactofermen* No 2256 do đó ức chế tổng hợp protein và ADN ở vi khuẩn nhiễm. Thêm sau giờ đó thì chất này không còn tác dụng.

Bảng 43. So sánh tác dụng ức chế của các chất chelat lên sự nhiễm thực khuẩn thể P.465 vào vi khuẩn *Brevibacterium lactofermen* No 2256, chủng V0Z (lắc trong 72 h, 30°C)

Tên hoá chất	Nồng độ (%)	Không thêm thực khuẩn thể		Có thực khuẩn thể		
Na-phyphat	0,1	0,77	42,8	0,80	43,5	0,0002
	0,2	0,84	45,3	0,81	47,5	0,0001
	0,3	0,75	45,5	0,87	46,2	0,0006
Natri-xitrat	0,1	0,89	46,3	0,76	37,5	4,8
	0,5	0,80	46,1	0,81	47,5	1,5
Natri-oxalat	0,1	0,83	45,8	0,80	48,6	0,20
	0,3	0,85	46,1	0,81	50,1	0,01
Natri-hexa-metaphotphat	0,1	0,88	50,1	0,50	31,6	5,4
	0,5	0,41	10,9	0,26	3,6	1,8
Natri-tryrothotphat	0,1	0,84	47,2	0,35	17,8	56,0
	0,5	0,64	24,9	0,60	30,7	4,1
Đối chứng	-	0,85	45,6	0,25	Vết	150

Bảng 44. Ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt không ion hoá lên sự nhiễm thực khuẩn thể P.465 vào chủng *Microbacterium ammoniaphilum* (lên men 40 ÷ 48 h trong môi trường nghèo Biotin. Nồng độ thực khuẩn thể ban đầu là 5.10^4 PEIU/ ml. Khi dùng tween 60 thì lên men trong môi trường giàu Biotin)

Tên hoá chất	Nồng độ (%)	Không có thực khuẩn thể		Cho thêm thực khuẩn thể		
		Sinh trưởng VK (OD)	Hiệu suất lên men AG (%)	Sinh trưởng VK (OD)	Hiệu suất lên men AG (%)	Sản lượng thực khuẩn thể (PFV/ml)
Đối chứng	-	0,69	42,0	0,10	-	10^{11}
POE-xetylete	0,05	0,70	44	0,56	29	10^9
	0,10	0,74	43	0,73	44	10^6
	0,20	0,56	31	0,54	34	10^6
	0,50	0,57	36	0,42	14	10^5
	1,00	0,39	7	0,36	2	10^3
POE-stearylete	0,10	0,79	43	0,73	44	10^6
	0,20	0,74	36	0,76	41	10^5
	0,50	0,74	38	0,74	37	10^4
	1,00	0,76	41	0,76	42	10^3
	2,0	0,80	37	0,79	40	10^3
POE-oleylete	0,10	0,79	44	0,76	42	10^7
	0,20	0,69	32	0,70	35	10^4
	0,50	0,82	27	0,85	29	10^5
	1,00	0,69	21	0,64	24	10^4
	2,0	0,47	20	0,41	19	10^3
PEG-monooleat	0,10	0,68	45	0,44	12	10^9
	0,20	0,66	41	0,61	39	10^4
	0,50	0,71	43	0,70	45	10^3
	1,00	0,64	39	0,78	40	10^3
	2,0	0,72	28	0,79	43	10^3
PEG-monotrarat	0,10	0,68	46	0,31	2	10^{10}
	0,20	0,64	40	0,51	23	10^9
	0,50	0,50	26	0,54	39	10^6
	1,00	0,43	19	0,41	22	10^3
Tween-60	0,10	0,91	10,1	0,31	6,3	10^{10}
	0,5	0,81	20,3	0,40	13,7	3×10^9
	2,0	0,64	47,3	0,63	44,7	4×10^6
	4,0	0,88	45,7	0,60	41,4	3×10^5

Một trường hợp là sau khi nhiễm chủng 5 phút, nếu thêm Na-TPP vào thì sẽ ức chế hoàn toàn sự sinh sản của thực khuẩn thể, nhờ đó khống chế được sự tổng hợp AND ở vi khuẩn nhiễm. Nhưng thêm vào sau đó khoảng 10 phút thực khuẩn thể vẫn phát triển bình thường như khi không có Na-TPP.

Đối với các chất hoạt động bề mặt (HDBM) cũng có quy luật tương tự. Các hoá chất thuộc loại này chỉ có tác dụng khi thực khuẩn thể chưa bị hấp thụ vào vi khuẩn; mà thôi. Cho nên nếu thêm các chất HDBM sau khi nhiễm thì thực khuẩn thể vẫn hoạt động bình thường. Ở đây có một trường hợp đặc biệt là Tween chẳng những có tác dụng ức chế sự hấp thụ đầu tiên của thực khuẩn thể mà còn có tác dụng đến hiệu suất sinh sản của thực khuẩn thể đã hấp thụ ở mức độ nhất định. Thêm sau khi nhiễm 0 ÷ 30 phút, sản lượng thực khuẩn thể thấp hơn mẫu không thêm, nhưng thêm chậm hơn thì lại cao hơn mẫu không thêm.

Nguyên nhân của hiện tượng này, một phần do tác dụng đặc tính của từng hoá chất, nhưng cơ bản là do sự hấp thụ nhanh của thực khuẩn thể vào vi khuẩn, được đặc trưng bằng tốc độ hấp thụ K. K phụ thuộc vào thực khuẩn thể, điều kiện hấp thụ (nhiệt độ pH, môi trường dinh dưỡng ...), đặc biệt là sự có mặt một số ion kim loại như Ca, Mg, K càng lớn thì tốc độ hấp thụ càng nhanh. Một số tác giả cho biết là: P465, P468II hấp thụ vào *Brevibacterium lactofermen* sau 15 phút là 65% còn P4 và Ap85III trong cùng khoảng thời gian đó lại hấp thụ được nhiều hơn khoảng 70%. Nói chung có điều kiện tiếp xúc thì sau khoảng 10 phút, có 50% thực khuẩn thể xâm nhập vào được vi khuẩn bản 44.

Như vậy khi tiếp xúc với vi khuẩn, thực khuẩn thể được hấp thụ rất nhanh và phần lớn các hoá chất lại không có tác dụng lên thực khuẩn thể đang được hấp thụ, cho nên phải bổ sung kịp thời mới có tác dụng. Làm thế nào để xác định chính xác thời điểm xâm nhập này để thêm hoá chất kịp thời. Ta biết biểu hiện của sự nhiễm thực khuẩn thể trong lên men như: tỷ lệ sinh trưởng của vi khuẩn (OD) giảm, pH tăng hay giảm, mức tạo thành L-AG, hiện tượng này diễn biến rất lâu, sau khi thực khuẩn thể đã chui vào vi khuẩn, bởi vì chu kỳ sinh trưởng của thực khuẩn thể khá dài khoảng 64 ÷ 188 phút (tiềm phát 40 đến 140 phút, LOG 24 ÷ 48 phút); nghĩa là nếu chờ đến khi thấy biểu hiện nhiễm mới thêm hoá chất thì đã quá muộn. Do vậy, để đảm bảo an toàn sản xuất người ta thường cho hoá chất vào môi trường lúc tiếp giống.

1.9. ĐIỀU KIỆN KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG

Thực khuẩn thể rất nguy hiểm cho quá trình lên men, nhưng nó rất nhạy cảm với nhiệt độ. Đa số thực khuẩn thể của vi khuẩn sinh L-AG đều dễ bị mất hoạt động trong 10 phút ở 80°C. Song để đảm bảo chắc chắn người ta chọn hai chế độ xử lý nhiệt (đun sôi 15 phút và hấp 110°C/

15 phút) để thấy rõ tác dụng nhiệt tới việc diệt thực khuẩn thể và tới hiệu suất lên men của môi trường.

Bảng 45. Kết quả thí nghiệm xử lý nhiệt dịch lên men nhiễm trùng

Nguồn gốc dịch xử lý	Đã lên men tới giờ thứ	Xử lý nhiệt	Lượng rỉ đường cho thêm (%)	Nồng độ L-AG dịch men thu được (g/l)
Dịch men đợt 1, pH = 7,5	9	Đun sôi 5 phút	0	37,6
			0,15	43,2
			0,20	44,0
		Hấp 110° C trong 15 phút	0	36,0
			0,15	43,0
			0,20	40,0
Dịch men đợt 2, pH = 8	14	Đun sôi 5 phút	0	0
			0,15	37,5
			0,30	41,3
		Hấp 110° C trong 15 phút	0	0
			0,15	32,5
			0,30	35,0
Dịch men đợt 3, pH = 8	20	Đun sôi 5 phút	0	0
			0,15	33,5
			0,30	43,9
		Hấp 110° C trong 15 phút	0	0
			0,15	32,7
			0,30	40,9

Số lượng nhiễm tạp thực khuẩn thể còn phụ thuộc vào tỷ lệ rỉ đường mĩa cho vào môi trường, nên các thí nghiệm cho biết thêm tỷ lệ đường mĩa thích hợp và hiệu suất lên men liên quan chặt chẽ tới khâu xử lý nhiệt môi trường.

Bảng 45 cho thấy rõ đun sôi dịch xử lý 5 phút hay hấp 110°C/15 phút để loại trừ tác hại của tạp trùng đã nhiễm, và trong thí nghiệm không thấy rõ rệt về mặt hiệu suất lên men giữa hai môi trường xử lý nhiệt khác nhau. Còn trong thực tế sản xuất điều kiện tiệt trùng chắc chắn sẽ ảnh hưởng lớn tới chất lượng môi trường, trước hết là tới hàm lượng L-AG sinh ra của giống.

Số liệu cho thấy dịch men sau xử lý nhiệt đều phải thêm rỉ đường thì L-AG sinh ra mới cao. Số lượng rỉ đường cần thêm cho từng mẻ phụ thuộc vào thời gian đã lên men của dịch đem xử lý. Nếu phát hiện nhiễm trùng và ngừng sớm từ giờ thứ 9 chẳng hạn thì phải cho thêm ít rỉ đường (0,15%). Nhưng nếu phát hiện chậm hay nuôi dưỡng lâu tới $14 \div 20$ giờ thì nhất thiết phải thêm lượng rỉ đường bằng lượng cho vào khi pha môi trường đầu tiên ($0,30 \div 0,48\%$), có như vậy hiệu suất lên men mới đạt giá trị cao nhất.

Điều này cho ta thấy rằng, tuy giống cấp hai đã bị nhiễm thực khuẩn thể không có khả năng sinh sản trên môi trường mới, nhưng vẫn hấp thụ các chất sinh trưởng, quan trọng nhất là biotin. Do vậy hàm lượng biotin trong môi trường giảm rất nhanh và thực tế cho thấy nếu giống mạnh khoẻ thì chỉ sau 6 giờ nuôi cấy, môi trường lên men nghèo biotin sẽ không còn chút biotin nào nữa. Song vì bệnh nên tốc độ hấp thụ biotin của giống bị chậm đi, do đó dù có kéo dài thời gian nuôi dưỡng hơn 6 giờ, môi trường vẫn còn chứa lượng đáng kể biotin. Kết quả là ta phải thêm một ít rỉ đường mía để đảm bảo đủ biotin cho sinh trưởng và tích lũy L-AG của giống sau này. Một loại chất sinh trưởng khác rất quan trọng là VTM B₁. Vì thừa B₁ không ảnh hưởng đến sự tích lũy L-AG, nên ở đây thường cho 150 g/l môi trường. Còn biotin dư thì phải được loại bằng penicilin G.

1.10. HIỆN TƯỢNG NHIỄM THỰC KHUẨN THỂ ÔN HOÀ

1.10.1. Giống nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa

➤ Hiện tượng lên men không phát triển: Trong lên men axit glutamic thường gặp hiện tượng giống cấp II không phát triển khi tiến hành vào môi trường lên men. Việc đó có thể là do: thứ nhất giống cấp II bị nhiệt tác dụng ở giữa giai đoạn phát triển logarit hay đầu thời kỳ cân bằng. Hai là giống cấp II bị nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa và giống bị nhiễm tác dụng qua diễn biến pH dịch lên men.

Khi tiếp giống bị tác dụng nhiệt vào môi trường lên men thì loại giống này không phát triển được, men ureaza cũng ngừng hoạt động. Cho nên pH môi trường không tăng với trị số không đáng kể. Những mẻ lên men như vậy chỉ cần tiếp thêm giống mới với số lượng như đã tiếp lần đầu thì lên men lại diễn ra bình thường và đạt kết quả tốt.

Ngược lại nếu dùng giống cấp II bị nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa tiếp và lên men thì nó không phát triển được nữa. Song men ureaza vẫn hoạt động được, NH₄ sinh ra không bị tiêu thụ làm pH môi trường tăng lên tới xấp xỉ 8. Những mẻ lên men như thế cần có phương pháp xử lý đúng mới cứu vãn được. Muốn có phương pháp đúng phải hiểu đặc điểm của vi khuẩn sinh tan

và thực khuẩn thể ôn hòa và sự biến đổi của thành phần dinh dưỡng của môi trường, đặc biệt là hàm lượng các chất sinh trưởng như biotin, vitamin H và vitamin B₁.

➤ Thực khuẩn thể ôn hòa: người ta chia virus ký sinh trên vi khuẩn thành hai loại: thực khuẩn thể cấp tính và thực khuẩn thể ôn hòa. Khi xâm nhập vào tế bào vi khuẩn thực khuẩn thể cấp tính bắt bộ máy sinh sản phải làm việc cho mình, tổng hợp nên ADN, ARN và protit cho riêng thực khuẩn thể. Sau khi đạt tới trị số cực đại, thực khuẩn thể cấp tính tiết ra men làm tan màng tế bào vi khuẩn và chui ra khỏi tế bào vi khuẩn. Người ta nói thực khuẩn thể cấp tính đã làm nổ tung tế bào vi khuẩn và giết chết vi khuẩn, làm cho dịch đang đục trở nên trong, do đó OD dịch tế bào giảm dần.

Ngược lại với thực khuẩn thể cấp tính, thực khuẩn thể ôn hòa không làm nổ tung tế bào mà chỉ đục những lỗ nhỏ và chui ra ngoài theo những lỗ đó làm cho hình dạng tế bào không thay đổi, do vậy OD dịch vi khuẩn cũng không thay đổi. Một số nơi, thực khuẩn thể ôn hòa truyền từ tế bào này sang tế bào khác mà không cần chui ra ngoài tế bào vi khuẩn. Ở mức độ nhất định loại này đã hợp tác với vi khuẩn theo nguyên tắc đôi bên cùng có lợi, vi khuẩn cũng sinh trưởng và thực khuẩn thể cũng phát triển theo. Có trường hợp khi sinh sản theo phân cắt, vì lý do nào đó vi khuẩn đánh rơi đoạn mặt mã do thực khuẩn thể gắn vào thì sẽ có một tế bào vi khuẩn mới sinh ra không chứa thực khuẩn thể ôn hòa và là tế bào bình thường. Còn tế bào kia là tế bào bệnh gọi là vi khuẩn sinh tan (vi khuẩn nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa). Sự đánh rơi đó hiếm hoi, trung bình cứ 10⁵ tế bào thì mới có một tế bào đánh rơi mặt mã di truyền. Và trường hợp này vi khuẩn sinh tan và vi khuẩn bình thường cùng song song tồn tại và phát triển trên cùng một môi trường.

Điều đáng nói là thực khuẩn thể ôn hòa khi đã xâm nhập vào tế bào vi khuẩn nó bủa lưới quanh vi khuẩn ngăn không cho thực khuẩn thể cấp tính tấn công vào. Cũng có thể nói thực khuẩn thể ôn hòa đã làm cho vi khuẩn miễn dịch đối với thực khuẩn thể cấp tính.

Nhưng tính ôn hòa của thực khuẩn thể ôn hòa không tồn tại mãi mà có sự thay đổi đột ngột khi chịu tác dụng của các nhân tố vật lý hay hóa học nào đó hoặc gặp điều kiện sống mới khắc nghiệt hơn điều kiện mà nó đang sống chung với vi khuẩn hay vi khuẩn sinh tan. Khi ấy nó biến thành thực khuẩn thể cấp tính phá hoại màng tế bào vi khuẩn. Nói một cách khác thực khuẩn thể ôn hòa không bền mà dễ biến thành thực khuẩn thể cấp tính mỗi khi có tác dụng của ngoại cảnh không thuận lợi.

Thật ra không phải lúc nào thực khuẩn thể ôn hòa cũng đoàn kết với vi khuẩn. Khi thực khuẩn thể ôn hòa và vi khuẩn gặp nhau trên môi trường mới thì thực khuẩn thể ôn hòa tỏ ra là mạnh mẽ, kìm hãm sự sinh trưởng của tế bào, sự kìm hãm đó mạnh hay yếu hoàn toàn tùy thuộc vào “độ quen biết”, “độ thích nghi” của vi khuẩn trên môi trường đó. Vấn đề này sẽ trình

bày kỹ hơn ở phần khác. Đã có nhiều nghiên cứu về thực khuẩn thể của vi khuẩn sinh L-AG. Nhưng chưa thấy nói rõ là thực khuẩn thể ôn hòa hay cấp tính. Có lẽ thực khuẩn thể ôn hòa cũng rất nhạy cảm đối với nhiệt, thuốc kháng sinh và một số hóa chất khác.

Tobicaza Oki và cộng sự đã bỏ ra nhiều công sức nghiên cứu về thực khuẩn thể của các vi khuẩn sinh L-AG và chỉ rõ 4 loại thực khuẩn thể của *Brevibacterium ladofermentum* No 2256 là P465, P468 II, P4 và Ap85 III đều kém chịu nhiệt hầu như chết hết sau 10 phút ở nhiệt độ 80°C trở lên, hoạt lực của các thực khuẩn thể này bền vững ở pH = 6 ÷ 10, và giảm nhanh khi bị tia tử ngoại chiếu vào (hầu như chết hết sau 3 phút tác dụng của đèn tử ngoại 15W, 2537A, 30cm). Độ nhạy cảm của thực khuẩn thể đối với nhiệt có nguồn gốc ở độ bền vững của protein và DNA, các tác giả trên cho biết ở nhiệt độ 85°C, DNA của thực khuẩn thể bị phá hủy dần.

Khi nghiên cứu về thực khuẩn thể dinh vi khuẩn L-AG *Microbacterium ammoniaphilum*, S. Seto, T. Osawa và Soto Yamaoto thấy rằng xitrat, oxalat, natrium-tri hay tetraphotphat là những chất kìm chế mạnh khi cho vào môi trường với lượng tối ưu và thời điểm nhất định. Oki và đồng nghiệp cũng cho biết các hóa chất vừa nói cũng có tác dụng tương tự lên thực khuẩn thể *Br. Ladofermentum* No2256. Họ chỉ ra rằng các chất hoạt động bề mặt như polyoxyethylase fatty axit ester hoặc polyoxy etylen alkyl ete ức chế mạnh sự phát triển nội bào của thực khuẩn thể. Cũng theo Oki và đồng nghiệp, cloramphenicol và tetraxylin tác dụng mạnh lên thực khuẩn thể của *Br. Ladofermentum* No2256.

Khi dùng các hóa chất kháng thực khuẩn thể cần chú ý tới liều lượng và thời điểm bổ sung. Liều lượng dùng thay đổi tùy theo loại hóa chất. Thời điểm bổ sung thích hợp thường là giai đoạn đầu tiên của quá trình vi khuẩn tiếp xúc với thực khuẩn thể. Theo Seto và cộng sự nồng độ cần dùng đối với xitrat và oxalat là 0,05M và natri polyphotphat là 0,1%. Thời điểm cho natri photphat có lợi là 0 ÷ 5 phút đầu sau khi tiếp giống hay có thực khuẩn thể xâm nhập.

Số liệu nghiên cứu thu được đối với thực khuẩn thể ôn hòa của *Corynebacterium* xác nhận độ nhạy cảm đối với nhiệt của thực khuẩn thể. Biểu hiện cụ thể là đối với P328, P338 và T240. Nếu dịch lên men có nhiễm 3 loại thực khuẩn thể này (từ giống cấp II) được đun sôi, bổ sung thêm một số hóa chất và tiếp lại giống bình thường thì giống sinh AG sẽ phát triển và tạo L-AG như mọi giống tiếp trên môi trường không nhiễm trùng khác. Mặt khác số liệu nghiên cứu cũng cho thấy thực khuẩn thể ôn hòa không ảnh hưởng tới lượng L-AG sinh ra nếu nó xâm nhập vào lúc mà vi khuẩn đã ở giữa giai đoạn phát triển logarit.

Đặc điểm vi khuẩn sinh tan (nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa): Trong nhân giống cấp II thường gặp trường hợp nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa. Khi đó giống sinh L-AG được gọi là vi

khuẩn sinh tan. Thời điểm thực khuẩn thể xâm nhập vào giống cấp II có ý nghĩa quyết định tới việc phát triển của vi khuẩn sinh tan.

Kết quả nghiên cứu và thực tiễn cho thấy, nếu thực khuẩn thể ôn hòa xâm nhập vào vi khuẩn từ giờ đầu tới gần giờ nuôi dưỡng thứ 5 thì vi khuẩn bị kìm chế hoàn toàn. Nhưng sau giờ nuôi dưỡng thứ 5 trở đi dù loại thực khuẩn thể ôn hòa nào xâm nhập vào, vi khuẩn sinh L-AG vẫn phát triển đều đặn, vẫn có hình thái bình thường và hấp thụ đường tương tự như các vi khuẩn khỏe mạnh khác.

Các số liệu trong bảng 46 cho thấy nếu căn cứ vào tốc độ hao đường, sự phát triển sinh khối và hình thái vi khuẩn thì khó phân biệt được giống bình thường và giống đã bị nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa hay vi khuẩn sinh tan. Đó cũng là khó khăn thực tế của sản xuất dẫn tới tình trạng chọn nhầm giống dẫn vào lên men.

Bảng 46. Ảnh hưởng của thời điểm xâm nhập của thực khuẩn thể ôn hòa P240, P382, P388 tới sự sinh trưởng của *Corynebacterium*

Loại thực khuẩn thể	Thời điểm xâm nhập	OD 1/20 sau thời gian nuôi dưỡng (giờ)		
		8	12	24
Không có	Không có	0,54	0,60	0,52
		0,54	0,62	0,51
		0,55	0,60	0,57
T240	0	0,19	-	0,25
	5	0,55	-	0,62
	8	0,55	-	0,61
	12	0,56	-	0,60
P382	0	0,09	0,1	0,09
	5	0,53	0,62	0,52
	8	0,54	0,60	0,51
	12	---	0,62	0,54
P388	0	0,07	-	0,09
	5	0,57	-	0,57
	8	0,57	-	0,56
	12	0,54	-	0,57

Bảng 47. Sự biến đổi nồng độ đường dịch giống khi thực khuẩn thể xâm nhập vào giờ thứ 5

Thời gian nuôi dưỡng (giờ)	Đường dư ở các đợt khác nhau (%)		
	(I)	(II)	(III)
0	1,92	2,14	1,74
6	0,84	1,96	1,36
9	0,22	1,78	0,70
10	0,08	0,98	0,60

Nếu đem vi khuẩn sinh tan gây nhiễm vào các giờ khác nhau từ 5,8 +12 giờ cấy lên hộp lỏng thạch hay tiếp vào môi trường nhân giống cấp I hay vào môi trường lên men mới thì có thể hiện tượng đặc biệt xảy ra: vi khuẩn sinh tan hoàn toàn không phát triển được trong môi trường lỏng, ngược lại trong môi trường đặc thì tùy theo loại thực khuẩn thể ôn hòa mà hoàn toàn không mọc hay có mọc nhưng khắp đường cấy có những lỗ trống, số lượng lỗ trống càng nhiều nếu thời gian gây nhiễm càng sớm.

Khi cấy vi khuẩn sinh tan vào môi trường mới ta mới biết được giống có bị nhiễm thực khuẩn thể hay không? Việc làm này chậm, đòi hỏi có thời gian tiến hành, cho nên kết quả thu được không phải để phòng ngừa mà chỉ có tác dụng đúc rút kinh nghiệm đánh giá quá trình sản xuất và tiến hành xử lý dịch men bị nhiễm nhằm hạn chế hậu quả nhiễm thực khuẩn thể mà thôi.

Thực tế sản xuất chưa cho phép ta xác định đầy đủ mọi yếu tố tạo thành môi trường mà chủ yếu tập trung vào chất có tác dụng nhất - biotin. Những chất khác như muối khoáng, vitamin B₁ có thể cho dư một chút vẫn không ảnh hưởng tới hiệu suất lên men.

Mặc dù không thể phát triển được trên môi trường lỏng mới, vi khuẩn sinh tan vẫn hấp thụ biotin. Tuy tốc độ hấp thụ biotin của vi khuẩn sinh tan có chậm hơn một chút so với vi khuẩn bình thường, nhưng nếu thời gian nuôi dưỡng tại môi trường mới kéo dài thì tới một lúc nào đó vi khuẩn sinh tan sẽ hấp thụ hết lượng biotin có trong môi trường. Nói cách khác thời gian nuôi dưỡng càng dài, vi khuẩn sinh tan càng hấp thụ nhiều biotin.

Để biết nồng độ biotin có trong môi trường ta có thể áp dụng phương pháp hóa học hay phương pháp sinh học. Áp dụng bất cứ phương pháp nào cũng tốn thời gian. Dưới đây là một cách làm đơn giản mang lại hiệu quả cao.

Lượng dịch lên men bị nhiễm, đun sôi, cho thêm hóa chất vô trùng như B₅ 500 γ/l, ri đường mía với tỉ lệ 0-0,15-0,3-0,35-0,4%. Tiếp thêm giống cấp I, lắc 12 giờ, xác định OD rồi

căn cứ vào OD của tất cả các mẫu so sánh với OD mẫu đối chứng (môi trường không có vi khuẩn sinh tan) và chọn tỉ lệ đường thấp nhất cho giá trị OD gần bằng OD mẫu đối chứng. Đó là tỉ lệ rỉ đường cao nhất cần phải cho thêm nếu muốn môi trường mới có nồng độ biotin xấp xỉ giá trị mong muốn. Nếu có thể thì cho lactic tới 24 giờ và xác định trị số AG sinh ra rồi căn cứ vào đó chọn tỉ lệ biotin cần đưa thêm vào. Trong bảng 50 dưới đây thấy giống nuôi dưỡng tới giờ thứ 9, biotin vẫn còn dư nhưng đến giờ thứ 12 thì hầu như không còn nữa. Trong trường hợp thứ nhất phải thêm 0,15%, trong trường hợp thứ hai phải thêm toàn bộ lượng biotin dùng đầu tiên.

Bảng 48. Ảnh hưởng của thời gian xâm nhập của thực khuẩn thể ôn hòa tới biến đổi hình thái tế bào ở *Corynebacterium*

Loại thực khuẩn thể	Thời điểm xâm nhập (giờ)	Hình thái tế bào ở các thời điểm khác nhau(giờ)		
		8	12	24
T240	0	Gậy dài, hai đầu bằng	Nhỏ vụn	Không thấy giống
	5 8 12	Béo khỏe, xếp V, dài ngắn không đều	Béo khỏe, xếp chữ V, một số quá dài	To nhỏ không đều
P382	0	Tế bào xếp thành chuỗi nối tiếp nhau		
	5 8 12	Béo khỏe xếp V, chưa đều và hơi ngắn	Béo khỏe, xếp V, to nhỏ không đều	Béo khỏe xếp V, tương đối đều, một số cá lẻ
P388	0	To nhỏ không đều, một số khá dài	Bé nhỏ, vụn li ti	Nhỏ vụn li ti
	5 8 12	Xếp V, tế bào dài ngắn không đều	Béo khỏe xếp chữ V, không đều lắm	Béo khỏe xếp chữ V, song song không đều lắm

Bảng 49. Sự phát triển của vi khuẩn sinh tan khi nhiễm các thực khuẩn thể ôn hòa khác nhau

Loại thực khuẩn thể	Đặc điểm phát triển trên đường cấy của vi khuẩn sinh tan
T240	Có nhiều lỗ hổng trên đường cấy, thời gian cấy nhiều càng sớm, đường cấy càng có nhiều lỗ hổng
P382	Trên khắp đường cấy có nhiều lỗ hổng, thời gian gây nhiễm càng sớm càng có nhiều lỗ hổng. Tổng số lỗ hổng nhiều hơn ở T240
P388	Không có tế bào mọc

Bảng 50. Ảnh hưởng lượng rỉ đường đưa vào môi trường đã tiếp vi khuẩn sinh tan nuôi dưỡng tới giờ thứ 9,12 (chủ động cho B₁ 150 γ/lít)

Tỉ lệ rỉ đường thêm vào (%)	AG sinh ra (g/l)	
	đợt I (giống nuôi tới 9 ^o C)	đợt II (giống nuôi tới 12 ^o C)
0	36	0
0,15	43	37,5
0,30	38	41,25
Môi trường mới	42,8	41,4

I.10.2. Phương pháp phòng ngừa và xử lý dịch men nhiễm thực khuẩn thể ôn hòa

I.10.2.1. Xử lý lại môi trường và tiếp giống mới

Xử lý bằng hóa chất: rỉ đường, B₁, hóa chất thanh trùng ở 120^oC thực khuẩn thể cấp tính trong 30 phút rồi đưa vào môi trường xử lý. Cần chú ý đến khả năng giảm pH của môi trường xuống dưới mức quy định. Nếu việc đó có thể xảy ra thì phải trung hòa trước khi thanh trùng sao cho môi trường có pH xấp xỉ 6,5 ÷ 7,0. Hóa chất đưa vào phải đảm bảo khả năng làm mất tác dụng của thực khuẩn thể đã nhiễm và không gây tác hại đến giống và L-AG sinh ra.

Xử lý bằng nhiệt: Gia nhiệt môi trường tới 80^oC thực khuẩn thể cấp tính đối với thiết bị cỡ lớn hay 100^oC khuẩn thể cấp tính đối với thiết bị cỡ nhỏ và làm lạnh đến nhiệt độ bình thường. Khi thanh trùng chú ý thanh trùng cả phần thiết bị và đường ống liên quan không tiếp xúc với môi trường nhằm trừ tận gốc cơ hội nhiễm trùng.

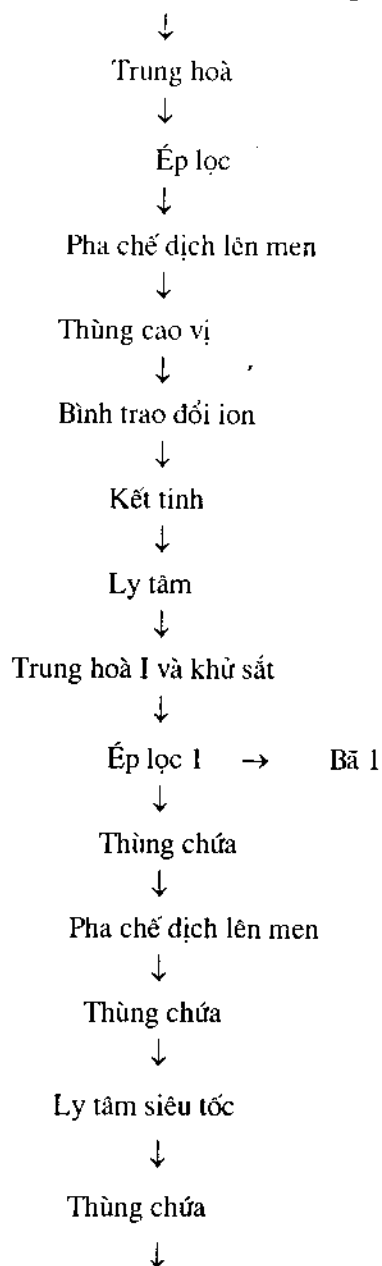
Cần phải xem xét, dự đoán khả năng tăng pH của môi trường. Nếu sau thanh trùng pH chỉ tăng lên không quá 8 thì không cần phải điều chỉnh. Nếu pH vượt quá 8 thì phải điều chỉnh lại bằng HCl, H₂SO₄ hay xitric trước khi xử lý nhiệt.

Theo dõi các đợt lên men bị nhiễm xử lý lại ta thấy sản lượng L-AG thu được ở mẻ cho thêm HCl thấp hơn là không cho. Bởi vậy nếu thật là cần thiết mới sử dụng để hạn chế muối clorua đưa vào môi trường. Môi trường sau khi xử lý, làm lạnh tới 32^oC thực khuẩn thể cấp tính và tiếp giống cấp II mới với tỉ lệ 2%. Diễn biến lên men có thể xảy ra bình thường như các đợt lên men khác.

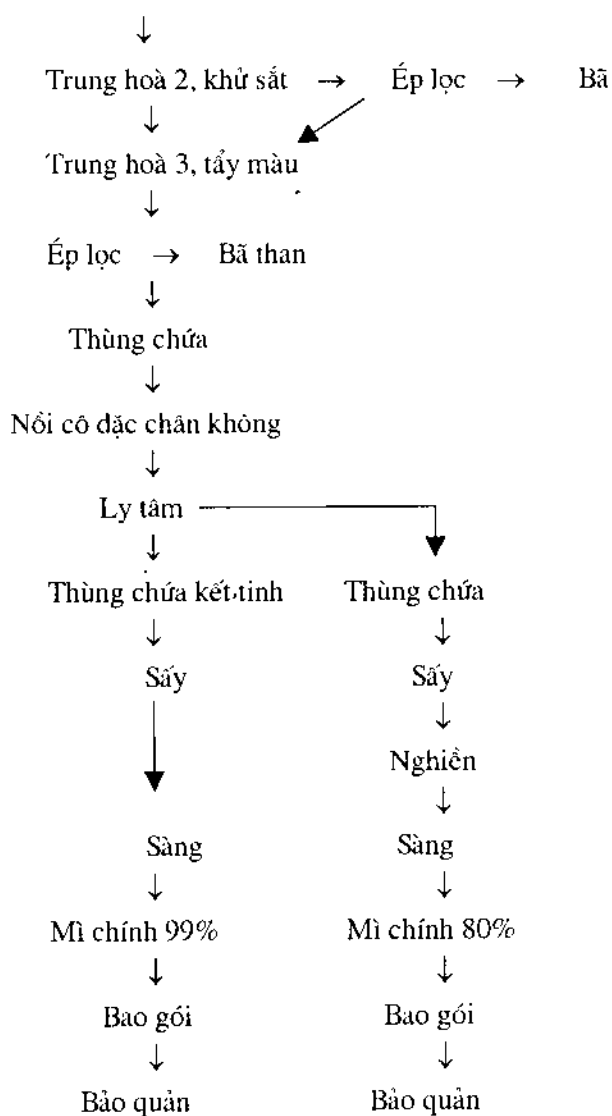
II. DÂY CHUYỀN CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MÌ CHÍNH THEO PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN

II.1. Sơ đồ dây chuyền

Sơ đồ 9: Bột → Hoà nước → Thủy phân hoàn xung



Sơ đồ 9 (tiếp theo)



II.2. Thuyết minh dây chuyền

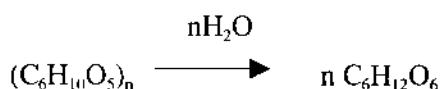
Căn cứ vào dây chuyền sản xuất ta có thể chia ra bốn công đoạn chính như sau:

- 1) Công đoạn thủy phân tinh bột.
- 2) Công đoạn lên men.
- 3) Công đoạn trao đổi ion tách axit glutamic ra khỏi dịch lên men.
- 4) Công đoạn trung hoà, tinh chế tạo glutamat natri tinh khiết.

II.2.1. Công đoạn thuỷ phân

Mục đích của công đoạn này là tạo điều kiện để thực hiện phản ứng thuỷ phân tinh bột thành đường lên men được, chủ yếu là đường glucoza.

Phản ứng xảy ra như sau:



Để thực hiện phản ứng trên, người ta có thể tiến hành theo nhiều phương pháp khác nhau và mỗi phương pháp đều có những ưu và nhược điểm riêng, đáng chú ý nhất là ba phương pháp sau đây:

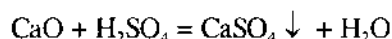
II.2.1.1. Phương pháp thuỷ phân bằng enzym

Người ta có thể dùng α -amilaza, β -amilaza của các hạt nảy mầm hay của nấm mốc để thuỷ phân tinh bột thành đường. Phương pháp này có ưu điểm là không cần dùng đến hoá chất hay thiết bị chịu axit, chịu áp lực..., không độc hại cho người và thiết bị nhưng có nhược điểm là:

- Đường hoá không triệt để tinh bột, mà ở dạng trung gian như dextrin... làm cho vi khuẩn lên men mì chính không có khả năng sử dụng.
- Thời gian đường hoá tương đối dài.
- Hàm lượng đường sau khi đường hoá thấp, do đó phải sử dụng thiết bị to, công kênh.

II.2.1.2. Phương pháp thuỷ phân bằng H_2SO_4

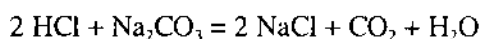
Phương pháp này có ưu nhược điểm cơ bản là sau khi thuỷ phân việc trung hoà axit dư sau này không phải dùng Na_2CO_3 hay NaOH mà dùng CaO rẻ tiền hơn, mặt khác sản phẩm của phản ứng trung hoà lại kết tủa làm cho dịch đường trong theo phản ứng:



mà không tạo ra NaCl như dùng HCl. Tuy vậy, như phân trên đã nêu, hiệu suất thuỷ phân bằng H_2SO_4 thấp hơn dùng HCl, trong thực tế hay dùng HCl.

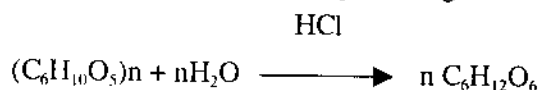
II.2.1.3. Phương pháp thuỷ phân bằng HCl

Phương pháp này tuy có nhược điểm là: phải dùng thiết bị chịu axit ở nhiệt độ cao, áp suất cao, khi trung hoà axit dư phải dùng Na_2CO_3 có tạo ra lượng muối nhất định theo phản ứng:



Hiện nay trong sản xuất hay dùng HCl để thủy phân tinh bột vì nó cho hiệu suất cao và thời gian thủy phân ngắn hơn do cường lực xúc tác mạnh, tuy khi trung hoà tạo ra một lượng NaCl trong dung dịch ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy vi khuẩn.

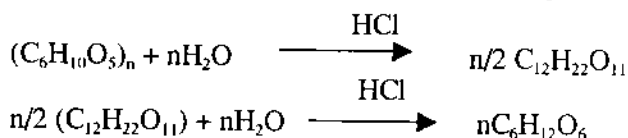
Quá trình thủy phân được tiến hành theo phản ứng và sơ đồ sau:



Bột → Hoà nước và HCl → Thủy phân → Trung hoà → Tẩy màu → Dung dịch đường glucoza.

Thường tỷ lệ bột/nước/axit HCl trung hoà theo tỷ lệ: 100/ 350/ 165 được khuấy đều.

Thủy phân: Cho dung dịch vào nồi áp lực 2 vỏ, dung dịch tinh bột ở trong, hơi nước vào ở vỏ ngoài và nâng nhiệt độ nhanh lên 138°C trong khoảng 20 phút dưới áp lực 2,6 kG/cm². Trong điều kiện này: Tinh bột → dextrin → mạch nha → glucoza nhanh hơn.



Nếu để thời gian dài sinh ra các phản ứng phụ có hại cho sản phẩm và làm hao tổn lượng đường khá lớn.

Yêu cầu quá trình

- Dung dịch ra có nồng độ: 100°Be
- pH: 1,5
- Tổng số thời gian: 1 giờ
- Tỷ lệ đường hoá: ≥ 90%
- Hàm lượng đường: 16 ÷ 18 %

II.2.2. Trung hoà

Thủy phân xong dung dịch vào thiết bị trung hoà cho 30% vào để đạt pH = 4,8. Cho than hoạt tính vào tẩy màu (khoảng 100kg tinh bột cho 0,45 kg than). Than tẩy màu và giúp cho quá trình lọc dễ, dung dịch có màu trong sáng.

II.2.3. Ép lọc

Tách các phần bã và các chất không hoà tan, được dịch đường glucoza 16 ÷ 18%.

II.2.4. Công đoạn lên men

Đây là khâu có tính chất quyết định nhất đối với toàn bộ dây chuyền sản xuất. Trong công đoạn này có 3 giai đoạn nhỏ là: nuôi giống cấp I, giống cấp II và lên men lớn. Ngoài ra còn có những công đoạn phụ phục vụ cho quá trình lên men như: dây chuyền lọc khí, xử lý ure, xử lý dầu khử bọt.

Các khâu sẽ lần lượt được nghiên cứu như sau:

II.2.4.1. Giống - chủng

Các giống chủng đã được tuyển chọn như phần giới thiệu các giống vi khuẩn ở trên.

II.2.4.2. Môi trường

Qua phân tích thành phần hoá học của xác vi khuẩn và nhiều thí nghiệm nuôi cấy ở các cơ sở nghiên cứu và sản xuất đã thấy: ngoài một số môi trường chung kể trên, các môi trường sau là thích hợp hơn cả như:

- Môi trường thạch nghiêng: pepton 1%; cao thịt bò 1%; NaCl tinh chế 0,5%; thạch 2%
- Môi trường giống cấp I: đường glucoza tinh khiết 2,5%; ri đường 0,25%; nước chấm 0,32%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,04%; Fe, Mn (đã pha 2000g/l) 0,002%; ure 0,5%; B_1 (đã pha 150g/l) 0,00015%.
- Môi trường nhân giống cấp II (VD ứng với thể tích thiết bị lên men 60 lít): đường glucoza 2000g; $MgSO_4$ 24g; H_3PO_4 60g; KOH; pH = 9; nước chấm 300 ml; ri đường 600g; ure 480g; dầu lạc 60 ml; B_1 20 mg.

Quá trình nuôi giống được tiến hành theo các bước sau:

Giống gốc → cấy truyền ra ống thạch nghiêng đời 1 → cấy truyền ra ống thạch nghiêng đời 2 → lên men bình lắc (giống cấp 1) → nuôi ở thùng tôn (giống cấp 2) → lên men chính (nồi lên men cấp 3).

Các nguồn chất chính để nuôi bảo đảm yêu cầu trên:

- Hợp chất cacbon: đường glucoza
- Đạm vô cơ: ure.
- Đạm hữu cơ
- Các muối khoáng cần thiết
- Các chất phát triển...

II.2.4.3. Bảo quản giống

- Môi trường thạch nghiêng.
- Kích thước ống nghiệm có mặt phẳng nghiêng ϕ 15.
- Ống nghiệm trước khi dùng, thanh trùng cần thận $120^{\circ}\text{C}/0,5\text{h}$.
- Pha trộn môi trường: Dùng nước hoà tan các chất, cho thạch vào sau đó cho NaOH, điều chỉnh $\text{pH} = 7 \div 7,2$. Cuối cùng cho môi trường vào ống nghiệm thanh trùng $20 \div 30$ phút, áp lực $1\text{kg}/\text{cm}^2$. Sau đó hạ nhiệt độ xuống $50 \div 60^{\circ}\text{C}$, để ống nghiệm nghiêng thạch đông lại, sấy 45 giờ ở $t^{\circ} = 32^{\circ}\text{C}$, đem bảo quản lạnh. Khi cần, cấy tiếp chúng vào mặt thạch.

Tiếp chủng xong, bảo quản trong tủ lạnh $3 \div 4$ tháng. Sau $3 \div 4$ tháng thuần hoá, nhặt bỏ những con yếu.

II.2.4.4. Thuần hoá

Bảo đảm giống dùng trong sản xuất được khoẻ. Có hai cách thuần hoá:

- Dùng phương pháp phân ly và pha loãng: Lấy nước vô trùng rửa, pha loãng, dùng kính hiển vi soi, chọn con khoẻ nhất.
- Chọn lọc: Lấy nhóm đơn khuẩn cho vào môi trường ống thạch nghiêng để trong 24h, ở 32°C . Cho sang bình 1000 ml đưa vào bình tam giác 250 ml cổ chứa $200 \div 250$ ml môi trường. Để môi trường lên mặt sàng lọc ở nhiệt độ 32°C trong 12 giờ. Sau đó lấy 1ml cho vào bình tam giác 250 ml chứa 15ml môi trường lên men, giữ 32°C trong 48 giờ. Cuối cùng xác định hàm lượng axit glutamic tạo thành.

Sau quá trình lên men dùng giống này lên men 3 cấp.

II.2.4.5. Lên men (nuôi men cấp 3)

Trong các thiết bị lên men sản xuất có đủ các chất cho quá trình lên men và hiệu khí môi trường. Quá trình lên men cho không khí vào và khuấy trộn, lên men tạo bọt, do đó phải dùng dầu để khử bọt.

Ure, dầu đậu, không khí trước khi vào thùng lên men, tất cả que cấy, ống nghiệm, bình tam giác... đều phải thật sạch sẽ, vô trùng không có bất kỳ gợn vết gì và được thanh trùng trong nồi áp lực. Môi trường đã thanh trùng phải để nguội trong phòng vô trùng. Sau khi đã chuẩn bị đầy đủ môi trường, dụng cụ... dùng que cấy cấy giống từ ống gốc sang ống thạch nghiêng để vào tủ ấm 24 giờ cho khuẩn lạc phát triển, ta được giống đời I, cấy truyền sang ống thạch nghiêng

một lần nữa, ta được giống đời II và đủ lượng cho vào bình tam giác đã có sẵn môi trường đưa đi lên men trên máy lắc 12 giờ được giống cấp I.

II.2.4.6. Lên men cấp II

Chuẩn bị môi trường và thiết bị như quá trình lên men chính, thanh trùng môi trường 120°C trong 30 phút, quá trình nuôi giống không chế ở nhiệt độ 32°C áp suất 1kG/cm² không tiếp ure và dầu như quá trình lên men chính, lượng không khí cho vào khoảng: 850 ÷ 1100 lít/giờ kiểm tra pH 1 giờ 1 lần hoặc lượng không khí tăng dần tính từ giống nhỏ sang lên men chính theo tỷ lệ 1,0 - 0,25 - 0,5 l/l.phút: (lít không khí/ lít môi trường/1phút). Đến giờ thứ 8 thì soi chọn giống: Nồi nào dùng được thì 9 giờ giống có thể cấy tiếp sang nồi lên men chính (Đo OD dịch lên men, soi nồng độ vi khuẩn và xác định hàm lượng đường sót...) nếu chưa đạt yêu cầu thì có thể kéo dài thời gian lên men thêm 1 ÷ 2h nữa.

Nếu giống đã được, nhưng môi trường lên men chưa chuẩn bị kịp giống phải đợi thì để nguyên giống trong nồi, tắt cánh khuấy, giữ nguyên áp lực, dùng nước đông lạnh qua vỏ ngoài để hạ nhiệt độ xuống ≈ 10°C. Nhiệt độ càng thấp, thời gian đợi được càng lâu nhưng không nên đợi quá 3 giờ, quá thời gian đó giống đã bị già, tiếp sang nồi lên men sẽ phát triển chậm, hiệu suất tạo ra glutamic sẽ kém. Như vậy thời gian nuôi cấy giống cấp 2 mất 9 giờ và đến giờ thứ 8 mới biết kết quả giống có thể tiếp được hay không? Nếu giống yếu không tiếp được thì phải hủy bỏ, nuôi nồi khác. Để khắc phục tình trạng này, thường áp dụng 1 trong 2 biện pháp:

- Nuôi giống dự phòng: Thường cần 2 nồi giống thì người ta cho nuôi 3 nồi một lúc, đến khi kết thúc chọn lấy 2, hủy bỏ 1. Cách này nói chung đảm bảo cho lên men, kịp thời nhưng lãng phí.

- Biện pháp 2: Căn cứ tốc độ tiêu hao đường, diễn biến của pH, nhiệt độ, màu sắc của dịch ngay giờ thứ 4 thứ 5 phải phán đoán được kết quả phát triển của nồi giống đó, nếu thấy cần thì quyết định cho cấy giống dự phòng từ giờ đó.

Biện pháp này tránh được lãng phí nhưng đòi hỏi người cán bộ kỹ thuật phải giàu kinh nghiệm thực tế và do đó mà quyết định chính xác, nếu quyết định kém chính xác thì lãng phí, thậm chí thiệt hại còn lớn hơn nhiều so với trường hợp trên.

II.2.4.7. Xử lý ure và dầu phá bọt

- Xử lý ure: ure tham gia vào thành phần môi trường gồm ure dầu và ure tiếp trong quá trình. Ure dầu là ure cho vào môi trường, sau khi môi trường được thanh trùng và làm nguội đạt nhiệt độ 32°C và trước khi tiếp giống, hàm lượng ure dầu tiếp vào phải tính sao cho sau khi tiếp là 1,8% so với lượng môi trường.

Ure tiếp là ure bổ sung vào trong quá trình lên men, số lượng không cố định, khi pH dịch lên men đang từ trên 7 xuống dần thì phải tiếp dần ure cho đạt lên $7,5 \div 8$ sau đó do lượng axit glutamic tạo ra trong môi trường càng nhiều, pH càng giảm xuống 7 hoặc dưới 7 lại tiếp ure nữa cho đến khi đường trong dịch lên men còn khoảng 1% thì không cần tiếp nữa.

Vậy lượng ure phải được pha và thanh trùng riêng, thường pha 1 lần đủ cho 1 ngày đêm sản xuất, và nồng độ pha thường là 50% cho dễ tính toán.

Thường thanh trùng dung dịch ure trong nồi 2 vỏ, dùng hơi nóng nâng lên đến nhiệt độ 115°C giữ ở nhiệt độ này 15 phút thì kết thúc thanh trùng. Đóng van hơi lại, mở van khí nén vào để giữ áp và mở van nước lạnh vỏ để làm nguội. Khi nhiệt độ giảm xuống $32 \div 33^{\circ}\text{C}$ thì có thể tiếp cho nồi lên men.

- Xử lý dầu: Trong quá trình lên men, do hoạt động các chất men của vi khuẩn, thải ra nhiều CO_2 tạo ra nhiều bọt, vì vậy cần phải dùng một lượng dầu thích hợp để phá bọt. Các loại dầu như kể trên, nhưng ở ta hay dùng loại dầu lạc thô.

Dùng nồi 2 vỏ thanh trùng dầu như thanh trùng ure nhưng giữ ở nhiệt độ $120 \div 140^{\circ}\text{C}$ trong 120 phút. Sau đó cho giữ áp lực bằng không khí và hạ nhiệt độ xuống $32 \div 33^{\circ}\text{C}$ mới tiếp sang nồi lên men.

II.2.4.8. Xử lý không khí

Các loại vi khuẩn lên men axit glutamic là loại hiếu khí nên quá trình lên men đều phải cung cấp không khí. Mặt khác ta còn cần một lượng không khí vô trùng để giữ áp lực toàn bộ hệ thống như nồi ure, nồi dầu, đường ống v. v...

Không khí từ khí trời được hút qua một thùng tách bụi sơ bộ, qua máy nén, qua hệ thống tách bụi, làm nguội, qua bình lọc bông thủy tinh đến các bình lọc riêng sơ bộ rồi mới vào nơi sử dụng như nồi giống, nồi lên men.

II.2.4.9. Lên men lớn (lên men cấp III)

Mục đích: mục đích của khâu này là thông qua hoạt động sống của vi khuẩn trong những điều kiện thích hợp để chuyển hoá đường glucoza và đạm vô cơ thành axit glutamic.

Quá trình chính xảy ra:

a. *Giai đoạn đầu:* $8 \div 12$ giờ gọi là giai đoạn sinh khối. Giai đoạn này các chất đường đạm vô cơ và hữu cơ, các chất muối khoáng, vitamin và các chất sinh trưởng có trong môi trường thẩm thấu vào tế bào vi khuẩn làm cho vi khuẩn lớn lên, đạt kích thước cực đại và bắt đầu sinh sản, phân chia. Quá trình lặp lại cho đến khi lượng vi khuẩn đạt đến giá trị cực đại.

Những biểu hiện của giai đoạn này là:

- Nhiệt độ tăng vừa phải, càng về cuối giai đoạn tốc độ tăng nhiệt độ càng nhanh, nếu nhiệt độ ngoài trời $35 \div 36^{\circ}\text{C}$, không mở nước làm lạnh thì lúc đầu 1 giờ đến 1 giờ 30 phút môi trường tăng 1°C , về cuối 30 + 40 phút tăng 1°C , về mùa đông nhiệt độ tăng chậm hơn.

- pH tăng dần từ 6,5 + 6,7 lên 7,5 + 8.

- Bọt tạo thành tăng dần (do lượng thải CO_2).

- Lượng đường tiêu hao tăng dần, thường 2 + 3 giờ đầu hao rất ít, càng về sau tốc độ hao càng nhanh, chung cho cả giai đoạn là 2 + 3 giờ.

- Lượng tế bào vi khuẩn tăng dần từ khoảng 0,13 + 0,14 đến 1 (Số đo OD trên máy so mẫu).

- Hàm lượng axit glutamic chưa có hoặc rất ít.

b. *Giai đoạn giữa*: từ giờ thứ 10, 12 đến giờ thứ 24, 26. Giai đoạn này giữ cho số tế bào không tăng thêm nữa hoặc tăng rất ít. Quá trình chủ yếu trong giai đoạn này là: Đường và đạm vô cơ thẩm thấu qua màng tế bào vi khuẩn và các quá trình chuyển hoá bởi các men và các phản ứng như trên để tạo ra axit glutamic trong tế bào. Lượng axit glutamic tạo thành lại hoà tan vào các môi trường làm cho pH môi trường giảm dần, CO_2 bay ra nhiều, bọt tăng ào ạt.

Trong giai đoạn này nhiệt độ tăng nhanh nếu không làm lạnh trong 1 giờ có thể tăng $1 \div 2^{\circ}\text{C}$. Lượng đường hao nhanh từ 8,9% xuống còn 2,3%. pH giảm xuống còn dưới 7 nên phải tiếp ure để pH tăng lên 8 rồi lại giảm xuống nhanh chóng, axit glutamic tăng nhanh từ 0 đến 30 + 40 g/l.

c. *Giai đoạn cuối*: những giờ còn lại tất cả các biểu hiện đều giảm dần cho đến khi hàm lượng đường chỉ còn $\leq 1\%$ thì lên men kết thúc.

Thường thường để bảo đảm quá trình lên men đạt hiệu quả cao phải chú ý khống chế các điều kiện kỹ thuật như:

+ Nhiệt độ: luôn luôn giữ ở 32°C .

+ Áp suất: $1\text{kg}/\text{cm}^2$.

+ Lượng không khí: 30 + 40 m^3/l giờ cho 1m^3 môi trường.

+ Cánh khuấy 2 tầng 180 + 200 vg/ ph.

+ Khi pH giảm đến 7 phải bổ sung ure ngay cho pH lên đến 8, thường bổ sung 1 nôi lên men gián đoạn 2 ÷ 3 lần.

+ Khi bọt nhiều phải tiếp giống để phá bọt tạo điều kiện cho CO₂ thoát ra ngoài dễ dàng.

Các chế độ kiểm tra cần thiết trong giai đoạn này:

- Nhiệt độ lượng không khí, áp suất phải kiểm tra thường xuyên, có chiều hướng thay đổi phải điều chỉnh ngay.

- pH mỗi giờ kiểm tra một lần.

- OD (độ đục trên máy so mẫu): thường đo vào giờ thứ 0; 6; 12; 16; 18.

- Độ đường: phân tích xác định hàm lượng đường vào các giờ thứ 0; 6; 12; 16; 18; 20; 24 đến khi kết thúc.

- Ure bổ sung vào các giờ thứ 0; 6; 12.

- Axit glutamic đo vào các giờ thứ 6; 12; 16; 20; 24; 28; 30 và kết thúc quá trình.

Qua số liệu theo dõi và phân tích, biểu diễn thông thường là hàm lượng đường giảm dần, hàm lượng axit tăng dần. Nhưng cá biệt có trường hợp lên men đến nửa chừng thì đường vẫn hao đều nhưng axit glutamic thì không tăng, thậm chí có khi còn giảm. Trong trường hợp đó cần phải xác định nguyên nhân cho chính xác và quyết định biện pháp xử lý ngay, nếu để chậm đường sẽ hao hết và số axit glutamic tạo được trong những giờ trước cũng hao hết.

Nguyên nhân thông thường gây ra các hiện tượng đó là dịch thải đã bị nhiễm trùng do không khí, ure hoặc dầu mang vào, loại tạp khuẩn này sống bằng axit glutamic và cũng tồn tại với vi khuẩn lên men tạo axit glutamic, hai loại này không tiêu diệt lẫn nhau. Khi quyết định biện pháp xử lý phải căn cứ theo tình hình cụ thể, nếu hàm lượng axit glutamic đã tương đối cao, đường còn rất ít thì kết thúc sớm quá trình lên men. Nếu lượng axit glutamic chưa đáng kể mà đường còn cao thì gia nhiệt thanh trùng lại và tiếp giống mới, lên men lại từ đầu.

** Chế độ kiểm tra thiết bị, vệ sinh và thanh trùng nôi lên men*

Do đặc điểm của quá trình sản xuất, khi đã bắt đầu lên men rồi thì không thể ngừng lại được nữa, nếu vì một lý do nào đó mà phải ngừng lại nửa chừng thì nôi lên men đó coi như bị hỏng, tổn thất hàng triệu đồng. Vì vậy, các bước trong việc chuẩn bị phải được tiến hành hết sức cẩn thận, tỉ mỉ với một kỹ thuật nghiêm ngặt.

- Kiểm tra thiết bị: trước khi phối liệu một nôi lên men phải kiểm tra toàn bộ hệ thống van vào, van ra, van kim của nôi lên men, những nôi bị hỏng phải được thay thế sửa chữa ngay,

kiểm tra bình lọc khí xem bông than có còn tốt không, kiểm tra mô tơ cánh khuấy xong mới quyết định xem nồi có phối liệu được hay không? Vệ sinh nồi lên men, thanh trùng nồi không, đóng van khí lại, mở van hơi vào bình lọc khí riêng. Thời gian thanh trùng không là 45 phút, nhiệt độ 120°C. Sau khi thanh trùng xong đóng van hơi lại, mở van khí nén vào bình lọc riêng và các đoạn ống liên quan để giữ áp.

- Cân pha môi trường và thanh trùng môi trường:

+ Đường ở thùng chứa đường.

+ H_3PO_4 cân đủ lượng rồi cho vào, hai thứ này cân đủ lượng pha riêng sau đó mới cho vào thùng.

+ Cho một ít nước vào thùng pha môi trường, cho cánh khuấy hoạt động rồi thứ tự cho ri đường, nước chấm, KH_2PO_4 khuấy tan hết rồi cho $MgSO_4$ vào. Bơm dịch đường vào cho đủ một nồi lên men, điều chỉnh lại pH = 6,5 ÷ 6,8, cuối cùng chố B₁ và dầu vào rồi bơm vào thùng lên men.

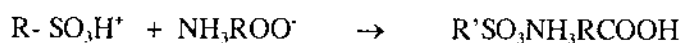
Cho cánh khuấy hoạt động và cho hơi sục vào môi trường nâng dần nhiệt độ lên 115°C và giữ ở nhiệt độ này 15 phút thì kết thúc thanh trùng. Đóng van hơi lại và thổi khí lạnh vào để làm nguội, cho nước lạnh vào vỏ để làm lạnh. Khi nhiệt độ môi trường giảm xuống còn 32°C thì tiếp ure đều (ure đã được thanh trùng và làm nguội riêng). Lấy mẫu phân tích xác định các thành phần nếu sai số không quá lớn so với các tiêu chuẩn kỹ thuật cho phép thì tiếp giống cấp hai sang và bắt đầu lên men.

Thời gian lên men thường kéo dài 28 ÷ 32 giờ. Sau 2 ÷ 3 lần tiếp ure và khi hàm lượng đường chỉ còn lại ≤ 1% thì quá trình lên men kết thúc. Dùng khí nén đẩy dịch lên men sang thùng chứa chuẩn bị trao đổi ion.

II.2.5. Công đoạn trao đổi ion

Mục đích của công đoạn này là tách lấy axit glutamic ra khỏi dịch lên men. Người ta lợi dụng tính chất hạt nhựa polyetylen sunfuric (ta quen gọi là refin) sau khi đã được cation hoá (tức tái sinh) có khả năng giữ lại trên bề mặt của nó anion, ở đây chủ yếu là axit glutamic. Sau đó lại dùng NaOH để tách anion ra khỏi hạt nhựa.

Quá trình hấp thụ:



Quá trình tách:

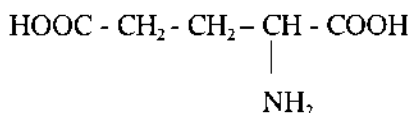


Ngoài ra còn có một số quá trình hấp thụ khác.

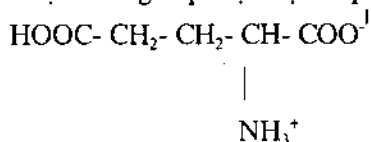
Quá trình trao đổi nhựa ion bao gồm các quá trình như sau:

II.2.5.1. Pha chế dịch men

Dịch men ra có hàm lượng axit glutamic khoảng 40 g/l tức là mật độ phân tử tương đối dày đặc nếu cứ để như vậy thì dòng chảy qua khối hạt nhựa; xác suất tiếp xúc giữa các phân tử axit glutamic với hạt nhựa sẽ ít hơn, số đi theo dòng chảy sẽ lớn, gây ra tổn thất lớn. Vì thế trước khi trao đổi người ta pha loãng dịch men bằng dịch thải lần trước hay bằng nước lạnh theo tỷ lệ sao cho sau khi pha dịch men có hàm lượng axit glutamic khoảng 18 ÷ 20 g/l. Mặt khác dịch men khi kết thúc quá trình lên men thường có pH = 6 ÷ 7, ở pH đó trung tính hoặc gần trung tính. Ở điều kiện này một số tác giả cho biết là axit glutamic phân lớn ở dưới dạng không phân cực



Dạng này hạt nhựa không hấp thụ được. ở pH = 5 ÷ 5,5 thì axit glutamic chủ yếu ở dạng phân cực:



Dạng này hạt nhựa hấp thụ tốt. Vì vậy người ta phải dùng HCl điều chỉnh pH dịch men xuống 5 ÷ 5,5.

II.2.5.2. Xử lý hạt nhựa resin

Hạt nhựa refin sau một mẻ trao đổi không còn khả năng hấp thụ nữa, muốn tiếp tục trao đổi phải qua khâu xử lý tái sinh. Dùng nước sạch rửa ngược khoảng 1 giờ, thỉnh thoảng dùng áp chân không và van đóng mở gián đoạn để sục đảo cho khối nhựa được tới, đều, rửa cho tới khi pH = 8 ÷ 9 thì thôi (trước khi rửa cho pH = 12 ÷ 13), xả bỏ hết lớp nước bẩn ở trên, sau đó tiếp tục cho nước vào rửa xuôi cho đến khi pH = 7 thì thôi và tiến hành tái sinh.

- Tái sinh: Dùng axit thu hồi cho chảy ngược 15 ÷ 20 phút sau đó mới cho axit mới pha, giữ cho tốc độ vào và ra ngang nhau để cho mật độ nước có chiều cao cố định tới khi dịch ra có pH = 2 ÷ 2,5 thì ngừng cho HCl.

Kiểm tra bình lọc khí xem bông than có còn tốt không, kiểm tra mô tơ cánh khuấy xong mới quyết định xem nổi có phối liệu được hay không? Vệ sinh nổi lên men, thanh trùng nổi không, đóng van khí lại, mở van hơi vào bình lọc khí riêng. Thời gian thanh trùng không là 45 phút, nhiệt độ 120°C. Sau khi thanh trùng xong đóng van hơi lại, mở van khí nén vào bình lọc riêng và các đoạn ống liên quan để giữ áp.

- Cân pha môi trường và thanh trùng môi trường:

+ Đường ở thùng chứa đường.

+ H_3PO_4 cân đủ lượng rồi cho vào, hai thứ này cân đủ lượng pha riêng sau đó mới cho vào thùng.

+ Cho một ít nước vào thùng pha môi trường, cho cánh khuấy hoạt động rồi thứ tự cho ri đường, nước chấm, KH_2PO_4 khuấy tan hết rồi cho $MgSO_4$ vào. Bơm dịch đường vào cho đủ một nổi lên men, điều chỉnh lại pH = 6,5 ÷ 6,8, cuối cùng cho B_1 và dầu vào rồi bơm vào thùng lên men.

Cho cánh khuấy hoạt động và cho hơi sục vào môi trường nâng dần nhiệt độ lên 115°C và giữ ở nhiệt độ này 15 phút thì kết thúc thanh trùng. Đóng van hơi lại và thổi khí lạnh vào để làm nguội, cho nước lạnh vào vỏ để làm lạnh. Khi nhiệt độ môi trường giảm xuống còn 32°C thì tiếp ure đều (ure đã được thanh trùng và làm nguội riêng). Lấy mẫu phân tích xác định các thành phần nếu sai số không quá lớn so với các tiêu chuẩn kỹ thuật cho phép thì tiếp giống cấp hai sang và bắt đầu lên men.

Thời gian lên men thường kéo dài 28 ÷ 32 giờ. Sau 2 ÷ 3 lần tiếp ure và khi hàm lượng đường chỉ còn lại ≤1% thì quá trình lên men kết thúc. Dùng khí nén đẩy dịch lên men sang thùng chứa chuẩn bị trao đổi ion.

II.2.5. Công đoạn trao đổi ion

Mục đích của công đoạn này là tách lấy axit glutamic ra khỏi dịch lên men. Người ta lợi dụng tính chất hạt nhựa polyetylen sunfuric (ta quen gọi là refin) sau khi đã được cation hoá (tức tái sinh) có khả năng giữ lại trên bề mặt của nó anion, ở đây chủ yếu là axit glutamic. Sau đó lại dùng NaOH để tách anion ra khỏi hạt nhựa.

Quá trình hấp thụ:



- Rửa tái sinh: mở van đáy thu hồi lấy axit cho tái sinh lần sau rồi mới dùng nước lạnh rửa xuôi cho tới khi pH = 3 thì ngừng cho nước và có thể tiến hành trao đổi. Thời gian kéo dài 40 ÷ 60 phút.

II.2.5.3. Trao đổi ion

Sau khi hạt nhựa đã được tái sinh, rửa tái sinh và dùng chân không đóng mở ngắt quãng làm cho hạt nhựa được tơi, xốp để cho ổn định rồi cho dịch men vào trao đổi ngược, lưu tốc vừa phải không chế trong khoảng 80 phút trao đổi hết một mẻ là vừa.

+ Rửa trao đổi: Sau khi trao đổi hết để cho refin lắng xuống tự nhiên, xả bỏ lớp dịch bản ở trên bề mặt, đảo trộn hạt nhựa rồi cho nước sạch vào rửa ngược cho tới khi sạch thì thôi (nước thải thải ra hết).

+ Giữ nhiệt: Sau khi rửa sạch thì ngừng cho nước lạnh và bắt đầu cho nước nóng vào để gia nhiệt hạt nhựa. Nước nóng 60°C đã được gia nhiệt chuẩn bị sẵn. Nước thải ra lúc nóng gọi là dịch rò có chứa một lượng rất ít axit glutamic nên được thu hồi lại làm nước pha dịch men ở mẻ sau. Gia nhiệt cho đến khi nước thải đạt 48% thì thôi và cho NaOH 5% vào để tách.

Nói chung phương pháp trao đổi ion hay là phương pháp trao đổi ion dùng để tách axit glutamic. Từ dịch mì chính lên men trong công nghiệp được áp dụng từ năm 1957 theo công bố của Kinoshita. Năm 1961, Monaber sêno đã thông báo về phương pháp trao đổi ion thu hồi axit glutamic từ phương pháp này. Tiếp theo đó nhiều tác giả Nhật Bản, Trung Quốc, Liên Xô (cũ) và các nước khác liên tiếp thông báo về phương pháp trao đổi ion thu hồi AG (axit glutamic).

Để hấp thụ AG, các tác giả thường các loại nhựa trao đổi ion có tính chất động học khác nhau: gồm các nhựa trao đổi ion dương (cationit): Amberlate IR-120, Amberlate IRC-50, Pover 50 (dạng H^+ , Na^+), KY-2 (dạng H^+ và NH_4^+), K. 732 (dạng H^+)..., các nhựa trao đổi ion âm (anionit): Amberlate IR-4B, AmberlateIRA-400...

Nhìn chung các cationit nói trên đều là cao phân tử tạo từ styren và divinylbenzen theo phương pháp trùng hợp (Amberlate IR-120, Amberlate IRC-50, Pover 50⁺, KY-2, K732) hoặc từ axit *m*-crylic và divinylbenzen (Amberlate IRC- 50), chúng đều có dung tích hấp thụ cao, bền trong môi trường axit mạnh và kiềm mạnh, chịu được nhiệt độ cao ~100°C, không thay đổi cấu trúc sau nhiều lần làm việc, có tính bền cơ học cao.

Ở nước ta từ năm 1972, song song với việc nghiên cứu lên men axit glutamic còn nghiên cứu phương pháp trao đổi ion thu hồi AG. Năm 1975, Nhà máy Mì chính Việt Trì đã dùng nhựa K.732 trong thu hồi AG.

Tại các nhà máy mì chính ở miền Nam (Thiên Hương, Vifon) đã dùng anionit Duolite A.7 trong thu hồi mì chính. Phương pháp trao đổi ion để thu hồi AG từ dịch mì chính lên men đã được khá nhiều nước quan tâm, bởi lẽ phương pháp trao đổi ion có nhiều ưu điểm cơ bản hơn hẳn phương pháp hoá giải và đẳng điện:

- Đạt hiệu suất thu hồi AG cao, thường lớn hơn 75% so với lượng AG có trong dịch men và làm sạch tinh thể AG ở dạng β . AG.

- Không phải cô đặc dịch men, do đó giảm tiêu hao điện, hơi, nước, nhân công.

- Dùng trong công nghiệp, phương pháp này có quy trình đơn giản, chu kỳ ngắn.

Để nhằm mục đích xác định một quy trình trao đổi ion thích hợp với điều kiện sản xuất công nghiệp, mỗi loại nhựa đều cần phải nghiên cứu phương pháp thu hồi cao nhất. Thí dụ trong điều kiện ở nước ta nghiên cứu áp dụng:

Nguyên liệu

- Dùng nhựa K372 (Trung Quốc) chế tạo từ styren và divinylbenzen (DVB) theo phương pháp trùng hợp, chứa 7 + 8 liên kết ngang. DVB có các tính chất sau:

- Dạng bề ngoài: tròn, trong suốt, vàng nâu.

- Khối lượng riêng: $1,24 \div 1,29 \text{ g/cm}^3$.

- Kích thước hạt: $0,3 \div 1,0 \text{ mm}$ (95%).

- Không tan trong NaOH, HCl, rượu, axeton, benzen.

- Chịu nhiệt: 100°C dạng H^+

120°C dạng Na^+

- Độ ẩm $46 \div 52\%$.

- Dung tích trao đổi $\geq 4,5 \text{ mg/g}$ nhựa khô.

Dịch mì chính lên men

Ví dụ cần phân tích các thành phần và có các thành phần trung bình sau:

Axit glutamic	$35 \div 40 \text{ g/l}$
Alanin	$3 \div 5 \text{ g/l}$
Đường khử	$6 \div 10 \text{ g/l}$

NH_4^+	7 ÷ 10 g/l
Axit lactic	10 g/l
Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	Lượng nhỏ
Fe^{2+} và Fe^{3+}	40 ÷ 100 mg/l
Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+}	Lượng nhỏ
Các chất màu	Chủ yếu melanoid
Khối lượng riêng	1,03 ÷ 1,05 g/cm ³

- AG của dịch mì chính lên men là AG có các tính chất hoá lý như sau:

+ Điểm đẳng điện: $\text{pI} = 3,22$.

+ Phân tử lượng: 147,1.

+ Hằng số phân ly: $\text{pK}_1 = 2,19$; $\text{pK}_2 = 4,25$; $\text{pK}_3 = 9,67$.

Cột trao đổi ion

- Cột nhựa có $\phi = 90$, $h = 680$ - chứa 2 kg hạt nhựa K.732 ẩm.

- Cột thuỷ tinh có $\phi = 16$, $h = 600$ - chứa 50 g K.732 ẩm.

Kết quả nghiên cứu

* Ảnh hưởng của NH_4^+

- Xem nhựa K. 732 dạng (H^+) hấp phụ NH_4^+ so với hấp thụ AG như thế nào ?

- NH_4^+ có thể làm giảm hiệu suất thu hồi AG trên không?

- Dùng cột thuỷ tinh trên, pha các dung dịch amoni clorua tinh khiết 10, 15, 20g trong 50 ml nước cất, cho chảy qua cột dạng. Nhả bằng dung dịch NaCl 10 % phân tích NH_4^+ trong dịch thải, tính khả năng hấp thụ NH_4^+ theo g/g K.732 ẩm. Qua thí nghiệm thì thấy khả năng hấp thụ tinh khiết bởi K.732(H^+) là: $0,060 \div 0,062$. Theo tài liệu Trung Quốc thì khả năng hấp thụ AG tinh khiết của K.732(H^+) là: 0,186 g/g K.732.

Theo nguyên lý trao đổi ion thì sự trao đổi ion tuân theo định luật đương lượng. Vậy:

$$\text{NH}_4^+ \geq 0,060/18 = 3 \text{ mg/g K.732 ẩm.}$$

$$\text{AG}^+ \geq 0,186/147,1 = 1,2 \text{ mg/g K.732 ẩm.}$$

Như vậy K372 (H^+) hấp thụ NH_4^+ mạnh hơn hấp thụ AG.

NH₄⁺ và hiệu suất thu hồi AG.

Bảng 51. NH₄⁺ và hiệu suất thu hồi AG

Thí nghiệm số	AG dịch men (g/l)	NH ₄ ⁺ (g/l)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	28	8,64	56,3
	28	13,58	56,5
2	31,6	6,84	64,0
	31,6	8,76	66,3

Dùng cột nhựa chứa 2 kg. Lấy 3 l dịch men có hàm lượng AG xác định, trao đổi ở pH = 4,5, T=60. Nhả bằng NaCl 4% thu dịch nhả, cô đặc đến 10⁰Be ở <80, hạ pH=3,2 để kết tủa AG, để 4 ngày, hút lọc AG và xác định độ thuần AG. Cùng loại dịch men trên nhưng thêm NH₄Cl tinh khiết vào và làm giống như trên, cũng tính như hiệu suất thu hồi AG. Kết quả thí nghiệm thu được ở bảng 51.

Số liệu cho thấy: NH₄⁺ không có ảnh hưởng gì tới hiệu suất thu hồi AG bằng K.732(H⁺).

Theo lý thuyết của Nicowski và Gohon, đã được xác nhận qua nhiều công trình thực nghiệm: sự trao đổi ion bất kỳ trên nhựa không phụ thuộc sự có mặt ion này hoặc khác. NH₄⁺ và hiệu suất thu hồi AG. Và theo Titsuo Hino: đối với cation mạnh, hằng số trao đổi K của axit amin không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của NH₄OH và axit xitric.

Như vậy là bằng lý thuyết và thực nghiệm chúng ta có thể hoàn toàn yên tâm về sự có mặt 7 ÷ 10 g/l trong dịch men. không ảnh hưởng gì lớn tới trao đổi ion AG mà chỉ "chiếm chỗ" trên nhựa.

Ảnh hưởng của pH

Như trên đã trình bày, tùy thuộc vào pH, AG có thể tồn tại trong dung dịch ở dạng các ion có hoá trị khác nhau. Vậy với K.732 (H⁺) nên sử dụng dung dịch men ở pH nào để vừa đỡ tốn HCl 31% dùng để hạ pH dịch men khi kết thúc (thường có pH = 6,5 ÷ 7), vừa bảo đảm có hiệu suất thu hồi AG cao. Thí nghiệm sau đây làm sáng tỏ điều đó:

Lấy 3 lít dịch men, điều chỉnh pH = 2 hoặc 4,5; 6. Cho chảy qua cột 2 kg K.732 rồi làm tương tự trên. Kết quả thí nghiệm dẫn ra ở bảng 52.

Qua đây cho thấy pH = 4,5 cho hiệu suất thu hồi AG cao nhất, rồi đến pH = 2 và pH = 6.

Theo Manabu Seno và Zigenzon, Ramina, hấp phụ AG trên cationit đạt cực đại tại pH gần điểm đẳng điện và giảm khi pH tăng. Manabu Seno cho thấy rằng khi AG bị hấp phụ trên cationit dạng H^+ thì trong quá trình hấp phụ H^+ tách ra khỏi nhựa làm tăng sự điện ly AG, tạo AG, thúc đẩy sự hấp phụ AG tốt hơn trên nhựa.

Như vậy trao đổi dịch men ở pH = 4,5 là tối ưu, vừa cho hiệu suất thu hồi AG cao, vừa tốn ít axit HCl. pH = 2 cũng tốt nhưng tốn nhiều HCl hơn.

Bảng 52. Ảnh hưởng của pH tới hiệu suất thu hồi AG

pH dịch men	AG dịch men	Hiệu suất thu hồi (%)
2	37	68,9
4,5		76,4
6		28,5
2	33	63,3
4,5		64,0
6		12,7

Ảnh hưởng của tốc độ

Tốc độ trao đổi ion có ảnh hưởng lớn tới khả năng hấp phụ ion của nhựa. Tốc độ trao đổi phụ thuộc chủ yếu vào tỷ lệ hấp phụ của lớp nhựa, loại nhựa, kích thước hạt nhựa, phương pháp chảy xuôi hay ngược dòng.

- Phương pháp xuôi dòng: phương pháp này dịch men được cho chảy từ trên đỉnh cột xuống (cột chứa 2 kg K.732) ở pH = 4,5. Nhả bằng NaOH 4% và xác định khả năng thu AG ở các tốc độ khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho ở bảng 53.

Qua đó ta thấy tốc độ 150 ml/phút là tối ưu cho hấp thụ AG của nhựa K.732 (H^+), theo phương pháp chảy xuôi dòng.

- Phương pháp chảy ngược dòng: trong phương pháp này dịch men được chảy ngược từ đáy tháp lên, pH = 4,5; nhả bằng NaOH 4% và xác định khả năng thu AG ở các tốc độ khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho ta thấy ở bảng 54.

Số liệu cho thấy: tốc độ 300 ml/phút là tối ưu cho hấp phụ AG của K/732 (H^+) theo phương pháp chảy ngược dòng.

So với phương pháp chảy xuôi dòng, phương pháp chảy ngược dòng có tốc độ tối ưu nhanh gấp 2 lần mà thu AG vẫn cao.

Bảng 53. Ảnh hưởng tốc độ lên khả năng thu AG (ngược dòng)

Thí nghiệm số	Tốc độ (ml/phút)	Dịch men			Dịch nhả		
		V (ml)	AG (g/l)	AG (g)	V (ml)	AG (g/l)	AG (g)
1	100	3000	33	99	3300	20,5	67,75
	150				3150	25,0	78,77
	200				3400	16,5	56,1
2	100				3400	20,1	69,1
	150				3200	26,2	83,24
	200				3350	16,3	54,6

Bảng 54. Ảnh hưởng của tốc độ đến khả năng thu AG (ngược dòng)

Thí nghiệm số	Tốc độ (ml/phút)	Dịch men			Dịch nhả		
		V (ml)	AG (g/l)	AG (g)	V (ml)	AG (g/l)	AG (g)
1	100	3000	30	90	3120	17,5	54,6
	200				3000	17,5	52,5
	300				5000	15,5	77,5
	400				3800	17,2	65,4
2	100				3400	12,0	61,4
	200				3700	12,9	47,7
	300				4300	18,5	79,5
	400				4700	16,8	79,0

Theo O. Samuelson: trong trao đổi ion, phương pháp xuôi dòng có nhược điểm là các loại dịch có khối lượng riêng lớn hơn nước khi chảy xuôi dòng thường gây ra dòng đối lưu nâng hạt nhựa lên và làm tăng thể tích rãnh trong giữa các hạt nhựa, làm giảm khả năng hấp phụ của nhựa. Rõ ràng là trong phương pháp ngược dòng, dịch dâng lên đều đặn, do đó các lớp nhựa hấp phụ đều và tốt.

Với dịch men cũng thấy rõ là do khối lượng riêng lớn hơn nước nên cho chảy xuôi thường không cho kết quả thu AG cao.

Ảnh hưởng của hàm lượng AG dịch men tới hiệu suất thu hồi AG

Theo O. Samuelson: trong trao đổi ion, những ion có cùng hoá trị và có bán kính nhỏ, nồng độ dung dịch chứa ion cần trao đổi không ảnh hưởng gì tới hằng số trao đổi ion. Về nguyên tắc, trong trao đổi ion dùng các dung dịch có nồng độ tương đối thấp. Điều này không chỉ là hướng đúng cho hoá phân tích mà cả cho kỹ thuật sản xuất.

Ta thấy rằng AG^+ là một ion khá lớn, trao đổi với ion H^+ (bán kính 1,54Å) của nhựa K.732, chắc chắn hàm lượng AG trong dịch men có ảnh hưởng lớn tới khả năng trao đổi và hiệu suất thu hồi, nên thử pha loãng dịch men đem trao đổi.

Thí nghiệm dùng cột 2 kg K.732, dịch men được pha loãng bằng nước, điều chỉnh pH = 4,5, trao đổi ngược dòng, rửa bằng NaOH 4%.

Bảng 55. Ảnh hưởng của hàm lượng AG tới hiệu suất thu hồi (phương pháp ngược dòng)

Thí nghiệm số	1	2	3	4	5
Thể tích dịch men (l)	3	3	3	3	3
Hàm lượng AG (g/l)	32	39	32	34	33,5
Tổng lượng AG (g)	96	96	96	102	100,5
Nước pha (l)	2,75	2,5	2	2	2
Hàm lượng AG sau khi pha loãng (g/l)	17	17,5	19,2	20,4	20,1
Hiệu suất thu hồi I (%)	63,6	60,2	65,5	61,3	63,0

Hiệu suất thu hồi II (trao đổi nước cái) của các thí nghiệm trên là 12,8 + 15,2%.

Qua thí nghiệm cho thấy: hàm lượng AG dịch men trong khoảng 17 ÷ 20 g/l cho hiệu suất thu hồi AG là 72 ÷ 75%. Nếu khảo sát hàm lượng AG < 15 g/l nhận thấy hiệu suất thu hồi I đều thấp dưới 40%, còn nếu dịch men có nồng độ AG > 30 g/l (không pha loãng) đem trao đổi thì hiệu suất thu hồi giảm.

Như vậy, trong trao đổi ion dịch men, hàm lượng AG khoảng 20 g/l là tối ưu, cho hiệu suất thu hồi cao. Rõ ràng là việc pha loãng đã làm giảm độ nhớt của dịch men, tạo điều kiện cho AG khuếch tán tốt qua thành hạt nhựa, giúp cho K.732 hấp phụ AG tốt hơn và rửa AG khỏi

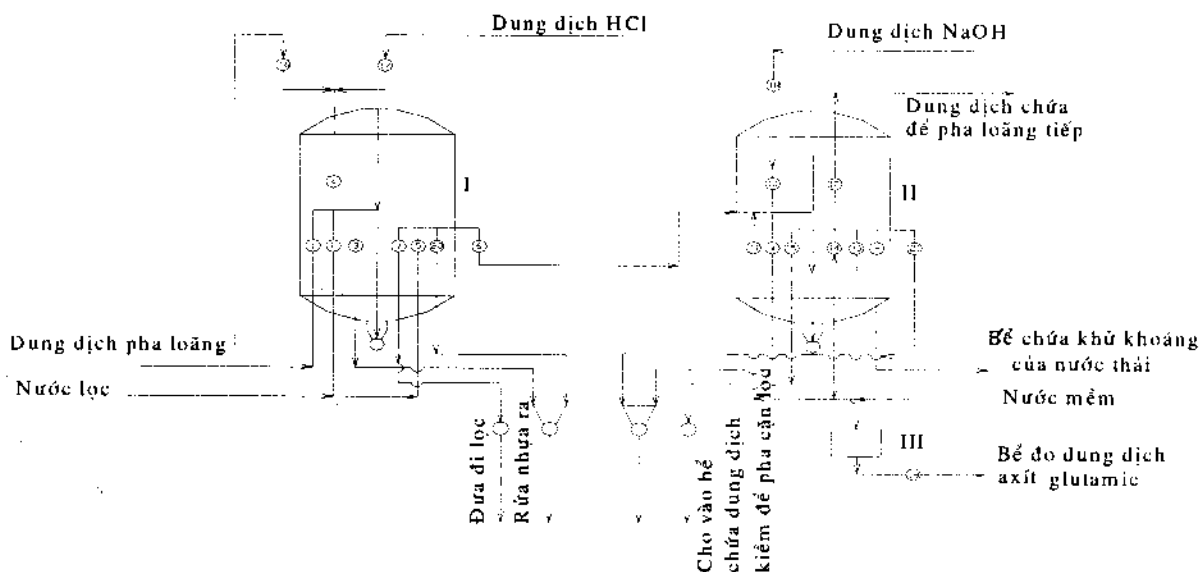
nhựa cũng tốt hơn. Song nếu pha loãng quá thì các tạp chất ion dương càng bị nhựa hấp phụ mạnh hơn và cùng bị rửa, làm giảm hiệu suất kết tinh và hiệu suất thu hồi AG.

Ảnh hưởng của xác vi khuẩn

Toàn bộ các nghiên cứu thường để dịch men đã gia nhiệt 95°C , hạ pH = 4,5, để lắng 1 ngày, loại xác vi khuẩn. Nên nghiên cứu dịch men không loại xác vi khuẩn nhằm rút ngắn chu kỳ trao đổi ion.

Trao đổi ion với dịch men không loại xác vi khuẩn đạt tổng hiệu suất thu hồi $70 \div 72\%$.

Như vậy là trao đổi ion với dịch men không loại xác vi khuẩn đã giảm hiệu suất thu hồi AG khoảng $2 \div 3\%$ so với dịch men đã loại xác vi khuẩn. Quan sát thực tế thường thấy rằng: xác vi khuẩn bám vào hạt nhựa làm nhựa dâng lên từng đoạn, do đó làm giảm chút ít dung tích hấp phụ AG của nhựa.



Hình 4.9.

II.2.5.4. Sơ đồ thiết bị trao đổi ion

Trong hình 4.9:

- I. Thiết bị phản ứng trao đổi cation.
- II. Thiết bị phản ứng trao đổi anion.
- III. Thùng chứa dung dịch axit glutamic.

1 – 21: Số hiệu của các van điều chỉnh tự động.

Các công đoạn chính tự động điều chỉnh sau:

1. Bao gồm các bơm để cho dung dịch pha loãng vào và ra qua van: 1; 6; 12.
2. Khoá 12 đóng, khoá 8 mở.
3. Bao gồm các bơm để cho dung dịch pha loãng chảy ra. Khoá 1 đóng, khoá 2 mở.
4. Khoá 8 đóng, khoá 12 mở.
5. Khoá 2; 6; 12 đóng; 5 và 3 mở.
6. Khoá 5 và 3 đóng; khoá 4; 16; 17 và 20 mở.
7. Khoá 20 đóng, khoá 7 mở.
8. Khoá 4; 16; 17 đóng; khoá 2 mở.
9. Khoá 7 đóng; khoá 20 mở.

Khi kết thúc giai đoạn 10, khoá 2 và 20 đóng, thiết bị chứa cationit chứa đầy nước lọc và theo đó tiếp tục các giai đoạn sau.

10. Bao gồm các bơm cho nước mềm và mở khoá 14 vòng.
11. Bao gồm các bơm cho nước mềm, các khoá 14 và 9 đóng, 10; 15; 18 mở.
- 12.- Các khoá 15; 19 đóng, mở khoá 13.
13. Khoá 10 và 18 đóng, khoá 11 mở.
14. Khoá 13 đóng và mở khoá 19 cho vào bể chứa 15, dung dịch axit glutamic cho vào thùng chứa 16, mở khoá 15.
15. Khoá 15 đóng, khoá 21 mở.
16. Khoá 11 và 21 đóng, 9 và 14 mở. Kết thúc giai đoạn này khoá 9 và 14 đóng. Thiết bị trao đổi nhựa anion chứa đầy nước lọc. Tất cả các khoá đóng lại.

Các khoá 16; 17; 18 và 19 cũng như các bơm cho dung dịch vào và ra và nước mềm có thể đóng hay mở tùy theo mục đích trong sơ đồ sản xuất.

II.2.6. Tách axit glutamic

Khi dịch ra đạt 45°C thì ngừng cho nước nóng và bắt đầu cho NaOH 5% cũng đã được gia nhiệt đến 60°C vào để tách axit glutamic, lúc này dịch thải ra vẫn được thu hồi để pha mẻ sau nhưng đồng thời phải liên tục kiểm tra pH và độ Baumé, vì axit glutamic theo dịch ra tăng lên nhanh chóng, khi độ Baumé đạt 0° thì lập tức thu hồi axit glutamic; chỉ 4 + 5 phút sau độ Baumé

đạt cực đại (khoảng $4^{\circ}5 \div 5^{\circ}$ Be), lúc này thôi cho NaOH. Sau khi đạt cực đại, độ Be giảm dần và cũng chỉ $4 \div 5$ phút sau xuống đến 0° Be, khi kết thúc phần còn lại được thu hồi làm nước chấm.

II.2.7. Axit hoá axit glutamic

Toàn bộ dung dịch axit glutamic thu được trong khoảng 2 lần đạt ở trên được đưa về thùng kết tinh, cho cánh khuấy hoạt động liên tục để ngăn ngừa axit glutamic kết tinh quá sớm, tinh thể nhỏ, hiệu suất thấp. Cho HCl 31% vào tạo điểm đẳng điện đến $\text{pH} = 2,9 \div 3,2$ thì thôi và mở nước lạnh.

II.2.8. Làm lạnh kết tinh

Dịch axit glutamic sau khi đã đưa về điểm đẳng điện thì cho nước vào vỏ thùng kết tinh để giảm dần nhiệt độ, trong khi đó cánh khuấy tiếp tục hoạt động làm cho axit glutamic kết tinh to, to và xốp. Tám giờ sau thì ngừng khuấy, còn nhiệt độ thì cho hạ từ từ đến nhiệt độ không khí (nếu có điều kiện thì dùng nước lạnh đưa xuống 12°C và giữ ở đó là tốt nhất). Sau ít nhất 48 giờ thì quá trình làm lạnh kết tinh kết thúc.

Ở đây, dung dịch axit glutamic chia làm 2 pha rõ rệt:

Pha rắn: gồm axit glutamic đã kết tinh lắng xuống dưới.

Pha lỏng: gồm nước và một ít axit glutamic không kết tinh hòa tan vào, ta gọi đó là nước cái.

Phần nước cái đưa đi trao đổi lại, phần kết tinh đưa đi ly tâm ta được axit glutamic ẩm.

II.2.9. Công đoạn trung hòa kết tinh

Mục đích chính của công đoạn này là chuyển từ axit glutamic thành glutamat natri theo phản ứng: $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 + \text{Na}_2\text{CO}_3 = \text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Đồng thời còn có các phản ứng khử sắt và tẩy màu. Yêu cầu:

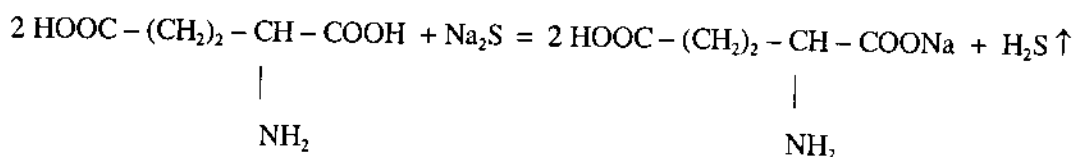
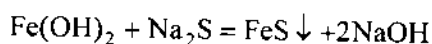
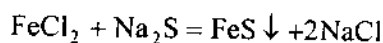
- Nồng độ của dung dịch trung hòa khống chế ở $21 \div 23^{\circ}$ Be.
- $\text{pH} = 6,5 \div 6,7$.
- Sắt phải được khử hết.
- Kiểm tra Na_2S quá lượng không còn vết kết tủa đen.
- Dịch thải trong suốt.

Để phản ứng trung hòa cũng như phản ứng khử sắt được tốt nhất, triệt để, phản ứng trung hòa thực hiện ở nhiệt độ $50 \div 60^{\circ}\text{C}$ là tốt nhất, nhiệt độ thấp hơn thì phản ứng sẽ xảy ra chậm, còn ở nhiệt độ cao hơn, phản ứng sẽ mạnh hơn nhưng cùng với nhiệt độ do phản ứng trung hòa tỏa ra, nhiệt độ toàn khối có thể lên trên 80°C gây ra tổn thất, phản ứng khử sắt cũng tiến hành tốt nhất ở $60 \div 70^{\circ}\text{C}$ và $\text{pH} = 5 \div 5,5$.

II.2.9.1. Trung hòa 1

Cho ít nước vào thùng trung hòa (phải tính toán lượng nước cho vào để sao cho sau khi trung hòa, dịch có nồng độ $22 \div 23^{\circ}\text{Be}$), gia nhiệt đến 70°C , cho cánh khuấy hoạt động rồi từ từ vừa cho axit glutamic vừa cho Na_2CO_3 cho đến $\text{pH} = 5 \div 5,5$. Cho gần 50% tổng lượng than vào để tẩy màu (thường cho bã than của trung hòa 2). Sau đó, cho Na_2S vào để khử sắt (Na_2S đã được pha loãng đến $13 \div 15^{\circ}\text{Be}$).

Khi cho Na_2S vào có thể có những phản ứng sau đây xảy ra:



Do các phản ứng như vậy nên khi cho Na_2S vào dung dịch trung hòa thì pH tăng lên và có hơi H_2S bay ra. Khí H_2S là khí độc nên khi cho Na_2S vào để 1 giờ cho phản ứng có đủ thời gian thực hiện (không cần người trực tiếp ở đấy). Sau đó, dùng Na_2CO_3 tiếp tục trung hòa đến $\text{pH} = 6,5 \div 6,8$ thì ép lọc lần 1.

II.2.9.2. Trung hòa 2

Mục đích chủ yếu là tẩy màu dịch ép lọc được sau trung hòa 1.

Sau khi ép lọc lần 1, dịch được bơm lên thùng trung hòa 2, ở đây dịch được gia nhiệt cho nóng lên $50 \div 60^{\circ}\text{C}$ rồi cho than hoạt tính vào khuấy đều. Đồng thời cũng kiểm tra quá lượng Na_2S nếu còn Fe^{++} thì tiếp tục cho Na_2S khử cho hết, lọc màu thấy trắng, trong suốt thì tiến hành ép lọc lần 2 ta được dung dịch glutamat natri đưa đi cô đặc.

Dịch ép lọc lần 1: yêu cầu trong suốt, đạt $\text{pH} = 6,5 \div 6,8$.

Dịch ép lọc lần 2: yêu cầu trắng, trong, đạt $\text{pH} = 6,5 \div 6,8$. Kiểm tra quá lượng Na_2S không còn kết tủa sắt.

Sau khi ép lọc lần 1 cũng như lần 2 đều phải cho nước nóng vào ép rửa bã cho đến khi dịch ép ra có độ Baumé = 0, bã than ép lần 2 dùng lại ở trung hòa lần 1, còn bã than ép lần 1 góp lại hòa với nước nóng ép lấy nước 2 lần mới được bỏ.

Vải ép lọc cũng phải giặt nước nóng 2 lần mới được bỏ ra giặt nước lạnh bình thường. Nước rửa bã than và nước giặt vải ép lọc dùng để pha dịch trung hòa mẻ sau.

II.2.10. Cô đặc kết tinh

Trong dây chuyền sản xuất nếu yêu cầu sản phẩm hoàn toàn là mì chính tinh thể nên cô đặc kết tinh là một trong mấy khâu kỹ thuật phức tạp nhất. Quá trình cô đặc, nếu các chỉ tiêu kỹ thuật không được chấp hành thật nghiêm ngặt thì có thể xảy ra một trong những hiện tượng sau:

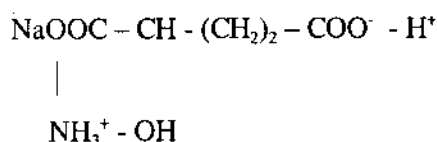
- Kết tinh thành tảng trong nồi: mì chính không kết tinh thành tinh thể như ý ta mong muốn mà kết tinh tảng to và cuối cùng toàn bộ kết tinh thành một khối lớn nằm chặt trong nồi. Khi đó không còn cách nào khác là cho nước nóng vào hòa tan ra rồi cô đặc lại thành mì chính bột. Một số sẽ bị cháy và kết quả cuối cùng là được mì chính bột màu vàng cháy.

- Mầm tinh thể tiếp vào bị hòa tan hết.

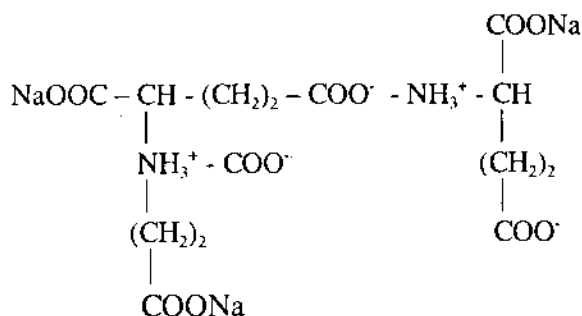
- Kết tinh dày đặc: ngoài mầm tinh thể ta tiếp vào còn xuất hiện dày đặc các tinh thể nhỏ. Kết quả ta được một loại mì chính nửa bột nửa tinh thể lẫn lộn, không đạt yêu cầu.

Về nguyên tắc, diễn biến của quá trình cô đặc kết tinh như sau:

Đầu tiên khi nồng độ dịch còn loãng, các phân tử glutamat natri trong dịch nằm riêng lẻ và xen kẽ giữa các phân tử nước theo kiểu:



Quá trình cô đặc phân tử nước tự loại dần do tác dụng của nhiệt chân không và chuyển động hỗn loạn (sôi) khi lượng nước càng giảm đi, mật độ phân tử glutamat natri càng dày đặc, tỉ lệ va chạm vào nhau càng lớn, kết quả là tạo nên các liên kết đa phân tử theo kiểu:



Các tập hợp phân tử cứ như vậy lớn mãi lên thành các hạt nhỏ li ti mất thường cũng có thể thấy được, rồi những hạt đó có hạt lớn lên do liên kết thêm được nhiều phân tử đơn độc, một số hạt thì lại liên kết với nhau thành hạt lớn hơn. Vì các phân tử lúc đầu và sau đó là đa phân tử khả năng liên kết như nhau, lớn bé chỉ là ngẫu nhiên không có một hệ chỉ đạo nào. Thế nhưng vào đúng lúc mà các phân tử nước đã tự loại dần đi đến mức mà các phân tử glutamat natri có thể liên kết được lại với nhau, nếu như trong hỗn hợp lại có sẵn các đại phân tử rồi thì các phân tử đơn độc sẽ có một trong 2 khả năng: một là liên kết xung quanh đại phân tử; hai là liên kết với nhau tạo ra các đại phân tử. Hai khả năng đều xảy ra, khi gặp nước thì cả 2 trường hợp, số phân tử tách ra thành đơn độc khả năng cũng như nhau. Song với đại phân tử có tới hàng vạn thì sự ra đi của một vài phân tử không làm cho nó thay hình đổi dạng hay tan rã được. Nhưng với đa phân tử, số phân tử chỉ mới có hàng chục thì dễ dàng bị tan rã thành các phân tử đơn độc.

Xuất phát nguyên tắc đó mà ta có quy trình kỹ thuật cô đặc kết tinh mì chính trong tinh thể như sau:

- Cô đặc: Cho dịch trung hòa có nồng độ $20 \div 21^{\circ}\text{Be}$ vào nồi cô đặc, cho khoảng 80% tổng lượng dịch, cô ở nhiệt độ 70°C chân không 600 mmHg, áp suất hơi $\leq 1 \text{ kg/cm}^2$.

- Tiếp mầm tinh thể: khi dịch đã đạt đến nồng độ $31,5 \div 32^{\circ}\text{Be}$ (phải đo chính xác) thì cho cánh khuấy nồi cô đặc hoạt động và dùng áp lực chân không hút mầm tinh thể vào. Mầm là mì chính tinh thể sàng lấy ở mẻ trước loại hạt nhỏ đều, lượng mầm tiếp vào khoảng 7% so với tổng lượng mì chính đưa vào cô.

- Nuôi mầm: sau khi tiếp mầm, số dịch 20% còn lại pha loãng $\approx 12^{\circ}\text{Be}$, gia nhiệt lên 60°C rồi bổ sung liên tục vào nồi cô đặc sao cho lượng bổ sung cân bằng với lượng bốc hơi của nồi. Lúc này mầm tinh thể lớn dần nhưng phải chú ý quan sát, nếu thấy xuất hiện các tinh thể nhỏ thì phải tiếp nước ngưng tụ đã gia nhiệt 60°C vào phá đi rồi lại tiếp tục cô cho đến khi thấy mầm tinh thể đã lớn thành hạt mì chính tinh thể như ý thì ngừng cô và khăn trương cho xuống ly tâm.

- Ly tâm: Khi ly tâm phải dùng một ít nước ấm, sạch, tia nhẹ vào khối mì chính để hòa tan những hạt kết tinh nhỏ bám ngoài tinh thể, làm cho tinh thể được sáng, bóng. Qua ly tâm ta được mì chính tinh thể và nước cái. Mì chính tinh thể được đưa đi sấy còn nước cái pha vào cô với mẻ sau.

II.2.11. Sấy mì chính

Mì chính hút ẩm rất nhanh nên sau khi ly tâm, ta phải xử lý ngay. Tãi mì chính ra khay nhôm đưa vào tủ sấy, bề dày lớp mì chính trong khay là $2 \div 3 \text{ cm}$. Mờ hơi nâng nhiệt độ tủ sấy

lên $\leq 80^{\circ}\text{C}$, cứ 30 phút đảo trộn 1 lần, đến khi độ ẩm mì chính còn lại $\leq 0,5\%$ thì kết thúc sấy. Thường sấy mất khoảng gần 2 giờ.

II.2.12. Sàng mì chính

Người ta dùng các loại mặt sàng 12 lỗ, 24 lỗ, 36 lỗ/1 tác vuông Anh để phân loại:

- Loại trên sàng 12 lỗ là loại vón cục hoặc quá to, có thể hòa ra nước đưa vào cô mẻ sau.
- Loại trên và dưới sàng 24 lỗ, trên và dưới sàng 36 lỗ đều là chính phẩm.
- Loại dưới sàng 36 lỗ dùng làm mầm tinh thể cho mẻ sau.

II.2.13. Bao gói

Mì chính sau khi sàng phân loại đem cân và đóng bao gói túi polyetylen 2 lần. Trọng lượng mỗi túi tùy yêu cầu có thể từ $100\text{ g} \div 1\text{ kg}$. Ở giữa 2 lần túi có nhãn hiệu ghi rõ trọng lượng tịnh, hàm lượng, người cân, người đóng gói và ngày sản xuất, mặt sau ghi hướng dẫn cách sử dụng.

Từng túi lớn 10 kg hay 20 kg được bọc kỹ bằng giấy chống ẩm và đóng kín trong hòm gỗ đưa đi nhập kho.

III. SƠ ĐỒ QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT MÌ CHÍNH (PHỤ LỤC)

Kỹ thuật sản xuất mì chính có thể thể hiện các công đoạn chính tóm tắt sau đây :

Quá trình nhân giống chuẩn bị cho lên men mở rộng được tiến hành theo các công đoạn chính sau đây:

Ký hiệu:

_____ Glutamát natri.

__M__ Dung dịch nước cái.

_____ Dung dịch NaOH.

__T__ Huyền phù axit glutamic.

__ __ Không khí.

__x__ Nước lọc.

__y__ Nước mềm.

__u__ pH mét để đo pH.

1. Thùng chứa Na_2CO_3 .

2. Thùng chứa axit glutamic.

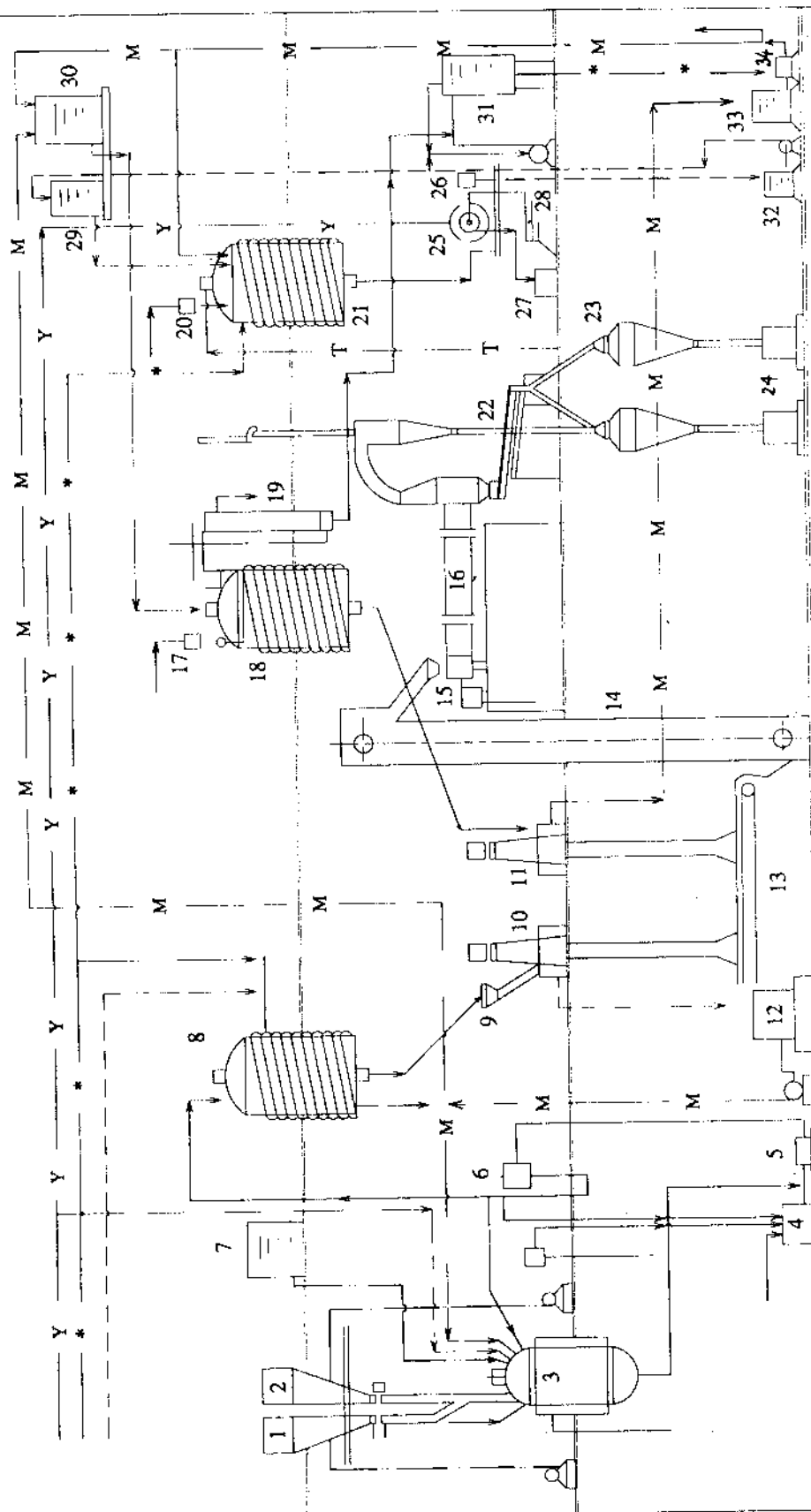
3. Thiết bị phản ứng thu glutamat natri.

4. Thùng chuẩn bị dung dịch than hoạt tính.
5. Bơm dung dịch.
6. Thiết bị lọc đĩa.
7. Thùng chứa dung dịch NaOH.
8. Thiết bị kết tinh glutamat natri.
9. Bộ phận phân phối trước khi vào máy ly tâm.
- 10; 11. Máy ly tâm.
12. Thùng chứa dung dịch nước cái sau khi ly tâm.
13. Băng tải vận chuyển.
14. Gầu tải.
15. Calorife – bộ đốt nóng không khí.
16. Thùng sấy với cyclon và quạt gió.
17. Bộ phận đo để cho glutamat natri.
18. Thiết bị cô đặc kết tinh.
19. Thiết bị ngưng tụ.
20. Thùng đông dung dịch HCl.
21. Thiết bị kết tinh axit glutamic.
22. Rây phân loại.
23. Phễu chứa glutamat natri khô.
24. Cân và bao gói glutamat natri.
25. Lọc chân không để tách axit glutamic.
26. Thùng chứa dung dịch nước cái axit glutamic
27. Thùng chứa dung dịch huyền phù axit glutamic
28. Vít tải.
- 29; 30; 32; 33. Thùng chứa dung dịch nước cái.
34. Thùng chứa đối chất ngưng tụ.

Các công đoạn chính thu axit glutamat natri từ axit glutamic theo sơ đồ và các thiết bị, bộ phận cụ thể được chú thích trên. Tóm tắt theo sơ đồ cụ thể được chú thích trên. Tóm tắt theo sơ đồ khối. Để thu được 4,5 tấn glutamat natri (theo sơ đồ này) với chất lượng cao 99,5% trong một ngày đêm cần $4,0 \div 4,2$ tấn axit glutamic tinh khiết hoặc nếu không trong quá trình sản xuất ra dung dịch nước cái axit glutamic từ nồng độ axit glutamic tạo thành trong dung dịch hay do quá trình lên men để tính ra lượng dung dịch axit glutamic cần cho vào đó. Nếu axit glutamic tinh khiết thì hòa tan dung dịch bão hòa có nồng độ 700 g/lít. Quá trình trung hòa xảy ra tốt ở nhiệt độ 60°C và luôn đạt pH = 6,8. Từ dung dịch trung hòa này cho làm lạnh có thể thu được gần 200g glutamat natri trong 1 lít dung dịch cho vào. Quá trình trung hòa chủ yếu dùng NaOH hay một số nước dùng Na_2CO_3 .

Quá trình hòa tan axit glutamic thu và tẩy màu glutamat natri kéo dài gần 1 giờ 30 phút.

Sơ đồ sản xuất glutamat natri bột dùng dịch NaOH trung hòa:
hay dùng Na_2CO_3 từ axit glutamic tinh khiết



Định lượng các chất cho vào theo sơ đồ này sau:

- Dung dịch nước cái 1100 lít
- Axit glutamic 260 kg
- Na_2CO_3 35 kg
- NaOH (dung dịch 42%) 110 kg
- Than hoạt tính 7 kg
- Oxy quynol 0, 25 kg

Kết thúc quá trình thể tích dung dịch ra gần 1350 / với trọng lượng riêng 1,28 g/cm³ khi ở nhiệt độ 60°C.

a. Các thiết bị và chức năng chính

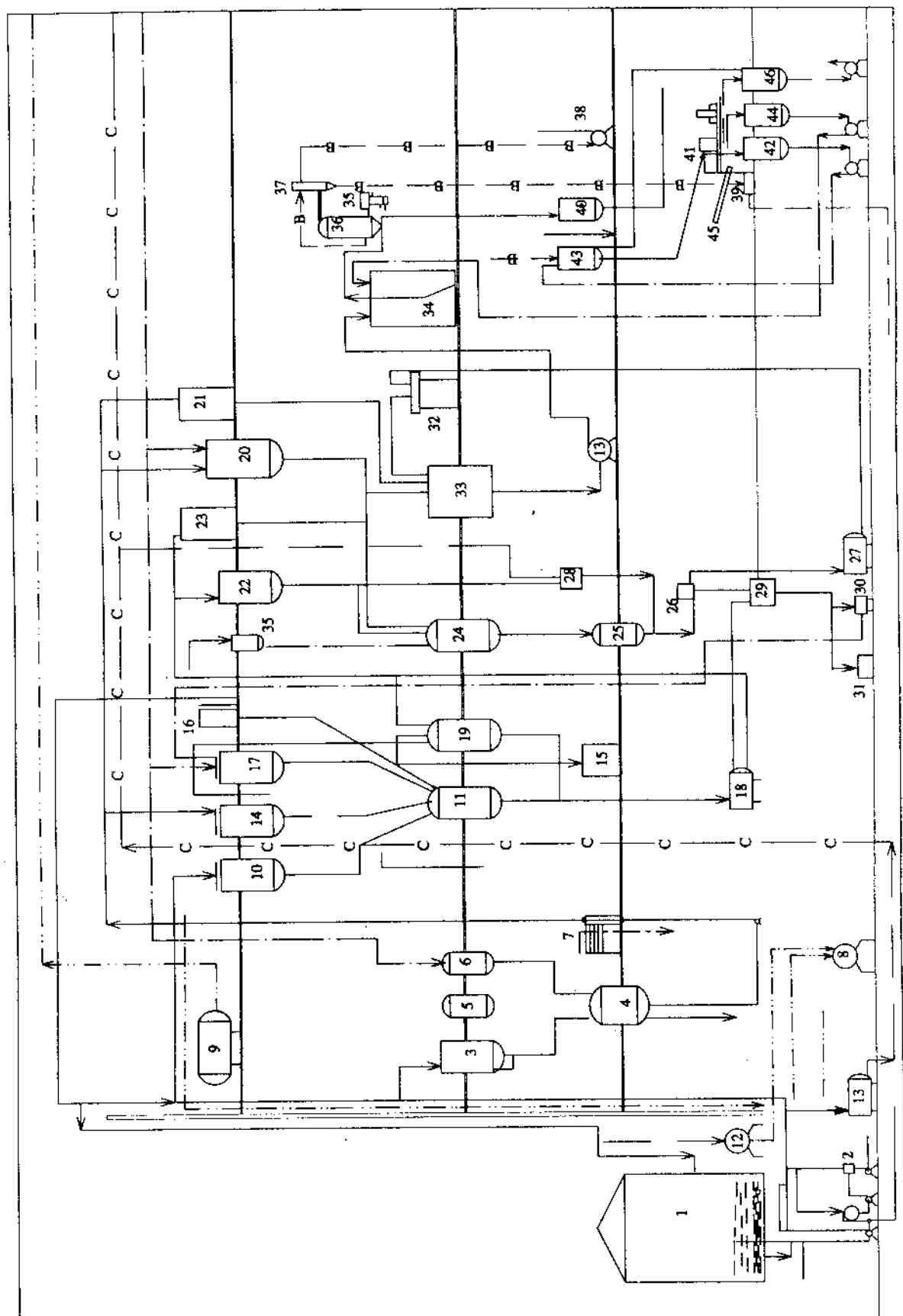
1. Thùng dung dịch cô đặc.
2. Thiết bị trao đổi nhiệt.
3. Thùng đo dung dịch cô đặc.
4. Thiết bị để thủy phân bằng kiềm.
5. Thùng đo dung dịch NaOH.
6. Thùng chứa dung dịch nước cái quay trở lại.
7. Thiết bị làm lạnh (làm nguội) dung dịch thủy phân.
8. Bể chứa dung dịch NaOH.
9. Thùng chứa dung dịch NaOH.
10. Thùng đo dung dịch kiềm thải cô đặc.
11. Thiết bị để thủy phân bằng axit.
12. Bể chứa axit HCl.
13. Thùng chứa axit HCl chảy xuống.
14. Thùng đo axit HCl.
15. Bộ phận làm lạnh ngưng tụ hơi trở lại.
16. Thùng định lượng nước.
17. Thùng chứa nước cái và nước rửa.
18. Thùng chứa dung dịch thủy phân bằng axit đi trung hòa.
19. Thiết bị làm nguội dung dịch thủy phân.
- 20; 21. Thiết bị chứa dịch thủy phân bằng kiềm.

- 22; 23. Thùng chứa dịch thủy phân bằng axit.
24. Thiết bị trung hòa 1.
25. Thùng chứa dung dịch trung hòa đi lọc.
26. Thiết bị lọc tách các chất màu, humin . . .
27. Thùng chứa dung dịch đưa đi trung hòa.
28. Thùng chứa dung dịch nước axit và rửa humin.
29. Thùng đi trung hòa các chất humin.
30. Thùng để chuyển dung dịch rửa vào thiết bị chứa.
31. Thùng chứa nước rửa sau khi lọc 17 và 31 qua 26.
32. Thiết bị lọc kiểm tra.
33. Thiết bị trung hòa 2.
34. Thiết bị trung hòa trước lúc cô đặc sơ bộ.
35. Thiết bị cô đặc sơ bộ (thiết bị gia nhiệt).
36. Thiết bị cô đặc sơ bộ.
37. Thiết bị ngưng tụ.
38. Bơm chân không.
39. Thùng chứa nước nóng.
40. Thùng chứa dung dịch trung hòa cô đặc sơ bộ.
41. Máy ly tâm.
42. Thiết bị khuấy để hòa tan muối.
43. Thùng chứa các nước để rửa muối kết tinh.
44. Thùng chứa nước rửa.
45. Thiết bị vận chuyển.
46. Thiết bị trung hòa sau khi tách muối.
47. Thiết bị trung hòa sau khi cô đặc kết thúc.
48. Thiết bị cô đặc dung dịch cuối.
49. Thùng chứa dung dịch trung hòa đã được cô đặc.
50. Thùng kết tinh axit glutamic.
51. Thùng chứa axit glutamic được kết tinh
52. Thùng chuyển axit glutamic vào lọc
53. 65. Máy lọc
54. Thiết bị để chuẩn bị nước làm lạnh.
55. Thiết bị trung hòa dung dịch betain.

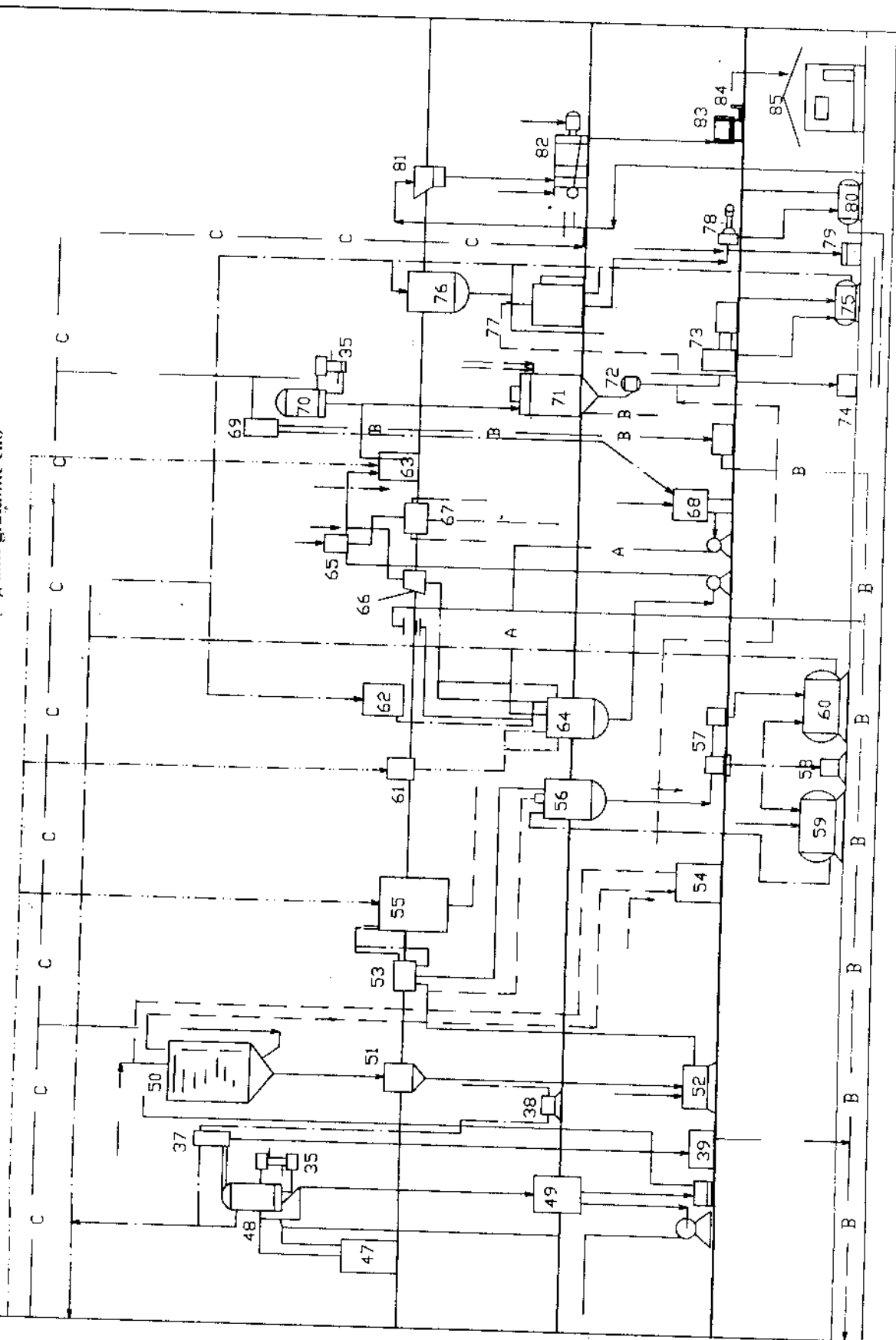
56. Thiết bị trung hòa axit glutamic.
57. Thiết bị ly tâm tách axit glutamic.
58. Thùng chuyển nước rửa vào thùng chứa 56.
59. Thùng chứa axit glutamic.
60. Thùng để chuyển dung dịch nước cái vào thùng 6; 17; 20.
61. Thùng chứa dung dịch NaOH.
62. Thùng chứa dung dịch glutamat natri.
63. Thiết bị phản ứng dung dịch axit glutamic.
64. Thùng chứa axit glutamic.
66. Thùng chứa nước rửa sau khi lọc
67. Thùng chứa cặn sau khi lọc.
68. Thùng chuẩn bị dung dịch than hoạt tính.
69. Thùng chứa dung dịch glutamat natri.
70. Thiết bị cô đặc.
71. Thiết bị kết tinh glutamat natri.
72. Thiết bị tách kết tinh glutamat natri
73. Ly tâm tách glutamat natri.
74. Thùng chứa glutamat natri ẩm.
75. Thùng chứa dung dịch glutamat natri.
76. Thùng chuyển dung dịch nước cái glutamat natri.
77. Thiết bị kết tinh tách L-glutamat natri.
78. Ly tâm tách L-glutamat natri.
79. Thùng chứa L-glutamat natri.
80. Thùng chuyển dung dịch nước cái L-glutamat natri.
81. Phễu chứa chuyển glutamat natri.
82. Thiết bị sấy glutamat natri.
83. Thùng có vít tải chuyển vận glutamat natri.
84. Cân glutamat natri.
85. Kho bảo quản glutamat natri.

b. Các ký hiệu chính

- _____ Dung dịch, sản phẩm trung gian, axit glutamic, glutamat natri.
- ____. ____ Dung dịch nước cái, dung dịch NaOH.
- ____c____ Dung dịch HCl.



Sơ đồ tóm tắt quá trình sản xuất glutamat natri từ dung dịch có chứa axit glutamic
hay thành phần protein có hàm lượng axit glutamic cao



- ___b___ Dung dịch betain.
- ___S___ Hơi (steam).
- ___AW___ Nước (water).
- ___CW___ Nước làm nguội (cooling water).
- ___AC___ Than hoạt tính (active coal).
- ___A___ Không khí (air).
- ___H___ Chất humin

PHẦN II

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MỘT SỐ SẢN PHẨM LÊN MEN CỔ TRUYỀN

PGS. TS. Nguyễn Thị Hiền, PGS. TS. Nguyễn Đức Lượng

LỜI GIỚI THIỆU .

Trong phần này chúng tôi muốn giới thiệu đại cương để học viên biết và hiểu các công đoạn cơ bản trong sản xuất một số sản phẩm lên men cổ truyền phổ biến nhất ở nước ta và một số nước Đông Nam Á, Châu Phi. Trên cơ sở đó chúng ta có thể áp dụng thích hợp vào sản xuất phục vụ nhu cầu hàng ngày của nhân dân ta và có thể xuất khẩu khi nghiên cứu hoàn chỉnh nó trên dây chuyền sản xuất quy mô công nghiệp.

Các sản phẩm chủ yếu chúng tôi tập trung giới thiệu trong tài liệu đi từ hai nguồn nguyên liệu chính là:

- Nguyên liệu giàu protein từ động vật là các loại tôm, cá,... sản phẩm của ngành thủy sản và thịt - nguồn gốc từ động vật .
- Nguyên liệu giàu protein sẵn có từ nguồn gốc thực vật để tạo ra các sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao và hợp khẩu vị dân ta đó là đậu tương.

Ngoài ra chúng tôi muốn giới thiệu thêm một số sản phẩm đi từ nguồn nguyên liệu giàu tinh bột nổi tiếng để sản xuất rượu Saké của Nhật Bản và một số sản phẩm rượu dân gian của dân ta đi từ gạo nếp, ngô, khoai, sắn và bánh men thuốc bắc hoặc bánh men lá của người dân tộc, cùng một số rau quả muối chua khác. Tuy nhiên đây chỉ là tập hợp tóm tắt một số tài liệu dịch và một số số liệu thực tế trong sản xuất, do vậy có thể chưa đáp ứng đầy đủ được những yêu cầu chung. Kính mong các độc giả và sinh viên góp ý kiến bổ sung hay đề xuất nghiên cứu thêm cho hoàn chỉnh để ứng dụng vào sản xuất các sản phẩm cổ truyền này có hiệu quả toàn diện nhất cả về chất lượng, số lượng, đặc trưng nhất cho dân tộc ta.

Hà Nội tháng 3 năm 2004

Tác giả

PGS.TS. Nguyễn Thị Hiền - ĐHBK Hà Nội

PGS.TS. Nguyễn Đức Lương - ĐHKTP.Hồ Chí Minh

MỞ ĐẦU

Một số đặc điểm của thực phẩm lên men cổ truyền

1. Các sản phẩm thực phẩm lên men truyền thống là một trong các loại sản phẩm lên men phổ biến của các dân tộc trên thế giới. Đó là một loại thực phẩm được sản xuất thủ công, mang sắc thái kinh nghiệm và bản sắc riêng của từng dân tộc. Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men truyền thống được thực hiện của cả một dân tộc được truyền từ đời này sang đời khác. Theo thời gian, các sản phẩm lên men truyền thống càng được mở rộng cả về chủng loại, cả về phương pháp chế biến. Do tính chất đặc biệt của nó mà các sản phẩm lên men truyền thống có một vị trí riêng cho từng vùng, nó mang sắc thái của một nền văn hóa riêng. Hầu như mỗi dân tộc trên thế giới đều có riêng những sản phẩm thực phẩm lên men truyền thống của mình. Các sản phẩm này có thể là một bộ phận không thể tách rời trong đời sống dân tộc này nhưng lại khó có thể được chấp nhận trong đời sống của một dân tộc khác. Mỗi dân tộc có thói quen thưởng thức, sử dụng mùi vị riêng. Do đó, các sản phẩm lên men truyền thống đã tạo thành một thói quen khó có thể bỏ qua của dân tộc đó. Thí dụ, người Việt Nam quen dùng nước mắm trong các bữa ăn như một điều hết sức tự nhiên. Thiếu nước mắm trong bữa ăn, người Việt Nam cảm thấy thiếu cái gì đó rất quan trọng, bữa ăn trở nên nhạt nhẽo. Người Việt xa quê, sống ở nước ngoài, nhớ quê hương đồng nghĩa với nhớ hương vị của món nước mắm trong mỗi bữa ăn. Trong khi đó, người Châu Âu lại không thể chịu đựng nổi mùi nước mắm. Cũng tương tự, dân Việt Nam khó chấp nhận được các sản phẩm lên men của các dân tộc khác.

2. Hiện nay, các sản phẩm lên men truyền thống đã không còn được sản xuất hoàn toàn theo phương pháp thủ công nữa. Cùng với sự phát triển xã hội, các công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men truyền thống cũng được cải tiến dần để đáp ứng không chỉ về chất lượng mà còn đáp ứng cả về số lượng cho người tiêu dùng. Một số sản phẩm lên men truyền thống đã được nghiên cứu kỹ không chỉ về mặt khoa học cơ bản mà cả về mặt kỹ thuật sản xuất. Chính vì thế các sản phẩm lên men truyền thống đã đi từ sản xuất thủ công chuyển dần sang sản xuất hàng loạt theo phương pháp công nghiệp. Lúc đầu người ta còn băn khoăn về chất lượng của sản phẩm này. Nhưng do những ưu điểm của phương pháp sản xuất công nghiệp như đảm bảo vệ sinh hơn, kiểm soát được và giữ được tính chất ổn định của sản phẩm, số lượng sản phẩm thoả mãn nhu

cầu thị trường nên các sản phẩm này đã được bán rộng rãi không chỉ ở trong nước mà cả ngoài nước.

3. Một đặc điểm nữa của các công nghệ và sản phẩm thực phẩm lên men truyền thống là tính phổ cập khá nhanh trong mấy thập kỷ gần đây. Do sự giao lưu văn hoá dân tộc khác nhau đã xích lại gần nhau hơn trong việc tìm hiểu văn hóa riêng của nhau. Trong đó có cả các mặt hàng thực phẩm lên men. Từ chỗ thử, tìm hiểu đến một thói quen cần thiết, các dân tộc đã tìm đến nhau, trao đổi nhau về sản phẩm, và trao đổi công nghệ sản xuất ra các sản phẩm này. Trong bối cảnh như vậy các sản phẩm thực phẩm lên men của các nước Đông Nam Á cũng đang được bán và được sản xuất tại Việt Nam. Tương tự như vậy, các sản phẩm lên men truyền thống của ta cũng đang hòa nhập trong cuộc sống của các nước khác trên thế giới. Như vậy việc nghiên cứu các công nghệ lên men truyền thống của ta và cả của các nước khác trên thế giới là điều rất cần thiết. Trong mối tương quan ấy, điều quan trọng là mỗi dân tộc phải biết chọn lựa và cải tiến sao cho phù hợp với dân tộc mình. Bản sắc dân tộc chính là ở cái riêng nằm trong cái chung ấy.

4. Đặc điểm cuối cùng của các sản phẩm thực phẩm lên men truyền thống và công nghệ sản xuất sẽ mãi mãi trường tồn cùng dân tộc, và sẽ được cải tiến dần, hoàn thiện dần theo thời gian. Do đó các thế hệ của một dân tộc, trong đó có chúng ta hiểu biết và phát huy truyền thống của các sản phẩm này không chỉ là điều cần thiết mà còn là trách nhiệm trong việc gìn giữ và phát huy các truyền thống lâu đời của quê hương, của dân tộc.

CHƯƠNG 5

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ THỦY SẢN

I. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT NƯỚC MẮM

I.1. Tình hình nghiên cứu và sản xuất nước mắm

Nước mắm là sản phẩm được lên men từ các loại cá, là sản phẩm truyền thống của dân tộc Việt Nam. Nước mắm được sản xuất rất lâu, cho đến nay chưa có tài liệu nào xác định được thời điểm chính xác và ai là người Việt Nam đầu tiên đưa ra quy trình sản xuất sản phẩm này. Chỉ biết rằng, nước mắm đã gắn liền với đời sống hàng ngày và là một bản sắc văn hóa rất riêng của dân tộc Việt Nam. Công trình nghiên cứu đầu tiên về nước mắm là do bác sĩ Rode vào năm 1914. Sau đó là các nhà nghiên cứu người Pháp khác như Matxna, Krem, Bots và Ghibec.

Các tác giả này nghiên cứu nước mắm ở Phú Quốc và Bình Thuận và đã đưa ra các kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học của nước mắm và nghiên cứu khá tỉ mỉ về công nghệ sản xuất nước mắm. Các kết luận như sau:

1. Nước mắm là hỗn hợp các axit amin. Các axit amin này được tạo thành do sự thủy phân của proteaza. Các proteaza này là do vi sinh vật tổng hợp nên.
2. Muốn có tác dụng ức chế vi sinh vật gây thối, tỷ lệ muối thích hợp là $20 \div 25\%$.
3. Tác dụng làm ngấu và tạo hương ngoài proteaza của vi sinh vật còn do các enzym tiêu hóa cơ trong nội tạng cá.
4. Nhiệt độ có tác dụng rất lớn đến hoạt động của các enzym trong quá trình sản xuất làm nước mắm. Nhiệt độ thích hợp là $36 \div 44^{\circ}\text{C}$.
5. Trong quá trình thủy phân, độ axit tăng. Ban đầu của quá trình làm nước mắm, môi trường kiềm yếu có tác dụng rất tốt.

Người Việt Nam đầu tiên tham gia nghiên cứu nước mắm là Đinh Minh Kha và Nguyễn Xuân Thọ. Các nghiên cứu này xoay quanh cơ chế hoạt động của proteaza và thành phần của

nước mắm. Sau đó là hàng loạt các tác giả trong và ngoài nước tham gia tích cực vào các nghiên cứu về công nghệ sản xuất nước mắm ở từng địa phương. Các nghiên cứu này tập trung rất nhiều vào khu hệ vi sinh vật cá và tác dụng của chúng trong quá trình tạo ra nước mắm.

Nội dung chủ yếu của các nghiên cứu:

- Nghiên cứu so sánh các phương pháp sản xuất nước mắm của các địa phương.
- Nghiên cứu chế độ nhiệt độ trong quá trình thủy phân nước mắm.
- Nghiên cứu các chế phẩm enzym nhằm mục đích rút ngắn quá trình lên men nước mắm.
- Nghiên cứu chế độ cho muối vào trong suốt thời kỳ lên men nước mắm.
- Nghiên cứu tính chất nguyên liệu và các quy trình công nghệ phù hợp với từng loại nguyên liệu ban đầu.

Tuy chưa hoàn toàn giải quyết triệt để những vấn đề trong công nghệ sản xuất nước mắm, nhưng các nghiên cứu đã làm sáng tỏ nhiều vấn đề và góp phần không nhỏ trong việc hoàn thiện và nâng cao quy trình công nghệ và chất lượng nước mắm của Việt Nam.

1.2. Nguyên liệu sản xuất nước mắm

Nguyên liệu dùng để sản xuất nước mắm là các loại cá. Tuy nhiên, chất lượng nước mắm lại phụ thuộc rất nhiều vào từng loại cá. Chính vì thế việc chọn cá để sản xuất nước mắm là điều mà các nhà sản xuất rất quan tâm, cũng chính vì thế mà tuy cùng một công nghệ nhưng chất lượng nước mắm mỗi nơi mỗi khác.

Thành phần hoá học các loại nguyên liệu cá được liệt kê trong bảng 1 và 2.

Bảng 1. Thành phần hóa học cá nước ngọt

tt	Loài cá	Thành phần hóa học (% khối lượng)		
		Nước	Protit	Lipit
1	Diếc	85	13	1,1
2	Chép	79	18,1	1,5
3	Trắm đen	77	17,9	3,8
4	Mè hoa	82	14,5	0,6
5	Mè trắng	86	10,0	1,0
6	Lòng canh	76	15,6	2,3

Bảng 2. Thành phần hóa học cá biển

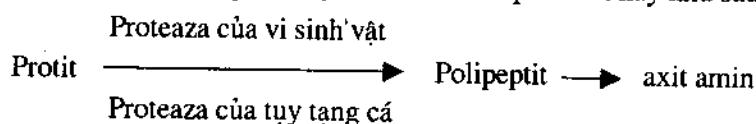
tt	Loài cá	Thành phần hóa học (% khối lượng)		
		Nước	Protit	Lipit
1	Nục sô	76,8	21,75	0,85
2	Mối thường	77,5	19,26	1,8
3	Trích	75,9	21,76	3,15
4	Phèn hai sọc	76,2	20,35	2,20
5	Lươn ngắn	79,3	19,03	1,21
6	Cơm	75,14	11,25	2,10
7	Mòi	76,66	9,37	14,4
8	Lẹp	81,84	10,00	1,40
9	Chuồn	76,17	9,75	7,5

1.3. Công nghệ sản xuất nước mắm

Nước mắm là dung dịch axit amin, NaCl, các chất thơm được tạo thành trong quá trình lên men. Bản chất của quá trình sản xuất nước mắm gồm hai quá trình chuyển hóa cơ bản:

a. Chuyển hóa protit thành axit amin

Đây là quá trình chính trong quá trình sản xuất nước mắm. Quá trình này xảy ra do proteaza của vi sinh vật và proteaza có trong tụy tạng cá. Quá trình thủy phân xảy ra nhờ ảnh hưởng của nhiệt độ là chính, thường rất chậm. Cơ chế của quá trình này như sau:



Nếu quá trình xảy ra mạnh sẽ tạo ra sản phẩm cuối cùng là axit amin và một số loại khí có mùi rất khó chịu như NH_3 , H_2S , mercaptan... Các sản phẩm khí này có thể sẽ tan trong nước mắm, cũng có thể bay hơi tạo ra mùi rất khó chịu. Chính vì vậy trong sản xuất nước mắm, người ta kìm hãm quá trình này xảy ra.

b. Quá trình thứ hai là quá trình tạo hương thơm

Nước mắm là một dung dịch, trong đó không chỉ có các axit amin, NaCl mà phải có các loại hương thơm đặc trưng của nó. Sự chuyển hóa các hợp chất hữu cơ tạo thành hương thơm là một quá trình rất phức tạp, đòi hỏi thời gian. Do đó trong công nghệ sản xuất nước mắm cũng

giống như trong sản xuất rượu vang người ta cần thời gian nhất định để sản phẩm tích lũy hương đặc trưng. Nếu thiếu quá trình này và thành phần này thì nước mắm sẽ không phải là nước mắm mà là dung dịch axit amin thuần túy.

Do đó việc sản xuất nước mắm càng trở nên phức tạp, đòi hỏi không chỉ kiến thức mà cần có kinh nghiệm thực tế của người sản xuất.

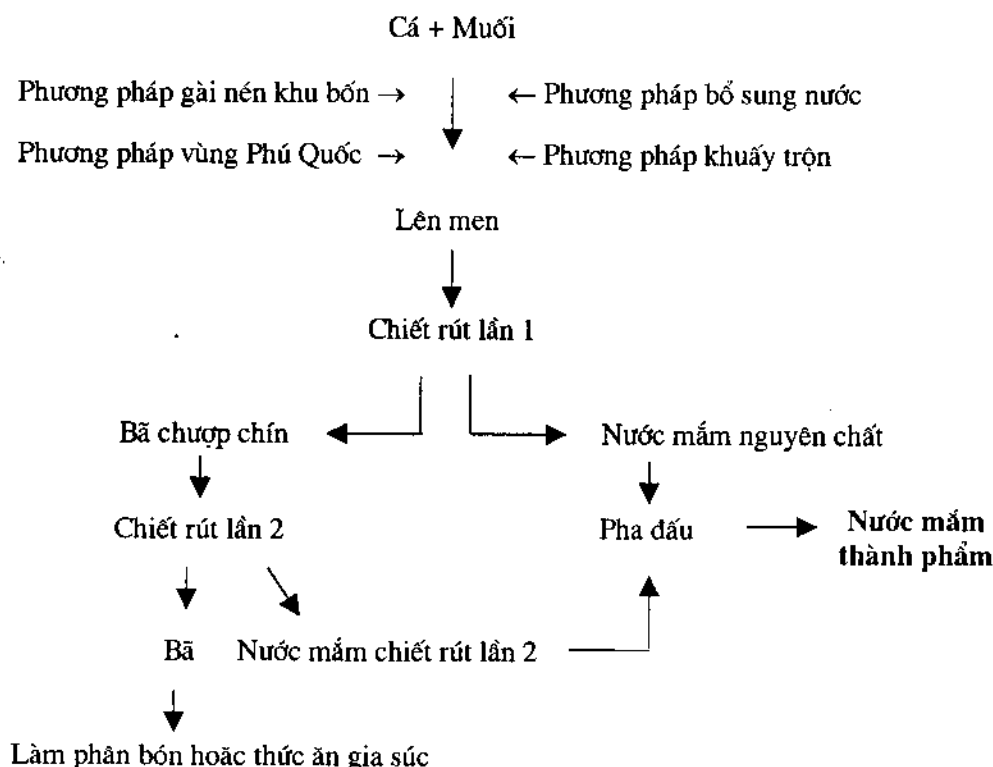
Hiện nay có nhiều phương pháp khác nhau, phụ thuộc vào kinh nghiệm của từng địa phương và khả năng cũng như nguyên liệu của từng vùng. Ta có thể tóm tắt lại thành hai nhóm công nghệ cơ bản như sau:

1.3.1. Công nghệ sản xuất nước mắm dài ngày

Ngay trong nhóm công nghệ này, người Việt Nam ở các địa phương khác nhau cũng thực hiện theo những cách khác nhau.

Khi xác định hệ vi sinh vật trong nguyên liệu cũng như hệ vi sinh vật trong khối cá đang lên men người ta thấy có mặt rất nhiều vi khuẩn thuộc *Bacillus subtilis*, *Bacillus mensentericus*, *E. coli*, *Pseudomonas sp*, *Clostridium sp*...

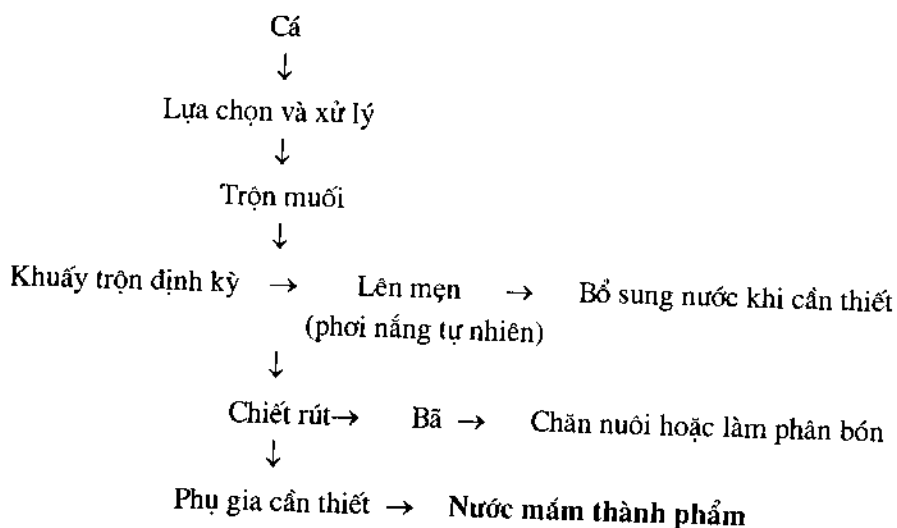
Sơ đồ 1. Sơ đồ tổng quát công nghệ sản xuất nước mắm dài ngày



1.3.2. Công nghệ sản xuất vùng Cát Hải (Hải phòng) (phương pháp bổ sung nước trong quá trình lên men)

Phương pháp này được nhân dân Cát Hải Hải phòng thực hiện từ thế hệ này sang thế hệ khác.

Sơ đồ 2. Công nghệ sản xuất nước mắm dài ngày của vùng Cát Hải, Hải Phòng



Một số điểm cần lưu ý trong công nghệ sản xuất:

- Cho muối vào cá và trong quá trình lên men: Muối được cho vào nhiều lần để hạn chế ảnh hưởng xấu của muối đến quá trình thủy phân.

Lần đầu: Cứ 100 kg cá tươi với 10 ÷ 12% lượng muối cần thiết (vào mùa hè) và 6 - 8% lượng muối cần thiết (mùa đông). Nếu cá bị ươn người ta cho thêm 2 ÷ 5 kg muối để cho cá không bị thối. Muối cho vào cá được trộn đều và phủ một lớp muối trên bề mặt cá (khoảng 1 ÷ 2 kg). Sau 24 giờ cho nước vào. Đối với cá đã ướp muối sau khi đánh bắt ngoài biển thì không cho thêm muối nữa mà chỉ cần cho cá vào các vật dụng lên men và thêm nước theo tỷ lệ nhất định. Sau một tuần lên men, khối cá sẽ chìm xuống. Nếu thấy hiện tượng cá nổi lên trên, đó là dấu hiệu thiếu muối, cần bổ sung muối.

Thời gian cho muối lần hai tiếp theo lần đầu: Nếu vào mùa hè là 3 ÷ 5 ngày, nếu là mùa đông là 5 ÷ 7 ngày. Lúc đầu cho 5 ÷ 10 kg, sau khi trộn đều, khi muối hoà tan xong thêm 2 kg muối nữa phủ kín lên trên. Sau 24 giờ đánh trộn lại.

Thời gian cho muối lần ba: vào mùa hè sau 2 ÷ 3 ngày, mùa đông 4 ÷ 7 ngày. Số lượng muối là 8 ÷ 10 kg cho 100 kg cá cần làm mắm. Lần cho cuối cùng được tính sao cho lượng muối trong sản phẩm là 24 ÷ 25⁰Baumé. Khuấy đều và phơi nắng liên tục.

- Việc cho thêm nước vào khối chượp có ý nghĩa nhất định trong sự chuyển hóa các chất: Nhờ có thêm nước (số lượng nước vừa phải) tăng nhanh hoạt động của các enzym thủy phân; nước thêm vào hòa loãng muối nên ít ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym; nước sẽ phân phối đều nhiệt độ nhận từ Mặt Trời và từ quá trình hoạt động của vi sinh vật trong khối chượp.

- Khi muối được cho vào nhiều lần còn có tác dụng hạn chế sự ức chế do muối gây ra đối với hoạt tính proteaza.

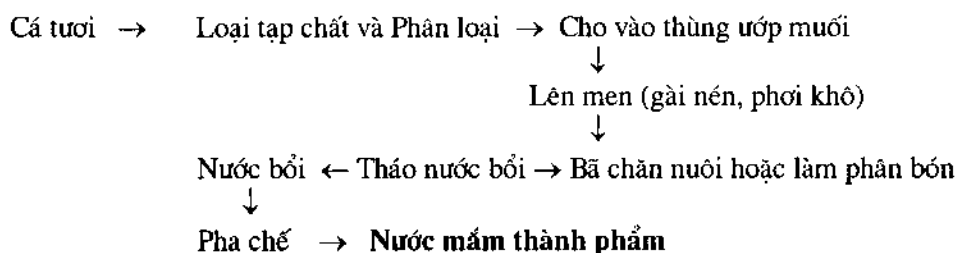
- Việc khuấy đảo cũng có nhiều tác dụng: thịt cá được đánh toi; tăng nhanh bề mặt tiếp xúc của thịt cá với hệ enzym; khuấy đảo phân phối nhiệt trong khối chượp tốt hơn; và muối tan nhanh hơn trong khối chượp.

- Nhiều gia đình còn dùng bã mắm và khối chượp chín để lên men trong những lần lên men sau. Cách làm này có tác dụng tốt, làm giảm lượng muối cho những lần lên men tiếp sau; tăng nhanh quá trình phân hủy cá do có thêm lượng vi sinh vật và lượng enzym cần thiết.

1.3.3. Phương pháp gài, nén của miền Trung

Nhân dân miền Trung tiến hành sản xuất nước mắm theo cách hoàn toàn khác, đó là phương pháp gài, nén khối cá chượp. Phương pháp được thực hiện theo sơ đồ sau:

Sơ đồ 3. Công nghệ sản xuất nước mắm theo phương pháp gài, nén



Một số lưu ý trong công nghệ này:

- Cách tính lượng muối cho vào khối cá lên men:

Lượng muối cần thiết trên có thể cho vào nhiều lần: Lần 1 cho 15% so với tổng lượng muối; lần 2, sau 3 ÷ 5 ngày sau lần 1 là 2 ÷ 7%; lần 3 cho số muối còn lại, khuấy đảo đều và phủ một lớp muối lên trên bề mặt. Khi ướp muối tiến hành gài, nén, sau 3 ÷ 4 ngày tiến hành rút nước bổi. Sau đó cứ 4 ÷ 5 ngày rút nước bổi một lần. Sau tháng đầu, cứ 7 ÷ 10 ngày rút nước bổi 1 lần.

Bảng 3. Hàm lượng muối cần thiết

tt	Loại cá	Lượng muối cần thiết (%)
1	Các nục	25 ÷ 32
2	Cá trích	25 ÷ 30
3	Cá cơm	22 ÷ 28
4	Cá lẹp	25 ÷ 30
5	Cá tạp	25 ÷ 32

I.3.4. Phương pháp sản xuất nước mắm ở Phú Quốc

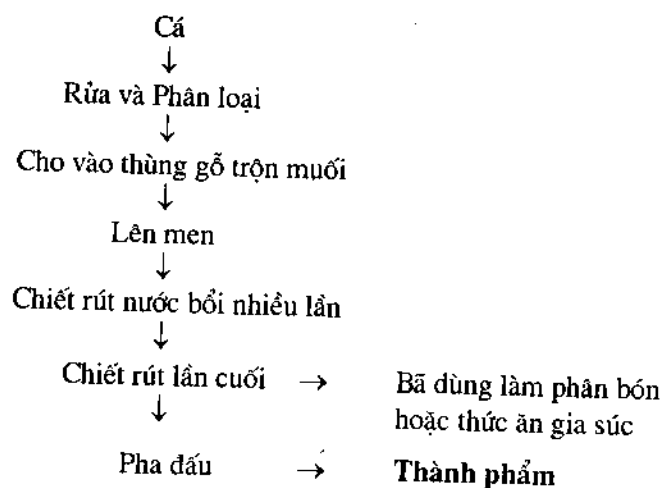
Phương pháp sản xuất nước mắm của nhân dân Phú Quốc gần giống của nhân dân miền Trung, tuy nhiên có một số điểm khác.

Một số điểm cần lưu ý trong công nghệ:

- Trong giai đoạn trộn cá và muối người ta cho thêm trái cây (dứa, mít): cho vào thùng gỗ một lớp cá, một lớp trái cây, một lớp thính gạo, một lớp muối. Trung bình mỗi lớp hỗn hợp dày 8 ÷ 12 cm, trên cùng phủ một lớp muối dày 3 cm. Lượng nguyên liệu được cho vào như sau: 100 kg cá, 25 kg muối, 1 kg thính gạo, 10 trái dứa hoặc 1 ÷ 2 trái mít.

- Nước bọt được rút ra liên tục từ một ống dẫn nhỏ từ đáy thùng gỗ, hoặc cứ 7 ngày lấy ra bằng một ống dẫn lớn. Lượng nước bọt này được đổ ngược lại khối cá chượp, thời gian rút nước bọt kéo dài trong 2 tháng và sau đó lên men 4 ÷ 7 tháng.

Sơ đồ 4. Công nghệ sản xuất nước mắm Phú quốc



I.3.5. Công nghệ sản xuất nước mắm ngắn ngày

Nhằm rút ngắn quá trình lên men, nhiều cơ sở đã cố gắng tìm mọi biện pháp, tăng cường lượng enzym từ vi sinh vật, thực vật, điều chỉnh chế độ nhiệt độ, pH, lượng nước. Các kết quả đó làm thay đổi đáng kể thời gian, công sức và chất lượng sản phẩm.

Một số điểm cần lưu ý khi sản xuất bằng cá nước ngọt

- Để tăng nhanh quá trình thủy phân cá, người ta cho thêm 3 ÷ 5% enzym proteaza của nấm mốc, đồng thời giữ ổn định thời gian đầu ở nhiệt độ 50 ÷ 55°C, sau đó hạ xuống 45°C.

- Lượng muối cho vào khối cá nhiều lần: Lúc đầu cho một lượng muối rất hạn chế để không ảnh hưởng đến hoạt động của enzym, sau đó tăng dần lượng muối để khống chế lượng vi khuẩn gây thối. Khi cho đủ lượng muối cần thiết thì hạ nhiệt độ xuống 40 ÷ 45°C. Chế độ cho muối được tính như sau:

Đối với cá tươi: Từ 12 ÷ 18 giờ cho 7% muối; từ 30 ÷ 48 giờ cho 3% muối; từ 72 giờ trở đi cho số muối còn lại.

Đối với cá không tươi lắm: Từ 6 ÷ 12 giờ cho 7% muối; từ 24 ÷ 48 giờ cho 3% muối; từ 52 ÷ 72 giờ cho 16 - 17% muối.

Đối với cá ươn: Từ 6 ÷ 12 giờ cho 5 ÷ 10% muối; từ 24 ÷ 30 giờ cho 15 ÷ 17% muối; sau 72 giờ cho 27% muối.

Thời gian muối cá là 7 ngày, chượp cá là 7 ÷ 15 ngày ở nhiệt độ 50 ÷ 55°C.

Sơ đồ 5. Công nghệ sản xuất nước mắm ngắn ngày từ cá nước ngọt

Cá tươi → Làm sạch → Phân loại và trộn muối



Lên men

(Thủy phân trong điều kiện nhiệt ổn định và lượng muối ít)



Ướp muối



Lên men (chượp cá)



Lọc → Bã → dùng chăn nuôi hoặc phân bón



Nước mắm nguyên chất → Pha chế → **Thành phẩm**

- Việc sử dụng các chế phẩm enzym proteaza để tăng nhanh thời gian làm nước mắm có ưu điểm là rút ngắn được thời gian lên men. Tuy nhiên mùi vị của nước mắm được sản xuất từ phương pháp cổ truyền dài ngày tốt hơn phương pháp ngắn ngày. Thành phần hóa học của nước mắm được sản xuất từ 2 phương pháp trên gần như nhau.

I.4. Thành phần hóa học của nước mắm

I.4.1. Thành phần axit amin

Trong nước mắm đã tìm được 17 axit amin. Kết quả phân tích 3 mẫu nước mắm được xem trong bảng 5.

Bảng 5. Thành phần các axit amin của nước mắm

tt	Axit amin	Mẫu số 1	Mẫu số 2	Mẫu số 3
1	Lizin	0,191	0,451	0,269
2	Treomin	0,049	0,049	0,050
3	Valin	0,253	0,290	0,157
4	Metionin	0,222	0,096	0,046
5	Izoloxin	0,125	0,189	0,121
6	Phenillulamin	0,270	0,222	0,273
7	Loxin	0,125	0,163	0,138
8	Tryptophan	Rất ít	0,085	0,051
9	Xistin	0,351	0,397	0,260
10	Arginin	0,722	0,672	0,130
11	Aspartic	0,482	0,496	0,168
12	Xerin	0,099	0,100	0,051
13	Glyxin	0,078	0,099	0,052
14	Alanin	0,272	0,342	0,165
15	Tiroxin	Rất ít	0,098	0,094
16	Prolin	Rất ít	Rất ít	Rất ít
17	Axit glutamic	0,602	0,927	0,502

I.4.2. Các vitamin

Trong 1 lít nước mắm theo phân tích của J.A. Drian có các vitamin sau: B₁ 7mg; B₂ 8,7mg; B₁₂ 3,3 mg; PP 4,4 mg.

1.4.3. Hợp chất vô cơ

Ngoài NaCl trong nước mắm còn có P, K, Ca, Mg, S. Trung bình 1 lít nước mắm có: P $0,266 \div 0,566$ g; Ca $0,439 \div 0,541$ g; Mg $2,208 \div 2,310$ g; S $0,546 \div 1,163$ g. Ngoài ra trong nước mắm còn có Br, I₂ ở dạng muối vô cơ hoặc dạng tự do. Mỗi lít nước mắm có I₂ $5,08 \div 7,62$ mg; Br $68,80 \div 97,50$ mg.

1.4.4. Thành phần nitơ

Phân tích các mẫu nước mắm từ các loại cá và các phương pháp khác nhau ta có kết quả về thành phần nitơ như sau:

Bảng 6. Thành phần nitơ trong nước mắm

Các loại đạm	Nước mắm cá biển dài ngày (phương pháp cổ truyền)	Nước mắm cá biển xí nghiệp dài ngày	Nước mắm cá nước ngọt 7 ngày
Nitơ toàn phần (g/l)	30	26,6	29,26
Nitơ hữu cơ	23,76	19,0	23,21
Nitơ formol	22,50	18,3	18,48
Nitơ amoniac	6,24	7,6	6,05
Nitơ amin	16,26	10,7	12,43
Tỷ lệ $\frac{\text{Nitơ hữu cơ}}{\text{Nitơ toàn phần}}$ (%)	79	71,4	79,3
Tỷ lệ $\frac{\text{Nitơ amoniac}}{\text{Nitơ toàn phần}}$ (%)	20,8	28,57	20,6
Tỷ lệ $\frac{\text{Nitơ formol}}{\text{Nitơ toàn phần}}$	75	68,7	63,6

- Nitơ toàn phần và đạm hữu cơ cao nước mắm ngon.

- Nitơ formol so với đạm toàn phần chiếm 75% nước mắm đã chín và tự thủy phân tương đối hoàn toàn.

- Nitơ amoniac so với đạm toàn phần có tỷ lệ 20,8% hoặc <30% so với formol, chứng tỏ nước mắm tốt không thể thối được.

- Nitơ amin so với đạm toàn phần có tỷ lệ 54,2% chứng tỏ nước mắm chứa nhiều đạm bổ có ích cho cơ thể.

II. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MỘT SỐ SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ THỦY SẢN TRÊN THẾ GIỚI

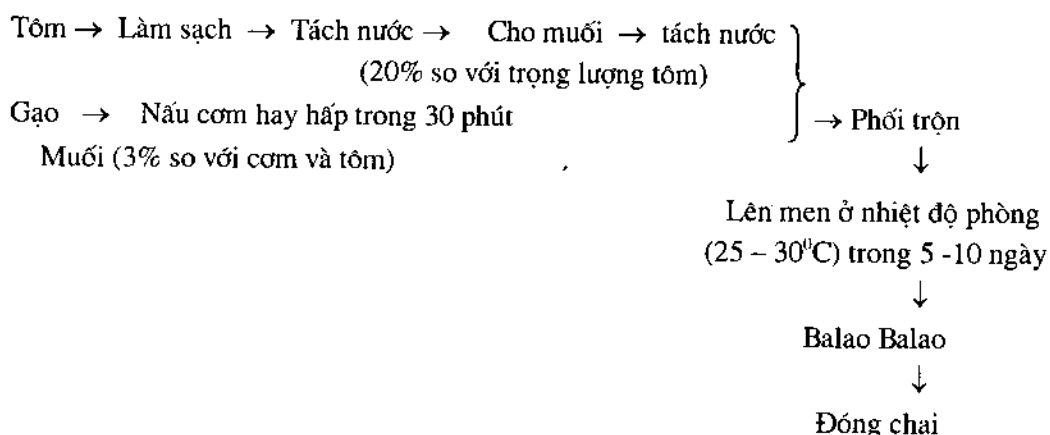
II.1. Balao Balao

Tên chung: tôm, gạo lên men

Tên địa phương của Philipin: Balao Balao, Burong hipon, Tagbilao

Nguyên liệu: tôm 17%; cơm 83%; muối 20% so với tôm và 3% so với tôm và cơm.

Sơ đồ 7. Công nghệ sản xuất Balao Balao



- Đặc tính vật lý: Dạng bán rắn, màu vàng tím đến màu đỏ tím, vị chua, mặn và mùi thơm như phomat.

- Đặc tính hóa học: pH = 3,6 ÷ 3,8; axit lactic: 1,77 ÷ 2,0%; axit axetic 0,11%

- Vi sinh vật: *Leuconostoc mensenteroides*, *Lactobacillus plantarum*; *L. brevis*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*.

- Thời gian bảo quản và sử dụng: vài tháng phụ thuộc vào nhiệt độ bảo quản.

- Sản xuất thủ công.

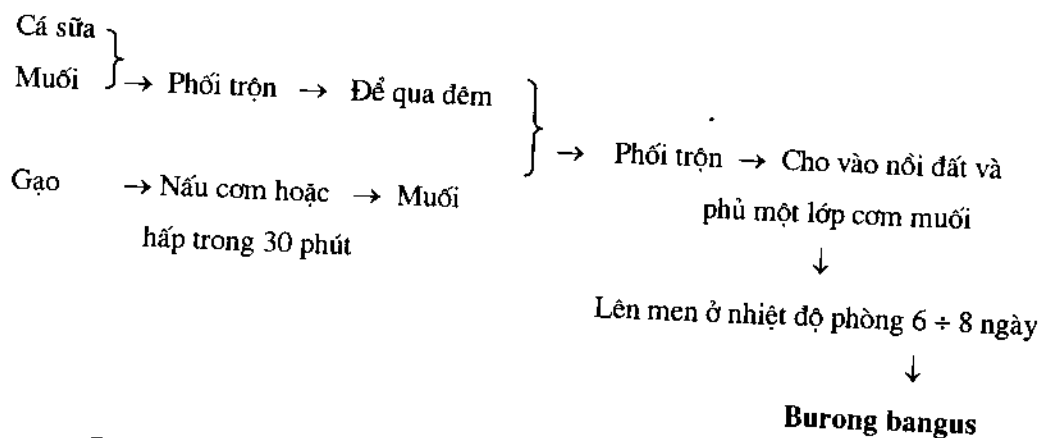
II.2. Burong bangus

Tên chung: Cá sữa lên men.

Tên địa phương của Philippin: Burong bangus.

Nguyên liệu: Các sữa, cơm, muối, dấm.

Sơ đồ 8. Công nghệ sản xuất Burong bangus



Đặc tính vật lý: Dạng bán lỏng, màu trắng, vị chua.

Đặc tính hoá học: pH = 3,47

Vi sinh vật: *Leuconostoc mensesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *L. confusus*.

Sản xuất thủ công.

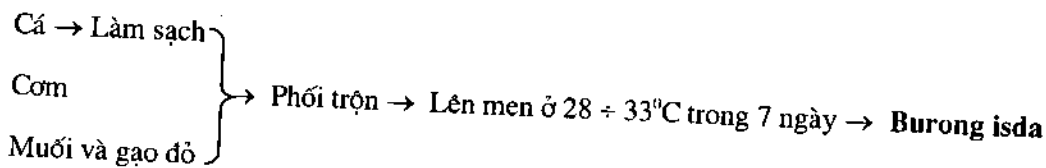
II.3. Burong isda

Tên chung: cá lên men

Tên địa phương của Philippin: Burong isda.

Nguyên liệu: Cá 33,45%; gạo đỏ (cơm) 65,22%; muối 1,33%; gạo đỏ để tạo màu.

Sơ đồ 9. Công nghệ sản xuất Burong isda



Đặc tính vật lý: Dạng đặc, màu tím, vị chua mặn và mùi phomat.

Đặc tính hóa học: pH = 3,5 ÷ 3,8

Vi sinh vật: *Leuconostoc mensenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Micrococcus* sp.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 1 tuần nếu để ở nhiệt độ phòng, 4 ÷ 8 tuần nếu để ở nhiệt độ tủ lạnh.

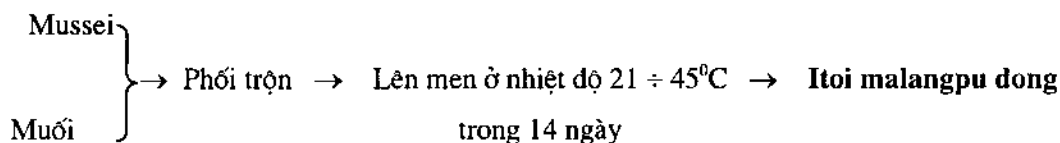
II.4. Itoi malangpu

Tên chung: Mussei lên men.

Tên địa phương của Thái Lan: Itoi malangpu dong.

Nguyên liệu: Mussei (*Mystilus smaragdinus*) 90%, muối 10%.

Sơ đồ 10. Công nghệ sản xuất Itoi malangpu dong



Đặc tính hóa học: pH = $4,51 \div 5,81$; NaCl: 40%; I_2 1,48%; axit lactic $0,27 \div 1,3\%$

Giá trị dinh dưỡng: protein $11,15 \div 13,22\%$; vitamin A và D có trong 100g.

Vi sinh vật: *Pediococcus halophilus*, *Staphylococcus* sp, *S. aureus*, *S. epidermidis*

Thời gian bảo quản và sử dụng: 6 tháng.

Sản xuất thủ công 200 000 tấn / năm

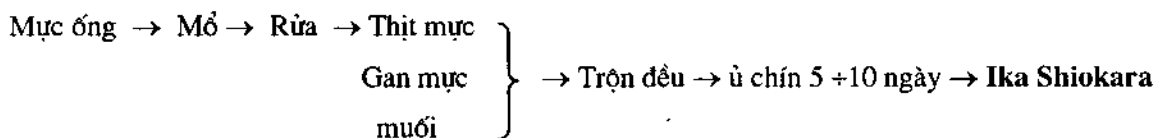
II.5. Ika Shiokara

Tên chung: Mực ống lên men.

Tên địa phương (Nhật): Ika Shiokara.

Nguyên liệu: Thịt mực ống 80 – 90%, muối 8 – 15%, gan mực 2 – 10%.

Sơ đồ 11. Công nghệ sản xuất Ika Shiokara



Đặc tính vật lý: dạng rắn, có vị mặn.

Đặc tính hóa học: pH = $6 \div 7$, độ ẩm 64,8%, tro 12,9%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 100 cal; protein 16,1%; chất béo 1,5%; hydratcacbon 4,7%; Ca 80 mg; P 250 mg; Fe 2,5 mg; Na 4500 mg; B₁ 0,10 mg; B₂ 0,20 mg; niacin 5,0 mg trong 100g.

Vi sinh vật: *Micrococcus* sp; *Staphylococcus* sp; *debaryomyces* sp.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 1 ÷ 2 tháng ở 25°C, 2 ÷ 3 tháng ở 5°C.

Sản xuất quy mô công nghiệp nhỏ, công suất 15000 ÷ 18000 tấn.năm

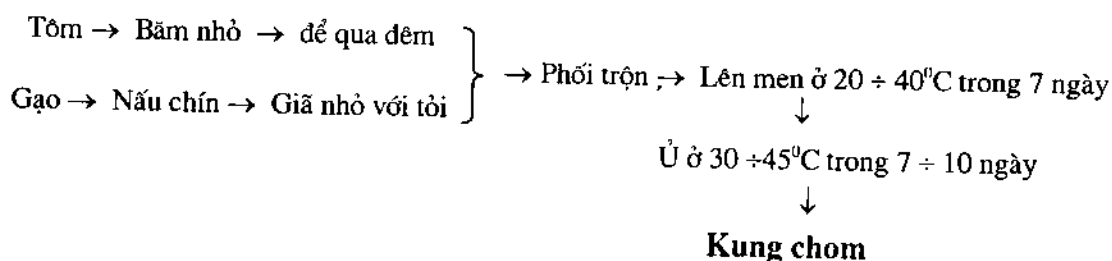
II.6. Kung chom

Tên chung: tôm lên men

Tên địa phương (Thái Lan): Kung chom.

Nguyên liệu: tôm (*Macrobrachium lanchesteri*) 90%; muối 7%; tỏi 1%; gạo 2%.

Sơ đồ 12. Công nghệ sản xuất Kung chom



Đặc tính vật lý: Dạng rắn, màu vàng nâu đến vàng đỏ, vị chua, mặn.

Đặc tính hóa học: pH= 4,46 ÷ 5,50, axit lactic 0,87 ÷ 2,99%; muối 4,62 ÷ 10,96%; glutamat natri 1,1 ÷ 3,5%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 11,0 ÷ 17,7%.

Vi sinh vật: *Pediococcus halophilus*, *Staphylococcus* sp., *S. epidermidis*.

Sản xuất thủ công: 700 000 tấn /năm.

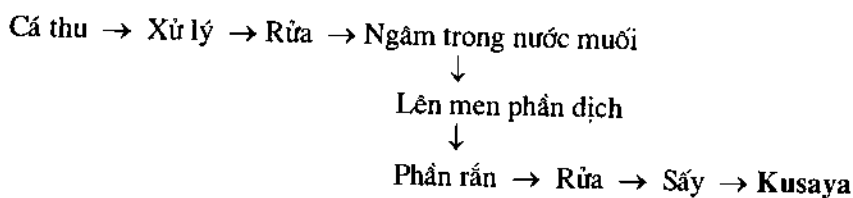
II.7. Kusaya

Tên chung: Cá khô lên men

Tên địa phương (Nhật): Kusaya

Nguyên liệu: cá thu (*Decapterus muroadsi*) 70%, muối 30%.

Sơ đồ 13. Công nghệ sản xuất Kusaya



Đặc tính vật lý: Dạng paste hay dạng cứng, vị muối và mùi lên men.

Đặc tính hóa học: nước 60,4%; tro 12,7%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 165 cal; protein 13,3%; chất béo 11,4%; đường 2,3%; tro 12,7%; Ca 330mg; riboflavin 0,22mg; niacin 1,24mg; axit ascorbic 0,93% trong 100g.

Vì sinh vật: *Pediococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*

II.8. Pla chao

Tên chung: Cá lên men vị ngọt

Tên địa phương của Thái Lan: Plachao, Pla khaomak.

Nguyên liệu: cá nước ngọt tươi 37,5%; muối 12,5%; khaomak 50%.

Công nghệ sản xuất: chặt cá thành từng miếng nhỏ có diện tích 1 inch, trộn với muối, cho vào lọ hoặc chai, để ở $20 \div 30^{\circ}\text{C}$ trong 38 giờ, sau đó cho khaomak và tiến hành lên men ở nhiệt độ $20 \div 30^{\circ}\text{C}$ trong 20 ngày.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu nâu đến màu hồng, vị muối và mùi dễ chịu.

Đặc tính hóa học: pH = $4,1 \div 5,3$; axitactic 1,08 $\div$ 3,8%; muối 4,35 $\div$ 9,48%.

Giá trị dinh dưỡng: có đầy đủ protein, chất béo, vitamin A, B trong 100 g.

Vì sinh vật: *Pediococcus cerevisiae*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng: 1 $\div$ 2 năm.

Sản xuất thủ công.

II.9. Pla chom

Tên chung: Cá lên men.

Tên địa phương (Thái Lan): Pla chom.

Nguyên liệu: cá nước ngọt hay cá biển 56%; muối 5,6%; cơm 16,4%; tỏi 5,6%; bột gạo rang 16,4%.

Công nghệ sản xuất: trộn thịt cá với muối, cơm, tỏi, bột gạo rang, cho tất cả vào khay sành và giữ ở nhiệt độ $20 \div 30^{\circ}\text{C}$ trong 3 ngày.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu nâu, vị chua.

Đặc tính hóa học: pH = $5,0 \div 6,08$; axit lactic 1,97 $\div$ 4,45%; muối 3,75 $\div$ 4,80%.

Giá trị dinh dưỡng: protein $11 \div 29\%$; chất béo $10 \div 14\%$; vitamin A, D có trong 100g.

Vì sinh vật: *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*., *Bacillus sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng: 2 tuần.

Sản xuất thủ công.

II.10. Pla paeng Daeng

Tên chung: Cá lên men màu đỏ.

Tên địa phương (Thái Lan): Pla paeng daeng.

Nguyên liệu: các loại cá biển khác nhau 75%; muối 25%; cơm và Angkak số lượng nhỏ.

Công nghệ sản xuất: chặt cá ra từng miếng nhỏ $1 \div 2$ inch, trộn muối để qua đêm, sau đó rửa sạch trộn với cơm và Angkak. Cho vào các dụng cụ chứa để ở nhiệt độ phòng trong 5 ngày.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu đỏ hay màu hồng, vị chua và mặn.

Đặc tính hóa học: pH = $3,9 \div 5,2$; axit lactic $1,42 \div 2,10\%$; muối $4,49 \div 9,20\%$.

Giá trị dinh dưỡng: protein $4,25 \div 8,48\%$; chất béo $4,37 \div 12,8\%$; vitamin A và D 16 IU trong 100g.

Vì sinh vật: *Pediococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*., *P. halophilus*, *S. epidermidis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: $6 \div 12$ tháng.

Sản xuất thủ công.

II.11. Pla Ra

Tên chung: Cá lên men.

Tên địa phương (Thái Lan): Plar, Pla dag; Pla ha, Ra.

Nguyên liệu: các loại cá nước ngọt khác nhau hoặc cá biển 38,5%; muối 11,5%; bột gạo rang 50%.

Công nghệ sản xuất: cá được phối trộn với muối tỷ lệ 10:3, cho vào khạp sành đậy thật kín, giữ trong 6 tháng, hàng ngày phơi nắng. Cho thêm bột gạo rang với tỷ lệ sản phẩm 1:1.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu hồng thẫm hay màu nâu, vị mặn.

Đặc tính hoá học: pH = $4,7 \div 6,2$; axit lactic $0,37 \div 3,15\%$; muối $7,77 \div 17,89\%$.

Giá trị dinh dưỡng: protein $10 \div 16\%$; chất béo $2,3 \div 6,10\%$; vitamin B₁₂ 2,17mg; Ca 1505,16mg; P 661,75 mg trong 100 g.

Vì sinh vật: *Pediococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus subtilis*, *P. halophilus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus sp.*, *B. licheniformis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 1 ÷ 3 tháng.

II.12. Plasom

Tên chung: Cá lên men

Tên địa phương (Thái Lan): Plasom, Pla khao sug.

Nguyên liệu: các loại cá nước ngọt và cá biển khác nhau 71,6%; muối 14,2%; cơm 7,1%; tỏi 7,1%.

Công nghệ sản xuất: cắt đầu cá, rửa sạch bụng cá và trộn với muối, cơm, tỏi. Gói chặt trong lá chuối hoặc túi bóng. Để ở nhiệt độ $20 \div 30^\circ\text{C}$ trong 7 ngày.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu cá tươi, vị chua.

Đặc tính hoá học: pH= $4,0 \div 4,6$; axit lactic $2,12 \div 4,01\%$; muối $2,25 \div 5,90\%$.

Giá trị dinh dưỡng: protein $13 \div 28\%$; chất béo $7 \div 11\%$ trong 100g.

Vì sinh vật: *Pediococcus cerevisiae*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus brevis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 3 tuần.

Sản xuất thủ công.

II.13. Saeoojeot

Tên chung: tôm lên men

Tên địa phương (Triều Tiên): Jeots, Jeotkals.

Nguyên liệu: tôm (*Acetes chinensis*) 100%; muối 20%.

Sơ đồ 14. Công nghệ sản xuất Jeots

Tôm tươi }
Muối } → Trộn đều → Lên men ở 20°C → Lên men chín → Jeots

Đặc tính vật lý: dạng rắn, mùi lên men.

Đặc tính hóa học: nước 64,9%; tro 24,0%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 47 cal, protein 10,5%; chất béo 0,6%; Ca 681mg; P 297mg;

Fe 3,2 mg; thiamin 0,05mg; riboflavin 0,04mg trong 100g.

Vì sinh vật: *Halobacterium sp.*, *Pediococcus sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng: 1 năm.

Sản xuất 2000 tấn/năm.

II.14. Som Fug

Tên chung: cá lên men của Thái Lan.

Tên địa phương: Som Fug, Som dog, Pla fug, Pla mug, Fug som.

Nguyên liệu: các loại cá nước ngọt khác nhau 69%; muối 10,20%; cơm 13,8%; tỏi 6,90%.

Công nghệ sản xuất: Chặt thịt cá cho vào túi vải, vắt bỏ nước. Trộn thịt cá với muối, cơm, tỏi. Cho sang khay và dầy bằng chiếc khay khác. Lên men ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu trắng nếu chỉ dùng 1 loại cá, vị mặn và chua với mùi đặc trưng.

Giá trị dinh dưỡng: protein 14 ÷ 19%; chất béo 2,4 ÷ 2,9% trong 100g.

Vì sinh vật: *Pediococcus cerevisiae*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus brevis*

Thời gian bảo quản và sử dụng: 2 tuần.

Sản xuất thủ công.

II.15. Tai Pla

Tên chung: ruột cá lên men.

Tên địa phương (Thái Lan): Tai Pla.

Nguyên liệu: ruột của nhiều loại cá nước ngọt hoặc cá biển khác nhau 75%; muối 25%.

Công nghệ sản xuất: trộn ruột cá với muối, cho vào các dụng cụ chứa bằng sành và giữ trong 6 ÷ 8 tháng, phơi nắng.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu đỏ đến màu nâu sẫm, vị muối.

Đặc tính hóa học: pH = 5,0 ÷ 6,1; axit lactic 1,01 ÷ 2,34%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 1,55 ÷ 3,9%; chất béo 3,1 ÷ 8,44%.

Vì sinh vật: *Pediococcus sp.*, *P. halophylus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 1 ÷ 5 năm.

Sản xuất rộng rãi trong gia đình bằng phương pháp thủ công.

II.16. Nước mắm và các sản phẩm tương tự

II.16.1. Bagoong

Tên chung: tôm, cá lên men dạng paste.

Tên địa phương (Philippin): Bagoong Qlamang, Bagoong isda, Bagoong

Nguyên liệu: cá hoặc tôm 75 ÷ 85,5%; muối 12,5 ÷ 25%.

Sơ đồ 15. Công nghệ sản xuất Bagoong

Cá hoặc tôm → Rửa sạch + muối → Trộn đều



Lên men trong phòng 7 ngày đến hơn 1 năm → **Bagoong**

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu gù hoặc màu nâu đỏ, vị muối, mùi fomat.

Đặc tính hoá học: pH= 5,5 ÷ 6,5; độ ẩm 67,1%; tro 20,7%; muối 20 ÷ 25%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 70 cal; protein 10,3%; chất béo 1,9%; Ca 535mg; K 341 mg; P 313 mg; Fe 10,9 mg; Na 71,53 mg; thiamin 0,01 mg; riboflavin 0,12 mg; niacin 3,0 mg trong 100 g.

Vì sinh vật: *Bacillus sp.*, *Pediococcus sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng đến 1 năm.

Sản xuất thủ công.

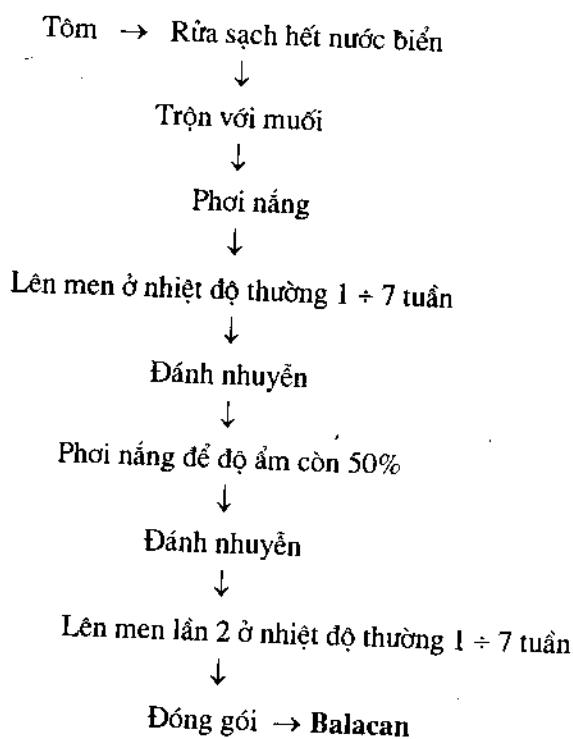
II.16.2. Belacan

Tên chung: tôm lên men dạng paste.

Tên địa phương (Malaixia): Balacan.

Nguyên liệu: các loại tôm khác nhau (Acetes), muối.

Sơ đồ 16. Công nghệ sản xuất Balacan



Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu nâu tới nâu đỏ, mùi cá rõ rệt.

Đặc tính hoá học và giá trị dinh dưỡng: pH = 7,2 ÷ 7,8; đường 0,5%; chất béo 1,4 ÷ 2,6%; Ca 2,0 ÷ 3,4%; Fe 0,02%; riboflavin 0,001%; niacin 0,004%.

Vi sinh vật: đầy đủ các vi sinh vật giàu proteaza.

Sản xuất thủ công quanh năm.

II.16.3. Budu

Tên chung: nước mắm.

Tên địa phương (Thái Lan): Budu.

Nguyên liệu: các loại cá khác nhau 67,5%; muối 22,5%; đường thề 10%.

Công nghệ sản xuất: trộn cá với muối, cho vào hũ hoặc khạp sành đáy bằng vĩ tre, lên men từ 3 ÷ 12 tháng. Sau đó cho thêm đường thề. Đun sôi, lọc và đóng chai.

Đặc tính vật lý: dạng dung dịch có độ nhớt cao, màu nâu, vị mặn.

Đặc tính hóa học: pH = 5,3 ÷ 6,6; axit lactic 0,22 ÷ 1,29%; muối 14,87 ÷ 27,55%; bột ngọt 0,33 ÷ 1,37%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 9,17 ÷ 11,01%; chất béo 0,4 ÷ 4,2%; Ca 42,4 mg; P 41,4 mg; Fe 4,3 mg; vitamin B₂ 0,17 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Pediococcus sp.*, *P. Halophylus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *B. laterosporus* *Proteus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Sarcina sp.*, *Corynebacterium sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng: trong 1 ÷ 3 năm.

Sản xuất thủ công.

II.16.4. Nam Pla

Tên chung: nước mắm.

Tên địa phương (Thái Lan): Nam Pla, Nampla dee, Nampla sod.

Nguyên liệu: các loại cá nước ngọt, nước biển khác nhau 75%, muối 25%.

Công nghệ sản xuất: trộn đều cá và muối rồi cho vào thùng lên men, phía trên rắc một lớp muối. Lên men trong 18 tháng, hàng ngày phơi nắng, chiết rút lấy dịch. Dịch này có màu vàng, vị muối, mùi đặc trưng.

Đặc tính vật lý: dịch trong, màu vàng hoặc vàng đậm, mùi thơm và vị mặn.

Đặc tính hoá học: pH = 7,0.

Giá trị dinh dưỡng: P 0,27 – 0,57 mg; Ca 0,44 ÷ 0,54 mg; Mg 2,21 ÷ 2,31 mg; Fe 10 ÷ 22mg; B₁₂ và các axit amin khác có trong 100 g.

Vi sinh vật: *Micrococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Sarcina sp.*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Halobacterium sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng 1 năm.

Sản xuất quy mô công nghiệp.

II.16.5. Patis

Tên chung: nước mắm.

Tên địa phương (Thái Lan): Patis .

Nguyên liệu: cá 70 ÷ 80%; muối 20 ÷ 30%; màu thực phẩm.

Sơ đồ 17. Công nghệ sản xuất Patis

Cá → Rửa sạch → Trộn với muối → Lên men $27 - 35^{\circ}\text{C}$ trong 1 – 6 tháng



Chiết rút lấy dịch → Lọc → Đóng chai

Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu vàng trắng, vị mặn, mùi phomat.

Đặc tính hóa học: độ ẩm 66%; pH = $5,5 \div 5,9$; axit lactic $1,024 \div 1,035\%$; tro 21,9%; NaCl $20 \div 25\%$.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 49 cal; protein $6 \div 12\%$; chất béo $0,3 \div 3\%$; hydratcacbon 0,9%; Ca 42 mg; P 32 mg; Fe 9,3 mg; riboflavin 0,08 mg; niacin 4,1 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Pediococcus halophilus*, *Micrococcus sp.*, *Halobacterium sp.*, *Halococcus sp.*, *Bacillus sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng 1 ÷ 2 năm.

Sản xuất công nghiệp 500 tấn/năm.

II.16.6. Shotsuru

Tên chung: nước mắm.

Tên địa phương (Nhật): Shottsuru.

Nguyên liệu: cá 70%; tôm 14%; muối $15 \div 20\%$.

Sơ đồ 18. Công nghệ sản xuất Shotsuru

Cá + Muối → Lên men 1 tuần



Bã ← Triết rút → Dung dịch



Đun sôi



Lọc + muối



Ủ chín tạo hương 3 năm



Đun sôi 10 phút → Lọc → Đóng chai

Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu nâu đậm, vị mặn.

Đặc tính hóa học: pH = 5,5 ÷ 5,6; độ ẩm 60 ÷ 65%.

Giá trị dinh dưỡng: nitơ 0,6 ÷ 0,8%; muối 27 ÷ 30%.

Vì sinh vật: *Halobacterium sp.*, *Aerococcus Viridans* (*Pediococcus homari*).

Thời gian bảo quản và sử dụng: 6 tháng ở 10°C; ở 20°C trong 20 ngày và 5 ngày ở 30°C

90% sản phẩm sản xuất theo quy trình công nghiệp.

II.16.7. Mắm nêm Việt Nam

Tên chung: Fermented fish.

Tên địa phương (Việt Nam): Mắm nêm .

Nguyên liệu: Cá cơm (để cả con), cá nục, cá trích xay nhuyễn.

- Công nghệ sản xuất: Cá cơm còn tươi, lấy 1/3 nhúng vào nước muối bão hoà khuấy nhẹ rồi vớt ra để ráo nước. Sau đó phơi nắng cho bay bớt nước trong 4 ÷ 5 giờ. Trộn chung với 2/3 số cá còn lại + 20% muối + 2% đường + 3% bột gạo nếp rang, trộn đều rồi cho vào hũ đậy kín. Lên men ở nhiệt độ 28 ÷ 30°C, rút nước. Cho lên men tiếp 20 ÷ 25 ngày thành mắm nêm.

Sản xuất: Gia đình

Sử dụng như một loại nước chấm: mắm nêm + nước khóm, ớt, tỏi, bột ngọt, chanh, đường dùng để chấm cá lóc hấp, thịt bò nhúng dấm.

II.16.8. Mắm cá thu Việt Nam

Tên chung: Fermented drier fish.

Nguyên liệu (Việt Nam): cá thu, muối ăn.

Yêu cầu thành phẩm:

Đặc tính vật lý và cảm quan: Chưa xác định.

Đặc tính hoá học: Chưa xác định.

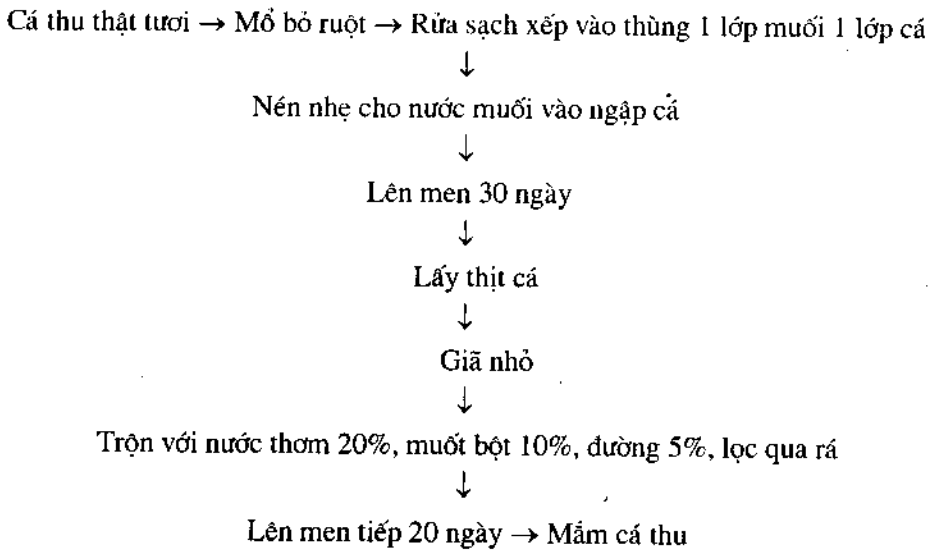
Giá trị dinh dưỡng: Chưa xác định.

Vì sinh vật : Chưa xác định.

Sản xuất : Gia đình.

Sử dụng: Món ăn phụ.

Sơ đồ 19. Công nghệ sản xuất



Trên đây giới thiệu một số sản phẩm lên men cổ truyền chủ yếu và qua đó học sinh và mọi đối tượng khác nhau có thể tham khảo và áp dụng cho sản xuất phù hợp nhất theo khả năng và kinh nghiệm rút ra từ thực tế sản xuất thêm.

CHƯƠNG 6

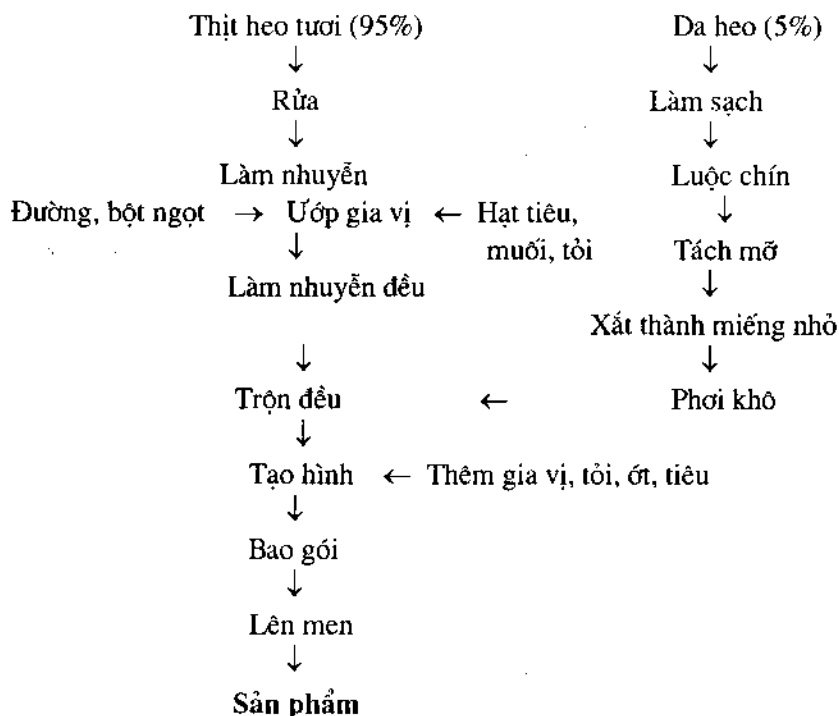
CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM TỪ THỊT VÀ SỮA

I. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ THỊT

I.1. Công nghệ sản xuất nem chua

Nem chua là một sản phẩm lên men thịt tươi được sản xuất và tiêu thụ nhiều ở đồng bằng sông Cửu Long và một số nơi ở Việt Nam. Đây là một sản phẩm được sản xuất hoàn toàn thủ công. Tùy theo kinh nghiệm của từng gia đình mà chất lượng và khả năng bảo quản nem chua rất khác nhau. Bản chất của quá trình lên men là quá trình chuyển hóa đường (cho thêm vào khi chế biến) thành axit lactic nhờ hoạt động của vi khuẩn *Lactobacillus*, *Pediococcus* và *Micrococcus*. Trong đó đóng vai trò quan trọng nhất là *Lactobacillus*.

Sơ đồ 20. Công nghệ sản xuất nem chua



Một trong những yếu tố quyết định chất lượng sản phẩm là nguyên liệu thịt. Thịt heo dùng sản xuất phải là thịt mới mổ, không dùng loại thịt đã ôi, có màu sẫm. Thịt heo được làm nhuyễn bằng máy hoặc bằng tay, sau đó được trộn đều với các gia vị cần thiết.

Song song với thời gian trên, da heo được làm sạch, luộc chín, thái nhỏ, làm ráo nước. Tất cả được trộn đều và tạo viên gói trong lá vòng, có thể là 1 lớp hoặc 2 lớp. Rồi gói vào lá chuối, buộc rất chặt và cho lên men ở nhiệt độ phòng 3 – 5 ngày. Trong thời gian này vi khuẩn lactic hoạt động mạnh sẽ chuyển hóa đường thành axit lactic. Axit lactic tạo thành sẽ giảm pH của thịt, làm thay đổi cấu trúc thịt, ức chế và ngăn cản sự phát triển của những vi sinh vật gây thối và tạo vị chua cần thiết cho sản phẩm.

Sản phẩm nem chua được đánh giá là đạt chất lượng khi ta ăn nem chua thấy có độ dai của thịt (thịt không bị nhão), có vị chua của axit lactic, có vị cay của tiêu, ớt, có vị ngọt của đường, bột ngọt. Bề mặt nem khô ráo, không nhầy nhớt, màu nem phải đỏ thẫm như màu thịt, không có nấm mốc phát triển.

Toàn bộ quy trình hoàn toàn mang tính thủ công nên chất lượng của nem chua trên thị trường không ổn định. Mặt khác thời gian bảo quản và sử dụng ngắn, vì thế hiện nay chưa có một tiêu chuẩn nhất định để quản lý chất lượng sản phẩm.

1.2. Một số công nghệ sản xuất sản phẩm thịt lên men ở các nước Châu Á

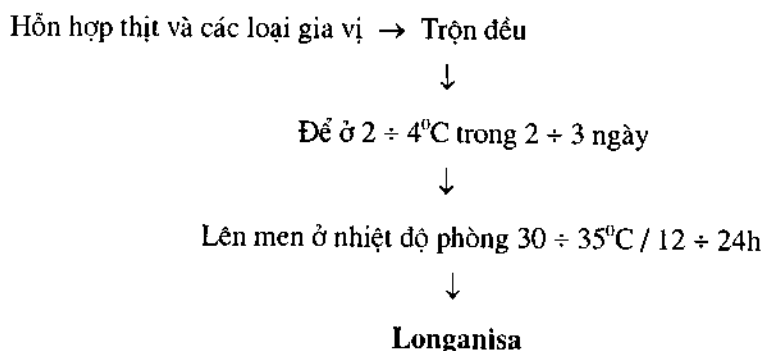
1.2.1. Longanisa

Tên chung: Xúc xích thịt heo lên men không triệt để.

Tên địa phương (Philippin): Long anisa.

Nguyên liệu: Thịt heo nạc 70%; thịt băm 30%; muối 2% so với tổng lượng thịt; 2% tàu vại yểu; 2% dấm; rượu 2%; tiêu 0,6%; tỏi 0,6%; KNO₃ 0,05%; photphat 0,15%.

Sơ đồ 21. Công nghệ sản xuất Longanisa



Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu nâu, vị chua, mặn.

Đặc tính hóa học: pH ban đầu = 6,0; pH sản phẩm = 5,2.

Vi sinh vật: hỗn hợp vi khuẩn lactic tự nhiên có trong nguyên liệu thịt.

Sản xuất thủ công.

1.2.2. Nham

Tên chung: thịt heo lên men .

Tên địa phương (Thái Lan): Nham, Musom.

Nguyên liệu: thịt heo 80%; da heo (25 x 0,5 mm/miếng) 12%; muối 8%; tỏi 1%; gạo 1%.

Sơ đồ 22. Công nghệ sản xuất Nham



Đặc tính vật lý: Dạng đặc, màu đỏ, vị mặn.

Đặc tính hóa học: pH = 4,45 ÷ 4,55.

Giá trị dinh dưỡng: protein 23,1%; hydratcacbon 2,3%; chất béo 5,1%; B₁, B₂, Fe, P có trong 100 g.

Thời gian bảo quản và sử dụng 1 ÷ 2 tháng.

Sản xuất thủ công 900 000 tấn/năm.

1.2.3. Salami

Tên chung: Xúc xích lên men .

Tên địa phương (Australia): Salami.

Nguyên liệu: thịt bò, thịt heo 95%; muối 3 ÷ 4%; tiêu 0,3%; gia vị, NaNO₂ 12,5mg/100g.

Công nghệ sản xuất: thịt sau khi được xử lý sạch, trộn với muối, tiêu, các gia vị, NaNO₂, giống vi sinh vật, đảo đều và nghiền mịn. Lên men ở nhiệt độ 20 ÷ 23°C trong 3 ÷ 5 ngày. Sau khi lên men xúc xích được hun khói và giữ tiếp ở 15 ÷ 20°C trong 2 ÷ 3 tháng.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu đỏ của thịt, có mùi vị và gia vị đặc trưng.

Đặc tính hóa học: nước 30 ÷ 40 g; muối 3 ÷ 4 g; tro 4 ÷ 5 g trong 100 g; pH = 5,0 ÷ 5,2

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 2,9 cal, chất béo 30 ÷ 40 g, nitơ protein 2 ÷ 3,5 g, nitơ phi protein nhỏ hơn 1 g trong 100 g.

Vi sinh vật: *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*, *Micrococcus sp.*

Thời gian sử dụng và bảo quản: phụ thuộc nhiệt độ bảo quản.

Sản xuất công nghiệp với cơ giới hoá.

I.2.4. Tapa

Tên chung: thịt bò lên men không triệt để.

Tên địa phương (Philippin): Tapa.

Nguyên liệu: thịt bò nạc (xắt lát dày 0,125 inch) 96%; muối 2,3%; đường 0,8%; KNO₃ 0,05%; tiêu 0,2%.

Công nghệ sản xuất Tapa: Thịt bò trộn đều với các gia vị, rồi cho lên men ở 2 ÷ 4°C trong 2 ÷ 3 ngày hay ở nhiệt độ phòng 12 ÷ 24 giờ. Sau đó sấy khô thành Tapa.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu nâu, vị chua và mặn.

Thời gian bảo quản và sử dụng hơn 1 tháng nếu đóng gói vào bao bì plastic.

Sản xuất thủ công.

I.2.5. Tocino

Tên chung: thịt heo lên men.

Tên địa phương (Philippin): Tocino.

Nguyên liệu: Thịt heo 76,6 ÷ 94,5%; muối 2 ÷ 6%; đường 3,5 ÷ 16%; KNO₃ 0,05%, màu thực phẩm (đỏ hoặc vàng) 1,25%; MgSO₄ 0,1%.

Công nghệ sản xuất: Thịt heo trộn đều với các gia vị rồi cho lên men 1 ÷ 2 ngày ở nhiệt độ phòng hay 7 ÷ 14 ngày ở 15 ÷ 18°C.

Đặc tính vật lý: Dạng rắn, màu đỏ, vị chua (lên men ở nhiệt độ phòng), vị ngọt (lên men ở 15 ÷ 18°C).

Đặc tính hóa học: Lên men ở nhiệt độ phòng pH = 4,86 ÷ 5,8; độ axit 0,85 ÷ 0,97% (tính theo axit lactic). Lên men ở 15 ÷ 18°C pH = 4,86 ÷ 5,8; độ axit 0,72 ÷ 0,97%.

Vi sinh vật: *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Leuconostoc mensesenteroides*.

1.2.6. Nem chua Việt Nam :

Tên chung: Fermented pork.

Tên địa phương (Việt Nam): nem chua.

Nguyên liệu: Thịt nạc móng heo 0,5kg, da heo 0,1kg, bột gạo rang vàng 1 muỗng cà phê, muối rang tán nhỏ 1/2 muỗng cà phê, tỏi 4 tép, KNO₃ 0,25g.

Đặc tính vật lý và cảm quan: Sản phẩm rắn, màu nâu đỏ, vị chua ngọt, thơm đặc trưng.

Đặc tính hoá học: Không xác định.

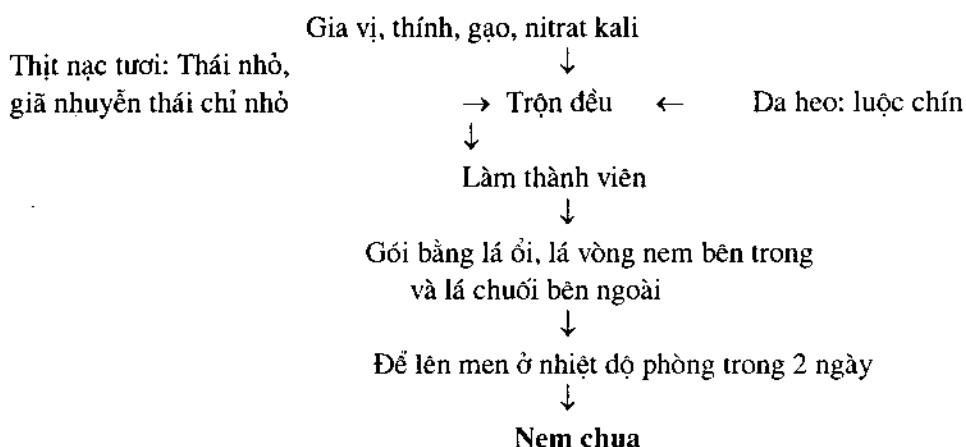
Vi sinh vật: Chưa xác định.

Thời hạn sử dụng: Vài ngày.

Sản xuất: Gia đình.

Sử dụng: Món ăn phụ

Sơ đồ 23. Công nghệ sản xuất



II. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ SỮA

II.1. Phomat và các sản phẩm tương tự

II.1.1. Phomat Camembert

Tên chung: Phomat.

Tên địa phương (Australia): Camembert.

Nguyên liệu: sữa tươi, giống vi sinh vật, chất tạo đông, NaCl, CaCl₂, nấm mốc (nấm sợi)

Công nghệ sản xuất: Sữa được thanh trùng ở 72°C trong 15 giây, làm nguội đến 30°C. Cho giống vi khuẩn lactic 0,1%, chất tạo đông 0,01%; CaCl₂ cho vào sau 30 phút, sau 1 ÷ 2 giờ tách sữa, cứ sau 6 ÷ 7 giờ lại làm sạch, công việc được tiếp tục đến ngày hôm sau. Phomat được làm ráo và cho thêm 6 ÷ 9 g NaCl so với tổng khối phomat. Làm ráo tiếp và phun bào tử nấm sợi. Làm chín phomat ở 12 ÷ 18°C trong 7 ÷ 12 ngày với độ ẩm 75 ÷ 90%. Bao gói và để 10 ÷ 15 ngày nữa trước khi làm lạnh.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, không có lỗ, màu trắng, vị chua, mùi nấm sợi.

Đặc tính hoá học: nước 51%; NaCl 3,7 g; Ca 380 mg trong 100 g; pH = 6,9

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 280 cal; chất béo 23 g; protein 19 g; hydratcacbon vết; vitamin A 240 µg; B₂ 450 µg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Streptococcus lactic*, *S. cremotis*, *Penicillium camemberti*.

Thời gian bảo quản và sử dụng 2 - 3 tuần.

Sản xuất công nghiệp 180 tấn / năm.

II.1.2. Phomat Cheddar

Tên chung: phomat loại rắn không có lỗ hổng.

Tên địa phương (Australia): Cheddar, Colby, Nionteray.

Nguyên liệu: sữa tươi, giống vi khuẩn, chất tạo đông sữa, CaCl₂, NaCl.

Công nghệ sản xuất: sữa được thanh trùng ở 72°C trong 15 giây, sau đó làm nguội đến 32°C. Cho giống vi khuẩn 1 ÷ 2%, chất tạo đông 0,03% khuấy đều 30 phút. Đun và khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ 38°C. Ở pH = 6,2 dịch sẽ được rút hết khỏi khối đông đặc. Sau đó lại nghiền và cho 2% muối. Tạo hình trong các khuôn mẫu trong 90 phút, ép ở 30 ÷ 33°C trong 40 phút đến 12

giờ hay ở 18°C trong 18 giờ. Sau đó bao gói và đóng dấu. Làm chín và bảo quản ở 2 ÷ 13°C trong 4 ÷ 12 tháng; pH = 5,1 ÷ 5,3.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, không có lỗ khí, màu vàng, có vị chua, mùi vị hạch phỉ.

Đặc tính hoá học: nước 35 g; NaCl 1,7 g; Ca 830 mg trong 100 g, pH = 5 ÷ 5,3.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 400 cal; chất béo 33 g; protein 26 g; hydratcacbon vết, vitamin A 380 µg; B₁ 50 µg; B₂ 500 µg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Streptococcus lactic*, *Streptococcus cremoris*.

Thời gian sử dụng và bảo quản 1 ÷ 2 năm.

Sản xuất công nghiệp 120 000 tấn / năm.

II.1.3. Phomat Cottage

Tên chung: phomat tươi.

Tên địa phương (Australia): Cottage.

Nguyên liệu: sữa tươi hay sữa nguyên chất béo, vi khuẩn lactic, chất tạo đông, chất ổn định, NaCl, axit thực phẩm, casein.

- Công nghệ sản xuất: sữa được thanh trùng ở 72°C trong 15 giây, làm nguội đến 21°C. Cho 0,5 ÷ 5% giống vi khuẩn lactic, chất tạo đông, chất ổn định, khi pH = 4,5 ÷ 4,6 có kết tủa bông. Khuấy đảo rồi để yên 15 ÷ 30 phút. Tăng nhiệt độ lên 49 ÷ 54°C, thời gian gia nhiệt trên 2 giờ, khối kết đông được rửa bằng clorin (5 ppm). Ở 49°C khối kết tủa này tiếp tục được khuấy trộn khoảng 15 ÷ 30 phút. Tách nước khỏi khối đông tụ và để vào lạnh 7 ÷ 10°C. Sau đó cho bằng thể tích nước rút ra. Rồi lại rút nước ra và rửa sạch. Lặp lại 3 lần, lần rửa cuối cùng ở 1°C và kéo dài 30 ÷ 60 phút. Sau đó rút hết nước và sấy khô, làm chín, bảo quản.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, không có lỗ khí, màu trắng ngà, với vị chua.

Đặc tính hóa học: nước 49 g; NaCl 1,1 g; Ca 90 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Streptococcus lactic*, *Streptococcus cremoris*, *Leuconostoc mensenteroides*.

Thời gian sử dụng và bảo quản 4 tuần ở 1°C.

Sản xuất công nghiệp 5000 tấn / năm.

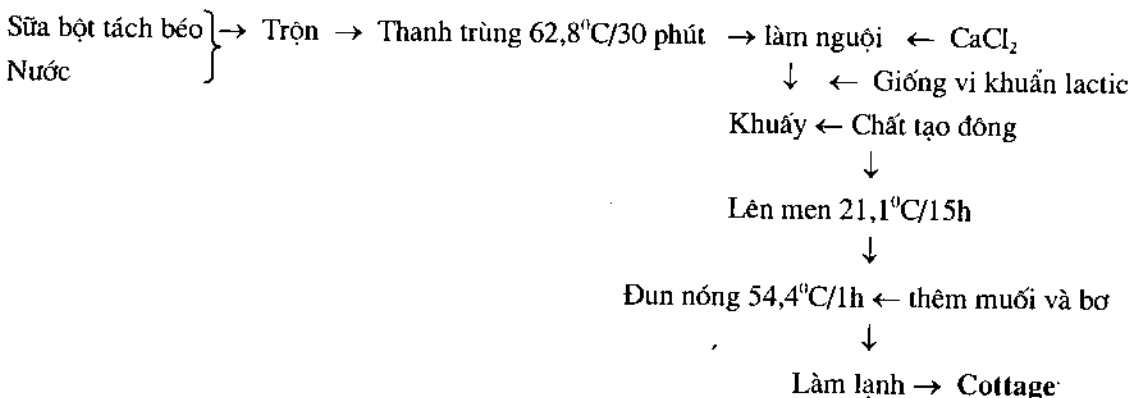
II.1.4. Phomat Cottage (Philippin)

Tên chung: Phomat cottage.

Tên địa phương (Philippin): Phomat cottage.

Nguyên liệu: sữa (sữa bột 12%, nước 88%) 100%; giống vi khuẩn lactic 5%; bơ 1,5%; muối 1,3%; CaCl_2 0,02%.

Sơ đồ 24. Công nghệ sản xuất cottage



Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu trắng, mùi đặc trưng.

Đặc tính hoá học: nếu theo phương pháp dài ngày axit lactic là 0,1%; còn phương pháp ngắn ngày là 0,12%.

Vi sinh vật: *Streptococcus lactic*.

II.1.5. Gouda

Tên chung: phomat cứng có lỗ thông khí.

Tên địa phương (Australia): Gouda, Edam.

Nguyên liệu: sữa nguyên kem, giống vi khuẩn lactic, chất tạo đông, NaCl , CaCl_2 và NaNO_3 .

- Công nghệ sản xuất: sữa được thanh trùng ở 72°C trong 15 giây, sau đó làm nguội đến 31°C , cho 0,5 ÷ 1% vi khuẩn lactic; 0,02% chất tạo đông, khuấy đảo trong 30 phút, rửa bằng nước 36°C trong 1 giờ. Rút dịch và ép trong 3 ÷ 5 giờ. Muối khối phomat bằng dung dịch muối 20%, pH = 4,8 ở 15°C từ 4 ÷ 6 tuần đến 6 ÷ 12 tháng với độ ẩm không khí 80%.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu vàng trắng với vị mặn và mùi sữa.

Đặc tính hoá học: nước 43 g; NaCl 2,6 g; Ca 760 mg trong 100 g; pH = 5,4 ÷ 5,6.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 320 cal; chất béo 42 g; protein 26 g; hydratecarbon vết; vitamin A 250 µg; B_1 60 µg; B_2 350 µg trong 100 g.

Vì sinh vật: *Streptococcus lactic*, *S. lactic*, *Leuconostoc cremoris*.

Thời gian sử dụng và bảo quản 1 năm.

Sản xuất công nghiệp công suất 3700 tấn / năm.

II.1.6. Kesong Puti

Tên chung: Phomat trắng, phomat mềm trắng, phomat mềm.

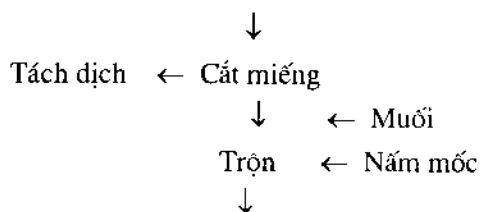
Tên địa phương (Philippin): Kesong Pitu, Keso, Kesiyo.

Nguyên liệu: sữa bò carabao $89 \div 96\%$; muối $2,0 \div 3,5\%$; dịch Abmasa $0,4 \div 0,6\%$; giống vi khuẩn lactic $5 \div 10\%$.

Sơ đồ 25. Công nghệ sản xuất Kesong Puti

* Công nghệ truyền thống

Sữa bò Carabao $\rightarrow$ Kết tủa với chất kết tủa $27 \div 33^\circ\text{C} / 25 \div 30$ phút



Kesong Puti

↓

Bao gói

↓

Làm chín ở $27 \div 33^\circ\text{C} / 2 \div 3$ ngày hay $6 \div 8^\circ\text{C} / 1 \div 3$ tuần

* Công nghệ cải tiến:

Sữa bò Carabao $89 \div 92\%$

Muối $2,5 \div 3,5\%$

} $\rightarrow$ Trộn $\rightarrow$ Lọc

↓

Nâng nhiệt lên $72 \div 75^\circ\text{C} / 5$ phút $\leftarrow$ giống lactic $5 \div 10\%$ và
chất kết tủa $0,4 \div 0,6\%$

↓

Kết tủa qua đêm ở $37 \div 40^\circ\text{C}$

↓

Tách nước $\leftarrow$ Cát $\rightarrow$ cho vào khay

↓

Tách nước qua đêm $\rightarrow$ Kesong Puti $\rightarrow$ Bao gói

↓

Làm chín ở $27 \div 33^\circ\text{C} / 2 \div 3$ ngày hay $6 \div 8^\circ\text{C} / 1 \div 3$ tuần

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu trắng hoặc trắng ngà, có vị mặn và chua nhẹ.

Đặc tính hoá học:

Sản phẩm truyền thống: độ ẩm $57 \div 66\%$; muối $1,5 \div 2,2\%$; pH = $5,4 \div 6,3$.

Sản phẩm của công nghệ cải tiến: Độ ẩm $59 \div 67\%$; muối $1,8 \div 2,5\%$; pH = $5,4 \div 6,3$.

Giá trị dinh dưỡng:

Sản phẩm truyền thống: protein $9 \div 17\%$; chất béo $17 \div 24\%$.

Sản phẩm của công nghệ cải tiến: protein $8 \div 13\%$; chất béo $16 \div 23\%$.

Vi sinh vật: phần lớn là vi khuẩn lactic, một số vi khuẩn *Bacillus*, *Micrococcus*, nấm men và các vi sinh vật trong sữa nguyên liệu.

Thời gian bảo quản và sử dụng 1 ÷ 4 ngày ở $27 \div 33^{\circ}\text{C}$; 1 ÷ 3 tuần ở $6 \div 8^{\circ}\text{C}$.

Sản xuất thủ công 9 000 ÷ 35 000kg/năm

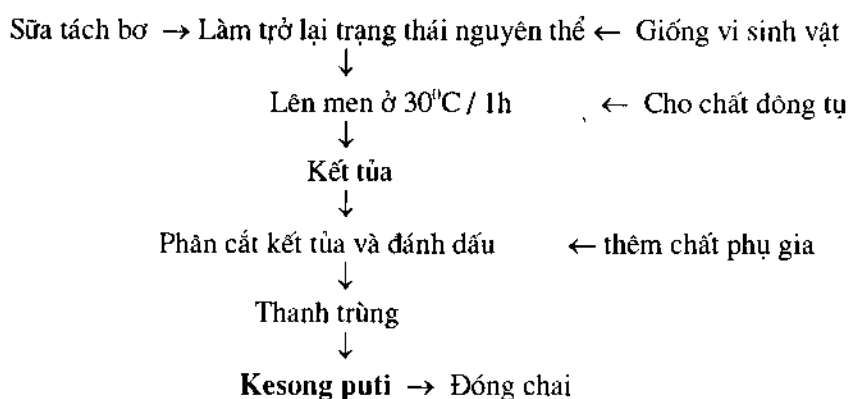
II.1.7. Kesong puti 2

Tên chung: Phomat tách bơ.

Tên địa phương (Philippin): Kesong puti.

Nguyên liệu: sữa tách bơ (nồng độ 16%) 85%; dầu bắp 10%; muối photphat 5%; axit sorbic 0,25%; mùi phomat cheddar 0,01%.

Sơ đồ 26. Công nghệ sản xuất Kesong puti 2



Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu trắng tuyết.

Đặc tính hóa học: độ ẩm 48,2%; tro 5,4%; muối 2,1%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 17,6%; chất béo 23%; hydratecacbon 5,8% trong 100 g.

Vi sinh vật: *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus lotus*.

Thời gian bảo quản và sử dụng 1 ÷ 4 ngày ($27 \div 33^{\circ}\text{C}$); 1 ÷ 3 tuần ($6 \div 8^{\circ}\text{C}$).

Sản xuất hoàn toàn thủ công.

II.1.8. Mozzarella

Tên chung: phomat tươi loại mềm.

Tên địa phương (Australia): Mozzarella, Pizza.

Nguyên liệu: sữa tách kem một phần, bột giống vi khuẩn lactic, CaCl_2 , chất tạo đông và NaCl.

Công nghệ sản xuất: Sữa thanh trùng ở 72°C trong 15 giây, làm nguội đến 32°C đồng thời cho $0,05 \div 0,5\%$ giống vi khuẩn lactic và chất tạo đông. Sau 30 phút sẽ tạo kết tủa bông, khuấy đảo và nâng nhiệt lên 40°C trong $3 \div 8$ giờ. Tách nước, khi đó pH đạt 5,1 nghiền nát thành dạng lỏng ở nhiệt độ $70 \div 80^{\circ}\text{C}$, cho vào dụng cụ chứa bằng thép không gỉ và làm nguội 1 giờ trong nước lạnh. Cho nước muối nồng độ $16 \div 20\%$ để yên trong $24 \div 72$ giờ ở $4 \div 8^{\circ}\text{C}$ để phomat có độ muối là 1,5%.

Đặc tính vật lý: dạng bán lỏng, không có lỗ không khí, màu trắng đục, vị chua và mềm nhẹ.

Đặc tính hóa học: nước 48 g; NaCl 2 g; Ca 650 mg trong 100 g; pH = $5,1 \div 5,4$.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 250 cal; chất béo 22 g; protein 19 g; lactoza 1,5 g; galactoza 0,5 g; vitamin A 180 μg ; B₁ 15 μg ; B₂ 240 μg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*.

Thời gian bảo quản và sử dụng 4 ÷ 10 tuần ở 4°C .

Công nghệ sản xuất có thể cơ giới hóa và công suất đạt 5300 tấn/năm.

II.1.9. Romano

Tên chung: phomat cứng.

Tên địa phương (Australia): Romano; Pecorino; Parmesan.

Nguyên liệu: sữa tách một phần bơ, bột giống vi khuẩn lactic, bột đông tụ, lipaza, CaCl_2 , NaCl.

Công nghệ sản xuất: sữa được thanh trùng ở 72°C trong 15 giây, làm nguội đến 32°C đồng thời cho 1% bột giống vi khuẩn lactic; 0,02% chất tạo đông. Sau 30 phút kết tủa bông hình thành, khuấy trộn để phá đông tụ trong 15 phút. Nâng nhiệt độ lên 43°C và giữ trong 15 phút, sau đó tăng lên đến 54°C trong hơn 30 phút, tách nước, ép tạo hình trong 12 giờ ở 21 ÷ 24°C, để khoảng 14 ÷ 15 ngày để làm chín phomat. Sau đó bảo quản ở 10°C trong 1 năm với điều kiện độ ẩm không khí 75%.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, không có lỗ không khí, màu trắng đục, vị axit và mùi butyric.

Đặc tính hóa học: nước 28 g; NaCl 1,8 g; Ca 1220 mg trong 100 g, pH = 5,4

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 400 cal; chất béo 28 g; protein 35 g; hydratecarbon vết; vitamin A 320 µg; B₁ 20 µg; B₂ 300 µg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acicophilus*.

Thời gian bảo quản và sử dụng 2 ÷ 4 năm.

Sản xuất theo phương pháp bán cơ giới với công suất 3000 tấn / năm.

II.1.10. Phomat Thụy Sĩ

Tên chung: Phomat cứng có lỗ không khí.

Tên địa phương (Australia): Swiss Emmentaler, St. Clare.

Nguyên liệu: sữa tươi nguyên kem, bột giống vi khuẩn *Propionibacterium*, chất đông tụ, CaCl₂, NaCl.

Công nghệ sản xuất: sữa được thanh trùng ở 72°C trong 15 giây, làm nguội đến 32°C, cho 0,5 ÷ 1% giống vi khuẩn *Propionibacterium* và 0,02% chất tạo đông, khuấy đều 30 phút khi đó sẽ tạo kết tủa bông. Nâng nhiệt lên 42 ÷ 46°C và khuấy đều đánh tan bông kết tủa. Sau đó, bông kết tủa được tách khỏi nước và ép trong 1 giờ, sấy trong 12 giờ. Khối phomat được ngâm trong dung dịch muối 20% ở 10 ÷ 14°C. Sau đó cho ra làm chín ở 20 ÷ 24°C trong 3 ÷ 6 tuần, rồi chuyển phomat đến nơi có nhiệt độ 7°C hay thấp hơn trong 6 ÷ 12 tháng.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, có lỗ không khí, màu vàng, vị chua ngọt, mùi propionic.

Đặc tính hóa học: nước 3 g; NaCl 1,7 g; Ca 800 mg trong 100 g; pH = 5,4 ÷ 5,6.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 400 cal; protein 26 g; chất béo 33 g; vitamin A 300 µg; B₁ 40 µg; B₂ 500 µg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Propionibacterium chermani*.

Thời gian bảo quản và sử dụng 1 năm.

Sản xuất theo phương pháp cơ giới hóa cao với công suất 6000 tấn/năm.

II.2. Sữa chua và những sản phẩm tương tự

II.2.1. Curd

Tên chung: sữa chua (Yoghurt).

Tên địa phương (Srilanka): Curd.

Nguyên liệu: sữa bò hoặc sữa trâu 100%, giống vi sinh vật.

Công nghệ sản xuất: Sữa được đun sôi khoảng 24 giờ cho bay bớt nước, làm nguội đến nhiệt độ phòng (khoảng 30°C), cho giống vi khuẩn và giữ 30°C trong 24 giờ.

Đặc tính vật lý: dạng bán lỏng, màu trắng đục với vị chua nhẹ.

Vi sinh vật: *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: tùy thuộc nhiệt độ bảo quản.

Sản xuất thủ công.

II.2.2. Dadhi

Tên chung: sữa chua (Yoghurt).

Tên địa phương Bangladesh: Dadhi.

Nguyên liệu: Sữa bò 95 ÷ 100%; đường 0 ÷ 5%; giống vi sinh vật.

Công nghệ sản xuất: Đun sôi sữa sau đó làm nguội đến 45°C, cho giống vi sinh vật và giữ ở 37 ÷ 42°C trong 6 ÷ 12 giờ, pH = 3,5 ÷ 5,0.

Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu trắng ngà, vị ngọt, chua.

Đặc tính hóa học: pH = 3,5 ÷ 5,0

Vi sinh vật: *Lactobacillus*, *Streptococcus* sp.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 24h.

Sản xuất thủ công.

II.2.3. Yoghurt

Tên chung: sữa chua.

Tên địa phương (Australia): Yoghurt.

Nguyên liệu: sữa nguyên kem, giống vi sinh vật, chất ổn định, hương trái cây.

- Công nghệ sản xuất: sữa được thanh trùng ở 90°C trong 30 phút, đồng hóa và làm nguội đến 43°C, cho 3 ÷ 5% giống vi sinh vật và hương trái cây. Lên men trong 3 ÷ 6 giờ cho đến khi pH đạt 4,7. Làm lạnh đến 4°C, khi đó pH đạt 4,1 ÷ 4,3.

Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu trắng đục, vị chua, có mùi trái cây.

Đặc tính hóa học: nước 80 – 86 g; Ca 180 mg trong 100 g, pH = 4,1 ÷ 4,3

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 62 cal; chất béo 1,5 g; protein 5 g; lactoza 4,6 g; galactoza 1,6 g; sacaroza 7 g; vitamin A 12 µg; B₁ 65 µg; B₂ 270 µg trong 100 g.

Vi sinh vật: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. axitophilus*.

Thời gian bảo quản và sử dụng 3 ÷ 6 tuần.

Sản xuất công nghiệp với công suất 8 500 tấn/năm.

CHƯƠNG 7

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ ĐẬU NÀNH VÀ HẠT NGŨ CỐC

I. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA HẠT ĐẬU NÀNH

Đậu nành có tên khoa học là *Glycine max* Merril. Đậu nành có nhiều màu sắc khác nhau. Trong đó đậu nành màu vàng là loại tốt nhất nên được trồng và sử dụng nhiều.

Hạt đậu nành gồm ba bộ phận:

Vỏ hạt chiếm 8% trọng lượng hạt.

Phôi chiếm 2%.

Tử diệp chiếm 90%.

Bảng 7. Thành phần hóa học của hạt đậu nành

Thành phần	Tỷ lệ	Protein (%)	Dầu (%)	Tro (%)	Hydratcacbon (%)
Hạt đậu nành nguyên	100	40,0	21,0	4,9	34,0
Tử diệp	90,3	43,0	23,0	5,0	29,0
Vỏ hạt	8	8,8	1,0	4,3	86,0
Phôi	2,4	41,1	11,0	4,4	43,0

Trong thành phần hóa học của đậu nành, thành phần protein chiếm một tỷ lệ rất lớn. Thành phần axit amin trong protein của đậu nành ngoài methionin và triptophan còn có các axit amin khác với số lượng khá cao tương đương lượng axit amin có trong thịt.

Trong protein đậu nành globulin chiếm 85 ÷ 95%, ngoài ra còn có một lượng như albumin, một lượng không đáng kể prolamin và glutelin.

Bảng 8. Thành phần axit amin trong đậu nành

Axit amin	Hàm lượng (%)
Izoloxin	1,1
Loxin	7,7
Lyzin	5,9
Methionin	1,6
Xystin	1,3
Phenilalanin	5,0
Treonin	4,3
Tryptophan	1,3
Valin	5,4
Histidin	2,6

Bảng 9. Thành phần hydratcacbon trong đậu nành

Hydratcacbon	Hàm lượng (%)
Xenluloza	4,0
Hemixenluloza	15,4
Stachyoza	3,8
Rafinoza	1,1
Sacaroza	5,0
Các loại đường khác	5,1

Hydratcacbon chiếm khoảng 34% hạt đậu nành. Phân hydratcacbon có thể chia làm hai loại: loại tan và không tan trong nước. Loại tan trong nước chỉ chiếm khoảng 10% tổng lượng hydratcacbon. Thành phần khoáng chiếm khoảng 5% trong lượng chất khô của hạt đậu nành. Trong đó đáng chú ý nhất là Ca, P, Mn, Zn và Fe. Hàm lượng các chất khoáng này như trình bày ở bảng 10.

Ngoài ra, đậu nành còn chứa rất nhiều vitamin khác nhau trừ vitamin C và D. Thành phần vitamin như ở bảng 11.

Bảng 10. Thành phần chất khoáng trong hạt đậu nành

Chất khoáng	Hàm lượng (%)
Ca	0,16 ÷ 0,47
P	0,41 ÷ 0,82
Mn	0,22 ÷ 0,24
Zn	37 mg/kg
Fe	90 ÷ 150 mg/kg

Bảng 11. Thành phần vitamin trong hạt đậu nành

Các vitamin	Hàm lượng (mg/kg)
Thiamin	11,0 ÷ 17,5
Riboflavin	3,4 ÷ 3,6
Niabin	21,4 ÷ 23,0
Piridoxin	7,1 ÷ 12,0
Biotin	0,8
Axit pantothenic	13,0 ÷ 21,5
Axit folic	1,9
Inositol	2300
Vitamin A	0,18 ÷ 2,43
Vitamin E	1,4
Vitamin K	1,9

Đậu nành là loại hạt giàu chất dinh dưỡng như protein, lipid, glucit, muối khoáng và vitamin. Chính vì thế, đậu nành là một nguồn thực phẩm quan trọng và được trồng rộng rãi ở Trung Quốc, Mỹ, Brazil. Ở Việt Nam, đậu nành được trồng nhiều ở các tỉnh phía Bắc và Nam. Trong công nghiệp thực phẩm đậu nành được coi là một nguyên liệu quan trọng, để sản xuất dầu thực vật và sản xuất các loại sản phẩm lên men.

II. CÔNG NGHỆ LÊN MEN HẠT ĐẬU NÀNH

II.1. Sản xuất đậu phụ

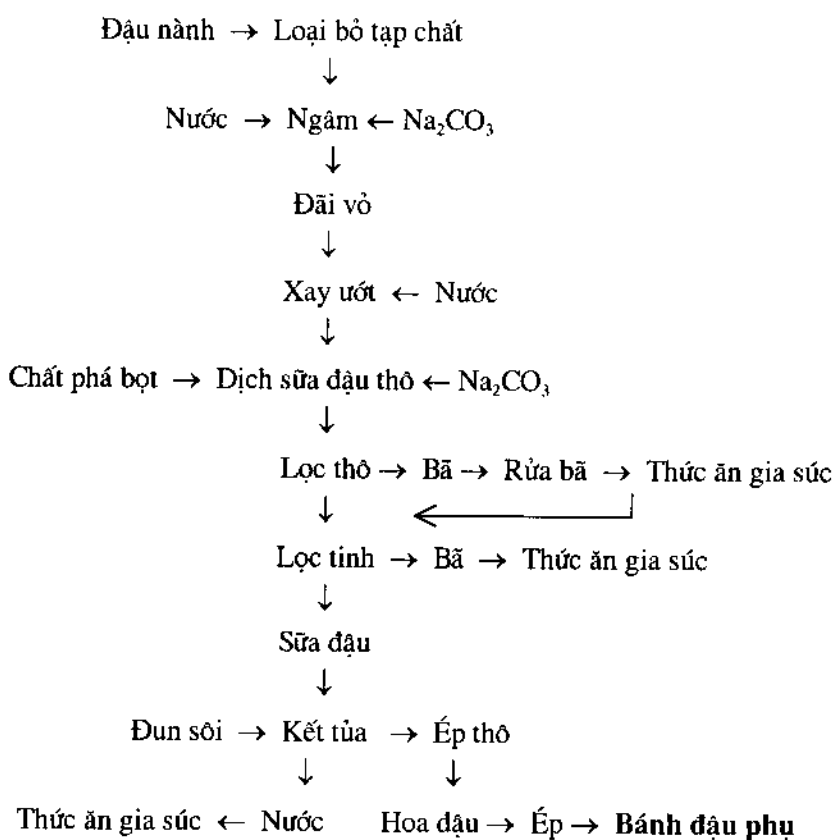
Đậu phụ là một sản phẩm được sản xuất từ đậu nành. Đậu phụ không chỉ được sản xuất tại Việt Nam mà còn được sản xuất ở nhiều nước khác như Trung Quốc, Nhật, các nước Đông Nam Á và cả các nước Châu Âu như Hà Lan, Pháp...

Đậu phụ có nhiều dạng khác nhau, chính vì thế mà cũng có tên gọi khác nhau, nhưng nói chung chia làm ba loại: mềm, cứng, phụ lụa.

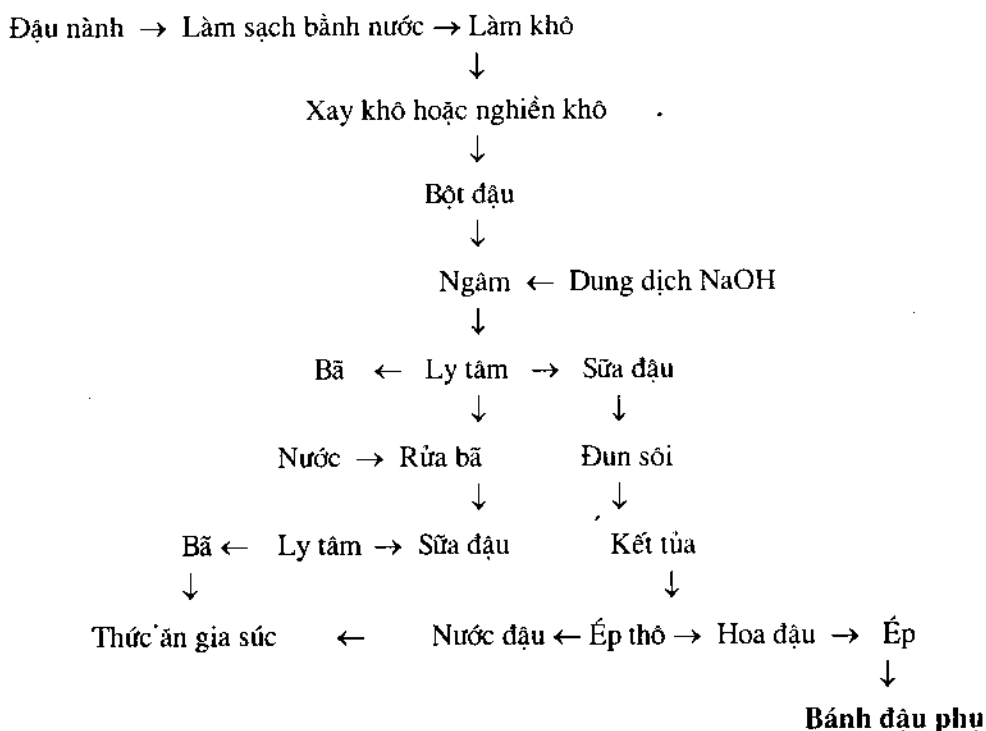
Trong đó đậu phụ mềm được sản xuất nhiều ở nước ta. Trung Quốc sản xuất cả ba loại, Nhật sản xuất nhiều loại đậu phụ lụa

II.1.1. Quy trình công nghệ sản xuất đậu phụ

Sơ đồ 27. Quy trình công nghệ phương pháp xay ướt



Sơ đồ 28. Công nghệ phương pháp xay khô



Giải trình quy trình công nghệ

a. Giai đoạn ngâm hạt

Trong phương pháp xay ướt, hạt đậu phải qua giai đoạn ngâm. Ngâm hạt nhằm mục đích làm hạt đậu hút nước và trương lên. Khi đó các phân tử nước có tính lưỡng cực sẽ tác động lên các phân tử protein, lipit, glucit và xenluloza. Quá trình này xảy ra qua hai giai đoạn:

+ Giai đoạn đầu xảy ra quá trình solvat hóa, ở giai đoạn này các liên kết trong hạt đậu chưa bị phá vỡ.

+ Giai đoạn 2 xảy ra khi các phân tử nước tiếp tục tác động và phá vỡ liên kết các phân tử trong hạt đậu và chuyển chúng sang trạng thái dịch thể keo linh động nằm trong các tế bào hạt đậu.

Có ba yếu tố ảnh hưởng rất nhiều đến quá trình ngâm là thời gian ngâm, lượng nước ngâm và nhiệt độ ngâm.

+ Thời gian ngâm: nhiệt độ ngoài trời từ $15 + 25^{\circ}\text{C}$ ngâm trong $5 + 6$ giờ, nếu nhiệt độ $25 + 30^{\circ}\text{C}$ thì ngâm trong $3 + 4$ giờ. Kết thúc giai đoạn ngâm là thời điểm độ ẩm hạt đậu đạt $55 + 65\%$ là tốt nhất.

+ Nhiệt độ ngâm: nếu ngâm ở nhiệt độ cao, tốc độ trương của hạt nhanh nhưng độ trương của hạt nhỏ. Nếu độ trương nhỏ thì các thành phần trong hạt đậu chỉ ở trạng thái keo đông, không phải dịch thể keo do đó khó hoà tan. Nhiệt độ nước dùng để ngâm đậu tốt nhất là $20 \pm 25^{\circ}\text{C}$.

$$+ \text{Lượng nước ngâm thường được sử dụng } \frac{\text{Đậu}}{\text{Nước}} = \frac{1}{2,5}$$

Lượng nước ngâm này sẽ giúp độ trương của hạt đậu đạt tương đối cao, độ chua thấp (khoảng 2,23 g axit axetic / 100 g đậu) và sự hao tổn chất khô nhỏ (0,6 g/ 100 g đậu).

b. Xay

Xay là một quá trình cơ học để phá vỡ tế bào, nhằm giải phóng protein, lipit và glucit... Nhờ có nước hoà tan các chất này và chuyển chúng sang dạng huyền phù. Yếu tố quan trọng nhất trong giai đoạn này là lượng nước cần thiết cho vào trong khi xay. Nếu ít nước thì việc hoà tan các chất sẽ kém và tạo ma sát mạnh gây nên hiện tượng tăng nhiệt làm protein biến tính, do đó khả năng tan của protein sẽ kém đi. Nếu quá nhiều nước sẽ làm tăng lượng hoà tan các chất nhưng lại gây khó khăn trong các giai đoạn chế biến sau.

$$\text{Lượng nước dùng để xay bột tốt nhất nên theo tỷ lệ: } \frac{\text{Đậu}}{\text{Nước}} = \frac{1}{6}$$

Trong khi xay phải cho nước chảy vào liên tục. Trong quá trình xay, saponin sẽ tạo bọt vì vậy phải cho chất phá bọt, chất phá bọt thường dùng với tỷ lệ 0,05% so với lượng đậu từ máng dẫn vào.

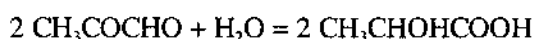
c. Lọc

Sau khi xay ta có một dung dịch huyền phù gồm có dung dịch keo và những chất rắn không tan trong nước.

Trong quá trình tách dung dịch keo khỏi các chất rắn xảy ra hiện tượng các chất rắn sẽ giữ trên mặt nó những tiểu phần keo vì vậy phải dùng nước rửa lại phần bã. Lượng nước rửa bã không nên quá nhiều. Trong giai đoạn lọc nên qua hai bước: lọc tinh và lọc thô. Sữa khi lọc tinh xong cần phải đạt các tiêu chuẩn sau: Nồng độ sữa $0,4 \div 0,5^{\circ}\text{Be}$; pH = $6 \div 6,5$; Lượng nước sữa thu được từ 1kg đậu là 9 lít.

Thành phần hóa học của dịch sữa: đạm tổng số $27 \div 30 \text{ g/l}$; lipit $13 \div 16 \text{ g/l}$; glucit $3,2 \div 4,5 \text{ g/l}$; chất khô $4,5 \div 5 \text{ g/l}$.

Sữa sau khi lọc xong thường có $15\ 000 \div 20\ 000$ vi khuẩn lactic/ 1cm^3 . Nếu để lâu, sữa sẽ có phản ứng hoá học xảy ra như sau:



Lượng axit lactic tạo thành sẽ làm thay đổi pH dịch sữa. Sự thay đổi pH sẽ làm thay đổi căn bản tính chất protein. Khi pH dịch sữa tới gần điểm đẳng điện của protein đậu nành thì khối sữa sẽ đông vón lại gây khó khăn cho quá trình ép sau này. Do đó sữa kể từ khi xay đến khi lọc xong không nên kéo dài quá 30 phút về mùa hè và 50 phút về mùa đông.

Bã lọc là phần rắn sau khi lọc có thành phần hoá học như sau: protein $3 \div 4\%$; lipid $1 \div 2\%$; glucit $5 \div 6\%$; độ ẩm $80 \div 90\%$. Bã đậu là thức ăn gia súc rất tốt, dễ gây thối, vì thế bã phải được sử dụng ngay.

d. Gia nhiệt, kết tủa

Dịch sữa sau khi lọc xong phải đem gia nhiệt ngay. Gia nhiệt nhằm phá enzym kháng trypsin và độc tố aflatoxin, diệt vi sinh vật, khử mùi tanh của đậu nành, phá vỡ lớp solvat (lớp nước bao quanh) tạo điều kiện cho các phần tử sữa gần nhau hơn và dễ keo tụ hơn.

Thời gian gia nhiệt càng nhanh càng tốt. Thời gian đun sôi 100 lít sữa trong phạm vi $5 \div 10$ phút là tốt nhất, trong quá trình đun sôi khuấy đảo liên tục tránh cháy khét dung dịch sữa.

Sau khi đun sữa phải kết tủa sữa ngay. Sự kết tủa protein có nhiều nguyên nhân như do sự tác dụng của nhiệt, sự thay đổi pH về vùng đẳng điện, tác dụng của muối.

Trong quá trình kết tủa, ta đun sữa đến $95 \div 100^\circ\text{C}$ để gây biến tính nhiệt và dùng tác dụng gây kết tủa protein. Tác nhân gây kết tủa có nhiều loại như nước chua tự nhiên, CaCl_2 , CaSO_4 , axit axetic, axit lactic, clohydric,... Trong các loại kết tủa trên, nước chua tự nhiên được dùng thích hợp nhất, nhưng đòi hỏi người công nhân phải có kinh nghiệm nhiều.

Điều kiện để kết tủa sữa như sau:

- Nhiệt độ dịch sữa khi kết tủa $>95^\circ\text{C}$.
- pH của dịch sữa khi kết tủa >6 .
- pH của nước chua $4 - 4,5$.

pH của nước chua có ý nghĩa rất lớn trong việc kết tủa, nếu pH cao thì lượng nước chua phải sử dụng nhiều, nếu pH thấp thì hiệu suất thu hồi đạm thấp. Khi dịch sữa đạt 95°C ta cho nước chua vào từ từ. Quá trình này nên theo 3 giai đoạn: giai đoạn đầu nên dùng $1/2$ lượng nước

chua cần dùng, sau 3 phút cho 1/2 lượng nước chua còn lại và sau 3 phút tiếp theo cho hết lượng nước chua. Thường lượng nước chua đem kết tủa chiếm $20 \div 22\%$ lượng sữa.

e. Ép định hình bánh đậu và ngâm nước

Sau khi kết tủa và chất bã nước trong, ta có óc đậu hay hoa đậu. Đưa hoa đậu vào khuôn ép. Nhiệt độ của hoa đậu đem ép tốt nhất là $70 \div 80^{\circ}\text{C}$, nếu để nhiệt độ dưới 60°C thì hoa đậu không kết dính được, bánh đậu bở và không định hình được. Thời gian ép thường là 10 phút.

Đối với phương pháp xay khô ta có một số công đoạn riêng như sau:

i. Vo đậu và hong khô

Phương pháp xay khô không qua giai đoạn ngâm mà chỉ vo cho sạch, loại bỏ các tạp chất như rơm, rác, sạn, cát... Quá trình vo này cũng nhằm làm cho hạt đậu ngâm một ít nước trở lại, sau đó hong khô ngoài không khí khoảng 30 phút. Sau khi hong khô vỏ đậu sẽ nhăn nheo lại, đem hạt đi nghiền.

ii. Nghiền

Ta có thể nghiền bột đậu bằng nhiều loại máy nghiền khác nhau. Bột nghiền xong phải có độ mịn qua rây có $64 \text{ lỗ}/\text{cm}^2$. Bột đậu nghiền xong phải sử dụng ngay không để quá 1 giờ vì trong quá trình nghiền, nhiệt độ tăng lên và sẽ làm tăng quá trình lên men, từ đó dẫn đến làm biến tính protein gây tổn thất hiệu suất sau này.

iii. Hòa bột vào dung dịch NaOH

Đem bột đã nghiền hoà vào NaOH pH = $11 \div 12$ với tỷ lệ 1 đậu và 7 nước ở nhiệt độ $65 \div 68^{\circ}\text{C}$. Khi cho bột vào pH sẽ giảm xuống $7 \div 7,5$ do tác dụng của các phân tử protein và các axit béo trong hạt đậu với NaOH.

Mục đích quá trình này là để hoà tan protein và các chất có trong hạt đậu vào nước. Từ đó tiến hành lọc, tách dung dịch protein ra khỏi phần không hoà tan. Sau đó kết tủa và ép thành bánh.

iv. Sản xuất nước chua

Sữa chua được sản xuất có thành phần như sau:

- Sữa đậu nành 10% (sữa có nồng độ $0,4 \div 0,5^{\circ}\text{Be}$), pH = 6,2.
- Nước chắt đậu 15% (pH = $5 \div 5,5$).
- pH chung của hỗn hợp dung dịch là 6,5.

Để môi trường lên men ở $35 \div 40^{\circ}\text{C}$, các vi khuẩn sẽ phát triển rất mạnh chỉ sau $39 \div 42$ giờ. Kết quả pH sẽ giảm từ 6,5 xuống $4,0 \div 4,5$ và đạt hàm lượng axit cực đại là $10 \div 11 \text{ g/l}$ (tính theo axit axetic).

Trong trường hợp không có nước chất đặc, có thể dùng axit lactic để kết tủa protein như trong sản xuất đậu phụ. Phần nước trong lấy ra chính là nước chua.

Trong sản xuất ta có thể nhận lượng nước chua như sau: lấy 1/2 lượng nước chua trên, cho 1/2 lượng nước chất đặc vào và lên men ở $35 \div 40^{\circ}\text{C}$ trong $1,5 \div 2$ giờ ta có lượng nước chua cần cho sản xuất.

II.2. Sản xuất chao

Bảng 12. Thành phần hoá học của chao

Thành phần	Các loại sản phẩm của chao		
	Chao nước		Chao bánh (%)
	Phần cái (%)	Phần nước (%)	
Hàm ẩm	73 ÷ 75	-	65 ÷ 70
Đạm toàn phần	2 ÷ 2,9	12,5 ÷ 13	2,3 ÷ 2,6
Đạm formol	0,70 ÷ 0,85	7,5 ÷ 7,8	0,8 ÷ 0,9
Đạm amoniac	0,3 ÷ 0,4	2,5 ÷ 3,0	0,3 ÷ 0,4
Muối ăn	4,5 ÷ 5	6,0 ÷ 6,2	6,0 ÷ 6,5
Chất béo	8 ÷ 8,5	-	9,0 ÷ 10,0
Độ chua	110,0 ÷ 120 mg NaOH 0,1N/100 g		
Các axit amin không thay thế			
Lizin	2,84 ÷ 2,9	-	5,3 ÷ 5,5
Treonin	3,3 ÷ 3,5	2,8 ÷ 2,9	-
Valin	1,70 ÷ 1,75	-	1,5 ÷ 1,6
Triptophan	0,15 ÷ 0,20	0,4 ÷ 0,45	
Phenilalanin	1,55 ÷ 1,60	-	2,5 ÷ 2,7
Izoloxin	-	-	-
Loxin	1,8 ÷ 1,9	-	0,8 ÷ 0,9
Methionin	0,4 ÷ 0,5	-	0,4 ÷ 0,5

Chao là sản phẩm lên men được sản xuất từ đậu nành. Vì qua quá trình lên men nên chao có giá trị dinh dưỡng và hệ số tiêu hoá cao hơn đậu phụ nhiều.

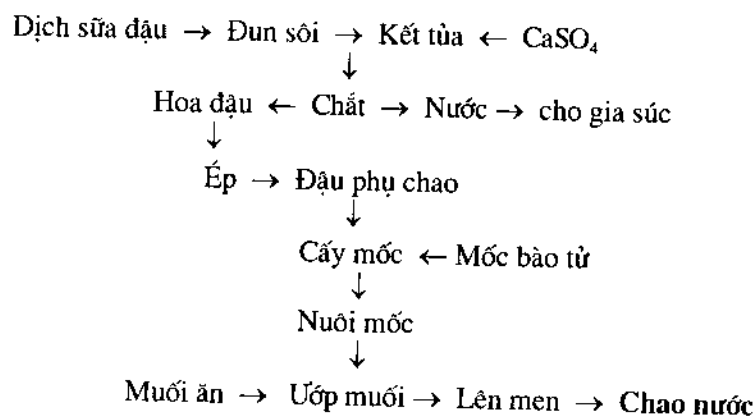
Chao có nhiều dạng sản phẩm khác nhau như chao nước, chao đặc, chao bánh và chao bột, thành phần hoá học của chao được thống kê trong bảng 12.

Do quá trình lên men, các enzym của vi sinh vật tham gia thủy phân protein thành các axit amin, lipid thành các este thơm nên chao có giá trị dinh dưỡng cao và mùi thơm rất đặc trưng. Các loài vi sinh vật tìm thấy trong chao: *Actinomucor elegans*, *M. hiemalis*, *M. silvaticus*, *M. subrilis*. Trong đó loài *Actinomucor elegans* là tốt nhất. Ngoài ra người ta còn thấy nhiều loài vi khuẩn tổng hợp proteaza trong các mẫu chao. Việc sử dụng các giống nấm mốc và vi khuẩn thuần chủng để sản xuất chao bao giờ cũng cho kết quả cao nhất.

II.2.1. Công nghệ sản xuất chao

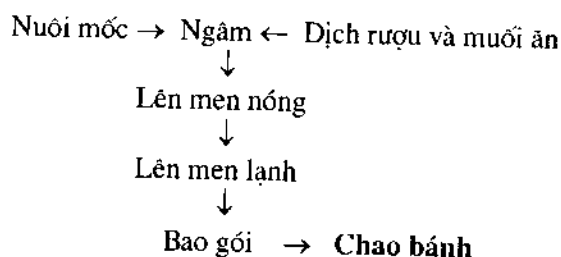
Tuy có nhiều loại chao khác nhau nhưng công nghệ sản xuất các loại chao bao giờ cũng qua 3 bước: sản xuất đậu phụ làm chao, nuôi mốc, lên men chao.

Sơ đồ 29. Quy trình sản xuất nước chao



II.2.2. Quy trình sản xuất chao bánh

Sơ đồ 30. Sơ đồ quy trình sản xuất chao bánh



II.2.3. Giải thích quy trình công nghệ

a. Định hình bánh đậu làm chao

Trong sản xuất chao người ta sử dụng CaSO_4 làm tác nhân đông tụ sữa. CaSO_4 có khả năng giúp ta thu hồi protein cao nhất. Thường dùng CaSO_4 với lượng 2g/l.

Tiêu chuẩn bánh đậu dùng sản xuất chao tốt nhất có thành phần: Hàm lượng nước 68 + 72%; pH = 6 ÷ 6,5.

Không chứa vi sinh vật tạp và vi sinh vật kỵ khí. Để đảm bảo được chỉ tiêu trên, sữa phải được đun sôi trong 5 phút.

Hòa 1kg CaSO_4 (loại 98% Ca^{++}) trong 15 lít nước, lọc bỏ rác cặn và đun sôi.

Khi cho dung dịch CaSO_4 vào phải khuấy đều tránh hiện tượng phản ứng cục bộ. Để lắng khoảng 2 ÷ 3 phút, sau đó chất bỏ phần nước. Kết tủa đem đi ép và thu được bánh đậu dùng sản xuất chao. Bánh đậu được coi có chất lượng tốt sau khi ép phải rắn chắc, khi cắt bằng dao, vết cắt mịn, không có lỗ rỗng.

b. Nuôi mốc

Nuôi mốc là giai đoạn quan trọng nhất trong công nghệ sản xuất chao. Sự phát triển của mốc có ý nghĩa rất lớn trong sự chuyển hoá protein và làm cứng bánh chao.

Bánh đậu trước khi cấy mốc vào cần phải được trần qua nước sôi để tiêu diệt các vi sinh vật nhiễm tạp. Mốc chao sau khi đã được sản xuất ở dạng bào tử, cấy trực tiếp vào bánh đậu không cần thêm chất dinh dưỡng nào khác. Ta có thể cấy giống mốc vào bánh chao bằng máy hoặc thủ công. Lượng giống mốc cho vào theo tỷ lệ 100 kg bánh đậu cần 0,5 kg giống mốc bào tử; 500 kg bánh đậu cần 1 kg và 100 kg bánh đậu cần dùng 1,2 kg mốc. Nếu cho mốc bằng phương pháp thủ công thì lượng mốc giống phải nhân với hệ số 0,2 ÷ 0,3.

Sau khi cấy mốc xong phải đảm bảo nuôi ở nhiệt độ 28 ÷ 30°C, hàm ẩm không khí là 90% ở những giờ đầu. Sau 14 ÷ 16 giờ nuôi, trên bề mặt đậu xuất hiện những khuẩn ty màu trắng ta phải tăng hàm ẩm lên 95%. Ở những giờ cuối nuôi mốc cần phải làm giảm hàm ẩm xuống để hạn chế sự phát triển của nấm mốc. Khi mốc chuyển từ màu trắng sang màu hung nâu thì kết thúc giai đoạn nuôi mốc. Lúc này khuẩn ty của mốc có thể dài tới 2 cm.

Để việc nuôi mốc tốt cần lưu ý phòng nuôi mốc phải có thiết bị điều chỉnh nhiệt độ, giữ được độ ẩm và nền phòng phải thoát nước tốt. Một phòng chỉ nên nuôi mốc cho 1000 kg đậu. Thông thường đối với các phòng thông gió tự nhiên 100 kg bánh đậu dùng để nuôi mốc cần có dung tích 6 ÷ 7 m³ khí trên diện tích 2 m².

c. Ướp muối hoặc ngâm trong dung dịch rượu và muối

Lượng muối thích hợp để ngâm là $130 \div 150$ g/kg bánh đậu đã lên men. Thời gian ướp muối là 24 giờ. Khi ướp muối nên xếp một lượt bánh đậu đã lên men, một lớp muối, cứ như vậy cho tới lớp đậu cuối cùng thì phủ một lớp muối kín bề mặt đậu. Muối dùng để ướp phải sạch.

Ngoài ướp muối, còn có phương pháp nhúng muối. Chuẩn bị dung dịch muối nồng độ $300 \div 320$ g/l và nhúng bánh đậu đã lên men liên tục trong 6 + 7 giờ thì nhấc lên để khô 24 giờ và cho vào thiết bị lên men.

d. Lên men

Sau nuôi mốc, lên men là công đoạn rất quan trọng, nó quyết định chất lượng sản phẩm, trong giai đoạn này các enzym của mốc sẽ tham gia hàng loạt các phản ứng sinh hóa tạo cho chao.

e. Kỹ thuật sản xuất giống vi sinh vật trong sản xuất chao

Sản xuất mốc giống dùng trong sản xuất chao cần qua 3 giai đoạn: sản xuất giống ống thạch; sản xuất giống trung gian; sản xuất giống bào tử dùng trong sản xuất.

** Sản xuất giống ống thạch:*

Dùng môi trường có thành phần: thạch $18 \div 20$ g; đường 20 g; nước giá đậu 1000 ml.

Rửa sạch 300 g giá đậu, cho vào 1000 ml nước, đun sôi nửa giờ, chắt lấy nước và bổ sung nước cho đủ 1000 ml. Cho thêm thạch, đun sôi, lọc. Điều chỉnh đến pH = $4,5 \div 5$ bằng axit xitric hoặc axetic. Cân đường cho vào, đun sôi và phân phối vào các ống nghiệm để làm thạch nghiêng.

Dùng que cấy cấy nấm mốc vào các ống nghiệm, và nuôi ở nhiệt độ $28 \div 30^{\circ}\text{C}$ trong 4 ÷ 5 ngày.

** Sản xuất giống trung gian:*

Có hai cách sản xuất giống trung gian: nuôi trong bình tam giác hoặc nuôi trong hộp nhôm. Môi trường có thành phần: bã đậu phụ 1 kg; bột mì 0,5 kg.

Dùng nước điều chỉnh độ ẩm tới 70 + 72%, pH môi trường = $5,5 \div 6,0$ được điều chỉnh bằng các axit thực phẩm trên. Môi trường được phân vào các bình tam giác 50 ÷ 60 g, nút bông và dùng giấy dầu bịt kín miệng bình. Hấp 45 phút với áp lực hơi nóng $1,2\text{kg/cm}^2$.

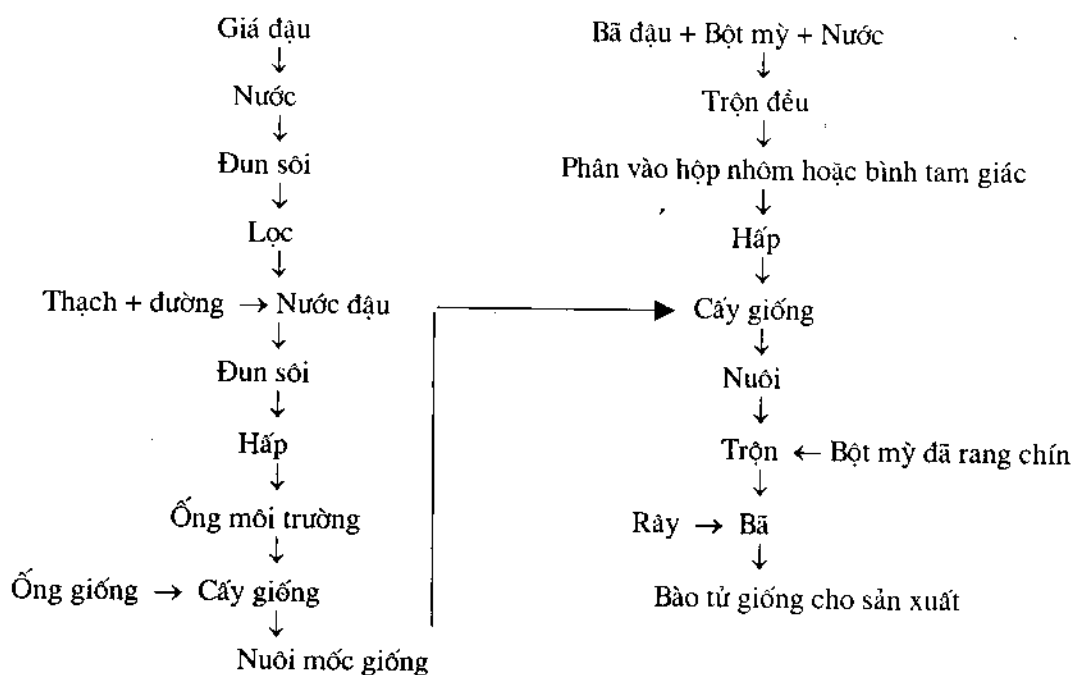
Làm nguội và cấy giống từ ống thạch nghiêng sang. Nuôi ở nhiệt độ $28 \div 30^{\circ}\text{C}$ khoảng 18 ÷ 24 giờ thấy xuất hiện các khuẩn ty trắng, nuôi tiếp 3 - 4 ngày ta có giống trung gian.

Nếu nhân giống trung gian trong các hộp nhôm thì phải dùng các hộp có đường kính 30cm, cao 12 cm và có nắp đậy kín. Thành phần môi trường giống như đã trình bày trên. Độ ẩm được điều chỉnh $62 \div 67\%$ nếu hấp trong điều kiện thủ công.

* Sản xuất giống bào tử cho sản xuất:

Cho giống trung gian vào bột mỳ đã rang chín với tỷ lệ 1:1. Dùng tay trộn đều, rây qua để lấy bột có bào tử và khuẩn ty.

Sơ đồ 31. Quy trình sản xuất giống vi sinh vật



* Một số hiện tượng xấu có thể xảy ra trong sản xuất:

Để tạo điều kiện cho các enzym hoạt động ta phải tạo điều kiện tối ưu cho chúng hoạt động, trong đó có độ ẩm, nhiệt độ và pH môi trường. Chính vì thế, sau khi ướp muối xong phải rửa sạch muối ở bánh đậu. Cho bánh đậu vào các dụng cụ lên men có rượu 12%V theo tỷ lệ 1 kg bánh đậu cho 0,5 ÷ 0,6 lít rượu, sao cho dung dịch rượu ngập bánh đậu là vừa. Đậy nắp thật kín và cho vào phòng lên men.

Đối với công nghệ sản xuất chao bánh, sau khi ngâm muối vớt bánh đậu ra, bao gói bằng giấy bạc hoặc giấy trắng parafin, gấn kín, cho vào túi polyetylen, dán kín lại và đưa vào phòng lên men.

Nhiệt độ lên men khoảng $35 \div 36^{\circ}\text{C}$ ở bánh đậu và $37 \div 38^{\circ}\text{C}$ ở phòng. Nếu nhiệt độ lên men lớn hơn 40°C thì thời gian lên men sẽ rút ngắn, sản phẩm dễ bị hỏng. Nếu nhiệt độ lên men nhỏ hơn 35°C thì thời gian lên men sẽ kéo dài, tốn kém thiết bị và diện tích phòng lên men.

Đối với chao bánh, thời gian lên men khoảng $6 \div 7$ ngày hoặc $9 \div 10$ ngày khi lên men ở các dụng cụ dung tích lớn. Sau lên men nóng còn có giai đoạn lên men phụ. Đây là giai đoạn ổn định sản phẩm. Công đoạn này cũng quan trọng như công đoạn lên men nóng, nhiệt độ lên men thích hợp nhất là $5 \div 10^{\circ}\text{C}$.

Chao khi lên men sẽ tạo những hương vị đặc trưng. Hương vị này gồm 4 nhóm chính tạo nên. Các axit amin với amoniac, sản phẩm của sự thủy phân protein, các axit béo, metylaxetol.

Sản phẩm chao có thể sử dụng trong $4 \div 5$ tháng đối với chao nước, chao bánh. Riêng chao bánh nếu bảo quản ở nhiệt độ 10°C có thể sử dụng trong $8 \div 10$ tháng.

- Hiện tượng chao bị đắng

Hiện tượng chao bị đắng thường thấy ở chao bánh. Nguyên nhân là do mốc xấu, nuôi trong điều kiện không đạt yêu cầu. Khi lượng proteaza tổng hợp được không nhiều, khả năng thủy phân protein kém, trong đó còn tồn tại một số peptit gây vị đắng. Vị đắng càng rõ khi hàm lượng axit glutamic trong sản phẩm thấp hơn 3 g/kg . Một nguyên nhân khác là do nhiễm vi khuẩn gây vị đắng. Trường hợp này dễ phát hiện khi thấy bánh đậu lúc lên men có màng nhớt, có mùi rất khó chịu. Vị đắng tạo thành cũng có thể do dùng quá nhiều CaSO_4 khi kết tủa hoặc cũng có thể do các chất đắng có sẵn trong nguyên liệu một số loại đậu nành.

- Có mùi khó chịu

Sản phẩm đạt chất lượng là các bánh chao có màu vàng và mùi thơm hấp dẫn. Tuy nhiên bánh chao có thể màu đen, xám và có mùi khó chịu như mùi mắm tôm. Nguyên nhân có thể do bị nhiễm mốc đen, có thể do mốc phát triển quá mạnh. Khi đó khả năng thủy phân rất cao, kết quả là sản phẩm cuối cùng của quá trình thủy phân tạo ra những sản phẩm gây mùi, hoặc cũng có thể do bánh đậu sau khi ép còn độ ẩm quá cao dễ bị nhiễm các vi sinh vật khác.

II.2.4. Chao (Việt Nam)

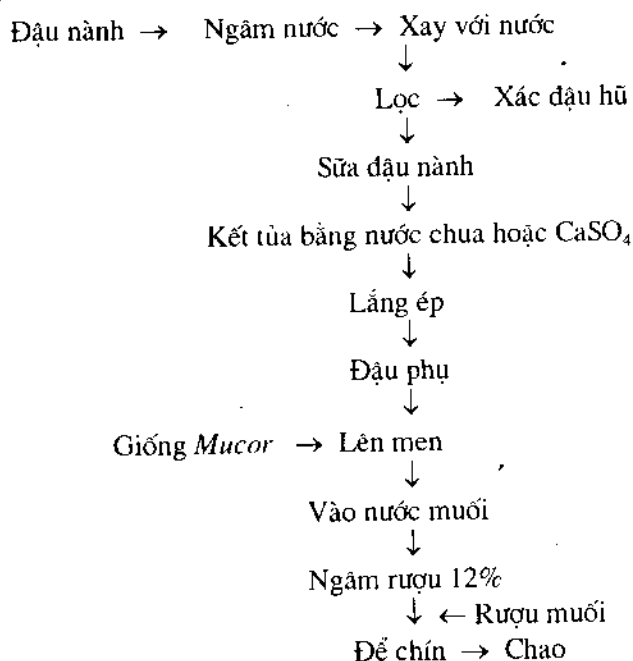
Tên chung: Soya cheese.

Tên địa phương (Việt Nam): Chao .

Nguyên liệu: Đậu nành, cón thực phẩm, giống.

Sơ đồ 32. Quy trình công nghệ sản xuất chao

Công nghệ 1:



Công nghệ 2

- Nguyên liệu: Đậu hũ 100 g, muối ăn, ớt khô 20 g, mốc chao hoặc men thuốc bắc hoặc cơm rượu 2 ÷ 10 g, rượu 15⁰ 200ml.

- Công nghệ sản xuất: Đậu hũ luộc sôi trong nước muối, vớt để ráo, cắt thành miếng vuông nhỏ, để nguội. Men thuốc bắc chà nhuyễn rải đều lên khắp mọi phía miếng đậu hũ, cho đậu hũ vào lọ đã rửa sạch, phía dưới lọ có khăn thưa để rút ẩm, các miếng đậu xếp cách nhau, dây kín vừa phải, để nơi thoáng mát, nuôi mốc 1 ÷ 2 ngày, lấy đậu cho ướp muối, xếp đậu vào hũ sạch để lên men 1 ngày ở nhiệt độ thường, cho rượu, ớt cay vào đáy lọ chao, dây kín phơi nắng hoặc để trong phòng trong 20 ngày → Chao.

Yêu cầu thành phẩm:

Đặc tính vật lý và cảm quan: Chao thơm mềm.

Đặc tính hoá học: Nước 67 ÷ 70%, đạm toàn phần 2 ÷ 2,3%, đạm amoniac 0,2 ÷ 0,25%, muối ăn 5,8 ÷ 6%.

Giá trị dinh dưỡng: Lipit 8 ÷ 9%, đạm formaldehyd 0,8 ÷ 0,9% .

Vì sinh vật : *Mucor sp*, *Rhizopus sp*.

Sản xuất: Gia đình, công nghiệp nhỏ.

Sử dụng: Món ăn phụ.

II.3. Sản xuất nước chấm

Nước chấm là tên chung chỉ các loại gia vị dạng lỏng chứa chủ yếu là axit amin, muối ăn và hương vị đặc trưng.

Nước chấm được sản xuất từ các nguyên liệu giàu protein bằng hai phương pháp: vi sinh vật và hoá học. Trong phạm vi chương này chỉ trình bày phương pháp vi sinh vật từ khô đậu nành.

II.3.1. Vi sinh vật trong sản xuất nước chấm

Trong sản xuất công nghiệp, điều quan trọng là phải tạo được vi sinh vật thuần chủng. Giống vi sinh vật đưa vào sản xuất phải đảm bảo các điều kiện sau: có ảnh hưởng tốt đến sự tạo hương, có hoạt lực proteaza cao, không chứa độc tố Aflatoxin.

Giống nấm mốc dùng trong sản xuất nước chấm có thể là *A. oryzae*, *A. soyae*, *A. teriol*, *A. mellieus*, *A. niger*, *A. ochracos*...

Môi trường giữ giống và nhân giống có thành phần như sau: đường 40g; nước chiết đậu 25g; thạch 25 g; pH = 5,5 + 6,0.

Hoặc có thể sử dụng môi trường thạch malt thông thường. Từ ống nghiệm nhân giống trung gian ở các bình tam giác với môi trường gạo hoặc bắp mảnh đã hấp chín. Nuôi ở 28 + 30°C trong 3 + 4 ngày.

II.3.2. Công nghệ sản xuất

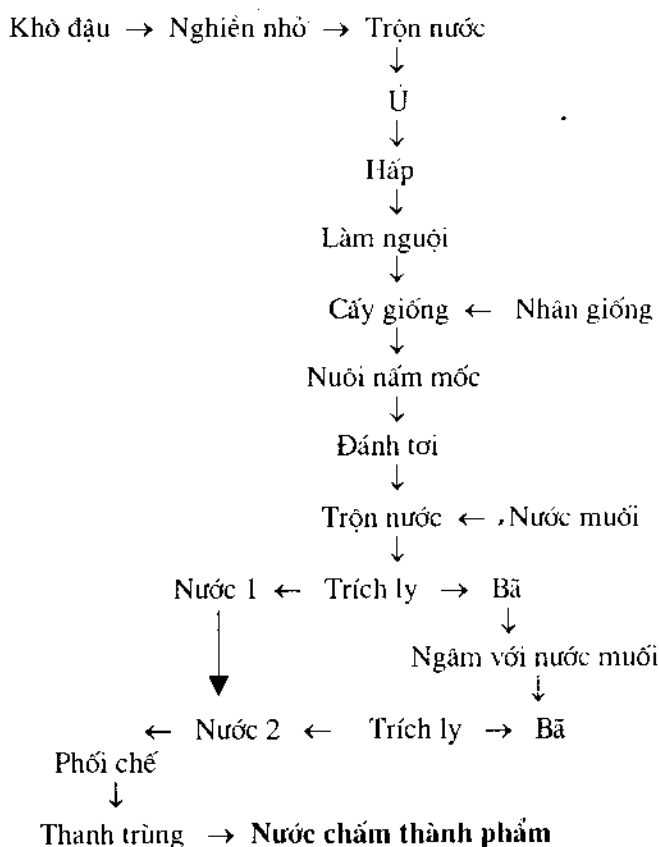
Thuyết minh quy trình

a. Xử lý nguyên liệu

Công đoạn xử lý nguyên liệu được thực hiện qua ba bước chính sau:

1. Xay nhỏ: xay nhỏ nhằm mục đích tăng khả năng xúc tác của enzym thủy phân. Kích thích hạt sau khi xay đạt 1mm là tốt nhất.
2. Phối liệu và trộn nước: Trộn 90% khô đậu đã xay nhỏ với 10% bột bắp hoặc bột mì. Cho thêm 60 ÷ 75% nước so với lượng bột trên.
3. Hấp chín: Mục đích là tiêu diệt vi sinh vật, đồng thời làm thay đổi đặc tính lý hoá của bột giúp nấm phát triển tốt hơn. Thường hấp ở 0,7 ÷ 0,9 kG/cm² trong 1,5 giờ.

Sơ đồ 33. Quy trình sản xuất nước chấm



b. Nuôi nấm mốc

Trong khi nuôi mốc cần lưu ý các yếu tố kỹ thuật sau: nhiệt độ, độ ẩm, thoáng khí. Nuôi nấm mốc nhằm thu nhận được số lượng và chất lượng enzym proteaza cao. Chính vì vậy các yếu tố trên đóng vai trò rất quan trọng. Thường nuôi nấm mốc ở $28 \div 32^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm không khí $85 \div 90\%$. Quá trình phát triển của nấm mốc có thể chia làm ba giai đoạn:

1. Giai đoạn 1: sau khi cấy giống 6 ÷ 8 giờ, nhiệt độ tăng dần.
2. Giai đoạn 2: sợi nấm sẽ phát triển mạnh, nhiệt tạo ra nhiều và hệ sợi thường kết thành tầng
3. Giai đoạn 3: sau 24 giờ bào tử của nấm mốc chuyển sang vàng hoa cam.

Trong quá trình nuôi nấm mốc cần trang bị quạt ly tâm có lưu lượng gió 6000 m³/tấn nguyên liệu giờ với áp lực 100 mmH₂O.

c. Lên men hoặc thủy phân

Trong quá trình thủy phân xảy ra hai quá trình chính. Quá trình thủy phân protein và quá trình thủy phân tinh bột. Quá trình này chịu ảnh hưởng của ba yếu tố:

- Lượng nước cho vào trong quá trình thủy phân. Tính lượng nước cho quá trình thủy phân theo công thức sau:

$$W = (A \times B) - C$$

trong đó: W: lượng nước cho vào;

A: khối lượng nước mốc không nước;

B: % khối lượng nước trộn vào;

C: hàm lượng nước của khối nấm sợi.

C và A có thể tính theo công thức:

$$C = (\text{khối lượng nấm mốc}) \times (\text{hàm lượng nước của khối nấm mốc})$$

Kinh nghiệm của các xí nghiệp sản xuất nước chấm cho thấy lượng nước cho vào tốt nhất thường là $30 \div 40\%$ so với nguyên liệu, tương đương với $60 \div 70\%$ so với khối lượng nấm. Khi cho nước vào nên cho $5 \div 10\%$ NaCl và duy trì nhiệt độ thủy phân $54 \div 58^\circ\text{C}$ trong $64 \div 72$ giờ.

Sau khi thủy phân xong, căn cứ vào hàm lượng nước trong dịch thủy phân để tính lượng muối và nước muối cần bổ sung sao cho đạt được nồng độ quy định và số lượng nước chấm cần thiết. Có thể tính theo công thức sau:

$$W = A \times K - (B - C)$$

trong đó: W: tổng khối lượng nước phải cho vào;

A: tổng khối lượng nguyên liệu không nước cần dùng;

K: lượng nước chấm cần lấy;

B: số lượng muối ăn phải cho thêm;

C: tổng khối lượng nước của dịch thủy phân.

C và B có thể tìm theo công thức sau:

$$C = \frac{(\text{Tổng lượng nước cho vào})}{\text{khí thủy phân}} = \frac{(\text{tổng lượng nước phải cho vào})}{\text{khí thủy phân}} \times \frac{(\text{hiệu suất tiêu hao})}{\text{khí thủy phân}}$$

$B = (\text{Tổng lượng nước có trong dịch thủy phân}) \times (\% \text{ muối cho vào để điều chỉnh nước muối đến độ Be cần thiết})$

d. Trích ly

Dịch trích ly lần thứ nhất thường được nước chấm đậm, có màu xấu và chiếm khoảng $60 \div 80\%$ lượng nguyên liệu đem thủy phân. Dịch trích ly lần hai thu được từ việc ngâm bã trong $12 \div 16\text{h}$ với nước muối $15 \div 18^\circ\text{Be}$. Cứ như vậy có thể tiến hành các lần trích ly tiếp theo nếu chưa hết. Tùy yêu cầu chất lượng nước chấm ta có thể pha trộn các lần trích ly với nhau.

e. Thanh trùng sản phẩm

Thanh trùng có thể tiến hành theo hai cách: đun trực tiếp hoặc dùng nồi hơi. Nhiệt độ thanh trùng nên là $60 \div 70^\circ\text{C}$ để tránh làm thay đổi chất lượng nước chấm. Thời gian thanh trùng khoảng $1,5 \div 2$ giờ.

f. Tính toán hiệu suất thủy phân

Tính lượng nước chấm lấy ra: $X = \frac{N}{n\%} \times 100$

trong đó : X: lượng nước chấm lấy ra tính theo dung lượng;

N: khối lượng NaCl tuyệt đối đã sử dụng ;

N: hàm lượng NaCl thuần khiết trong nước chấm.

Nếu muốn tính riêng khối lượng nước chấm lấy ra có thể đo khối lượng riêng của nước chấm rồi nhân lên là được.

- Tính hiệu suất thủy phân protein: $Y = \frac{X \times M\%}{M} \times 100$

trong đó: Y: hiệu suất thủy phân protein;

M: khối lượng tuyệt đối của protein trong nguyên liệu;

M%: hàm lượng protein trong nước chấm (dung lượng).

- Hiệu suất sử dụng protein

Hiệu suất sử dụng protein là tỷ suất thành phần protein của nguyên liệu đi vào trong thành phẩm hay tỷ số giữa hàm lượng đạm toàn phần trong thành phẩm nước chấm đã qua lọc và hàm lượng đạm toàn phần của nguyên liệu dùng trong sản xuất nước chấm.

Hiệu suất sử dụng protein = $\frac{B \text{ (hoặc C)}}{A}$

trong đó: A- hàm lượng đạm toàn phần có trong 100kg nguyên liệu hỗn hợp dùng để nuôi nấm sợi;

B: Hàm lượng đạm toàn phần của nước chấm chế từ 100kg nguyên liệu để nuôi nấm sợi.

B hoặc C có thể tìm theo công thức:

$$B \text{ hoặc } C = \frac{\text{Hs nước chấm lấy ra} \times \text{Hàm lượng đạm (\%)} \text{ trong nước chấm trích ly}}{100 \times \text{khối lượng riêng}}$$

Từ đó tính được hiệu suất sử dụng protein

- Tính hiệu suất tạo thành axit amin:-

$$\text{Hiệu suất tạo thành axit amin} = \frac{A}{T} \times 100$$

trong đó : A: hàm lượng axit amin trong nước chấm;

T: hàm lượng đạm toàn phần trong nước chấm (%).

Thường đạt hiệu suất 40 ÷ 55%.

II.3.3. Tane Koji

Tên chung: Starter.

Tên địa phương (Nhật Bản): Tane Koji .

Vi sinh vật : *Aspergillus oryzae*.

Sử dụng: Làm giống trong sản xuất các loại nước chấm: Koikuchi shoyu, saichikomi shoyu, shiro shoyu, tamari shoyu, usukuchi shoyu.

III. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT TƯƠNG

Tương là một sản phẩm lên men từ các nguồn nguyên liệu giàu glucit và giàu đạm. Đây là dạng nước chấm cổ truyền của Việt Nam.

Tương là một loại thực phẩm gắn liền với văn hóa dân tộc ta từ xa xưa cho đến nay và mãi mãi về sau. Có những địa phương làm tương nổi tiếng như Bắc Yên Nhân (Hưng Yên), Cự Đà (Hà Đông) và Nam Đàn (Nghệ An).

III.1. Nguyên liệu sản xuất tương

III.1.1. Nguyên liệu giàu gluxit

a. Gạo nếp

Gạo nếp được dùng trong sản xuất tương phải không bị mốc, không mốc. Thành phần hóa học của gạo nếp như sau:

Bảng 13. Thành phần hóa học của gạo nếp

Nước	14%
Gluxit	74,9%
Protein	8,2%
Lipit	1,5%

Protein của gạo nếp chủ yếu là glutelin (orizein) và globulin. Ngoài ra còn có ít lân – Cozin và prolamin. Gluxit của gạo nếp chủ yếu là tinh bột, đường, xenluloza, hemixenluloza. Trong tinh bột chủ yếu là amilopectin, các chất khoáng có photpho, kali, magiê. Ngoài ra còn chứa một số vitamin như B₁, B₂, B₆, PP, E.

b. Gạo tẻ

Cũng như gạo nếp, gạo tẻ được dùng trong sản xuất tương không được mốc, không mốc. Thành phần trung bình của gạo tẻ như sau:

Bảng 14. Thành phần hóa học của gạo tẻ

Nước	13,84%
Gluxit	77,55%
Protein	7,35%
Lipit	0,52%
Xơ	0,18%
Muối khoáng	0,54%

c. Bột mì

Bảng 15. Thành phần hóa học của bột mì

Nước	11,61%
Gluxit	73,80%
Protein	12,48%
Lipit	1,78%
Vitamin B ₁	0,48 mg/(%)
PP	76
Ca	36

Protein của bột mì có 4 loại: albumin, globulin, prolamin, glutelin. Trong đó chủ yếu là glutelin và prolamin chiếm khoảng 75% tổng lượng protit.

d. Bắp

Bảng 16. Thành phần hóa học của bắp

	Bắp hạt	Bắp mảnh
Nước (%)	12	11,4
Gluxit (%)	72	78,9
Protein (%)	9	8,5
Lipit (%)	4,8	0,8
Xơ (%)	1,5	0,4
Muối khoáng (%)	1,2	0,4

Protein của bắp gồm 4 nhóm: albumin, prolamin, globulin và glutelin. Phôi bắp chứa nhiều lipit nhất.

III.1.2. Muối

Muối dùng trong sản xuất tương thường là NaCl, phải có độ tinh khiết 92 ÷ 97%, khi pha vào nước không có vị chất.

III.1.3. Nước

Nước dùng sản xuất tương có độ cứng trung bình 8 ÷ 17⁰ (1⁰ tương đương 10 mg CaO/ lít hay 7,19 mg MgO/ lít nước). Các chất khoáng và các chất hữu cơ khác không được quá 500 ÷ 600 mg/l. Lượng vi sinh vật không được quá 20 ÷ 100/cm³ nước.

III.2. Vi sinh vật dùng trong sản xuất tương

Trong phương pháp cổ truyền, nhân dân ta thường dùng vi sinh vật có sẵn trong tự nhiên. Thường là các loài nấm mốc: *Mucor mucedo*, *M. rouxii*, *Rhizopus nigricans*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. niger*, *P. notatum*, *P. prolutum*, *P. expansum*, *Monilia sitofila*, *Trichoderma lignorum*.

Chính vì thế trong nguyên liệu nấm mốc thấy có nhiều màu sắc khác nhau. Các nghiên cứu về tương cho thấy nấm mốc có ý nghĩa lớn nhất trong sản xuất tương là nấm *A. oryzae*. Trong sản xuất tương công nghiệp ứng dụng chủ yếu nấm mốc *A. oryzae* thuần chủng, khi phát triển trong khối nấm mốc thấy chỉ có màu vàng. Điều kiện sinh trưởng của loài nấm mốc như sau:

Bảng 17. Điều kiện sinh trưởng của *A. oryzae*

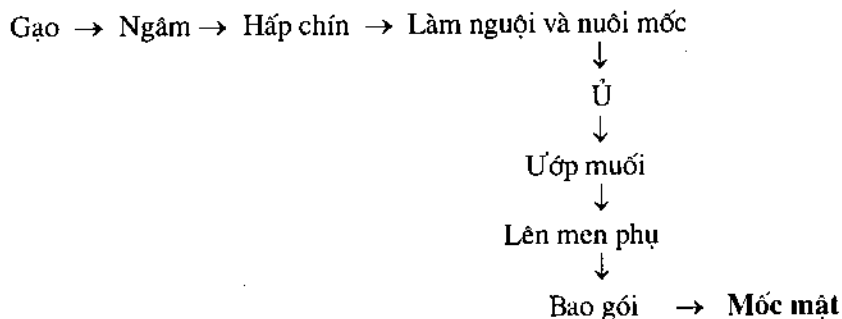
Độ ẩm	45 ÷ 55%
pH môi trường	5,4 ÷ 6,5
Độ ẩm không khí	85 ÷ 95%
Nhiệt độ	27 ÷ 30°C
Thời gian	30 ÷ 36h

Nấm mốc *A. oryzae* có các loại enzym sau: amilaza, proteaza, các enzym oxy hóa khử như glucooxidaza.

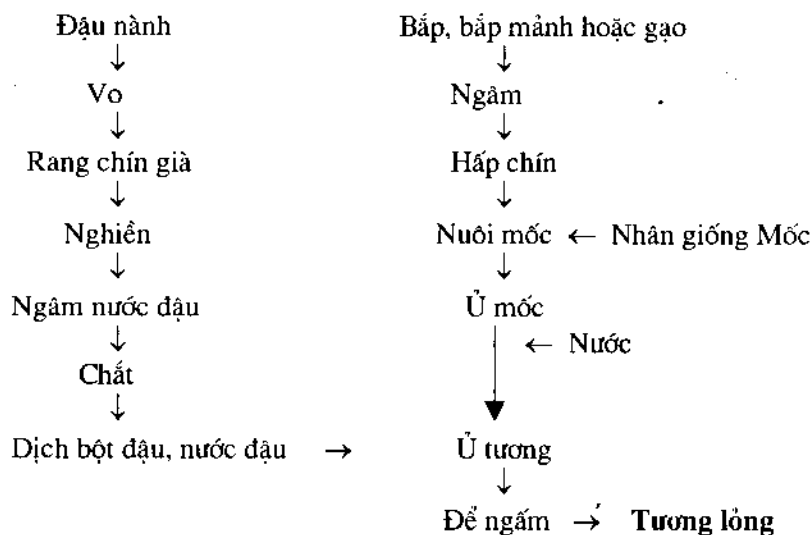
III.3. Kỹ thuật sản xuất tương thủ công

Bản chất sinh hóa của quá trình sản xuất tương là hai quá trình thủy phân: quá trình thủy phân protein và thủy phân tinh bột. Ngoài ra còn có quá trình tạo thành rượu, các este. Các chất này tạo nên hương vị đặc trưng của tương.

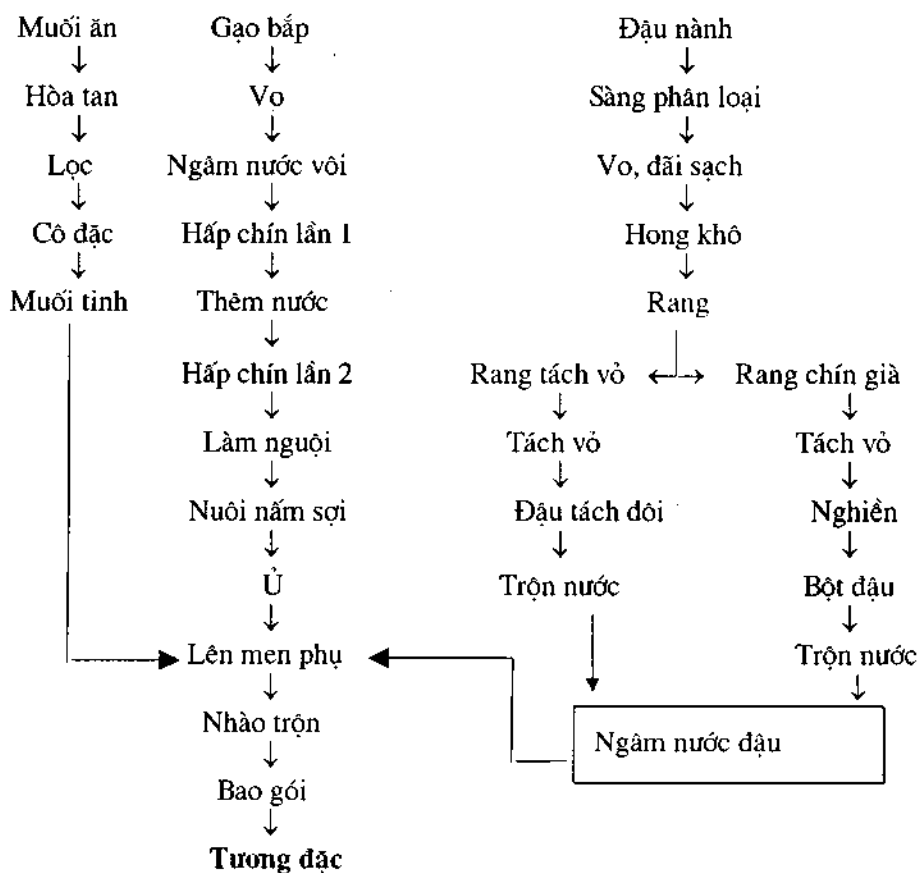
Sơ đồ 34. Quy trình sản xuất mốc ủ mật



Sơ đồ 35. Quá trình sản xuất tương lỏng



Sơ đồ 36. Quy trình sản xuất tương đặc



Thuyết minh quy trình công nghệ:

a. Xử lý nguyên liệu:

Nguyên liệu trước khi cấy giống nấm mốc phải qua hàng loạt công đoạn xử lý như: làm sạch, vo, đãi sạch, ngâm phối liệu và hấp chín.

b. Nuôi nấm mốc

Mục đích quá trình này là tạo điều kiện tối ưu cho sự hình thành enzym amilaza, proteaza. Nguyên liệu sau khi hấp chín và làm nguội, làm nguội đến $35 \pm 40^\circ\text{C}$, cấy giống trung gian với tỷ lệ $0,5 \div 1\%$ so với lượng nguyên liệu ban đầu. Trải lượng nguyên liệu này ra các thiết bị nuôi, chiều dày $1,5 \div 2\text{ cm}$ và cho vào phòng nuôi. Nhiệt độ phòng nuôi duy trì $28 \pm 32^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí $85 \div 95\%$.

c. Ủ nấm mốc (hay ủ mốc)

Tùy loại tương mà có các phương pháp ủ khác nhau:

* Ủ mốc mật: công đoạn này gọi là lên men ăm. Sự chuyển hoá protein trong giai đoạn này hầu như không đáng kể, chủ yếu là quá trình chuyển hóa tinh bột thành đường. Các yếu tố ảnh hưởng nhiều đến giai đoạn này là chất lượng nấm mốc, nhiệt độ ủ, thời gian ủ, lượng nước đem trộn và pH của nguyên liệu ủ.

Cách tiến hành: Mốc được bóp toại, trộn với nước theo tỷ lệ:

- Đối với gạo là 30%.
- Đối với bắp mảnh là 20%.

Nước được dùng để trộn có lượng NaCl là 2%. Sau $6 \div 8$ giờ nhiệt độ khối ủ sẽ đạt $50 \div 60^\circ\text{C}$. Thời gian ủ tùy loại nguyên liệu.

- Đối với gạo nếp: 2 ngày.
- Đối với bắp: 4 ngày.

* Ủ mốc làm tương đặc: ở đây không dùng nước thường như trong ủ mốc mật. Nước được dùng là nước ngâm đậu có 5% muối. Tỷ lệ nước đậu dùng để ủ như sau:

- Đối với gạo: 15%.
- Bắp: 10%.

Sau 2 ngày ủ ở nhiệt độ $50 \div 55^{\circ}\text{C}$. Kết thúc giai đoạn ủ, cho muối vào với lượng 45%, trộn thêm bột đậu ngâm sau khi đã gạn lấy nước. Trộn đều và để lên men phụ khoảng $5 \div 7$ ngày ở $30 \div 35^{\circ}\text{C}$ cho ra đánh nhuyễn ta có tương đặc.

d. Rang đậu và ngâm nước đậu

Đậu được loại tạp chất, cho vào nước đãi kỹ rồi ngâm $10 \div 25$ phút, vớt ra để ráo. Đem rang ở nhiệt độ $170 \div 200^{\circ}\text{C}$ trong $45 \div 60$ phút. Sau khi rang độ ẩm của hạt đậu là $1,0 \div 1,5\%$. Đậu rang xong, để nguội, xay tách vỏ, nghiền mịn để thuận lợi cho sự chuyển hóa sau này.

e. Ngả tương để ngấu và bảo quản

Công thức phối liệu như sau:

- Nấm mốc ủ hoặc nguyên liệu đường hóa: 10 phần
- Bột đậu: 2,5 phần
- Bột đậu ngâm: 0,5 phần
- Muối tinh: 1 phần

Cân trộn thật đều và đánh nhuyễn, cho vào thùng, chum, vại hoặc thiết bị ủ để làm ngấu. Thời gian làm ngấu là 10 ngày thì sản phẩm có mùi thơm rõ rệt. Nhiệt độ ngả tương thích hợp nhất là $30 \div 35^{\circ}\text{C}$.

Tương có thể bảo quản và sử dụng trong vài năm nếu chế biến tốt. Muốn giữ lâu, các dụng cụ phải được rửa sạch và bảo quản trong điều kiện vệ sinh.

III.4. Kỹ thuật sản xuất tương công nghiệp

Phương pháp sản xuất tương công nghiệp giống như phương pháp sản xuất tương thủ công, cũng trải qua bốn giai đoạn, tuy nhiên có một số đặc điểm riêng sau:

- Sử dụng các loài nấm mốc thuần chủng, trong đó chủ yếu là chủng *A. oryzae*.
- Đảm bảo được các điều kiện nuôi nấm hoàn toàn ổn định nên chất lượng tương ổn định.
- Điều chỉnh được các điều kiện lên men, thủy phân nên chất lượng tương cao và ổn định hơn.

III.4.1. Các giai đoạn sản xuất

a. Giai đoạn sản xuất nấm mốc giống

Mục đích của giai đoạn này là tạo được lượng giống đủ cho sản xuất với lượng bào tử đạt được là cao nhất. Đồng thời giống nấm mốc phải thuần khiết về chủng loại. Giai đoạn làm mốc giống cần phải tiến hành theo ba bước:

- Nuôi cấy giống trong ống thạch nghiêng hay là giữ giống trong ống nghiệm.
- Nuôi cấy trong bình tam giác (nhân giống nhỏ).
- Nuôi cấy trong sàng, nia.

*** Nuôi cấy trong ống thạch nghiêng**

Giống được cấy truyền sang các ống thạch vừa để bảo quản giống vừa dùng cho sản xuất. Ống giống phải tuyệt đối đảm bảo thuần khiết không bị tạp nhiễm. Môi trường nuôi cấy nấm mốc phải đầy đủ các chất dinh dưỡng.

*** Nuôi cấy nấm mốc giống trong bình tam giác**

Đây là bước nhân giống trong sản xuất, từ đây sẽ nhân giống tiếp sang khay, mảnh hoặc trên các dụng cụ phù hợp khác.

Thường sử dụng bình tam giác dung tích $0,3 \div 0,5$ lít hoặc 1 lít có cổ rộng. Giai đoạn này có thể dùng gạo tẻ loại tốt, không mốc. Tiến hành nấu cơm như bình thường, hạt cơm phải chín đều, không bị nhão và đồng thời không khô quá, độ ẩm khoảng $45 \div 45\%$. Dỡ ra, để nguội, bóp rời từng hạt rồi cho vào bình tam giác thành một lớp dày 1 cm, dày nút bông và buộc giấy chống ẩm. Thanh trùng 1 at trong $30 \div 45$ phút.

Cũng có thể dùng môi trường ngô mảnh trộn nước đều trong khay hoặc xoong, để khoảng 1 ÷ 2 giờ cho nước ngấm đều. Bóp thật tơi rồi cho vào bình tam giác có độ dày 1 cm và đem khử trùng ở 1 at trong 60 phút.

Sau khi chuẩn bị xong môi trường trong bình tam giác, tiến hành gieo cấy vi sinh vật. Trước tiên, chuẩn bị các ống nghiệm có chứa 5 ml nước vô trùng. Sau đó cho bào tử vào nước, đồng thời cấy truyền sang bình tam giác. Trung bình cứ 1 ống giống có thể cấy sang 2 ÷ 3 bình tam giác 1 lít. Lắc đều cho giống phân bố đều vào môi trường và nuôi chúng ở nhiệt độ thích hợp khoảng 5 ÷ 6 ngày. Yêu cầu giai đoạn này phải đảm bảo điều kiện để các bào tử phát triển mạnh, nếu thấy bình bị nhiễm phải loại bỏ ngay.

*** Nhân giống mốc trên mảnh, sàng (nhân giống lớn)**

Đây là giai đoạn cuối cùng trong quá trình nhân mốc giống. Môi trường dùng để nhân giống là ngô mảnh, cũng có thể dùng một số môi trường khác thay thế.

Ngô mảnh trộn nước để 3 ÷ 4 giờ cho ngấm nước rồi hấp chín. Thời gian hấp có thể tới 3 ÷ 4 giờ. Nếu dùng gạo thì thời gian hấp sẽ nhanh hơn. Nguyên liệu sau khi hấp phải chín đều, không quá bết hoặc quá khô, độ ẩm còn lại khoảng $45 \div 50\%$.

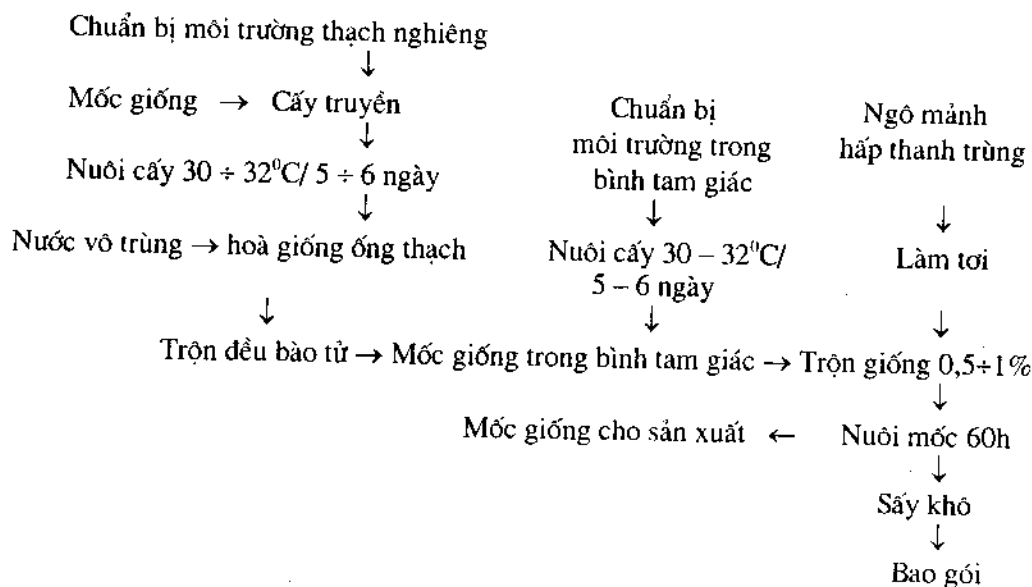
Sau khi hấp nguyên liệu xong phải làm nguội nhanh đến $26 \div 38^{\circ}\text{C}$ để trộn mốc giống vào với tỷ lệ $0,5 \div 1\%$ hoặc cao hơn. Để cho đều có thể dùng một lượng môi trường đã thanh trùng trộn trước với mốc giống, sau đó trộn đều với khối môi trường. Hoặc có thể dùng nước vô trùng cho vào bình tam giác đánh đều rồi trộn vào môi trường.

Sau khi trộn đều rải ra khay, mảnh thành lớp có chiều dày $0,3 \text{ m}$ để môi trường không bị khô. Khay, mảnh được đặt vào nơi có nhiệt độ $30 \div 32^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $85 \div 100\%$. Thời gian ủ khoảng $6 \div 8$ giờ. Sau $3 \div 4$ giờ đảo trộn lại 1 lần để điều hoà nhiệt độ và không khí. Sau $6 \div 8$ giờ tãi mỏng ra lớp dày $1,5 \div 2 \text{ cm}$. Sau $34 \div 36$ giờ nuôi, nhiệt độ trong khối nuôi bắt đầu giảm cần phải điều chỉnh nhiệt độ tới $34 \div 35^{\circ}\text{C}$ để duy trì sự hình thành bào tử của nấm mốc.

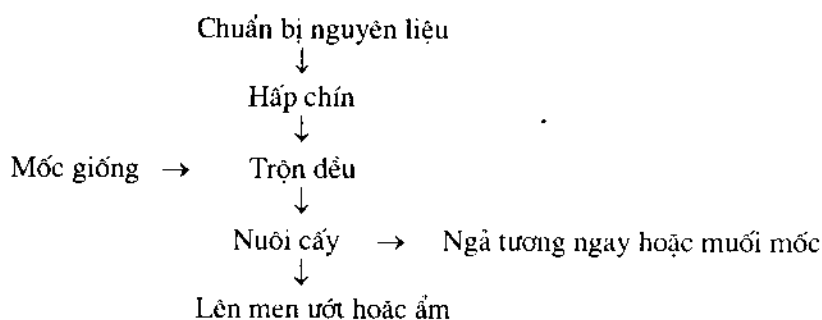
Thời gian nuôi trên khay, mảnh thường kéo dài tới 60 giờ, nếu thấy mốc hình thành bào tử chậm có thể kéo dài thời gian tới $70 \div 72$ giờ. Sau đó có thể sử dụng mốc ngay trong sản xuất hoặc có thể sấy khô tới độ ẩm 8% để bảo quản và dùng dần hoặc cung cấp cho các nơi sản xuất. Chú ý không được sấy quá nhiệt độ 40°C . Sau khi sấy xong cho mốc giống vào túi ni lông để chống ẩm, và chú ý không gây nhiễm bào tử của các loài khác.

Túi mốc giống cần được bảo quản nơi khô ráo, tránh ánh nắng. Cũng có thể bảo quản ở nhiệt độ $4 \div 5^{\circ}\text{C}$. Ta có thể bảo quản mốc giống trong $1 \div 2$ tháng.

Sơ đồ 37. Quy trình sản xuất mốc giống



Sơ đồ 38. Quy trình sản xuất mốc trung gian



a. Giai đoạn làm mốc sản xuất

* Chuẩn bị nguyên liệu

Nguyên liệu dùng sản xuất mốc tương có thể là gạo nếp hoàn toàn hoặc dùng ngô thay thế một phần hoặc hoàn toàn. Ngô khi dùng cần được xay nhỏ $0,3 \div 0,5$ mm và cứ 100 lít tương cần $30 \div 35$ kg nguyên liệu tinh bột.

* Hấp chín

Đầu tiên, ngâm nguyên liệu $8 \div 12$ giờ, để ráo nước và đem hấp thành trùn. Thường hấp ở nhiệt độ 100°C hoặc cao hơn.

* Trộn giống

Sau khi hấp, đánh tơi và làm nguội, hạ nhiệt độ tới $38 \div 40^{\circ}\text{C}$ và trộn mốc giống vào, có thể dùng nước sôi để nguội trộn cho đều và nhanh hơn.

* Nuôi mốc

Nhiệt độ nuôi mốc là $30 \div 32^{\circ}\text{C}$, sau $16 \div 24$ giờ nuôi cấy thì hạ nhiệt độ xuống $28 \div 30^{\circ}\text{C}$. Thời gian nuôi mốc nhanh gấp 2 lần so với phương pháp thủ công.

* Ngả tương

Sau khi nuôi cấy mốc được rồi, đem thủy phân luôn hay ngả tương với nước đậu. Làm như vậy sẽ tận dụng được thời điểm hoạt động mạnh nhất của amilaza và proteaza.

* Nuôi mốc

Lấy mốc ra bóp tơi từng hạt rồi cho vào thành hoặc chum, vại trộn với nước muối. Lượng muối dùng là $3/4$ tổng lượng muối trong 1 mẻ tương.

c. Giai đoạn làm nước đậu

Kiểu ngâm nước đậu thông thường: thường qua 2 khâu rang đậu và ngâm đậu.

- Rang đậu: Sàng đậu nành qua máy sàng để loại tạp chất (rơm, rác, sạn) và phân loại. Sau đó qua máy rửa hình trống có các lỗ xung quanh trục khoảng 10 phút. Để ráo nước khoảng 1 giờ, đem sấy $180 \div 200^{\circ}\text{C}$ trong $45 \div 60$ phút rồi xay.

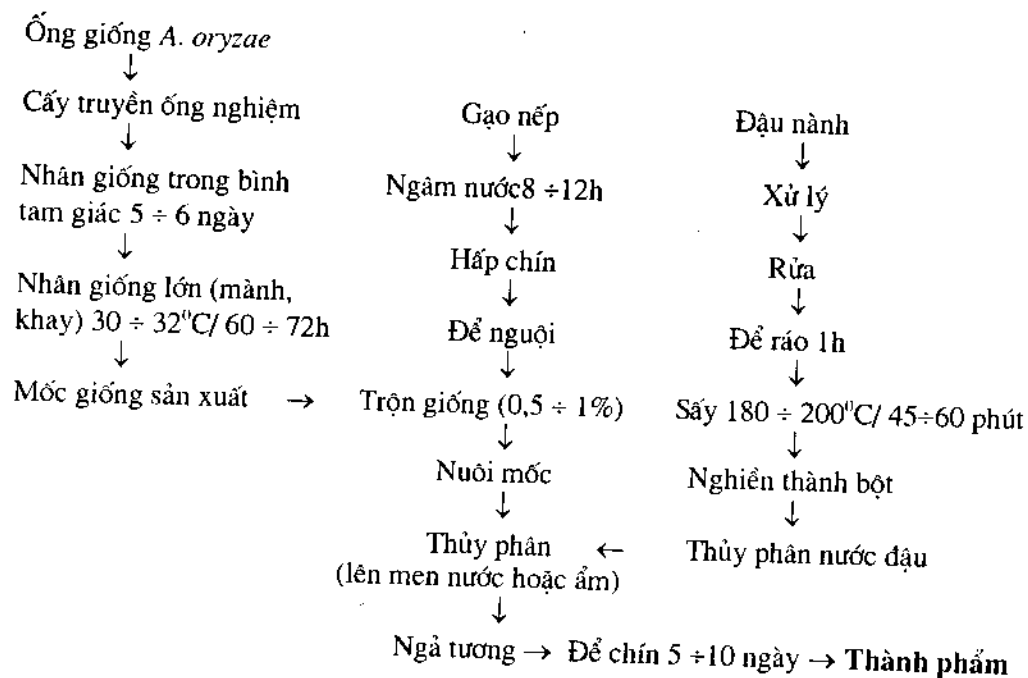
- Ngâm đậu: Bột đậu rang trộn đều với nước (1 kg bột + 0,5 l nước), đun sôi $45 \div 60$ phút, đổ vào thùng hoặc chum, vại để ngâm. Có thể cho 10% nước đậu đã ngâm ở mẻ trước vào và ngâm trong 6 ÷ 7 ngày. Có thể rút ngắn thời gian ngâm bằng cách cho thêm mồi vào (15 ÷ 20%) nước đậu đun thủy phân giữ $55 \div 58^{\circ}\text{C}$, ngâm trong 14 ÷ 15 giờ.

Ta có thể thủy phân ngay đậu tương bỏ qua giai đoạn ngâm nước đậu. Ta có thể thủy phân kiểu ủ mồi vùng Cụ Đà. Sau khi rang đậu xong trộn với mồi đã nuôi được 3 ÷ 4 ngày, sau đó ủ mồi như bình thường. Hoặc có thể dùng bột đậu rang trộn vào hỗn hợp nước, mồi và chuẩn bị đường hóa. Giữ $55 \div 58^{\circ}\text{C}$ trong 6 ÷ 8 giờ, sau đó đem ngả tương.

d. Giai đoạn ngả tương

Sau khi chuẩn bị xong nước đậu thì trộn đều với mồi và xay nhỏ hoặc nghiền bằng máy rồi cho vào thùng hoặc chum, vại để chín trong 5 ÷ 10 ngày ở nhiệt độ $30 \div 35^{\circ}\text{C}$, nếu nhiệt độ thấp thì phải kéo dài thời gian. Toàn bộ quy trình sản xuất được trình bày ở sơ đồ 39.

Sơ đồ 39. Quy trình sản xuất tương công nghiệp



III.4.2. Giá trị dinh dưỡng của tương

Như đã trình bày trong sản xuất tương, nguyên liệu chính là đậu nành và các loại hạt chứa gluxit. Do đó trong quá trình chuyển hoá trong tương, hàm lượng các chất dinh dưỡng đáng chú ý nhất vẫn là protein, cụ thể là các axit amin và gluxit (đường glucoza...)/

Ngoài ra, do quá trình chuyển hoá ấy mà tạo nên một số axit hữu cơ cung cấp cho tương mùi vị dễ chịu. Ngoài các thành phần cơ bản, tương còn cung cấp cho cơ thể chất béo, sinh tố và muối khoáng. Thành phần hóa học trong tương như bảng 18.

Bảng 18. Thành phần hóa học của tương

Thành phần	Hàm lượng (g/l)	
	Tương gạo	Tương ngô
Nước	58 ÷ 68'	560 ÷ 650
Đạm toàn phần	6,6 ÷ 9,2	6,4 ÷ 9,4
Đạm amin	1,4 ÷ 2,2	1,0 ÷ 1,6
Đạm amoniac	0,35 ÷ 0,45	0,36 ÷ 0,48
Chất béo	7,0 ÷ 9,1	12,0 ÷ 15,5
Đường	140 ÷ 172	65 ÷ 120
Tinh bột	15 ÷ 24	45 ÷ 80
Xenluloza	0,5 ÷ 1,5	0,8 ÷ 2,0
Độ axit (axetic)	2,5 ÷ 6,5	3,5 ÷ 7,4
Tro	110 ÷ 160	115 ÷ 160
NaCl	105 ÷ 155	109 ÷ 157
CaO	0,5 ÷ 30	0,5 ÷ 1,0
Fe ₂ O ₃	0,0005 ÷ 0,001	0,0005 ÷ 0,001
P ₂ O ₅	0,001 ÷ 0,002	0,002 ÷ 0,005
B ₁	310 ÷ 500 mg%	350 ÷ 545 mg%

Thường 1 lít cho 1100 ÷ 1200 cal.

Bảng 19. Thành phần một số loại tương sản xuất ở miền Bắc

Loại tương	Đường khử (glucoza) g/l	N formol (g/l)	Axit (axetic) (g/l)	NaCl (g/l)
Tương nếp	140	2,5	6	156
Tương tẻ	115 ÷ 120	2,3 ÷ 2,5	6	156
Tương ngô + mì	100	2,3	5 ÷ 6	156
Tương bản nếp	120 ÷ 150	2,5 ÷ 3,5	5 ÷ 6	156
Tương bản tẻ	100	2,5 ÷ 3,5	5 ÷ 6	156
Tương bản ngô	80 ÷ 90	2,5 ÷ 3,5	6 ÷ 9	156

III.5. Một số sản phẩm tương cổ truyền

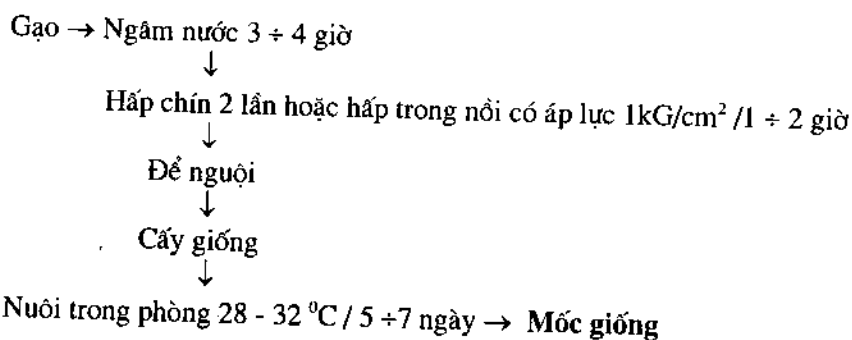
III.5.1. Mốc tương (Việt Nam)

Tên chung: Fermented soybean starter.

Tên địa phương (Việt Nam): Mốc tương.

Nguyên liệu: Gạo 100%, giống nấm *A. oryzae* (hoạt lực protease, amylaza cao, phát triển tốt trên nguyên liệu, không sinh độc tố Aflatoxin).

Sơ đồ 40. Công nghệ sản xuất mốc giống



Vi sinh vật : *Aspergillus oryzae*.

Sử dụng: Trong sản xuất tương, sản xuất nước chấm từ đậu nành.

III.5.2. Tương bắc (Việt Nam)

Tên chung: Soybean soy.

Tên địa phương: Tương Bắc.

Nguyên liệu:

Tương Bán: Gạo nếp 33 kg, đậu nành 12 kg, muối ăn 16 kg, nước đủ 100 lít.

Tương Cự Đà: Gạo nếp 30 kg, đậu nành 9 kg, muối ăn 13 kg, nước đủ 100 lít.

Yêu cầu thành phẩm:

Đặc tính vật lý và cảm quan: Tương có màu vàng đậm, mùi thơm, vị chua ngọt.

Đặc tính hoá học: Đạm tổng số 0,76%; đạm amin 0,155%; đạm amoni 0,04%; xơ 0,1%; khoáng 14,2%; NaCl 13,7%; CaO 0,08%.

Giá trị dinh dưỡng: Protein 4,5%; lipid 0,8%; đường 14,8%; tinh bột 1,5%; vitamin B₁ 450 đơn vị / 100 g sản phẩm (Theo Lê Văn Nhung 1966).

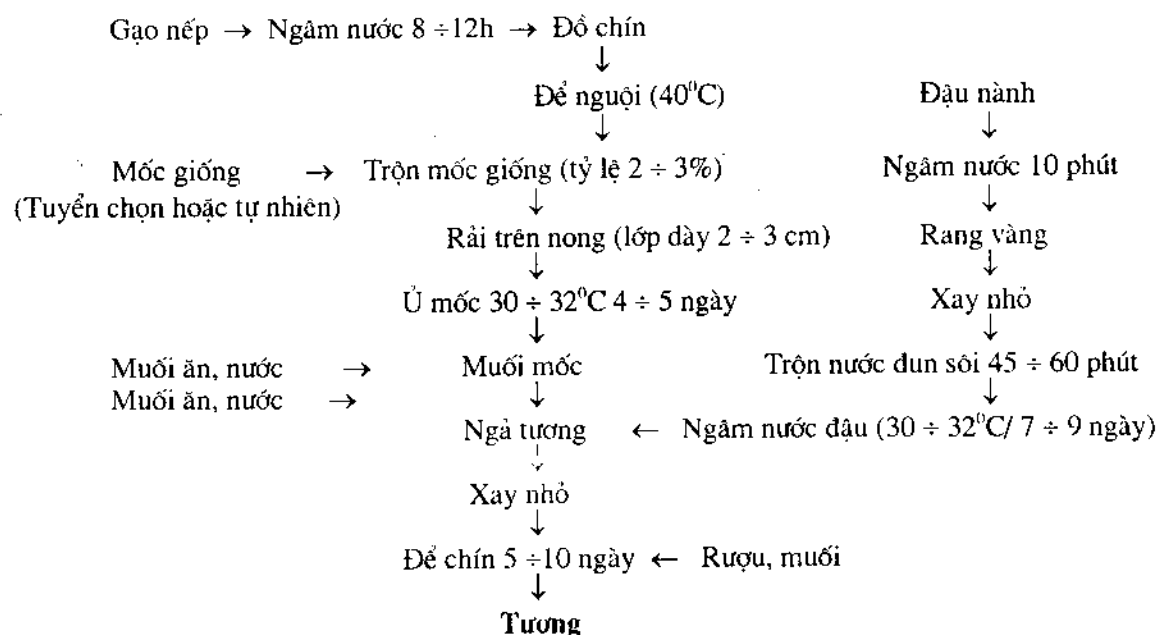
Vi sinh vật: *Mucor mucedo*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *M. rouxii*, *Rhizopus nigricans*, *Synecephalasrum cinereum*, *S. racemosum*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. glaucus*, *A. sydowi*, *A. versicolor*, *Penicillium commune*, *P. cycloplum*, *P. expansum*, *P. notatalum*, *P. puberulum*, *P. roqueforti*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Monilia sitophila*, *Torula convoluta*, *Tricoderma konigi*, *Tr. Lignorum*. (Theo Lê Văn Nhung 1991).

Thời hạn sử dụng: 6 tháng.

Sản xuất: Gia đình.

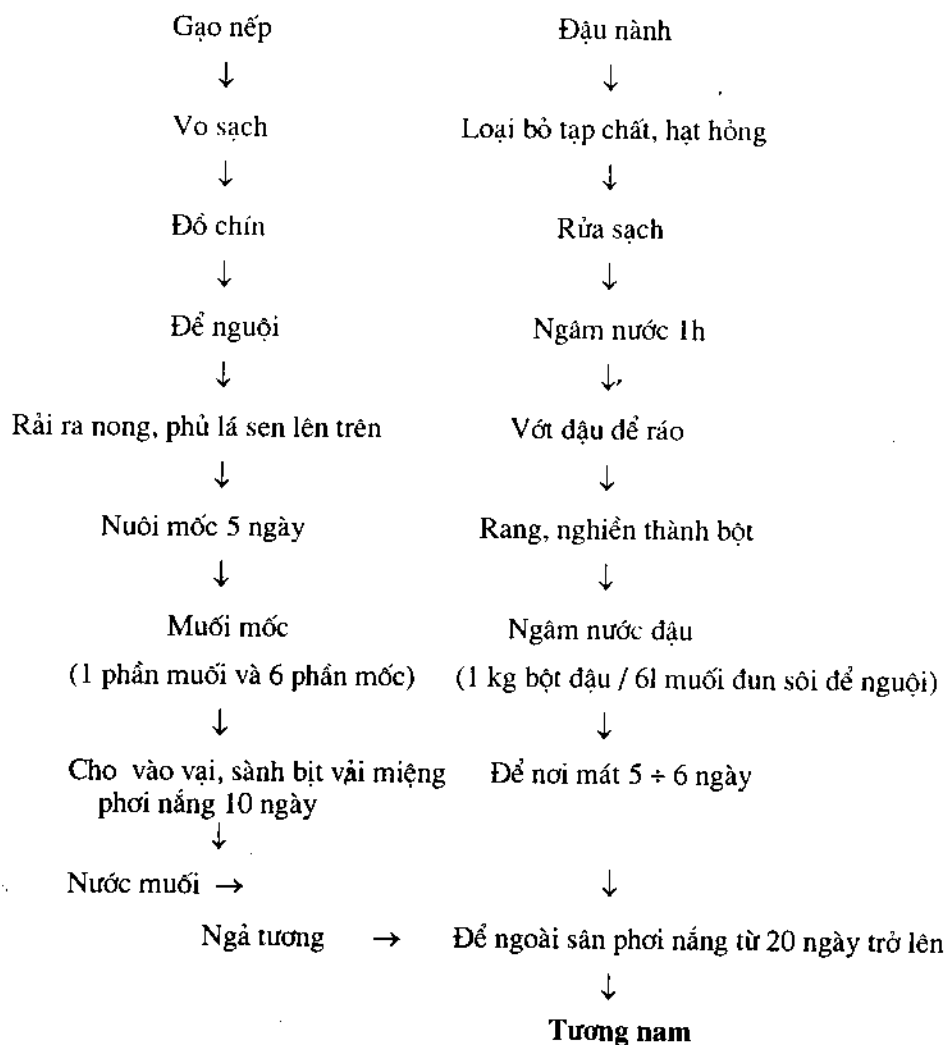
Sử dụng: Gia vị.

Sơ đồ 41. Công nghệ sản xuất tương bắc



III.5.3. Tương nam (Việt Nam)

Sơ đồ 42. Công nghệ sản xuất tương nam



Tên chung: Soybean soy.

Tên địa phương (Việt Nam): Tương .

Nguyên liệu: Gạo nếp 20 kg, đậu nành 10 kg, muối ăn 19 kg, nước đủ 124 lít.

Yêu cầu thành phẩm: Tương màu vàng, mùi thơm, vị ngọt chua mặn, thành phần dinh dưỡng như tương Bần.

III.5.4. Tương đặc (Việt Nam)

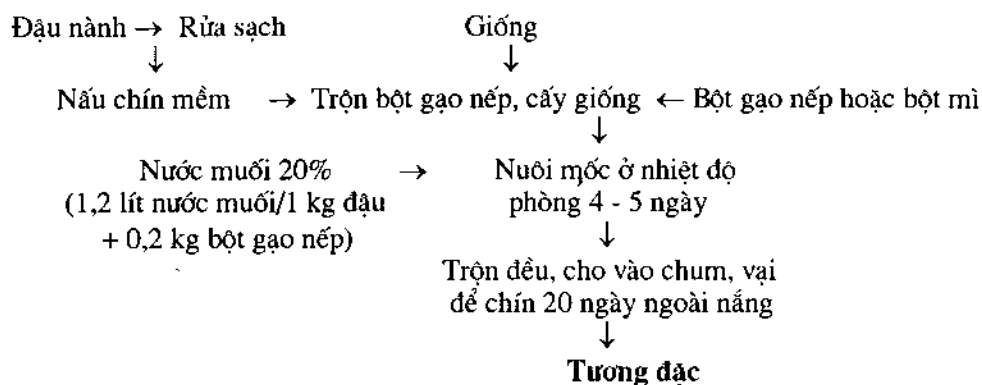
Tên chung: Soybean soy.

Tên địa phương (Việt Nam): Tương đặc.

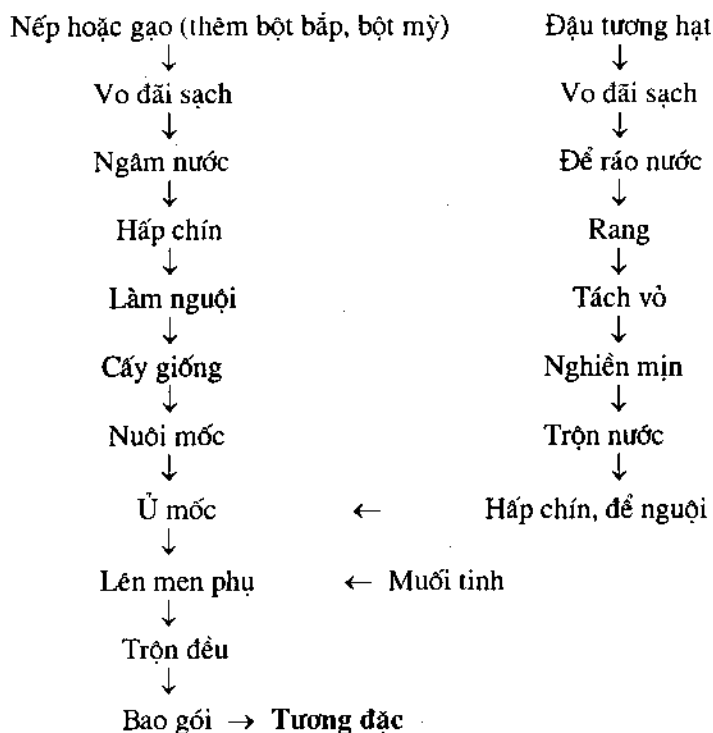
Nguyên liệu: Đậu nành 5 kg, bột gạo nếp 1 kg, muối ăn 0,12 kg, nước 6 lít.

Sơ đồ 43. Công nghệ sản xuất tương đặc

* Công nghệ 1:



* Công nghệ 2:



Yêu cầu thành phẩm: Tương đặc sệt, vị ngọt, mặn, hơi chua.

Vi sinh vật: *Aspergillus oryzae*, *Pediococcus sp.*, *Bacillus subtilis*.

Sản xuất: Gia đình.

Sử dụng: Gia vị.

IV. MỘT SỐ CÔNG NGHỆ LÊN MEN CÁC SẢN PHẨM TRUYỀN THỐNG CHÂU Á

IV.1. MISO và các sản phẩm tương tự

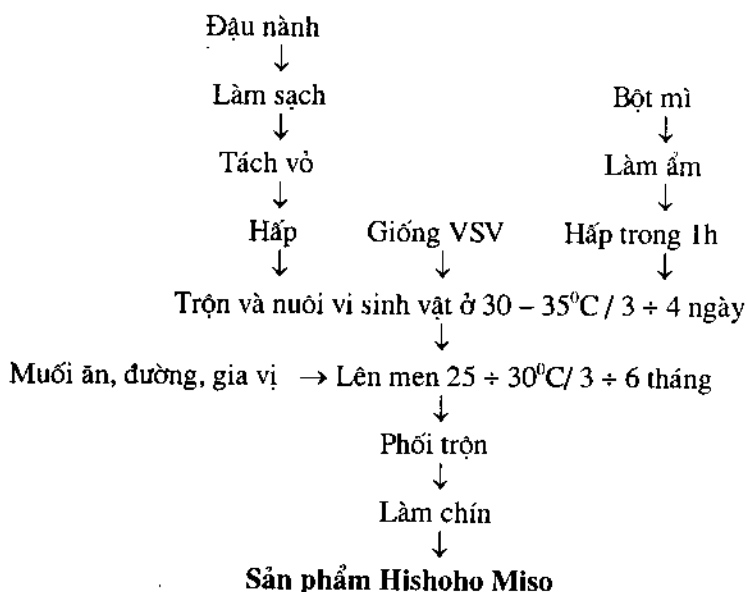
IV.1.1. Hishiho Miso

Tên chung: Miso ngọt.

Tên địa phương (Nhật): Hishiho Miso.

Thành phần nguyên liệu: Đậu nành 40 phần, bột mì 60 phần, muối 17 phần, đường, tàu vị yếu của Nhật, dịch dextroza, gừng, các gia vị thực vật và giống vi sinh vật.

Sơ đồ 44. Công nghệ sản xuất Hishiho Miso



Đặc tính lý học: màu hồng vàng, có vị ngọt hơi mặn với vị thịt đặc trưng.

Đặc tính hóa học: pH = 5,0 ÷ 5,6; độ ẩm 46,4%, tro 8%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 193 cal; protein 6,5%; chất béo 2,7%; đường 33,7%; xơ 37%; Ca 170 mg; Fe 1,9 mg; Na 3000 mg; K 280 mg; B₁ 0,11 mg; B₂ 2,6 mg; niacin 2,6 mg trong 100 g sản phẩm.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *P. halophilus*, *S. rouxii*, *Streptococcus sp.*

IV.1.2.Kome Ama Miso

Tên chung: Miso gạo ngọt.

Tên địa phương (Nhật): Kome Ama Miso.

Nguyên liệu: gạo 22 phần, đậu nành 10 phần, muối 2,6 phần.

Đặc tính lý học: dạng bán rắn, màu vàng sáng đến vàng đỏ, vị ngọt, hơi mặn và có vị thịt.

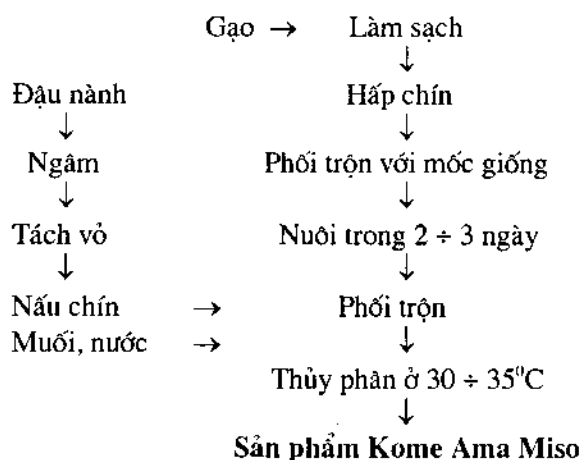
Đặc tính hóa học: pH = 5,2; độ ẩm 42,6%; tro 6,8%.

Giống vi sinh vật: *A. oryzae*, *Streptococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *S. rouxii*.

Thời gian sử dụng và bảo quản: 1 tháng ở 20°C.

Sản xuất theo quy mô công nghiệp.

Sơ đồ 45. Công nghệ sản xuất Kome Ama Miso



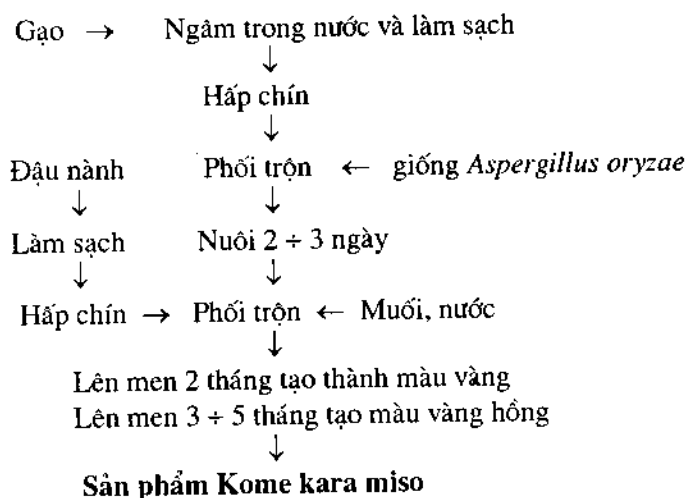
IV.1.3.Kome Kara Miso

Tên chung: Miso gạo mặn.

Tên địa phương (Nhật): Kome kara miso.

Nguyên liệu: Gạo 6 ÷ 10 phần; đậu nành 10 phần; muối 4,3 phần; giống vi sinh vật *Aspergillus oryzae*.

Sơ đồ 46. Công nghệ sản xuất Kome kara miso



Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, vàng sáng mịn và có mùi thịt rất rõ.

Đặc tính hóa học: pH = 5,0 ÷ 5,1; độ ẩm 45,6%; tro 14,4%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 180 cal, protein 12,8%; chất béo 5,8%; hydratcacbon 19,3%; chất xơ 2,3%; Ca 115 mg; P 185 mg; Fe 4,2 mg; Na 5000 mg; vitamin B₁ 0,03 mg; B₂ 0,1 mg; niacin 1,5 mg trong 100g.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *S. rouxii*, *P. halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *T. versatilis*, *T. echellsii*, *Bacillus sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng: chứa trong túi plastic trong 4 tháng ở 20°C với etylic 2%.

Sản xuất theo quy mô công nghiệp, tổng sản lượng là 447 000 tấn/năm và quy mô gia đình 149000 tấn/năm.

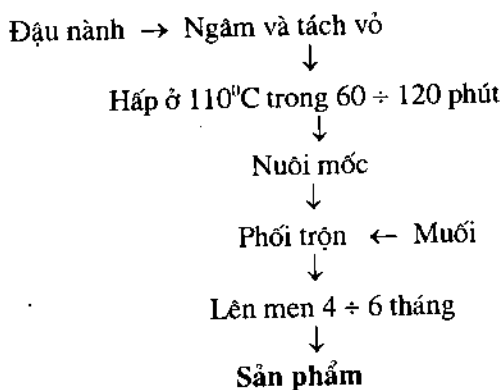
IV.1.4.Mame miso

Tên chung: Miso đậu nành.

Tên địa phương (Nhật): Mame miso.

Nguyên liệu: đậu nành 100 phần; muối 22 phần; bột và giống vi sinh vật.

Sơ đồ 47. Công nghệ sản xuất Mame miso



Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu vàng đỏ, mặn và có mùi thịt rở.

Đặc tính hóa học: pH = 4,35 ÷ 5,3; độ ẩm 44,9%; tro 12,9%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 207 cal; protein 17,2%; chất béo 10,5%; chất xơ 3,2%; Ca 150 mg; P 25 mg; Fe 6,8 mg; Na 4,3 mg; B₁ 0,04 mg; B₂ 0,12 mg; niacin 1,2 mg trong 100 g

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *A. Sojae*, *Streptococcus faecalis*, *T. versatilis*, *Bacillus sp.*

Thời gian sử dụng và bảo quản: 6 tháng trong túi plastic ở 20°C, được sử dụng như một loại gia vị

Sản xuất quy mô công nghiệp với sản lượng 54 000 tấn/năm

IV.1.5.Miso

Tên chung: đậu nành dạng paste.

Tên địa phương (Philippin): Miso.

Nguyên liệu: gạo và đậu nành 80%; lúa mạch 20%; muối.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn hay dạng paste, có màu vàng sáng hay nâu đen, vị mặn và có mùi rất đặc trưng.

Đặc tính hóa học: độ ẩm 66,1%; chất xơ 2,9%; tro 2,2%.

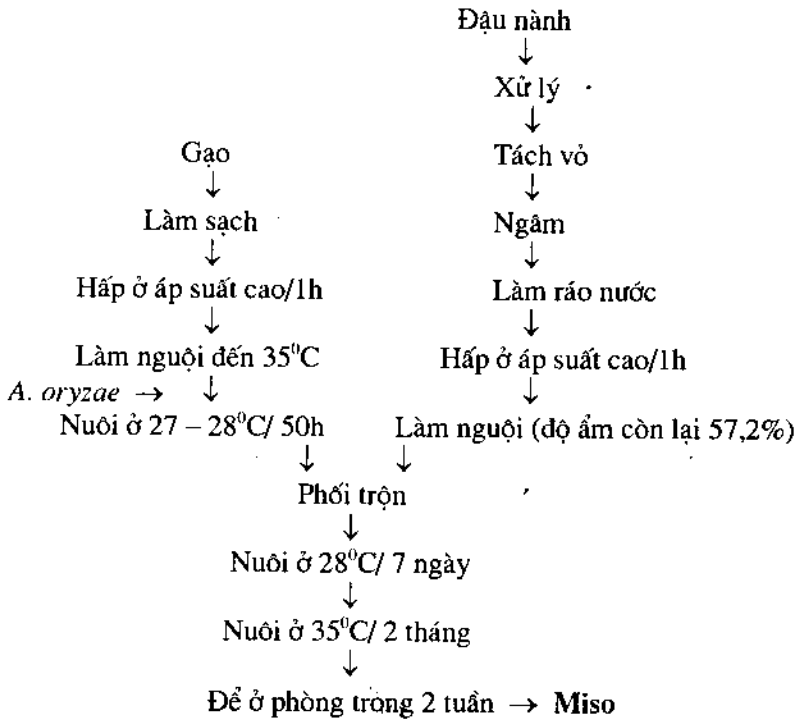
Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 136 cal; protein 13,0%; chất béo 3,5%; hydratecarbon 15,2%; Ca 107 mg; P 112 mg; Fe 2,8 mg; Na 761 mg; K 334 mg; vitamin A 10 IU; thimin 0,09 mg; riboflavin 0,06 mg; niacin 0,4 mg; axit ascorbic vết trong 100 g.

Vi sinh vật: *A. oryzae*

Bảo quản và sử dụng trong vài tháng như một loại gia vị.

Sản xuất thủ công và bán công nghiệp.

Sơ đồ 48. Công nghệ sản xuất Miso



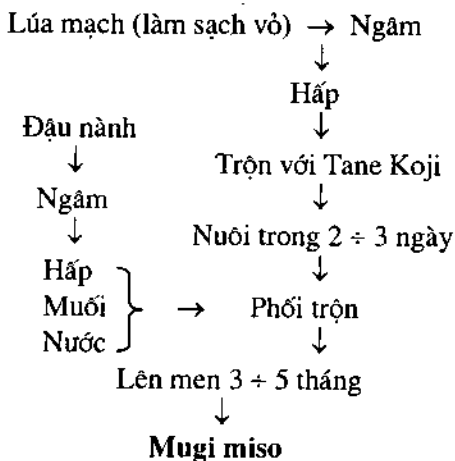
IV.1.6. Mugi miso

Tên chung: Miso lúa mạch.

Tên địa phương (Nhật): Mugi Miso.

Nguyên liệu: lúa mạch 50 phần; đậu nành 50 phần; muối 23 phần; giống Tane Koji.

Sơ đồ 49. Công nghệ sản xuất Mugi Miso



Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, vị mặn và có mùi thịt rõ.

Đặc tính hóa học: pH = 4,78; độ ẩm 44%

Giá trị dinh dưỡng: Năng lượng 192 cal; protein 9,7%; chất béo 4,3%; chất xơ 1,7%; tro 12,0%; Ca 8 mg; P 120 mg; Fe 3,0 mg; Na 4,2 mg; vitamin B₁ 0,04 mg; B₂ 31 mg; niacin 1,5 mg trong 100 g.

Vì sinh vật: *A. oryzae*, *S. rouxii*, *P. halophilus* sp., *Streptococcus faecalis*, *T. versatilis*, *T. echellsii*, *Bacillus* sp.

Thời gian sử dụng và bảo quản: khoảng 4 tháng ở 20°C trong túi plastic có 20% etylic.

Hàng năm sản xuất 94 000 tấn. Trong đó 64 000 tấn sản xuất quy mô công nghiệp và 20000 tấn sản xuất thủ công.

IV.1.7. Tao Chiew

Tên chung: đậu nành dạng paste.

Tên địa phương (Thái Lan): Tao chiew.

Nguyên liệu: đậu nành, muối, gạo, giống vi sinh vật *Aspergillus oryzae*.

Công nghệ sản xuất: nghiền và ngâm đậu nành trong nước, nấu chín hoặc hấp chín, cho *Aspergillus oryzae* nuôi ở 27 ÷ 28°C trogn thời gian 50h. Sau đó, lên men trong 2 tuần.

Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu vàng hoặc màu đỏ nâu, vị mặn và mùi dễ chịu.

Đặc tính hóa học: tổng axit 1,4%; độ ẩm 49,5%; dầu thô 3,5%; muối 4,5%; nifoanin 0,3%; tro 1,6%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 13,2%; đường 17,8%; tinh bột và dextrin 4,8%; chất béo 2,2%; chất xơ 17,7%.

Vì sinh vật: *Trichosporon* sp., *Candida*, *Endonycopsis* sp., *Pichia* sp., *Khochotorula* sp., *A. oryzae*, *S. rouxii*, *T. versatilis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: trong nhiều năm.

Sản xuất thủ công.

IV.2. Natto và những sản phẩm tương tự

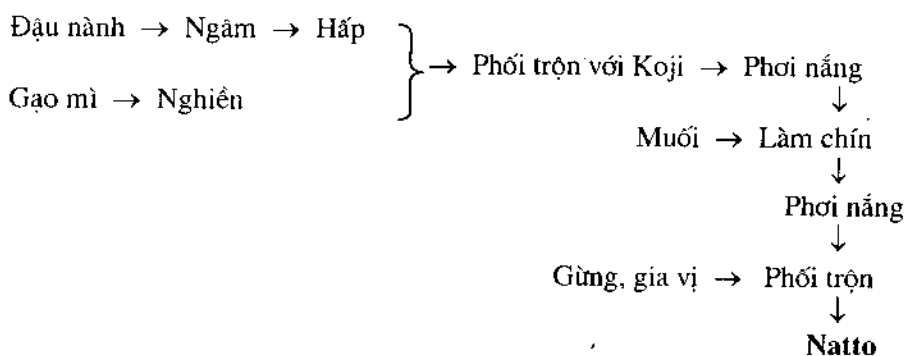
IV.2.1. Hama natto

Tên chung: Natto đậu nành.

Tên địa phương (Nhật): Hama natto.

Nguyên liệu: đậu nành 85%; bột mì 8 ÷ 9%; gừng 1 ÷ 2%; hạt tiêu Nhật 0,5%; muối 4 ÷ 5%.

Sơ đồ 50. Công nghệ sản xuất Hama natto



Đặc tính vật lý: thể rắn, màu đen và có vị rất mặn.

Đặc tính hoá học: pH = 4,7; độ axit 0,2 - 0,3%; độ ẩm 34%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 268 cal; protein 25 - 29%; chất béo 12 - 14%; hydratecarbon 13%; Ca 140 mg; riboflavin 0,25 mg; niacin 0,1 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *A. sojae*, *P. halophilus*, *S. rouxii*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 6 - 12 tháng ở 20°C.

Sản xuất công nghiệp 90%.

IV.2.2. Itoniki natto

Tên chung: đậu nành lên men với *Bacillus natto*.

Tên địa phương (Nhật): Itoniki natto.

Nguyên liệu: đậu nành, giống vi sinh vật *Bacillus natto*.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu nâu nhạt, có mùi thịt.

Đặc tính hoá học: pH = 6,5; nước 59,5%; dầu 1,0%; tro 1,9%.

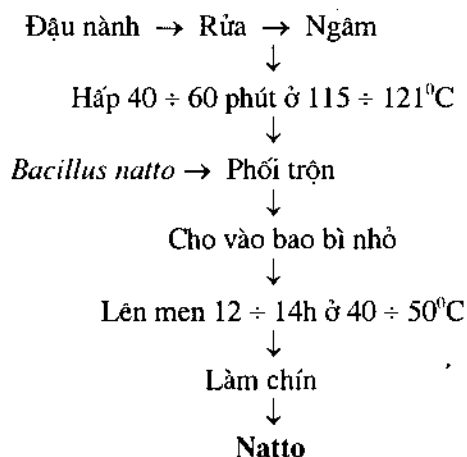
Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 190 cal; protein 16,5%; hydratecarbon 9,8%; chất xơ 2,3%; Ca 90 mg; thianin 0,07 mg; riboflavin 0,56 mg; niacin 1,1 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *B. subtilis* (*B. natto*)

Thời gian bảo quản và sử dụng: phụ thuộc nhiệt độ, thí dụ ở 10°C là 7 ngày, ở 20°C là 2 ngày và 30°C là 2 ngày.

Sản xuất công nghiệp với số lượng 170 000 tấn/ngày.

Sơ đồ 51. Công nghệ sản xuất Itoniki natto



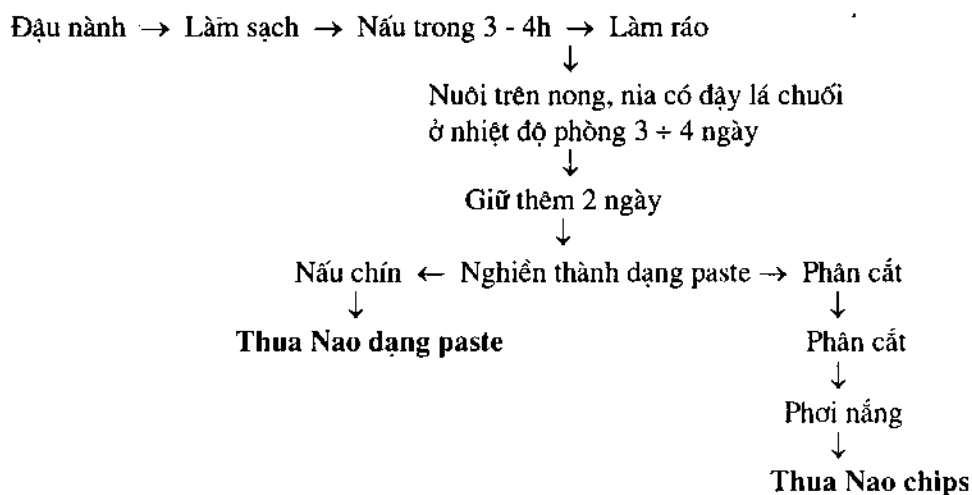
IV.2.3. Thua Nao

Tên chung: Natto đậu nành dạng paste.

Tên địa phương (Thái Lan): Thua Nao.

Nguyên liệu: đậu nành 100%.

Sơ đồ 52. Công nghệ sản xuất Thua Nao



Đặc tính vật lý: dạng bán rắn, màu nâu, có mùi amoniac.

Đặc tính hóa học: pH = 8,4 ÷ 8,6, độ ẩm 61,6 ÷ 62,8%; NH₃ 1,05%; tro 2,5%.

Giá trị dinh dưỡng:

+ Thua Nao: protein 16,0%; chất béo 7,0 - 14,8%; hydratcacbon 11,5%.

+ Thua Nao chips: protein 76,8%; hydratcacbon 19,4%; chất béo 14,8%; chất xơ 12,9%.

Vi sinh vật: *B. subtilis*

Thời gian bảo quản và sử dụng: Thua nao 2 ngày; Thua nao chips trong nhiều năm.

IV.3. Các sản phẩm đậu nành lên men dạng paste và các sản phẩm tương tự khác

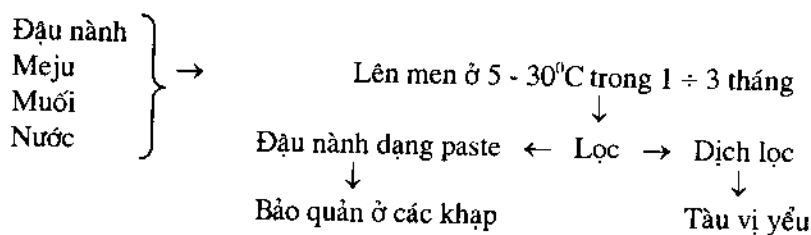
IV.3.1. Doenjang

Tên chung: sản phẩm đậu nành lên men dạng paste (meju).

Tên địa phương (Triều Tiên): Doenjang.

Nguyên liệu: đậu nành 17%; muối 17%; nước 66% (meju).

Sơ đồ 53. Công nghệ sản xuất Doenjang



Tính chất vật lý: dạng rắn, màu nâu, có vị mặn.

Tính chất hóa học: độ ẩm 10%; chất béo 6,4%; hydratcacbon 4,5%.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *B. subtilis*, *B. pumillus*, *Sarcina maxima*, *S. rouxii*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: một vài năm.

Sản xuất 268 757 tấn/năm trong đó 20% sản xuất bằng phương pháp công nghiệp.

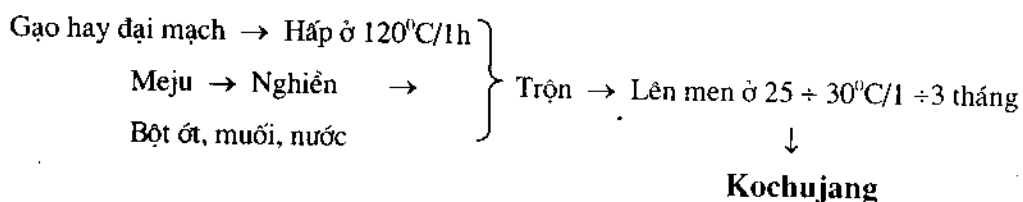
IV.3.2. Kochujang

Tên chung: sản phẩm đậu nành lên men (meju) dạng paste.

Tên địa phương (Triều Tiên): Kochujang.

Nguyên liệu: gạo hay đại mạch 37%, meju 8%; ớt bột 12%, muối 10%, nước 33%.

Sơ đồ 54. Công nghệ sản xuất Kochujang



Đặc tính vật lý: dạng đặc, ngọt và rất cay.

Đặc tính hóa học: pH = 5,0 ÷ 5,8; nước 47,7%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 171 cal; protein 8,9 g; hydratcacbon 25,9 g; Ca 126 mg; thiamin 0,35 mg; riboflavin 6,35 mg; niacin 1,5 mg; axit ascorbic 10 mg; caroten 310 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *S. rouxii*, *Torulopsis versatilis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 6 ÷ 12 tháng phụ thuộc nhiệt độ bảo quản.

Sản xuất công nghiệp 25%, sản xuất thủ công 75%. Tổng sản lượng 133 499 tấn/năm.

IV.3.3. Tao si

Tên chung: đậu nành lên men.

Tên địa phương (Singapor): Tao si.

Nguyên liệu và công nghệ sản xuất: đậu nành được ngâm, làm sạch vỏ và nấu chín. Sau đó làm nguội và làm khô, cho thêm bột mì. Cây *A. oryzae*, nuôi 2 ÷ 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Sau đó cho vào các khay bằng sành, lên men trong 2 tháng.

Đặc tính vật lý: dạng đặc trong dung dịch, màu nâu, vị mặn với mùi đặc trưng.

Đặc tính hóa học: protein, axit amin, muối.

Vi sinh vật: *A. oryzae*.

Sản xuất hoàn toàn thủ công.

IV.3.4. Tauco cair

Tên chung: đậu nành lên men.

Tên địa phương (Indonesia): Tauco cair.

Nguyên liệu: đậu nành 50%; muối 20%; đường 20 - 30%; bột gạo 1%.

Đặc tính vật lý: màu nâu đến nâu đen, mặn, ngọt.

Đặc tính hoá học: pH = 5,4; độ axit 1,03%; nước 53%; tro 12%; chất xơ 2,9%.

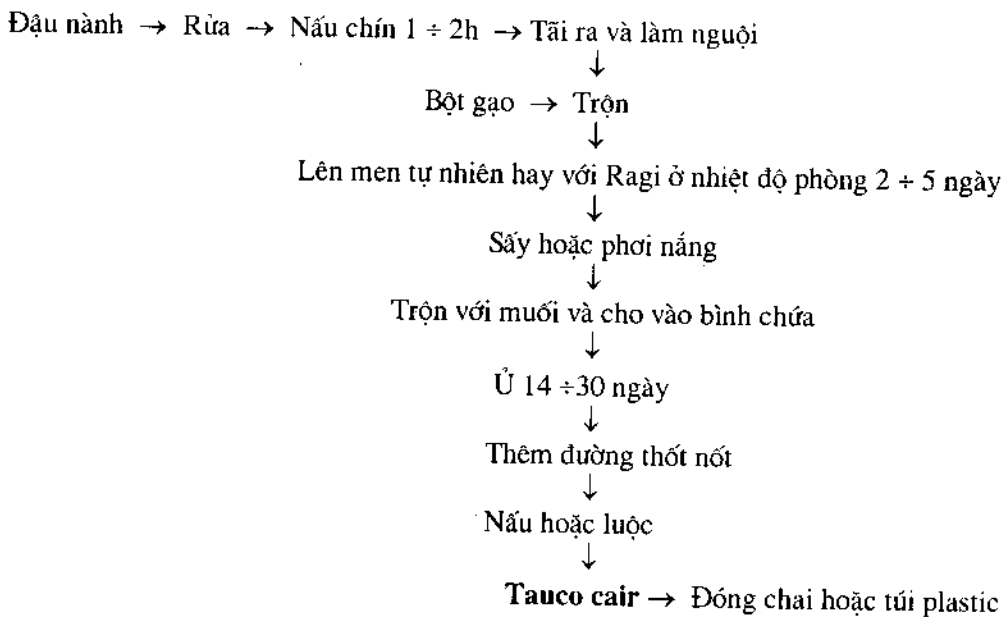
Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 157 cal; protein 11,3%; chất béo 5,4%; hydratecacbon 15,7% trong 100 g.

Vi sinh vật: *Rhizopus oryzae*, *R. oligosporus*, *A. oryzae*.

Thời gian sử dụng và bảo quản: vài tháng

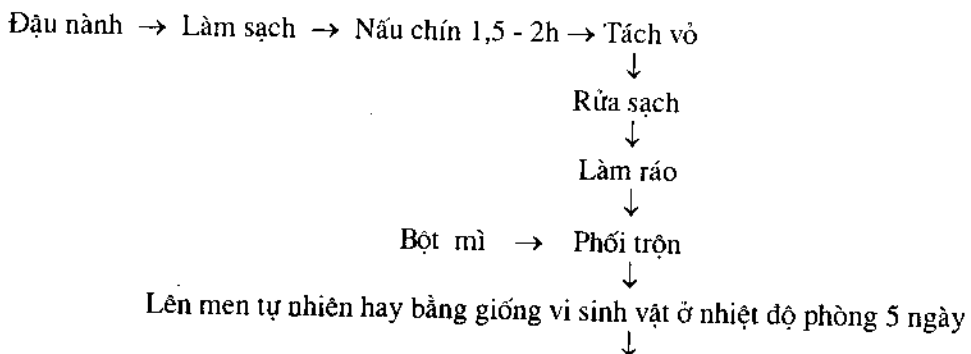
Sản xuất bán thủ công.

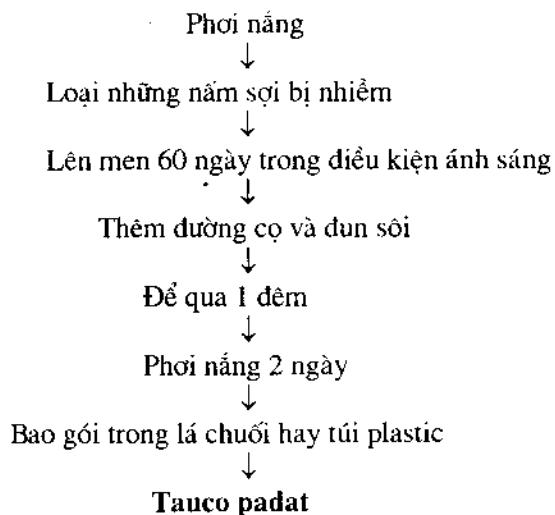
Sơ đồ 55. Công nghệ sản xuất Tauco cair



IV.3.5. *Tauco padat*

Sơ đồ 56. Công nghệ sản xuất Tauco padat





Tên chung: đậu nành lên men .

Tên địa phương (Indonesia): Tauco padat.

Nguyên liệu: đậu nành 50%; khoai mì bột 1 - 5%; muối 15 - 20%; đường thốt nốt 25 - 30%.

Đặc tính lý học: dạng bán rắn, màu nâu đen, vị mặn.

Vi sinh vật: *Rhizopus sp.*

Khả năng bảo quản: 1 năm.

Sản xuất bán công nghiệp.

IV.3.6. Tausi

Tên chung: đậu nành lên men mặn.

Tên địa phương (Philippin): Taosi, Taoshih, Tao Tjo, Tausi.

Nguyên liệu: đậu nành 66,7%; bột đậu nành 3%; dung dịch muối 17%; một ít gừng.

Đặc tính vật lý: dạng đặc, màu đen, vị mặn.

Đặc tính hóa học: độ ẩm 51,5%; chất xơ 2,7%; tro 18,9%.

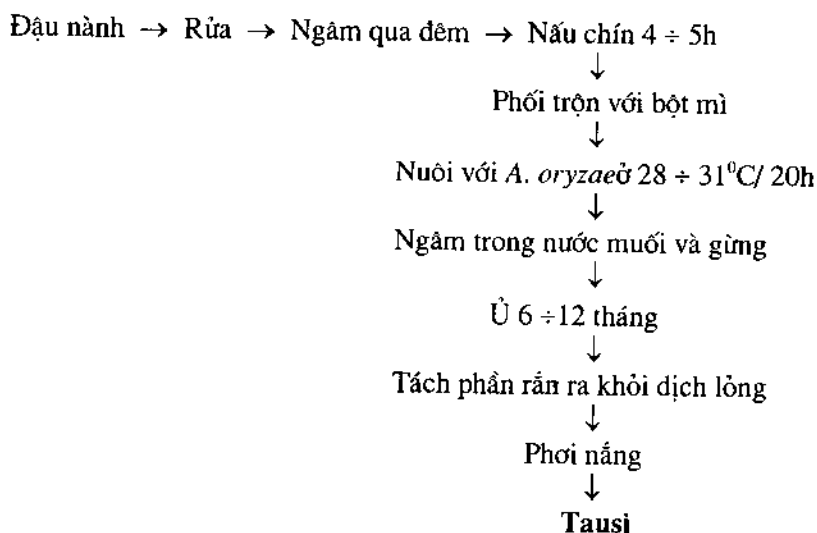
Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 142 cal; protein 13,8%; chất béo 6,9%; hydratcacbon 8,9%; Ca 176 mg; P 180 mg; Fe 8,8 mg; Na 5,683 mg; K 84 mg; vitamin A 35IU; thiamin 0,02 mg; riboflavin 0,23 mg; niacin 1,4 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *A. oryzae*.

Thời gian sử dụng và bảo quản: vài tháng.

Sản xuất bán công nghiệp.

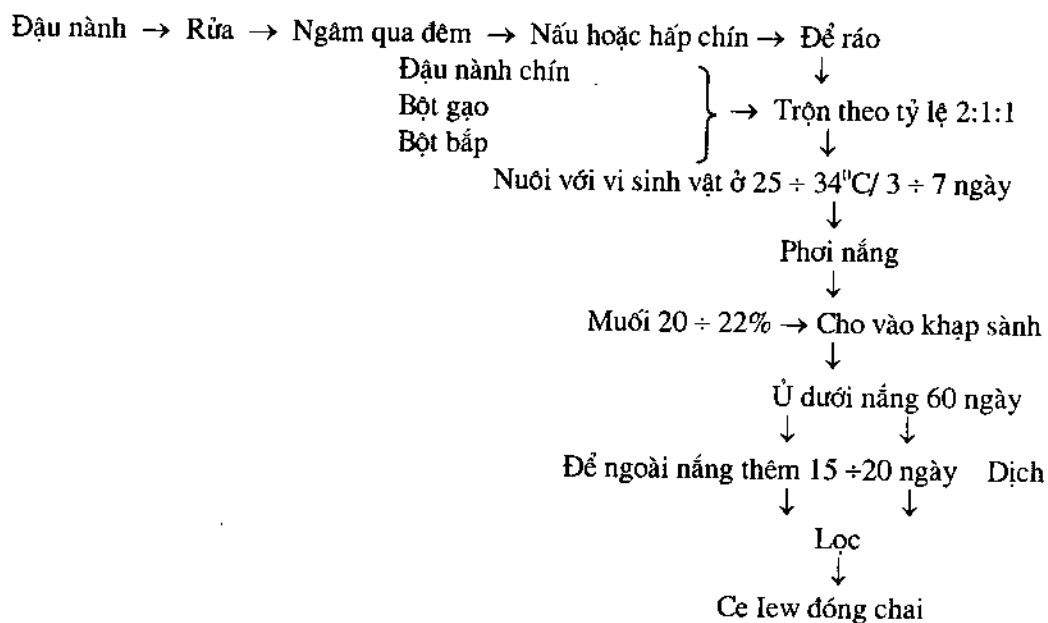
Sơ đồ 57. Công nghệ sản xuất Tausi



IV.4. Nước chấm và các sản phẩm tương tự từ đậu nành

IV.4.1. Ce Iew

Sơ đồ 58. Công nghệ sản xuất Ce Iew



Tên chung: nước chấm từ đậu nành.

Tên địa phương (Indonesia): Kecap asin.

Nguyên liệu: đậu nành 23,5%; bột mì 55%; dung dịch muối 20 - 66%; gia vị.

Đặc tính vật lý: dung dịch màu nâu, vị mặn với mùi thơm dễ chịu.

Khả năng bảo quản: 1 năm.

Sản xuất thủ công và công nghiệp.

IV.4.3. Kecap manis

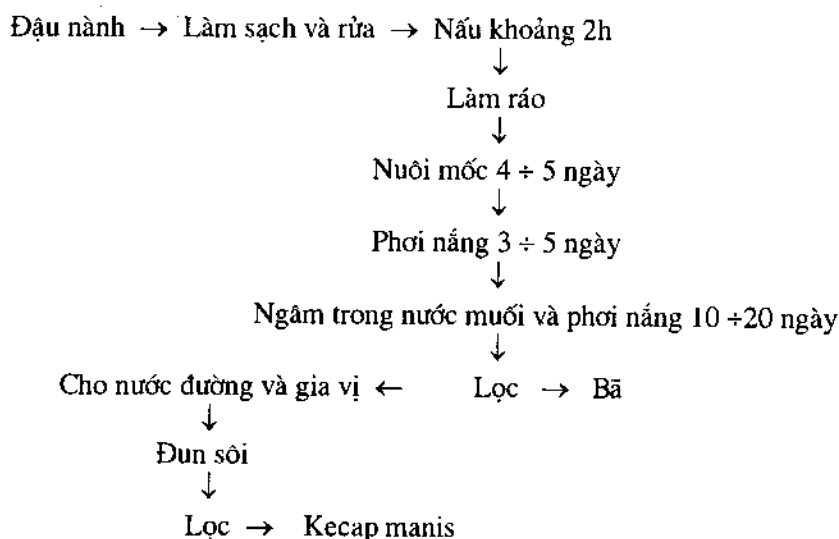
Tên chung: nước chấm ngọt.

Tên địa phương (Indonesia): Kecap Manis.

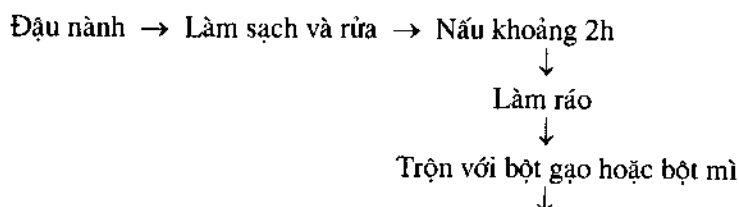
Nguyên liệu: đậu nành 12,5 ÷ 25%; nước muối nồng độ 25 ÷ 30%; đường thề 37 ÷ 50% (dung dịch 55 ÷ 60% đường); bột gạo hay bột mì, gia vị tỏi, gừng.

Sơ đồ 60. Công nghệ sản xuất Kecap manis

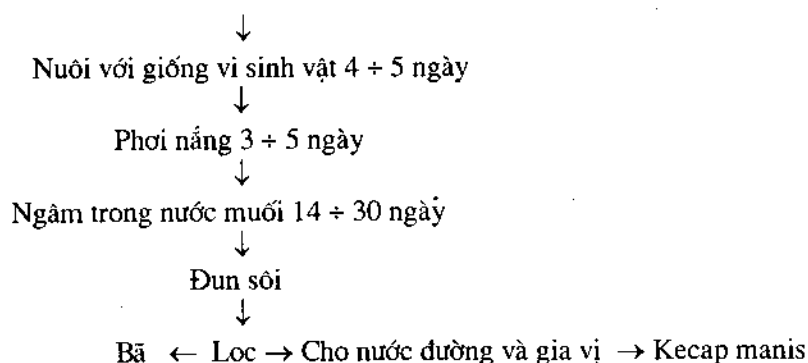
* Công nghệ 1:



* Công nghệ 2



Công nghệ 2 (tiếp theo)



Đặc tính vật lý: dung dịch màu nâu, vị ngọt và mặn nhẹ, mùi thơm dễ chịu.

Đặc tính hóa học: pH = 5,0; nitơ 0,5%; nitơ amin 0,14%; tro 1,5 ÷ 2,0%; nước 47,9%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 162 cal; protein 3,5%; chất béo 2,9%; hydratcacbon 30,7%; Ca 475 mg; P 104 mg; Fe 3,0 mg trong 100 g.

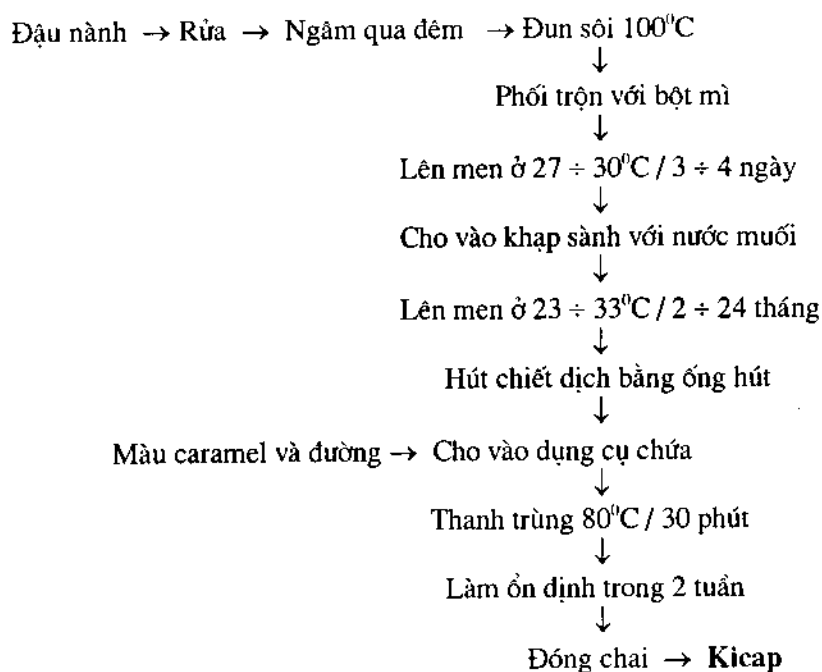
Vi sinh vật: *R. oligosporus*, *R. oryzae*, *A. oryzae*.

Bảo quản và sử dụng trong 1 năm.

Sản xuất theo quy mô công nghiệp và gia đình.

IV.4.4. Kicap Kacang Soya

Sơ đồ 61. Công nghệ sản xuất Kicap



Tên chung: nước chấm từ đậu nành.

Tên địa phương (Malaysia): Kicap Kacang soya, Tauvu.

Nguyên liệu: đậu nành, bột mì, muối, đường, màu caramel, chất bảo quản (axit benzoic), và mật rỉ.

Đặc tính vật lý: dạng dung dịch màu nâu đến màu đen, có mùi thơm đặc trưng.

Đặc tính hoá học: pH = 4,0 ÷ 4,6; độ axit (tính theo axit lactic) 0,24 ÷ 4,70%; axit benzoic 1000 ppm; Na 11,9 ÷ 24,8%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 0,27 ÷ 0,28%; chất béo 0,02 ÷ 0,095%.

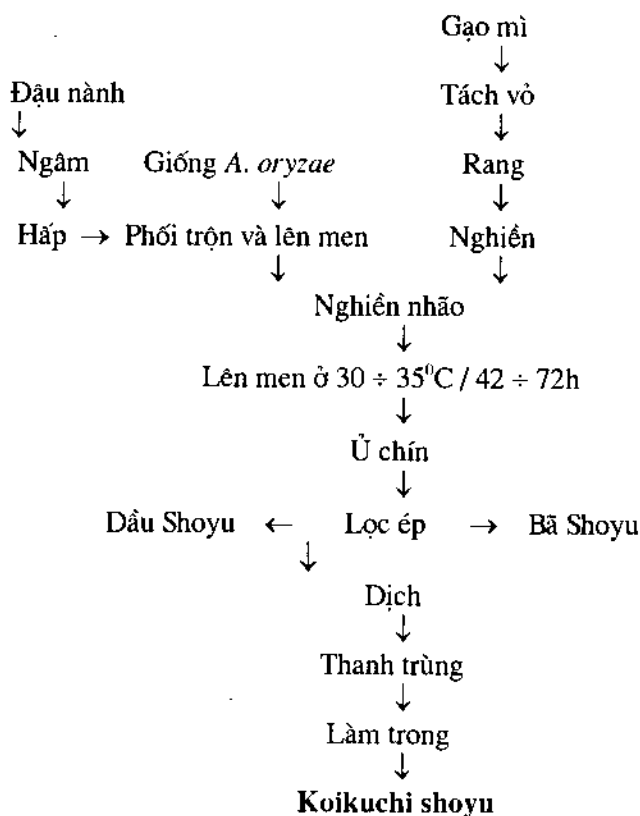
Vi sinh vật: lên men rắn với *A. oryzae*, Lên men dịch có muối với *P. halophilus*, *P. soyae*, *Bacillus sp.*, *B. Licheniformis*, *Pichia sp.*, *Candida sp.*

Thời gian sử dụng và bảo quản phụ thuộc thao tác và phương pháp thanh trùng.

Sản xuất quy mô nhỏ đến 70%.

IV.4.5. Koikuchi Shoyu

Sơ đồ 62. Công nghệ sản xuất Koikuchi shoyu



Tên chung: nước chấm từ đậu.

Tên địa phương (Nhật): Koikuchi shoyu.

Nguyên liệu: bánh đậu tách dầu 3300 kg; gạo mì 3375 kg; nước muối nồng độ 22,5% 1200 lít; giống vi sinh vật.

Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu đỏ vàng, vị mặn với mùi thịt rõ ràng.

Đặc tính hoá học: pH = 4,6 ÷ 5,6; độ ẩm 69,5%; tro 15,9%.

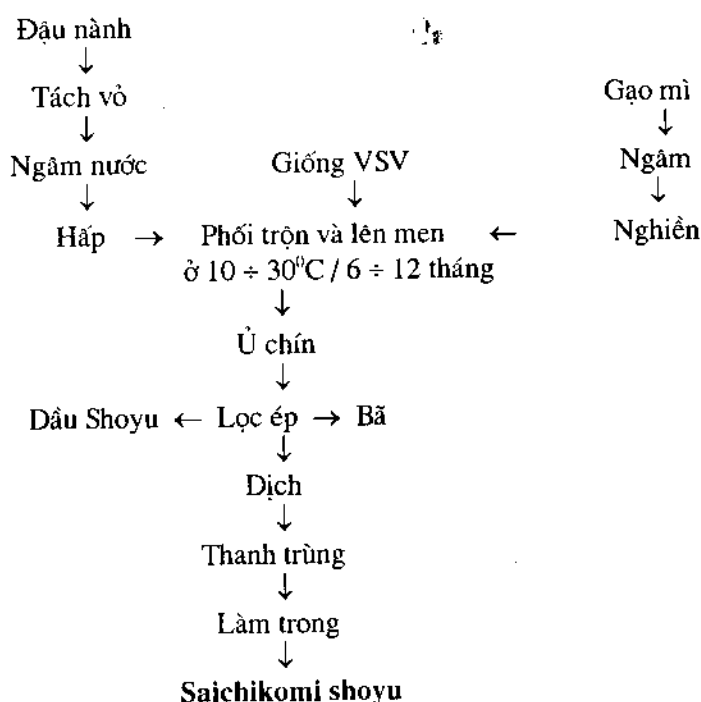
Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 58 cal; protein 7,5%; đường 7,1%; Ca 21 mg; P 140 mg; Fe 1,7 mg; Na 5,9 mg; vitamin B₁ 0,05 mg; B₂ 0,19 mg; niacin 1,1 mg trong 100 g.

Thời gian sử dụng và bảo quản: 1 ÷ 3 năm.

Sản xuất công nghệ với số lượng 920 000 tấn /năm.

IV.4.6. Saichikomi Shoyu

Sơ đồ 63. Công nghệ sản xuất Saichikomi Shoyu



Tên chung: Shoyu lên men .

Tên địa phương (Nhật): Saichikomi Shoyu.

Nguyên liệu: đậu đã tách béo 3300 kg; gạo mì 337 kg; Shoyu nguyên liệu 13100 lít; giống vi sinh vật.

Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu vàng, mặn, có mùi thịt rõ.

Đặc tính hóa học: pH = 4,5 ÷ 4,8; tro 14,0%; độ ẩm 62,5%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 94 cal; protein 0,4%; đường 14,1%; Ca 35 mg; P 200 mg; Fe 4,1 mg; Na 4,9 mg; B₁ 0,05 mg; B₂ 0,21 mg; niacin 1,8 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *S. rouxii*, *T. versatilis*, *T. echllsii*, *P. halophilus*, *S. halomembrans*, *Str. Faecalos*, *Bacillus sp.*

Thời gian sử dụng và bảo quản 1 ÷ 3 năm.

Sản xuất theo quy mô công nghiệp với số lượng 3300 kg/năm.

IV.4.7. Soya sauce

Tên chung: Nước chấm lên men từ đậu.

Tên địa phương (Singapor): Soya sauce.

Nguyên liệu: đậu nành, bột mì, nước muối.

Công nghệ sản xuất: đậu nành tách vỏ, ngâm trong nước 20°C/ 10 ÷ 12h. Sau đó tiến hành hấp khoảng 1h. Làm nguội, rồi trộn với bột mì và nuôi cấy *A. oryzae*. Lên men trong phòng khoảng 4 ngày. Sau đó cho sang các khay bằng sành với nước muối (nồng độ 19%) trong khoảng 6 tháng. Sau đó chiết rút lấy dịch.

Đặc tính vật lý: dạng dung dịch màu vàng, vị mặn với mùi rất đặc trưng.

Đặc tính hoá học: pH = 4,5 ÷ 5,5; muối 18 ÷ 25%; chất rắn tổng cộng 10%.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *Saccharomyces sp.*, *Lactobacillus sp.*

Sản xuất theo qui mô công nghiệp.

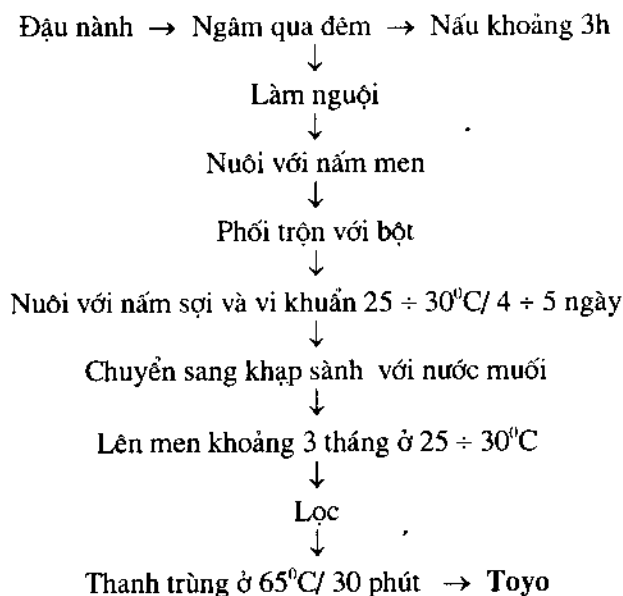
IV.4.8. Toyo

Tên chung: dịch đậu nành lên men.

Tên địa phương (Philippin): Toyo.

Nguyên liệu: đậu nành 66 ÷ 90%; bột đậu nành 10 ÷ 34%; dung dịch muối 15 ÷ 20%; đường thô, giống vi sinh vật.

Sơ đồ 64. Công nghệ sản xuất Toyo



Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu caramel sáng trong đến màu nâu, vị mặn ngọt hay mặn.

Đặc tính hóa học: pH = 4,4 ÷ 5,0; độ ẩm 52 ÷ 56%; axit chung (axit lactic) 0,5 ÷ 1,53%; chất rắn chung 43,6 ÷ 45%; NaCl 18 ÷ 22,43%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 4,6 ÷ 9,3%.

Vi sinh vật: *A. oryzae*, *Hasinula anomala*, *H. sugelliculosa*, *L. clebruki*.

Khả năng bảo quản trên 1 năm.

Sản xuất dạng công nghiệp và thủ công.

IV.5. Tempeh và những sản phẩm tương tự

IV.5.1. Dage

Tên chung: bánh dừa lên men.

Tên địa phương (Indonesia): Dage.

Nguyên liệu: bánh dừa đã tách dầu 99%; giống vi sinh vật 1%.

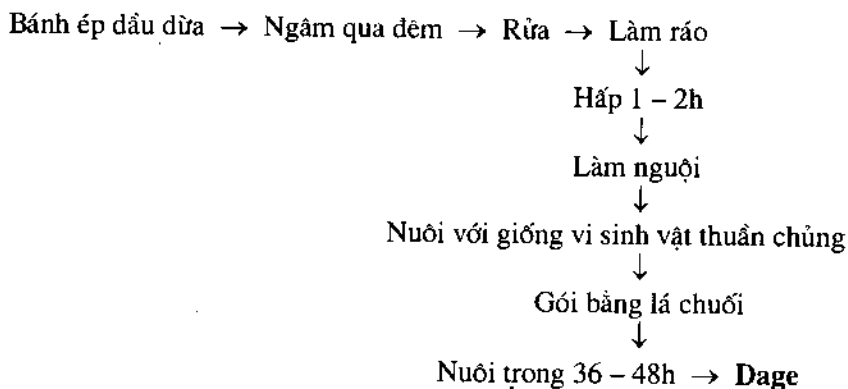
Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu trắng, mùi đặc trưng.

Giống vi sinh vật: *Rhizopus sp.*

Khả năng bảo quản 2 ÷ 4 ngày.

Sản xuất thủ công với công suất nhỏ.

Sơ đồ 65. Công nghệ sản xuất Dage



IV.5.2. Oncom Hitam

Tên chung: bánh đậu phộng lên men màu đen.

Tên địa phương (Indonesia): Oncom hitam.

Nguyên liệu: bánh dừa đậu phộng 40 ÷ 90%; bột khoai mì 10%; bánh dầu dừa 40 ÷ 60%; Tahu 5%; giống vi sinh vật 0,1%.

Đặc tính vật lý: dạng đặc, màu đen, mùi dễ chịu.

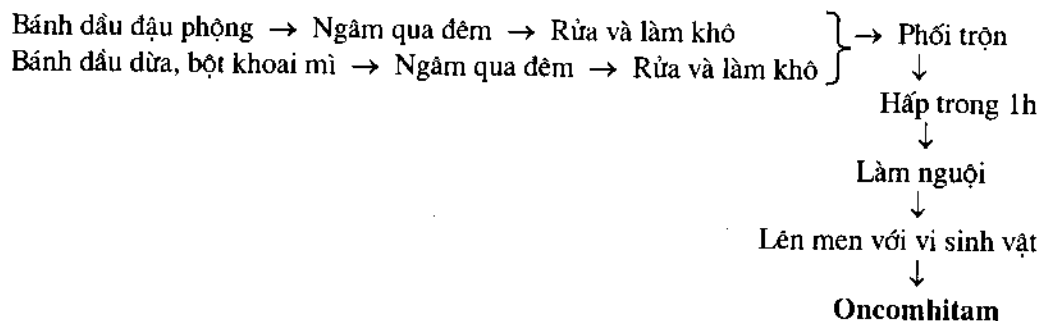
Giống vi sinh vật: *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*

Thời gian bảo quản không quá 3 ngày.

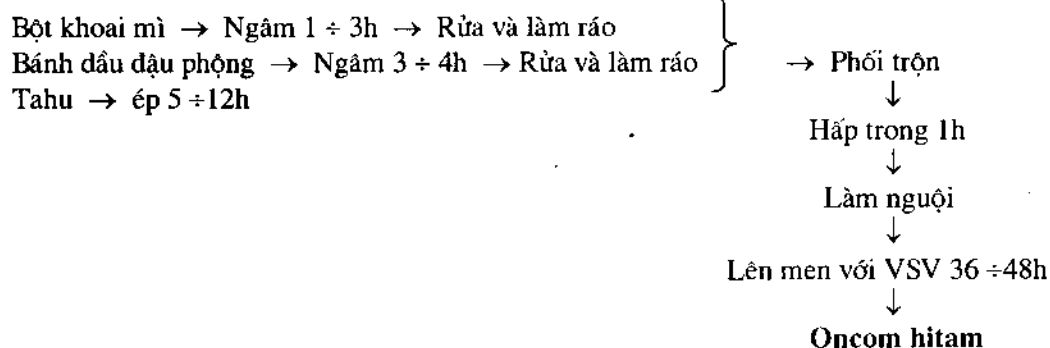
Sản xuất thủ công với công suất nhỏ.

Sơ đồ 66. Công nghệ sản xuất Oncom hitam

*** Công nghệ 1:**



*** Công nghệ 2**



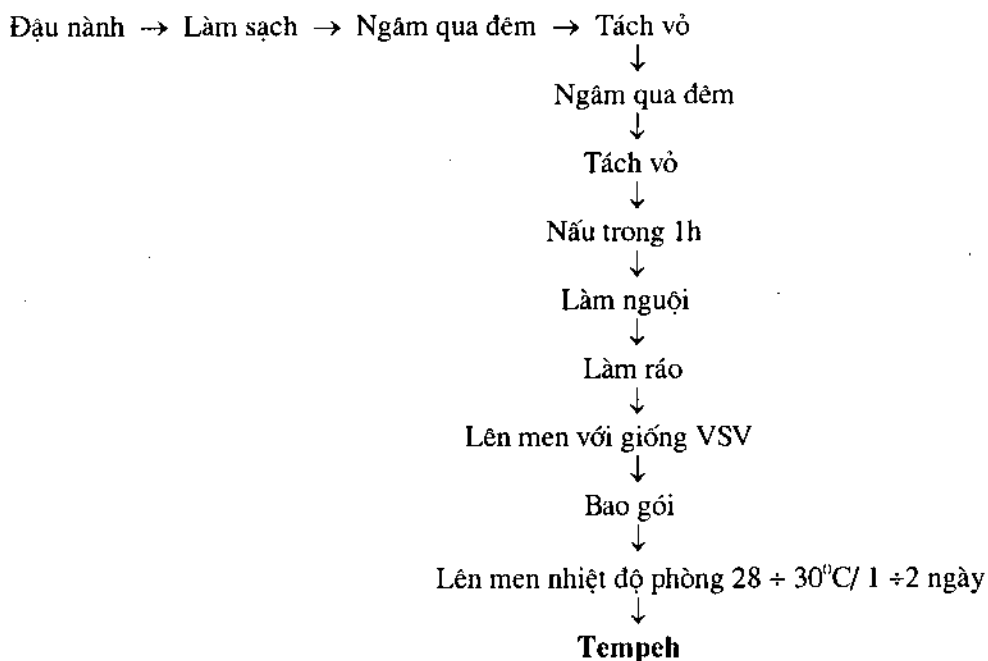
IV.5.3. Tempeh

Tên chung: bánh đậu lên men.

Tên địa phương (Malaixia): Tempeh.

Nguyên liệu: đậu nành 99%; giống vi sinh vật 1%.

Sơ đồ 67. Công nghệ sản xuất Tempeh



Đặc tính vật lý: dạng đặc, màu trắng, nguyên hạt, mùi đặc trưng.

Đặc tính hóa học: pH = 6,5 ÷ 6,8.

Giá trị dinh dưỡng: Protein 18,3%; chất béo 4%; hydratcacbon 12,5%; Ca 130 mg; P 150 mg; Fe 10 mg; vitamin A 50IU; thiamin 0,28 mg; riboflavin 0,65 mg; niacin 2,52 mg trong 100g.

Thời gian bảo quản: 1 ÷ 2 ngày ở 30°C; 4 ÷ 5 ngày ở 5°C.

Sản xuất thủ công.

IV.5.4. Tempeh (Singapor)

Tên chung: bánh đậu nành lên men.

Tên địa phương (Singapor): Tempeh.

Nguyên liệu: đậu nành 99%; giống vi sinh vật 1%.

Công nghệ sản xuất: đậu nành nguyên hạt làm sạch, ngâm qua đêm, tách vỏ và đem nấu chín, làm nguội, làm ráo và cho lên men với *Rhizopus oligosporus* ở 31°C trong 24 ÷ 48h.

Đặc tính vật lý: dạng bánh cứng, màu trắng, mùi đặc trưng.

Đặc tính hóa học: pH = 7,3

Giá trị dinh dưỡng: có đầy đủ protein, axit amin, chất béo, vitamin.

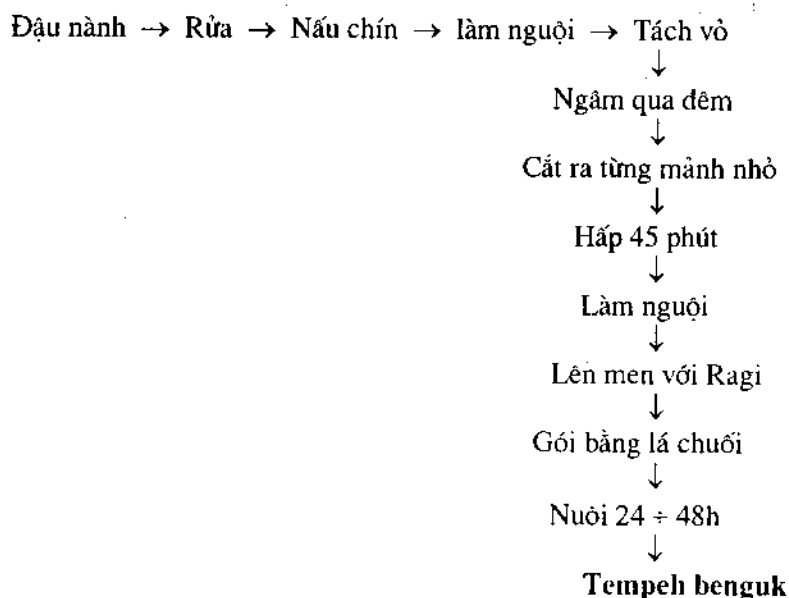
Vi sinh vật: *Rhizopus oligosporus*.

Bảo quản trong 2 ngày.

Sản xuất thủ công.

IV.5.5. Tempeh Benguk

Sơ đồ 68. Công nghệ sản xuất Tempeh Benguk



Tên chung: đậu nành lên men.

Tên địa phương (Indonesia): Tempeh Benguk.

Nguyên liệu: đậu Velvet (*Mucuna Pruriens*) 99,9%; giống vi sinh vật 0,1%.

Đặc tính vật lý: dạng bánh đặc, màu trắng, có vị chua ngọt.

Đặc tính hóa học: độ ẩm 56,6 – 59,2%; tro 0,7%; xơ 1,8 – 2,0%; pH = 6,5 ÷ 7,2.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 168; protein 13,1 – 13,4%; chất béo 2,2%; hydratcacbon 23,5 – 36,9% trong 100g.

Vi sinh vật: *R. oryzae*, *R. oligosporus*, *R. arrbizus*.

Thời gian sử dụng 1 ngày.

Sản xuất hoàn toàn thủ công.

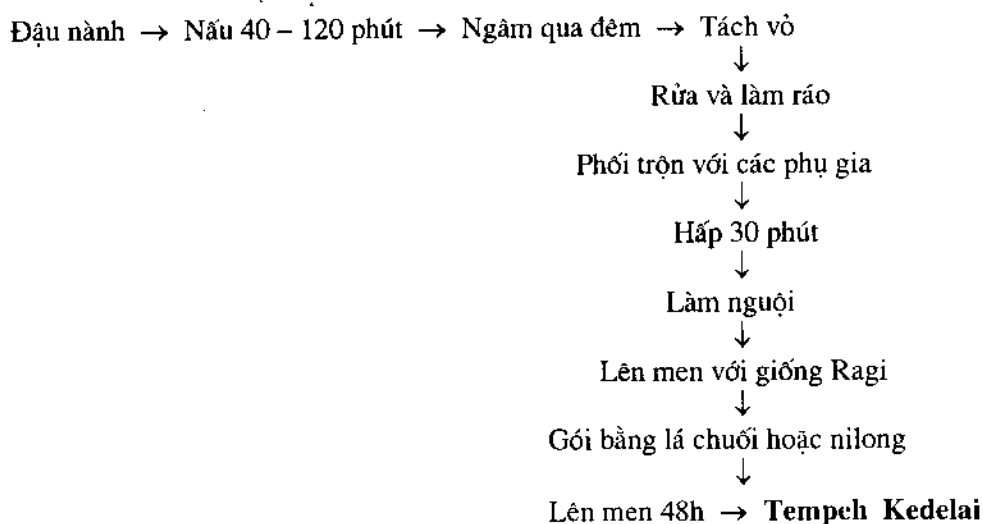
IV.5.6. Tempeh Kedelai

Tên chung: đậu nành lên men.

Tên địa phương (Indonesia): Tempeh Kedelai.

Nguyên liệu: đậu nành 60 ÷ 100%; phụ gia (bột khoai mì, bột bánh dừa...) 0 ÷ 4%; giống Ragi 0,1%.

Sơ đồ 69. Công nghệ sản xuất Tempeh Kedelai



Đặc tính vật lý: dạng bánh đặc, màu trắng, mùi dễ chịu.

Đặc tính hoá học: năng lượng 150 cal; protein $14 \div 15\%$; chất béo $7,7 \div 8\%$; hydratcacbon $9,1 \div 17\%$; Ca 517 mg; P 202 mg; caroten 35 mg; B₁ 0,17 mg trong 100 g.

Giống vi sinh vật: *Rhizopus sp.*, *R. oligosporus*, *R. oryzae*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 1 ÷ 2 ngày.

Sản xuất hoàn toàn thủ công.

IV.6. Dạng tương

Dạng tương là một sản phẩm mới được sản xuất ở nước ta trong thời gian khoảng 20 năm nay. Sản phẩm này có thành phần dinh dưỡng gần giống với sản phẩm Mắm sì của người Trung Quốc, Miso của người Nhật và Tempơ của người Indonesia.

Dạng tương là sản phẩm dạng nhão, có độ ẩm khoảng $52 \div 54\%$, rất dễ dàng bao gói trong túi polietylen và dễ dàng vận chuyển.

Thành phần hóa học của dạng tương như sau: Nước 54,5%; protein 16,62%; glucit 3%; NaCl 12,13%.

Hầu như toàn bộ các thành phần hoá học có trong đậu nành được chuyển sang dạng tương. Tuy nhiên, do quá trình thủy phân của enzym proteaza và amilaza nên giá trị dinh dưỡng của dạng tương cao hơn hẳn giá trị dinh dưỡng của đậu nành trước khi đưa vào sản xuất.

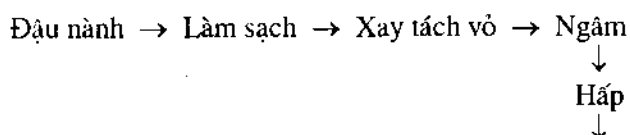
Nếu so sánh với các thực phẩm khác, dạng tương xấp xỉ dạng trong cá và ít hơn dạng trong thịt. Riêng lượng đạm hoà tan thấy cao hơn cả dạng của cá và dạng của thịt.

Ngoài giá trị dinh dưỡng có trong dạng tương ra, dạng tương ép có ưu điểm là có thể dùng như nguyên liệu để sản xuất các món ăn khác như nước chấm, nước sốt, các loại canh, các loại chả và làm nhân bánh.

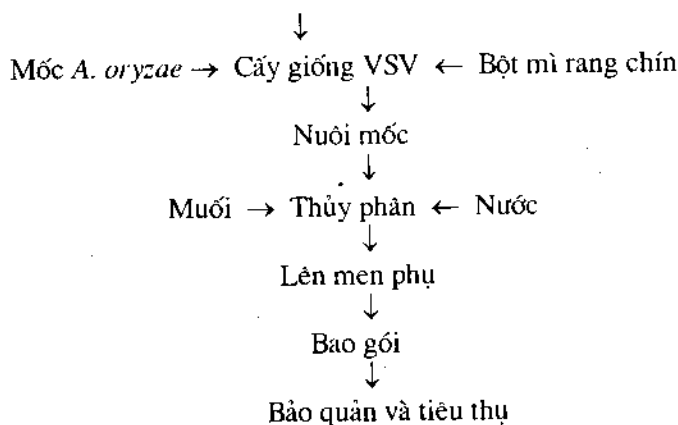
IV.6.1. Phương pháp sản xuất

Sản xuất tương giống như sản xuất nước chấm lên men, do đó có thể sử dụng toàn bộ trang thiết bị của nhà máy sản xuất nước chấm lên men để sản xuất dạng tương.

Sơ đồ 70. Quy trình sản xuất dạng tương



Sơ đồ 70 (tiếp theo)



IV.6.2. Lưu ý các công đoạn chính sau

IV.6.2.1. Xử lý nguyên liệu

Đậu nành được làm sạch và rang chín. Quá trình rang chín có các tác dụng như sau: Dưới tác dụng của nhiệt protein sẽ bị biến tính tạo điều kiện dễ dàng cho enzym proteaza hoạt động và dễ dàng cho quá trình thủy phân sau này. Đậu sau khi rang sẽ tạo mùi và tạo màu sắc thích hợp cho sản phẩm.

Sau khi rang, xay, tách vỏ, đậu được ngâm nước trước khi hấp. Lượng nước ngâm khoảng 80 – 90% tùy thời tiết. Thời gian ngâm là 4 – 5 giờ, thời gian hấp 3 – 4,5 giờ.

IV.6.2.2. Nuôi nấm mốc *A. oryzae*

Quá trình nuôi nấm mốc cũng giống như trong sản xuất nước chấm, điều khác là trong sản xuất đậm tương sử dụng lượng bột mì cao hơn (15%) nên mốc ở đây phát triển tốt hơn.

Bột mì sau khi rang chín đem trộn đều với mốc giống tỷ lệ 1 ÷ 2%. Đậu nành sau khi hấp chín được làm nguội, trộn đều với bột mì và mốc giống. Nuôi ở 30°C, độ ẩm không khí 90 ÷ 95%, độ ẩm nguyên liệu (khối mốc ủ) 65 ÷ 70%. Sau 16 ÷ 20 giờ nuôi sẽ xuất hiện các sợi tơ trắng và kết thành bánh. Cần phải đảo trộn và làm tơi hạt đậu. Sau 22 ÷ 24 giờ nấm sẽ tạo bào tử và sau 36 ÷ 40 giờ sẽ chuyển sang màu vàng. Đến lúc này kết thúc giai đoạn nuôi mốc.

IV.6.2.3. Thủy phân

Có hai yếu tố quyết định quá trình thủy phân. Đó là lượng nước cho thêm vào và lượng muối.

Lượng nước cần là 70%.

Lượng muối cần là 60%.

Nhiệt độ thủy phân duy trì 45 ÷ 50°C.

Thời gian thủy phân 2,5 ÷ 3 giờ.

IV.6.2.4. Lên men phụ

Lên men phụ là thời gian tạo hương cần thiết cho sản phẩm. Giai đoạn này xuất hiện nấm men *S. rouxii* và các loại vi khuẩn tạo hương khác. Kết quả sự phát triển của nấm men và vi khuẩn cho ra các loại rượu, các axit hữu cơ, các axit béo tạo thành trong quá trình thủy phân sẽ tác dụng với etanol tạo nên các este của chất béo.

Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men là $28 \div 30^{\circ}\text{C}$. Cần phải cho thêm một lượng nước và muối nhất định để tạo điều kiện cho quá trình tạo hình và vận chuyển.

Lượng nước cho thêm bằng 30% so với nguyên liệu. Với lượng nước này, sau 1 tuần lên men phụ sản phẩm sẽ mất mùi mốc, sau 2 tuần sẽ có hương thơm đặc biệt và là sản phẩm tiêu dùng được ngay.

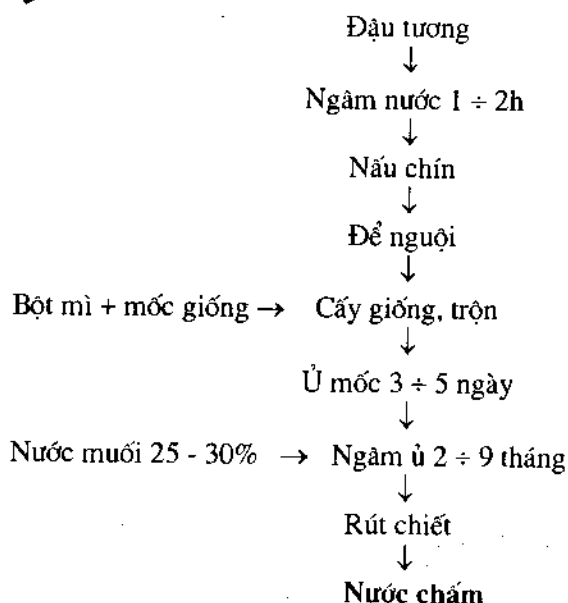
Lượng muối cho vào giai đoạn này là 25% so với nguyên liệu. Nước và muối cho vào đánh nhuyễn tan đều với sản phẩm.

Sau 5 ngày lên men phụ, đảo trộn lần thứ nhất, sau 10 ngày đảo trộn lần hai, sau đó rắc một lớp mỏng trên bề mặt. Sau 15 ngày lên men phụ đem bao gói và sử dụng.

Bao gói đậm tương trong túi polietylen có thể bảo quản và tiêu thụ trong $1,5 \div 2$ tháng. Từ 1kg đậu nành có thể sản xuất được 1,8 kg đậm tương.

IV.7. Nước chấm (Việt Nam)

Sơ đồ 71. Công nghệ sản xuất



Tên chung: Soy sauce.

Tên địa phương (Việt Nam): Nước chấm, xì dầu.

Nguyên liệu: Đậu tương 10 kg, bột mì 1 ÷ 2 kg, muối ăn 8 ÷ 9 kg (thu 30 lít nước chấm loại 10 ÷ 13 g Nitơ / lít).

Yêu cầu thành phẩm:

Đặc tính vật lý và cảm quan: Nước chấm có màu nâu sẫm.

Đặc tính hoá học: Chất khô chiếm 32,5 ÷ 38,7% đậm toàn phần 1,5 ÷ 2,5, đạm amoniac 0,1 - 0,2%, NaCl 20 ÷ 25%, độ axit (theo axit acetic) 0,6 ÷ 0,9%, pH = 5,05 ÷ 6,2, tỷ trọng 1,15 ÷ 1,25.

Giá trị dinh dưỡng: cacbonhydrat 1,45 ÷ 5,3%, lipit 1,7 ÷ 2,5%, đạm amin 0,85 ÷ 1,3%

Vì sinh vật : *Aspergillus oryzae*.

Thời hạn sử dụng: Phụ thuộc vào điều kiện bảo quản.

Sản xuất: Công nghiệp nhỏ.

Sử dụng: Gia vị.

CHƯƠNG 8

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ RAU QUẢ

I. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT RAU, QUẢ MUỐI CHUA VIỆT NAM

I.1. Cơ sở lý thuyết của quá trình muối chua rau quả

Muối chua rau quả là một quá trình lên men lactic mà nguyên liệu là rau, quả, đường, muối và gia vị.

Trong quá trình lên men xảy ra hàng loạt quá trình: quá trình trích ly hay thẩm thấu các chất từ mô bào thực vật, quá trình tăng sinh khối của vi sinh vật (chủ yếu là vi khuẩn lactic), quá trình tạo axit lactic, quá trình ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây thối bởi axit lactic và muối, quá trình tạo hương của sản phẩm. Quá trình lên men này hoàn toàn là quá trình lên men tự nhiên gây ra bởi nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau. Bởi vậy quá trình này xảy ra ba giai đoạn cơ bản:

- Giai đoạn thứ nhất: đường và các chất hòa tan có trong dịch bào của mô bào thực vật được thẩm thấu ra ngoài, nhờ vậy tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn lactic và một số vi sinh vật khác phát triển. Điều dễ nhận thấy là trên bề mặt khối dịch lên men có nhiều bọt khí. Khí tạo thành do hoạt động của các vi sinh vật tạo khí. Trong giai đoạn này vi khuẩn *Leuconostoc mensesenteroides* phát triển rất mạnh. Loài vi khuẩn này sinh axit lactic và sinh khí. Lượng axit lactic ở giai đoạn này rất nhỏ (<1%).

- Giai đoạn thứ hai: trong giai đoạn này số lượng vi khuẩn lactic đạt cao nhất, đồng thời axit lactic tích tụ rất nhiều, pH dịch lên men giảm nhanh. Do tác dụng của axit lactic mà các vi khuẩn gây thối giảm mạnh. Trong giai đoạn này, hương vị đặc trưng của sản phẩm lên men bắt đầu hình thành, chất lượng sản phẩm cuối cùng phụ thuộc nhiều ở giai đoạn này. Cuối giai đoạn hai lượng axit lactic đạt cực đại và tác động ngược lại với vi khuẩn lactic, quá trình lên men chuyển sang giai đoạn thứ ba.

- Giai đoạn ba: ở giai đoạn này vi khuẩn lactic chết dần trong khi nấm sợi và nấm men tăng dần số lượng. Do sự phát triển mạnh của nấm sợi axit lactic bắt đầu giảm dần tới sự hư

hồng nhanh chóng của sản phẩm. Khối rau, quả lên men bắt đầu bị các vi khuẩn P gây thối. Để kéo dài giai đoạn ba nên đưa sản phẩm kết thúc ở giai đoạn 2 vào điều kiện lạnh ($2 - 4^{\circ}\text{C}$) hay dùng hoá chất chống nấm sợi, nấm men và vi khuẩn gây thối, thường sử dụng axit sorbic và benzoat natri.

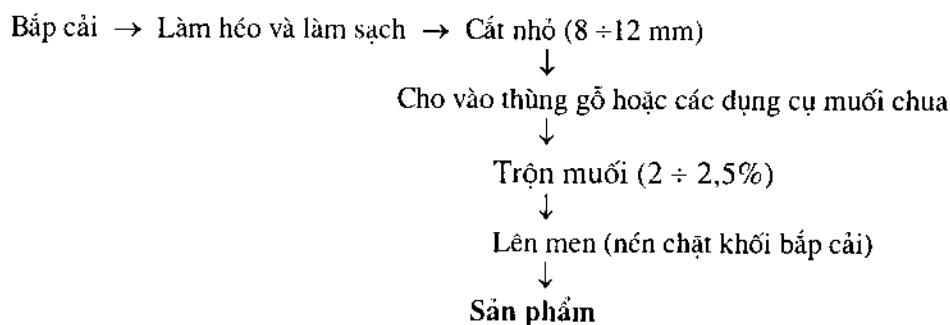
1.2. Một số công nghệ muối chua rau, quả

1.2.1. Muối chua bắp cải

Bắp cải là một loại rau được trồng và sử dụng nhiều ở Việt Nam. Trong bắp cải có: protein: $1,1 \div 2,3\%$; tro: $0,6 \div 0,7\%$; đường: $2,6 \div 5,3\%$; vitamin C: $15 \div 17\%$; xenluloza: $0,6 \div 1,1\%$.

Không phải tất cả các loại bắp cải đều có thể làm nguyên liệu tốt cho việc muối chua. Để muối chua phải chọn loại bắp cải có hàm lượng đường cao, mô lá không quá giòn, có chứa $4 \div 5\%$ đường là tốt nhất. Không nên dùng lá quá giòn và quá non hoặc lá bị sâu bệnh. Quy trình lên men được thực hiện như sau:

Sơ đồ 72. Công nghệ sản xuất dưa chua



Trong quá trình lên men lưu ý mấy điểm sau: dung dịch muối cho vào sao cho ngập khối rau. Thời gian lên men là 10 ngày ở 20°C . Nếu nhiệt độ lên men cao hơn 20°C thì thời gian lên men sẽ ngắn hơn, hoặc nếu lên men ở nhiệt độ thấp hơn 20°C thì thời gian kéo dài hơn. Quá trình lên men lactic sẽ ngừng lại khi lượng axit lactic đạt $1,5 \div 2,4\%$ và sản phẩm có hương vị tốt nhất bằng cách điều chỉnh nhiệt độ lên men. Sản phẩm thu nhận được đem tiêu thụ hoặc bảo quản lạnh dùng dần.

1.2.2. Muối chua cải bẹ

Cải bẹ là một loại rau được trồng nhiều ở miền Bắc Việt Nam. Cũng chính vì vậy cải bẹ được xem như là một nguyên liệu cơ bản để lên men. Cải bẹ được dùng làm nguyên liệu để lên

men là loại rau có hàm lượng đường trung bình là $3 \div 3,5\%$. Công nghệ lên men không khác nhiều khi so với công nghệ lên men bắp cải. Một số điểm cần lưu ý trong khi lên men cải bẹ như sau:

Hàm lượng muối là $6 \div 9\%$ so với khối lượng rau.

Cho thêm $1,0 \div 1,5\%$ đường nếu lượng đường trong nguyên liệu thấp.

Nhiệt độ thích hợp cho quá trình lên men cải bẹ tốt nhất là $20 \div 25^{\circ}\text{C}$. Ở nhiệt độ này sản phẩm có chất lượng tốt nhất. Nếu lên men ở nhiệt độ cao sản phẩm có màu xỉn và có mùi lạ.

Thời gian kết thúc lên men là $15 \div 16$ ngày.

Để tăng hương vị cho sản phẩm có thể cho hành tươi (khoảng $4 \div 5\%$), trộn đều với cải bẹ trước khi lên men.

Sau khi kết thúc giai đoạn hai, sản phẩm nên bảo quản ở điều kiện lạnh.

1.2.3. Muối cà

Cà bát là loại quả được trồng nhiều ở miền Bắc Việt Nam và cà pháo là loại quả được trồng khắp nơi trong nước. Các loại cà thích hợp cho muối chua là các loại cà có hàm lượng đường $3,5 \div 4,0\%$. Cà non quá và già quá đều không thích hợp cho lên men vì hàm lượng đường quá thấp. Công nghệ lên men tương tự như công nghệ trên. Một số điểm khác cần lưu ý: lượng muối thích hợp $10 \div 12\%$. Nếu cho lượng muối thấp hơn (khoảng $5 \div 7\%$) cho chất lượng sản phẩm tốt hơn, thời gian lên men nhanh hơn, song thời gian bảo quản sẽ ngắn hơn. Ngược lại nếu ta cho lượng muối quá cao (hơn $1,5\%$) trái cà sẽ biến dạng. Khi đó cà sẽ bị nhăn nheo và sản phẩm cuối cùng có vị mặn chát. Để trái cà có màu trắng đẹp khi kết thúc lên men có thể cho $3 \div 5\%$ của giềng vào lúc bắt đầu lên men. Khi lên men cần cho trái cà ngập sâu trong nước muối. Muốn vậy nên có vật nén với lực nén khoảng $10 \div 15$ kg cho 100 kg cà. Ta có thể tiến hành lên men trong điều kiện nhiệt độ $25 \div 26^{\circ}\text{C}$. Thời gian lên men kéo dài $25 \div 30$ ngày. Khi đó lượng axit lactic có thể đạt tới $3,0 \div 3,2$ g/l.

1.2.4. Muối cà chua

Cà chua là loại quả có thể sử dụng tất cả các độ chín khác nhau để muối chua. Nhưng phải muối chua riêng từng độ chín. Không nên muối chua tất cả các độ chín của cà chua trong cùng một thiết bị với cùng một điều kiện.

Công nghệ muối chua cà chua cũng giống như các loại trái cây khác. Ta có thể dùng gia vị khác nhau để tăng giá trị cảm quan của sản phẩm. Sau khi làm sạch cà, cà được đưa vào các

thiết bị lên men và rót nước muối vào sao cho cà ngập trong nước. Lượng muối được sử dụng là $6 \div 9\%$. Thời gian lên men là $25 \div 50$ ngày tùy độ chín của cà và tùy lượng muối cần sử dụng. Lượng axit lactic sau khi lên men sẽ đạt $0,7 \div 2,0\%$. Sản phẩm được bảo quản lạnh để dùng dần.

1.2.5. Muối dưa leo (dưa chuột)

Dưa leo là loại trái cây được sử dụng như một loại nguyên liệu rất phổ biến trên thế giới và ở Việt Nam. Dưa leo dùng để muối chua là loại dưa non, hạt nhỏ, ít ruột, thịt quả chắc, vỏ mỏng, tươi. Thời gian bắt đầu thu hái đến lúc bắt đầu làm muối chua không quá 21 giờ. Dưa leo dùng để muối chua có hàm lượng đường không thấp hơn 2%. Dưa được phân loại theo kích thước. Ta có thể cho các loại gia vị như thì là, cần tây, tỏi, ớt, lá quế. Tất cả các loại gia vị này có thể chiếm $3 \div 8\%$ so với lượng dưa leo. Xếp dưa leo và gia vị vào các dụng cụ lên men và rót nước muối vào sao cho ngập dưa leo. Dung dịch muối có nồng độ $6 \div 10\%$ được dùng để lên men dưa leo khi đó sản phẩm cuối của sản phẩm có độ muối là $3 \div 5\%$. Sản phẩm được bảo quản lạnh để dùng dần.

II. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN TỪ RAU, QUẢ Ở CÁC NƯỚC CHÂU Á

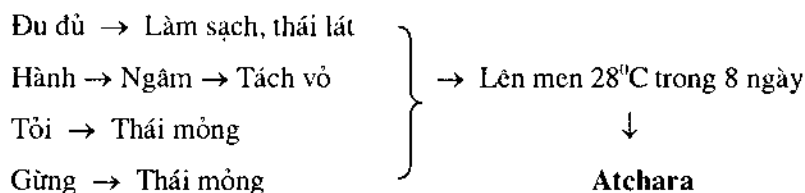
II.1. Atchara

Tên chung: đu đủ xắt lát lên men .

Tên địa phương (Philippin): Atchara.

Nguyên liệu: đu đủ xanh là nguyên liệu chính, gia vị (tỏi, ớt, hành, gừng, muối).

Sơ đồ 73. Công nghệ sản xuất Atchara



Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu sáng hay màu đu đủ, vị chua dễ chịu.

Đặc tính hóa học: pH = 3,5; độ axit (theo axit lactic) 1,32%; chất xơ 2,2%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 203 cal; protein 0,8 mg; chất béo 8,7%; hydratecarbon 30,3%; Ca 86 mg; P 12 mg; Fe 4,5 mg; β -caroten 40 mg; thiamin 0,01 mg; riboflavin 0,04 mg; niacin 0,1 mg; axit ascorbic 1 mg trong 100 g.

Vì sinh vật: *Leuconostoc mensesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Str. Faecalis*, *P. cerevisiae*.

Sản xuất thủ công trong gia đình.

II.2. Baechoo kim chi

Tên chung: dưa chua.

Tên địa phương (Triều Tiên): Baechoo kim chi.

Nguyên liệu: bắp cải 90%, hành xanh 2,0%; ớt 2,0%, gừng 0,5%; muối 2,5 ÷ 3%.

Sơ đồ 74. Công nghệ sản xuất Baechoo kim chi

Bắp cải → Rửa → Muối } → Phối trộn → Lên men 10°C/ 7 ngày → Kim chi
Các gia vị → Rửa → Thái nhỏ }

Đặc tính vật lý: dạng đặc, màu vàng hay xanh, vị chua ngọt, cay và nóng.

Đặc tính hóa học: pH = 4,2 - 5,8; axit lactic 0,6 - 0,18%; nước 88%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 19,0 cal; protein 2,0%; chất béo 0,6%; hydratcacbon 1,3%; Ca 28 mg; thiamin 0,03 mg; riboflavin 0,06 mg; niacin 2,01 mg; axit ascorbic 12,0 mg trong 100 g.

Vì sinh vật: *Leuconostoc mensesenteroides*, *Lactobacilli*, *P. cerevisiae*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 6 tháng ở 5°C và 7 ngày ở 10°C; 3 ngày ở 20°C; 1 ngày ở 30°C.

Sản xuất 800 000 tấn/năm. Trong đó sản xuất công nghiệp 80 000 tấn/năm, sản xuất thủ công 80 000 tấn/năm.

II.3. Dongchimi

Tên chung: củ cải lên men.

Tên địa phương (Triều Tiên): Dongchimi, Kim chi.

Nguyên liệu: củ cải, nước muối 3%; các loại gia vị như phần Baechoo Kim chi.

Sơ đồ 75. Công nghệ sản xuất Dongchimi

Củ cải → Rửa }
Gia vị → Rửa } → Lên men 5 ÷ 30°C → Dongchimi
Nước muối }

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu xanh, vàng, vị ngọt chua, cay và nóng.

Đặc tính hóa học: pH = 4,5; nước 93,6%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 9 cal; protein 0,7%; chất béo 0,2%; hydratcacbon 1,1%; Ca 1,0 mg; thiamin 0,01 mg; riboflavin 0,03 mg; niacin 1,0 mg; axit ascorbic 7 mg trong 100 g.

Vì sinh vật: *Leuconostoc mensenteroides*, *Lactobacilli*, *P. cerevisiae*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 6 tháng ở 5°C; 7 ngày ở 10°C; 3 ngày ở 20°C và 1 ngày ở 30°C.

Sản xuất thủ công.

II.4. Gundruk

Tên chung: dưa muối.

Tên địa phương (Nepal): Gundruk.

Nguyên liệu: rau xanh (rau cải xanh, bắp cải, cải bông).

Công nghệ sản xuất: lá cây cải rửa sạch, cho lên men 5 ÷ 7 ngày ở 10 ÷ 15°C, pH lúc ban đầu là 6,0 và kết thúc là 3,9. Tách dịch khỏi khối lên men, thanh trùng và đóng chai, phần lá lên men phơi khô và bảo quản.

Đặc tính vật lý: dạng rắn và dạng lỏng, có vị chua và ngọt.

Đặc tính hoá học: pH = 3,6 ÷ 4,0; độ axit 0,1 ÷ 0,5%; hàm ẩm 3,5 ÷ 6,0%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 19 ÷ 30 cal; protein 3,5%; chất béo 0,1%; hydratcacbon 1 ÷ 2%; caroten 1000 ÷ 3000 mg; riboflavin 0,2 mg; thiamin 0,07 mg; niacin 0,5 mg; axit ascorbic 55 mg trong 100 g.

Vì sinh vật: *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus sp.*, *L. plantarum*, *L. brevis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng 6 - 12 tháng.

Khoảng 2% sản xuất theo quy mô công nghiệp.

II.5. Kakdugi

Tên chung: củ cải lên men .

Tên địa phương (Triều Tiên): Kakdugi, kim chi.

Nguyên liệu: củ cải 90%; tỏi 2,0%; hành xanh 2,0%; ớt 2,0%; gừng 0,5%; muối 2,5 ÷ 3,0%.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu xanh sẫm, có vị chua ngọt, mặn và có mùi đặc trưng.

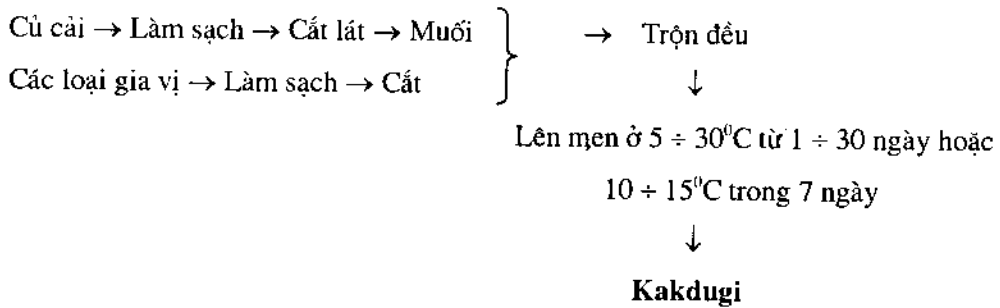
Đặc tính hóa học: nước 78%; đường 1,8%; chất xơ 1,4%; tro 73%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 20 cal; chất béo 0,9%; Ca 58 mg; P 55 mg; Fe 0,4 mg; thiamin 0,04 mg; riboflavin 0,04 mg; niacin 0,04 mg trong 100 g.

Vị sinh vật: giống như kim chi.

Thời gian bảo quản và sử dụng phụ thuộc nhiệt độ bảo quản.

Sơ đồ 76. Công nghệ sản xuất Kakdugi



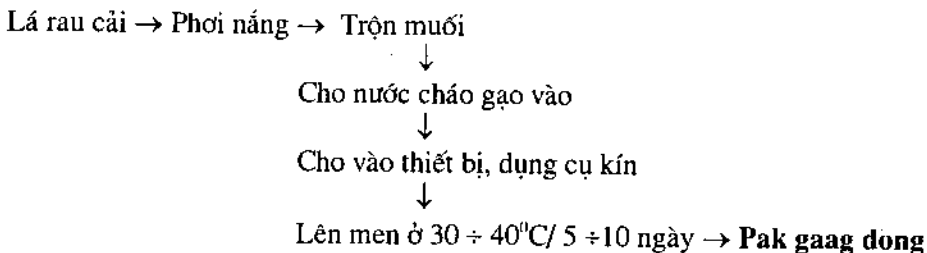
II.6. Pak gaad dong

Tên chung: lá rau cải lên men.

Tên địa phương (Thái Lan): Pak gaag dong.

Nguyên liệu: lá rau cải (*Brassia funcea*) 90%, muối 8%; nước cháo gạo 2%.

Sơ đồ 77. Công nghệ sản xuất Pak gaad dong



Đặc tính vật lý: dạng đặc, màu vàng, vị chua.

Đặc tính hóa học: axit lactic $0,71 \div 0,75\%$.

Vị sinh vật: *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. cerevisiae*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 3 tháng.

Sản xuất thủ công 4 600 000 tấn/năm.

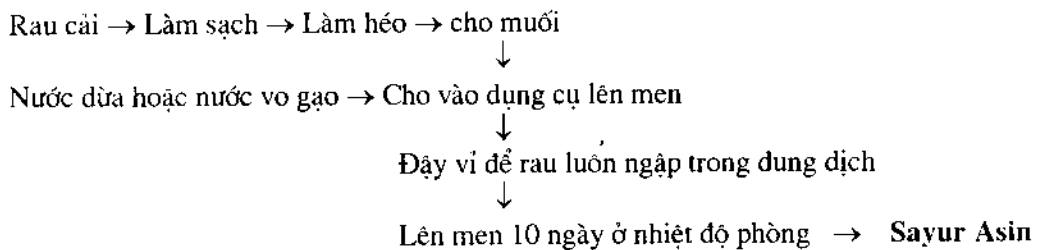
II.7. Sayur Asin

Tên chung: rau cải xanh lên men.

Tên địa phương (Indonesia): Sayur Asin.

Nguyên liệu: bắp cải xanh (*Brasia juncea* var *rugosa*) $95 \div 97\%$; muối $2,5 \div 5,0\%$; nước dừa hay nước vo gạo 1 lít (đủ làm ngập rau).

Sơ đồ 78. Công nghệ sản xuất Sayur asin



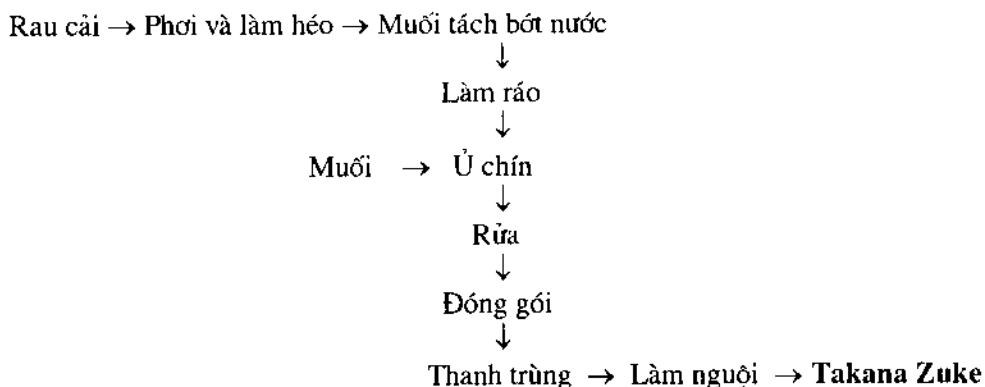
Đặc tính hóa học: pH = 6,5 (ban đầu); 3,4 (lúc kết thúc) lên men, độ axit (theo axit lactic) 1,41%; NaCl 2%.

Vi sinh vật: *Leuconostoc mensesenteroides*; *L. cucumeris*, *L. Plantarum*, *L. penteaceticus*, *L. brevis*. Tổng số vi sinh vật 1 triệu tế bào/ml.

Thời gian bảo quản và sử dụng: vài tuần.

II.8. Takana Zuke

Sơ đồ 79. Công nghệ sản xuất Takana Zuke



Tên chung: dưa chua.

Tên địa phương (Nhật): Takana Zuke.

Nguyên liệu: lá rau cải (*Brassica funcea* var *integrifolia*) 80 ÷ 85%; ớt đỏ 0,5%; muối 15 ÷ 20%.

Đặc tính vật lý: dạng đặc, vị chua ngọt, mặn.

- Đặc tính hóa học: pH = 3,5 ÷ 3,8; muối 8 ÷ 11%; độ ẩm 85%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 31 cal; chất béo 0,2%; protein 2,5%; hydratcacbon 5,2%; thiamin 0,06 mg; riboflavin 0,12 mg; niacin 0,4 mg; axit ascorbic 75 mg; caroten 1300 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *P. halophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: 6 tháng ở 5 ÷ 30°C.

90% sản xuất công nghiệp.

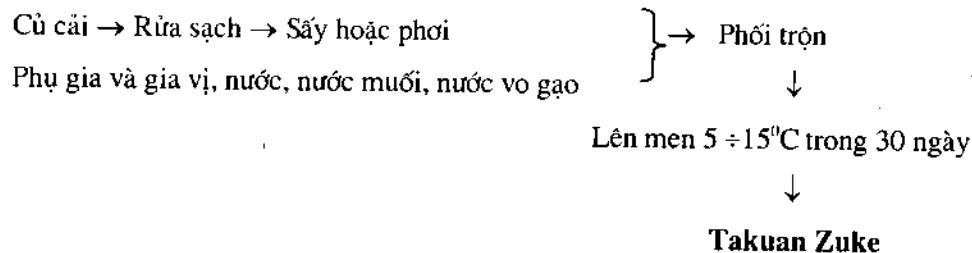
II.9. Takuan Zuke

Tên chung: củ cải lên men.

Tên địa phương (Nhật): Takuan Zuke.

Nguyên liệu: củ cải của Nhật (*Rhaphanus Sativus* L. var *longipinnatus*) 90%; muối 5,4%; đường 3,6%; gia vị 0,6%; shochu 0,4%.

Sơ đồ 80. Công nghệ sản xuất Takuan zuke



Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu vàng, có vị đặc trưng của sản phẩm.

Đặc tính hóa học: pH = 4,2 ÷ 4,5; độ axit 0,5 ÷ 0,8%; độ ẩm 81,5%.

Giá trị dinh dưỡng: năng lượng 40 cal; protein 1,4%; chất béo 0,1%; hydratcacbon 9,1%; Ca 55 mg; thiamin 0,05 mg; riboflavin 0,03 mg; niacin 0,4 mg; axit ascorbic 15 mg trong 100 g.

Vi sinh vật: *L. plantarum*, *L. sp.*, *Leuconostoc mensenteroides*, *Streptococcus sp.*, *L. brevis* và nấm men.

Thời gian sử dụng và bảo quản: 2 ÷ 3 tháng ở 10°C.

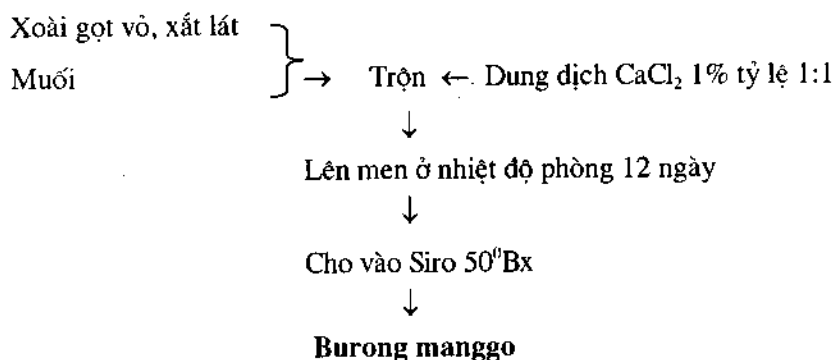
II.10. Burong mango

Tên chung: Xoài xanh ủ chua.

Tên địa phương (Philippin): Burong manggo.

Nguyên liệu: Xoài xanh chưa chín 100%; muối 10% so với xoài xanh, dung dịch CaCl_2 1%.

Sơ đồ 81. Công nghệ sản xuất Burong manggo

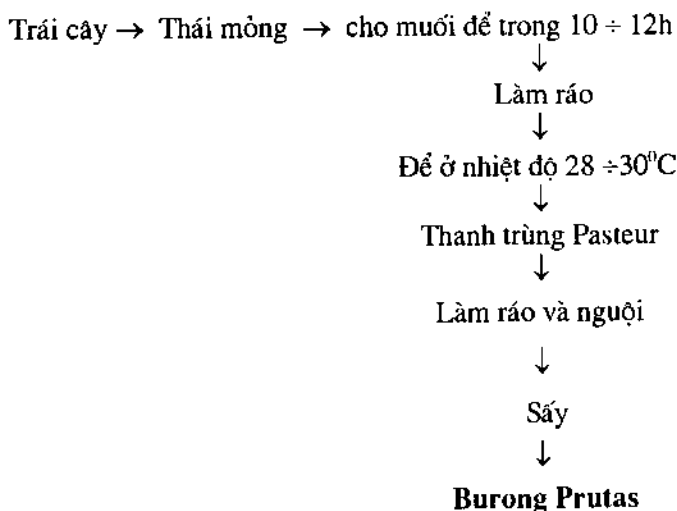


Đặc tính vật lý: dạng rắn, màu xanh vàng sáng, vị chua ngọt.

Đặc tính hóa học: pH = 2,8; độ axit 1,52%.

II.11. Burong Prutas

Sơ đồ 82. Công nghệ sản xuất Burong Prutas



Tên chung: trái cây muối chua.

Tên địa phương (Philippin): Burong Prutas.

Nguyên liệu: trái cây 100%; muối $2,25 + 2,5\%$ so với trái cây, đường 1%.

Đặc tính vật lý: dạng rắn, vị chua và ngọt.

Vì sinh vật: *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mensesenteroides*.

Thời gian bảo quản và sử dụng $2 + 3$ tháng.

Sản xuất thủ công 90% và sản xuất công nghệ 10%.

III. CÀ MUỐI

Tên chung: Fermented fruit.

Tên địa phương: Cà muối (Việt Nam).

Nguyên liệu: Cà bát, cà pháo, (*Solaum melongana*) 97%, riềng (*Alpinia stamensis*) 3%, muối ăn 15%.

Cách làm: cà bát hoặc cà pháo vừa già (có vết vàng ở đáy quả), cắt bỏ núm và tai cà, rửa sạch, cho vào chum sành cứ một lớp muối một lớp cà, thêm nước muối. Ép bằng nén đá ($10 + 15$ kg/100 kg cà). Lên men ở nhiệt độ thường $26 + 28^{\circ}\text{C}$ trong $15 + 30$ ngày.

Vì sinh vật: *Lactobacillus* sp.

Thời gian sử dụng: 3 tháng (trong điều kiện yếm khí).

Quy mô sản xuất: gia đình 80%, công nghiệp 20%.

Sử dụng: món ăn phụ.

IV. DƯA CHUỘT MUỐI

Tên chung: Fermented cucumber.

Tên địa phương: Dưa chuột muối (Việt Nam).

Nguyên liệu: dưa chuột bánh tẻ, màu xanh thẫm hoặc trắng xanh, kích thước đồng đều, không bị dập nát 10 kg, tỏi khô 40g, ớt cay xanh 12g, củ riềng 20g, thì là khô 30 g, cần tây khô 20 g.

Cách làm: dưa chuột rửa sạch, xếp vào chum hoặc hũ, cho gia vị vào xen kẽ với dưa chuột, dưa chuột xếp đứng và thật khít nhau. Hoà tan 1,2 kg muối vào 10 lít nước sạch, 10 g axit lactic, 50g CaCl_2 đổ nước muối lên ngập hết dưa chuột, cài vỉ nén chặt, đậy kín, để lên men ở nhiệt độ phòng $25 + 30^{\circ}\text{C}$.

Yêu cầu thành phẩm: dưa chuột muối có màu vàng xanh, ăn chua giòn, không rở nước, có mùi thơm đặc trưng của gia vị, nước muối dưa chuột màu trong. hàm lượng muối ăn 3% muốn bảo quản lâu hơn bổ sung 3 ÷ 5% muối.

Vi sinh vật: *Lactobacillus cucumeris*, *L. pentoaceticus*.

Quy mô sản xuất: gia đình, công nghiệp nhỏ.

Sử dụng: món ăn thêm.

V. DƯA MUỐI

Tên chung: Salted field cabbage.

Tên địa phương: dưa muối (Việt Nam).

Nguyên liệu: dưa cải (*Brassica campestris*) 95%, hành 55%, muối 7% so với tổng số rau.

Yêu cầu sản phẩm:

- + Đặc tính vật lý và cảm quan: sản phẩm dạng rắn, màu vàng nâu, vị chua, mặn.
- + Đặc tính hoá học: nước 93%, pH ban đầu 6, thán lý 4,5, tro 3,6.
- + Giá trị dinh dưỡng: protein 1,8%, calo 17/100 g sản phẩm.

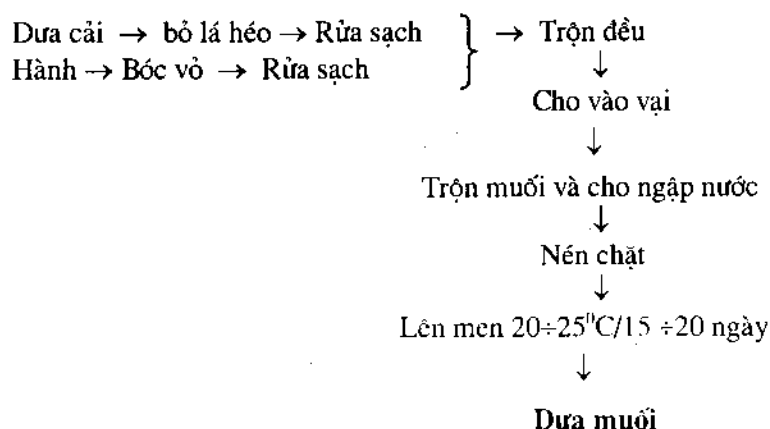
Vi sinh vật: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *L. pentoaceticus*, *L. brevis*, *Bacillus brassicae* var. *fermenti*.

Thời hạn bảo quản và sử dụng: 3 tháng (25°C) trong điều kiện yếm khí.

Sản xuất: Tổng số 200 000 t/năm, sản xuất công nghiệp 20%, sản xuất gia đình 80%.

Sử dụng: Món ăn phụ

Sơ đồ 83. Công nghệ sản xuất



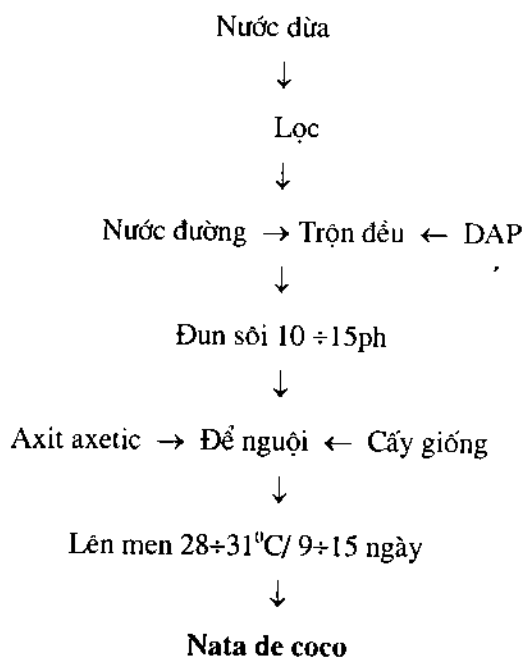
VI. THẠCH DỪA

Tên chung: Nata.

Tên địa phương: Nata de coco, Nata de pina (Philippines).

Nguyên liệu: Nước dừa 100%, đường 10%, DAP (dihydrogen ammonium phophat) hoặc sunfat 0,5%, axit axetic đậm đặc 0,1 ÷ 0,8%, giống 10%.

Sơ đồ 84. Công nghệ sản xuất



Yêu cầu thành phẩm:

+ *Đặc tính vật lý và cảm quan*: sản phẩm rắn chắc, màu trắng hoặc kem phụ thuộc vào gia vị.

+ *Đặc tính hoá học*: pH = 3,9 ÷ 5,5, nước 63,7%.

+ *Giá trị dinh dưỡng*: calo 146, lipid 0,2%. Cacbonhydrat 36,1%, Ca 12 mg, P 2 mg, Fe 0,5 mg, trong 100 g.

Vi sinh vật: *Acetobacter xylinum*.

Thời hạn sử dụng: 1 năm ở nhiệt độ phòng.

Quy mô sản xuất: gia đình.

Sử dụng: món ăn phụ.

CHƯƠNG 9

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT NƯỚC UỐNG LÊN MEN

I. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MỘT SỐ LOẠI RƯỢU ĐẶC SẢN CỦA VIỆT NAM

I.1. Công nghệ sản xuất rượu nếp than

Rượu nếp than là một loại đồ uống có cồn, được sản xuất hoàn toàn thủ công từ một loại gạo đặc biệt. Loại rượu này không quá chung cất, sử dụng cả phần dịch và phần bã lên men đã làm nhuyển.

a. Nguyên liệu sản xuất rượu nếp than

- Gạo nếp than

Gạo nếp than là một loại gạo đặc biệt được trồng nhiều ở vùng Nam Bộ, vì thế loại rượu này là đặc sản của vùng Nam Bộ. Gạo nếp than gồm bốn loại:

- + Nếp cẩm Đức Hòa
- + Nếp đen Khánh Vĩnh
- + Nếp than Long Đất
- + Lúa lức nếp cẩm.

Các loại lúa này có năng suất không cao, thường chỉ đạt 2,8 – 3,3 tấn/ha.

Hiện nay dân vùng đồng bằng Nam Bộ phân loại nếp than theo màu sắc hạt gạo. Theo cách này nếp than được chia thành hai loại:

- + Nếp than đen tuyền.
- + Nếp than hồng đỏ.

Các sắc tố của nếp than rất dễ tan trong nước, vì thế sản phẩm rượu mang màu đặc trưng của loại gạo nguyên liệu.

Tuy khác nhau về màu sắc bên ngoài, nhưng các loại nếp than có thành phần hóa học không khác nhau nhiều. Ta có thể tham khảo các số liệu bảng 20.

Bảng 20. Thành phần hóa học của gạo nếp than

Thành phần	Hàm lượng (%)
Nước	14
Protein	8,2
Lipit	1,5
Gluxit	74,9
Axit hữu cơ	0,6
Tro	0,8

- Bánh men thuốc bắc

Bánh men thuốc bắc là một loại men rượu được sản xuất thủ công. Nguyên liệu chính để sản xuất bánh men thuốc bắc là: bột gạo, men giống, các vị thuốc bắc. Bánh men thuốc bắc chứa nhiều giống vi sinh vật thuộc vi khuẩn, nấm men và nấm mốc (nấm sợi).

+ Nấm men

Trong mỗi gam bánh men có từ vài chục triệu đến vài trăm triệu tế bào nấm men. Chúng gồm hai chi khác nhau: *Endomycopsis* (chủ yếu là *Endo. Fibuligenes*) và *Saccharomyces* (chủ yếu là *S. cerevisiae*).

Endo Fibuligenes: là loài nấm men rất giàu enzym amilaza, glucoamilaza, do đó chúng vừa có khả năng đường hóa vừa có khả năng rượu hóa.

Saccharomyces cerevisiae: có khả năng lên men nhiều loại đường khác nhau như glucoza, sacaroza, maltoza, fructoza, rafinoza, galactoza. Chúng có khả năng lên men ở nhiệt độ cao ($36 \div 40^{\circ}\text{C}$), chúng có khả năng chịu được độ axit. Đặc biệt chúng có khả năng chịu được thuốc sát trùng Na_2SiF_6 với nồng độ $0,02 \div 0,025\%$. Đặc điểm này rất thuận lợi cho lên men khi cần sử dụng thuốc sát trùng. Đặc điểm quan trọng hơn hết đó là có khả năng lên men nhiều loại nguyên liệu khác nhau như gạo, ngô, khoai, sắn, với lượng đường trong dung dịch từ $12 \div 14\%$ có khi $16 \div 18\%$. Nồng độ rượu trong dung dịch lên men $10 \div 12\%$. Nhiệt độ lên men thích hợp là $28 \div 32^{\circ}\text{C}$.

Ngoài hai chi nấm men cơ bản trên, trong bánh men thuốc bắc còn thấy nhiều loại nấm men đại khác, chúng vừa có khả năng thủy phân tinh bột, vừa có khả năng chuyển đường thành rượu, tuy sự chuyển hóa này thấp. Điều đặc biệt là các loài nấm men đại này chịu nhiệt rất cao, có khi tới $60 \div 65^{\circ}\text{C}$ và chịu được chất sát trùng nồng độ $0,05 \div 1\%$.

+ Nấm mốc

Trong bánh men thuốc bắc thấy nhiều loài nấm mốc phát triển thuộc *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* phát triển nhiều hơn cả.

Loài *Mucor*, đặc biệt là *Mucor rouxii* có nhiều đặc tính rất quý như khả năng chịu nhiệt độ cao 32 – 35°C, chúng vừa có khả năng đường hóa vừa có khả năng rượu hóa.

+ Vi khuẩn

Trong bánh men thuốc bắc có nhiều loài vi khuẩn phát triển. Trong đó thấy chủ yếu là các loài vi khuẩn lactic và vi khuẩn axetic. Các loài vi khuẩn thường làm chua môi trường. Thời gian đầu quá trình lên men, quá trình này xảy ra có lợi vì tạo pH môi trường thích hợp cho nấm men và nấm sợi phát triển. Tuy nhiên nếu để pH xuống quá thấp sẽ ảnh hưởng xấu cho quá trình lên men. Mặt khác nếu trong dịch lên men có mặt oxy thì vi khuẩn axetic sẽ oxy hóa rượu thành axit axetic, quá trình này làm tổn hao lượng cồn tạo thành.

- Cồn tinh khiết

Trong quá trình lên men gạo nếp than, lượng cồn tạo thành chỉ khoảng 7 ÷ 10%. Nồng độ rượu này thấp rất dễ dàng bị oxy hóa tiếp (oxy hóa sinh học và oxy hóa hóa học) để tạo CO₂ và nước. Do đó, sau khi lên men xong phải cho thêm một lượng cồn tinh khiết nhất định vừa để nâng cao hàm lượng cồn trong rượu vừa tránh khả năng oxy hóa rượu bởi vi khuẩn axetic.

Cồn được dùng để làm rượu là loại cồn thực phẩm có độ tinh khiết cao với các chỉ tiêu sau:

+ Trong suốt, không màu, không mùi lạ.

+ pH = 6,5 ÷ 7,0.

+ Hàm lượng cồn 96,5 %V.

+ Furfurol không có.

+ Hàm lượng andehyt 6 ÷ 10 mg/l.

+ Hàm lượng este 30 ÷ 35 mg/l.

+ Dầu fusel 30 ÷ 60 mg/l.

+ Nước: thường sử dụng nước sạch, đun sôi để nguội, trong suốt, không mùi vị lạ, có pH = 6,5 ÷ 7,5.

b. Cơ chế quá trình chuyển hóa các chất trong lên men rượu nếp than

Lên men rượu nếp than là một quá trình hết sức phức tạp, xảy ra các quá trình hóa học, sinh học và các quá trình vi sinh vật.

- Các quá trình vi sinh vật

Thực chất của quá trình này là quá trình sinh sản và sinh trưởng của vi sinh vật. Quá trình này xảy ra rất nhanh ở giai đoạn đầu lên men, khi cho bánh men thuốc bắc vào nguyên liệu. Sự phát triển mạnh của các vi khuẩn giai đoạn này kéo theo sự tạo thành một số axit hữu cơ. Kết quả là pH môi trường giảm xuống tạo điều kiện thuận lợi cho các loài nấm mốc phát triển. Song song đó là các loài nấm men bắt đầu phát triển tuy với tốc độ yếu hơn.

Các loài nấm mốc chỉ phát triển mạnh trong giai đoạn đường được tạo thành, hay đúng hơn là cuối của giai đoạn nấm mốc phát triển. Việc phân rõ ràng các giai đoạn phát triển của vi khuẩn, nấm mốc, nấm men rất khó vì thực tế việc phát triển của các loài vi sinh vật trong khối lên men diễn ra đồng thời. Chỉ có một điều khẳng định là sự phát triển không cùng một mức độ. Sự phát triển của một số vi khuẩn, nấm mốc đòi hỏi sự có mặt một lượng oxy nhất định trong môi trường, chính vì thế các loài vi sinh vật này phát triển mạnh ở giai đoạn đầu. Nấm men cũng cần sự có mặt của oxy để tăng sinh khối, tuy nhiên mức độ không cao như của nấm mốc. Mặt khác nấm men phát triển cần đường, do đó cần có thời gian để nấm mốc chuyển hóa đường từ tinh bột.

- Các quá trình sinh hóa:

Trong quá trình lên men gạo nếp than xảy ra ba quá trình sinh hóa cơ bản:

+ Quá trình chuyển đường và các thành phần khác thành các axit hữu cơ: trong đó có hai quá trình tạo axit hữu cơ cơ bản: quá trình tạo axit axetic và quá trình tạo axit lactic. Quá trình tạo axit lactic mạnh hơn, cả hai quá trình này xảy ra với cường độ không mạnh vì giai đoạn đầu lượng đường tạo thành trong khối lên men chưa cao.

+ Quá trình chuyển hóa tinh bột thành đường: do sự phát triển của nấm men *Endomycopsis*, tinh bột được chuyển thành đường. Các loài nấm mốc và nấm men này trong quá trình phát triển tạo ra rất nhiều enzym amilaza, glucoamilaza. Các enzym này hoạt động rất thuận lợi trong giai đoạn đầu và được kéo dài trong suốt thời gian tiếp theo. Bản chất của các enzym này là các enzym cảm ứng, do đó nguyên liệu chứa nhiều tinh bột kích thích mạnh mẽ quá trình sinh tổng hợp. Điểm quan trọng thứ hai cần đề cập đến là các enzym này chịu sự điều khiển bởi sản phẩm cuối cùng là glucoza. Bình thường thì glucoza sẽ ức chế phản ứng thủy phân tinh bột, nhưng các loài nấm mốc *Mucor rouxii*, *Rhizopus delemar*, các loài nấm men *Endomycopsis* vừa có khả năng sinh tổng hợp amilaza, glucoamilaza, vừa có khả năng chuyển đường thành rượu, mặt khác các loài nấm men *Saccharomyces* cũng rất tích cực chuyển hoá đường glucoza thành rượu. Kết quả là lượng đường glucoza tạo thành bao nhiêu ngay lập tức sẽ chuyển hoá thành

rượu, một phần phục vụ cho sinh trưởng của chính các loài vi sinh vật đó. Do đó trong khối lên men này thường không xảy ra cơ chế kìm hãm ngược bởi glucoza.

- Quá trình chuyển hóa đường thành rượu

Quá trình này được thực hiện bởi *Saccharomyces sp.*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Endomycopsis sp.* Trong đó các loài nấm men *Saccharomyces* đóng vai trò cơ bản. Song song với quá trình này là các quá trình chuyển hóa đường, các axit hữu cơ thành các sản phẩm phụ khác.

Điều đặc biệt lưu ý là tất cả các quá trình chuyển hóa được xảy ra xen kẽ nhau, hỗ trợ nhau và tạo nên một quá trình chung hài hòa, để cuối cùng tạo ra sản phẩm không chỉ có nước, rượu mà là một hỗn hợp sản phẩm bao gồm nhiều thành phần khác nhau.

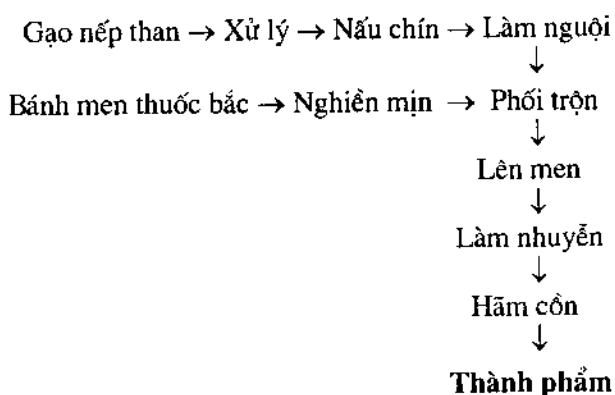
Chính vì thế rượu nếp than là một loại rượu có hương vị đặc trưng và có giá trị cảm quan rất riêng.

c. Quy trình công nghệ sản xuất rượu nếp than

Rượu nếp than được sản xuất theo một quy trình đặc biệt. Mặt nào đó quy trình mang nội dung của công nghệ sản xuất cồn theo phương pháp amiloza, mặt khác lại mang nội dung của công nghệ sản xuất rượu vang và một mặt khác mang nội dung của công nghệ sản xuất nước giải khát lên men.

Sản phẩm cuối cùng của công nghệ sản xuất rượu nếp than không phải là sản phẩm qua chưng cất như rượu cao độ thường thấy ở quy trình sản xuất công nghiệp hoặc quy trình sản xuất thủ công rượu đế. Sản phẩm này gần giống rượu cần của đồng bào dân tộc miền núi, nhưng không hoàn toàn giống. Người sử dụng rượu cần chỉ dùng dung dịch rượu được tách ra bằng ống hút (cần hút), bã rượu được giữ lại trong các bình sành dùng lên men. Còn rượu nếp than, người sử dụng có thể sử dụng riêng dung dịch lên men, cũng có thể sử dụng hỗn hợp cả dung dịch và cả bã rượu sau khi đã làm nhuyễn.

Sơ đồ 85. Tổng quát quy trình công nghệ sản xuất rượu nếp than



Thuyết minh quy trình

- Xử lý nguyên liệu

Nguyên liệu được ngâm nước và làm sạch tách các tạp chất bẩn bám vào nguyên liệu. Đồng thời quá trình ngâm còn có mục đích làm mềm và làm trương nở hạt gạo để dễ nấu chín.

- Phối trộn

Sau khi ngâm và làm sạch gạo, gạo được nấu chín và làm nguội. Rắc men thuốc bắc (28 – 30 g men thuốc bắc dùng cho 1 kg nguyên liệu), trộn đều và cho vào hũ có miệng nhỏ, không đậy nắp trong 4 giờ. Thời gian này cung cấp oxy cho quá trình tăng sinh khối vi sinh vật. Sau đó đậy nắp hũ tiến hành lên men.

- Lên men

Tiến hành lên men ở nhiệt độ thường, thời gian này sẽ có ba quá trình xảy ra song song với các mức độ khác nhau, đó là các quá trình tăng sinh khối của vi sinh vật, quá trình đường hóa và quá trình rượu hóa.

- Hãm cồn

Sau khi lên men, hàm lượng cồn đạt khoảng $7 \div 10\%V$. Với hàm lượng cồn này rất khó bảo quản và chất lượng rượu không cao. Do đó ta phải bổ sung thêm cồn để tăng hàm lượng cồn trong sản phẩm rượu và tăng khả năng bảo quản sản phẩm.

Sau khi cho cồn vào (lượng cồn tùy yêu cầu của người sản xuất và người tiêu dùng), rượu nếp than được tàng trữ ít nhất 6 tháng để ổn định chất lượng rượu và tạo hương cho sản phẩm.

d. Chất lượng rượu nếp than

Rượu nếp than hiện có hai loại:

- Rượu nếp than dạng đục: Sau khi lên men, đem cả khối lên men xay nhuyễn, hãm cồn và tàng trữ tạo hương. Có màu tương ứng màu của nguyên liệu đưa vào sản xuất.

- Rượu nếp than dạng trong: Sau khi lên men, đem xay và hãm cồn, sau đó lọc lấy phần dịch, rồi đưa đi tàng trữ, tạo hương, có màu tương ứng với màu của nguyên liệu sản xuất.

Cả hai loại rượu nếp than trên đều có màu và mùi vị đặc trưng, còn hàm lượng cồn thấp hay cao tùy theo đối tượng phục vụ mà lượng cồn hãm vào sau khi lên men nhiều hay ít.

1.2. Công nghệ sản xuất rượu “đề”, rượu “làng Vân”

Đặc điểm khác với rượu nếp than là các loại rượu “đề” hay “làng Vân” là sản phẩm qua chưng cất và nguyên liệu dùng để sản xuất không phải là gạo nếp than (có màu) mà là gạo nếp dẻo (không màu).

Rượu “đề” được sản xuất ở nhiều địa phương với nhiều loại nguyên liệu khác nhau, phụ thuộc loại gạo nếp của vùng đó.

Rượu “làng Vân” được sản xuất ở vùng Hà Bắc nổi tiếng ở miền Bắc. Rượu được sản xuất từ loại gạo nếp đặc biệt của vùng này.

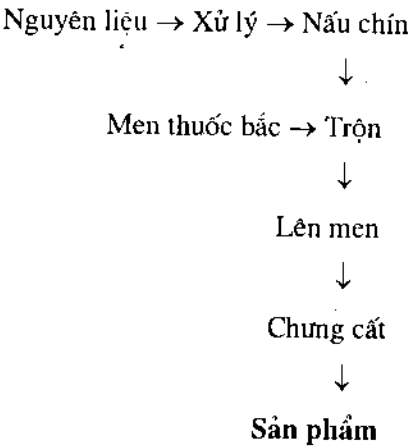
Tất nhiên mỗi vùng có những kinh nghiệm riêng không chỉ ở các khâu lên men, chưng cất, pha chế mà đặc biệt là nguyên liệu và chất lượng bánh men thuốc bắc.

Men thuốc bắc của người dân phía Bắc Việt Nam được sản xuất với lượng thuốc bắc nhiều hơn các vùng khác, lượng thuốc bắc như sau:

Đại hồi	3 g	Tạo giác	1 g
Tiểu hồi	3 g	Quế chi	3 g
Thất phát	2 g	Quế khâu	3 g
Nha tạo	2 g	Cam thảo	3 g

Các quá trình sinh học và hóa sinh xảy ra trong khi lên men giống như xảy ra trong lên men rượu nếp than.

Sơ đồ 86. Quy trình sản xuất rượu “đề” hay rượu “làng Vân”



Có sự khác biệt ở khâu chưng cất. Thiết bị chưng cất là những dụng cụ rất thủ công gồm một bộ phận nấu (chứa khối lên men), một bộ phận làm lạnh (dụng cụ chứa nước lạnh phía trên nổi) và một bộ phận hứng rượu ngưng tụ ở giữa hai bộ phận trên. Rượu được ngưng tụ và lấy ra theo một ống dẫn nhỏ.

Quá trình chưng cất rượu thường chia làm hai đợt. Đợt đầu thu loại rượu có nồng độ cồn $45 \div 65\%V$, đợt sau thu được rượu nồng độ $25 \div 30\%V$. Tùy theo yêu cầu của người sản xuất và người tiêu dùng có thể pha đầu hai loại rượu với nhau hoặc để riêng.

Vì quá trình chưng cất hoàn toàn thủ công nên rượu sau khi chưng cất vẫn có độ đục chứ không hoàn toàn trong suốt.

Công nghệ này cũng tương tự công nghệ sản xuất rượu nếp than, cũng giống công nghệ sản xuất rượu cao độ của các nước phương Tây (Whisky hay Vodka).

Hiện nay đã có những thay đổi đáng kể trong công nghệ sản xuất, một số địa phương đã tiếp thu công nghệ sản xuất rượu nếp than bỏ qua khâu chưng cất. Sau khi lên men còn đem toàn bộ khối lên men xay nhỏ và hãm cồn. Sản phẩm cuối cùng là hỗn hợp cả bã và dịch đã lên men.

1.3. Công nghệ sản xuất rượu cần

Rượu cần là loại rượu lên men từ nhiều nguồn nguyên liệu có chứa glucit khác nhau, là sản phẩm của người dân tộc thiểu số. Rượu cần mang bản sắc dân tộc hết sức độc đáo của người miền núi.

Trước đây nguyên liệu sản xuất rượu cần là các loại gạo của lúa nương (lúa cạn). Sau này, do nhiều nguyên nhân, trong đó có nguyên nhân thiếu lương thực, nên nguyên liệu được thay bằng các loại khác như sắn, ngô.

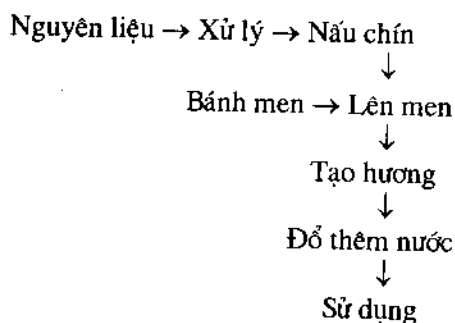
Men thuốc bắc dùng để sản xuất rượu cần, về cơ bản cũng giống như loại men dùng sản xuất rượu nếp than hay rượu “đế” của người Việt, nhưng thay vì thuốc bắc, người dân tộc thiểu số sử dụng các loại lá rừng có nhiều tinh dầu. Chất lượng rượu cần phụ thuộc nhiều vào số lượng và loại lá này. Người ta phân ra làm ba loại men: men một lá, men hai lá và men ba lá.

Điểm khác biệt nữa là rượu cần không qua chưng cất, không có hãm cồn và không sử dụng bã rượu mà chỉ sử dụng dịch lên men.

Cách uống rượu cần của người dân tộc thiểu số cũng rất độc đáo, nó mang bản sắc văn hóa dân tộc vùng cao. Rượu cần được dùng trong những dịp lễ hội, cưới hỏi, ma chay, ngày kỷ niệm. Rượu cần được lên men trong những hũ sành có trang trí hoa văn rất đẹp. Khi sử dụng người ta đổ nước mưa hoặc nước suối sạch vào hũ sành đã lên men. Hiện nay ở các nhà hàng, khách sạn vùng núi người ta cho nước tinh khiết vào đảm bảo vệ sinh hơn. Nhánh cây tre, cây trúc đã đục thông qua các đốt cắm trong hũ rượu. Mỗi người dùng một cần rượu, mỗi người

uống một lần và sau đó đến người khác. Cứ như vậy, khi gần hết rượu trong hũ, lại đổ thêm nước vào. Lần uống đầu tiên có vị cồn, chua, thơm, ngọt. Càng về sau rượu càng trở nên nhạt hơn.

Sơ đồ 87. Quy trình sản xuất rượu cần



Chất lượng rượu cần được đánh giá ở sự hài hoà giữa các thành phần của axit hữu cơ, cồn, đường và hương thơm. Nồng độ cồn trong rượu cần tương đương hoặc lớn hơn không nhiều của các loại bia.

II. CÔNG NGHỆ CÁC LOẠI ĐỒ UỐNG LÊN MEN TRÊN THẾ GIỚI

II.1. Brem Bali

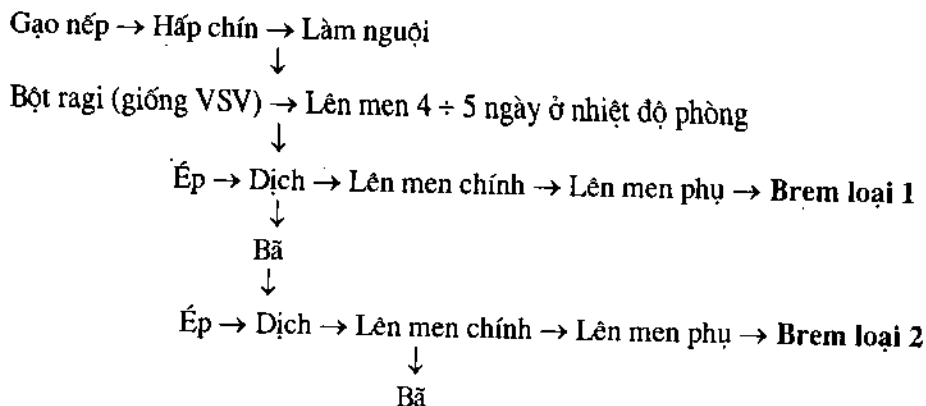
Tên chung: rượu vang Brem.

Tên địa phương (Indonesia): Brem Bali.

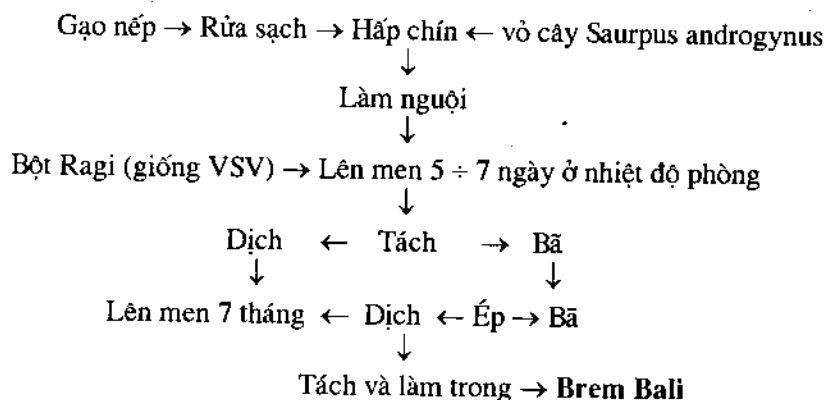
Nguyên liệu: gạo nếp (loại trắng hoặc loại đen) 95%, giống vi sinh vật là cây Katuk hay vỏ cây *Saurpus androgynus merr* 5%.

Sơ đồ 88. Công nghệ sản xuất Brem Bali

* Công nghệ 1



* Công nghệ 2



Đặc tính vật lý: dạng dung dịch, màu nâu đen hay màu đỏ, vị ngọt, chua có cồn.

Đặc tính hóa học: pH = 3,0 ÷ 4,3; độ cồn 6 ÷ 14%.

Giá trị dinh dưỡng: đường khử 17,3 ÷ 26,3%.

Vi sinh vật: *Mucor (M. indicus)*, *Candida (C. parapsilopsis)*.

Sản xuất thủ công.

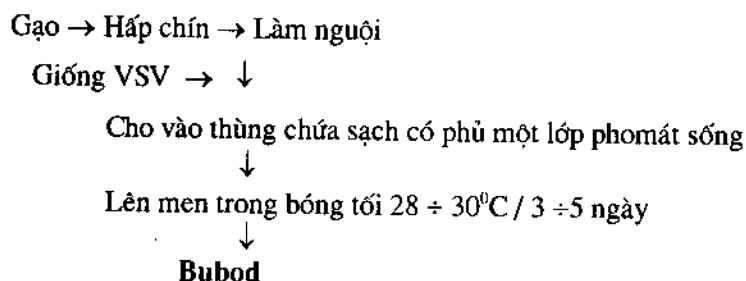
II.2. Bubod

Tên chung: vang gạo.

Tên địa phương (Philippin): Bubod.

Nguyên liệu: gạo 99%, giống vi sinh vật 1%.

Sơ đồ 89. Công nghệ sản xuất



Đặc tính vật lý: dạng đặc hoặc lỏng, màu trắng hay màu đỏ, vị ngọt có cồn.

Đặc tính hóa học: pH = 3,0 ÷ 5,0

Vi sinh vật: *Endomycopsis fibuliger*, *Aspergillus sp.*, *Rhodotorula sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng 2 ngày ở 27 ÷ 30°C; 7 ngày 10 ÷ 15°C.

Sản xuất thủ công.

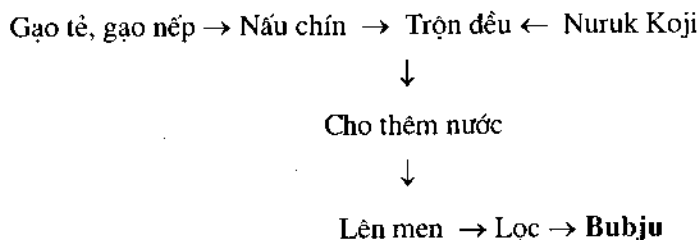
II.3. Bubju

Tên chung: nước uống có cồn.

Tên địa phương (Triều Tiên): Bubju.

Nguyên liệu: gạo 25%; gạo nếp 25%; nước 60%; Nuruk 2%; Koji 2%.

Sơ đồ 90. Công nghệ sản xuất Bubju



Đặc tính vật lý: dạng dung dịch, màu trắng, có cồn.

Đặc tính hóa học: cồn etylic 16%

Vì sinh vật chủ yếu là *Saccharomyces sp.*

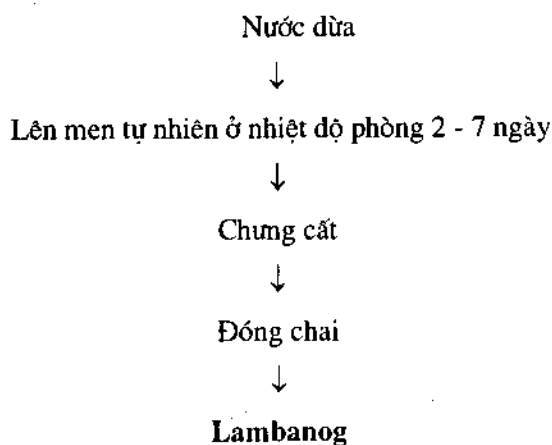
Sản xuất theo quy mô công nghiệp.

II.4. Lambanog

Tên chung: Rượu nước dừa.

Tên địa phương (Philipin): Lambanog, Tuba.

Sơ đồ 91. Công nghệ sản xuất



Đặc tính vật lý: dịch lỏng, màu sáng có cồn.

Đặc tính hoá học: pH = 6,5, tổng chất rắn 16,88%; tro 0,33%; độ axit 0,09%; cồn 7,9 ÷ 8,6%.

Giá trị dinh dưỡng: đường 10,63%; đường khử 0,27%; protein 0,23%.

Sản xuất thủ công 53 903 lít/năm.

II.5. Mirin

Tên chung: Mirin.

Tên địa phương (Nhật): Mirin.

Nguyên liệu: gạo sạch, cồn.

Sơ đồ 92. Công nghệ sản xuất

Gạo sạch → Nấu hoặc hấp → cho mốc → Koji

Cồn } → Trộn
Cơm }

Lên men 30 ÷ 40 ngày

↓

Lọc

↓

Thanh trùng → **Mirin**

Đặc tính vật lý: dung dịch, màu vàng lợt, vị ngọt.

Đặc tính hoá học: cồn 14%; đường 43 ÷ 48%; N tổng số 30 ÷ 80 mg/100ml.

Giống vi sinh vật: *Aspergillus oryzae*.

Thời gian sử dụng bảo quản: vài năm.

Sản xuất 100% theo quy mô công nghiệp 59 000 hl.

II.6. Sake

Tên chung: Rượu gạo.

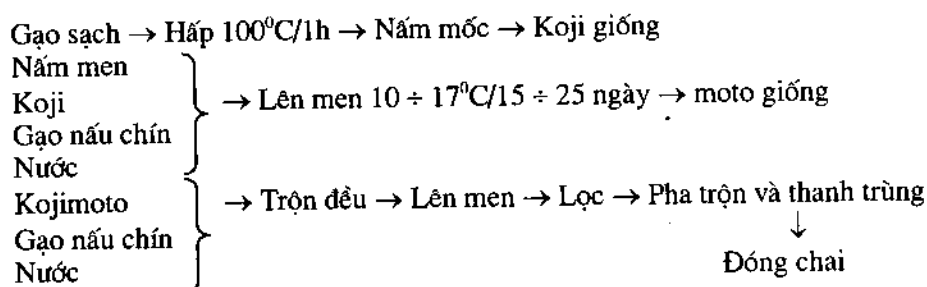
Tên địa phương (Nhật): Sakê.

Nguyên liệu: gạo sạch, cồn, glucoza.

Đặc tính vật lý: dạng dung dịch, màu vàng lợt.

Đặc tính hoá học: pH = 4,2; cồn 15 ÷ 16%.

Sơ đồ 93. Công nghệ sản xuất



Giá trị dinh dưỡng: đường tổng 4%; đường lên men 3,5%.

Giống vi sinh vật: *A. oryzae*, *S. cerevisiae*, *L. sake*, *Leuconostoc mensesenteroides* var *sake*.

Thời gian bảo quản và sử dụng vài năm.

Sản xuất công nghiệp 100%, 1 182 000 hl.

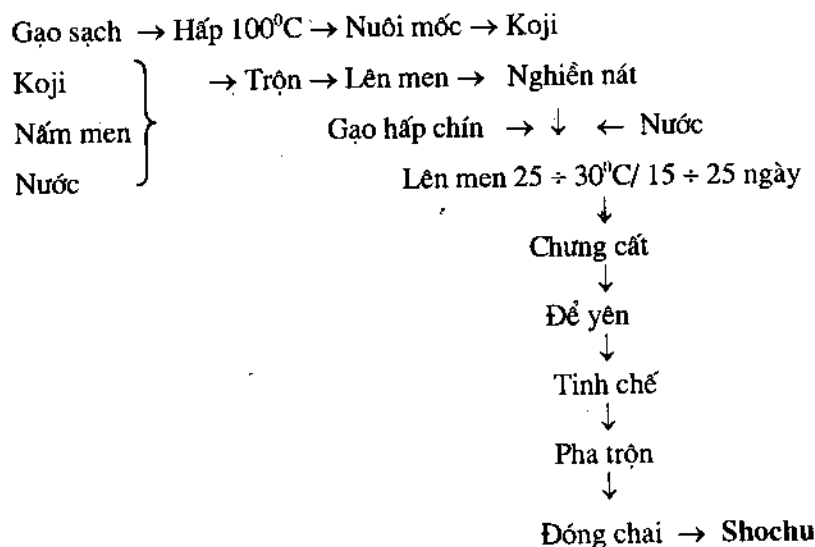
II.7. Shochu

Tên chung: rượu trắng.

Tên địa phương (Nhật): Shochu.

Nguyên liệu: gạo làm sạch, khoai ngọt, bột mì, bột bắp, kê.

Sơ đồ 94. Công nghệ sản xuất



Đặc tính vật lý: dung dịch trong, có mùi đặc trưng của chất mùi cho thêm vào.

Đặc tính hoá học: pH = 3,5 ÷ 4,0; cồn 25 ÷ 30%.

Vì sinh vật: *A. awamori*, *A. kawachii*, *S. cerevisiae*.

Thời gian bảo quản và sử dụng: nhiều năm

Sản xuất công nghiệp 100%, công suất 254 000 hl.

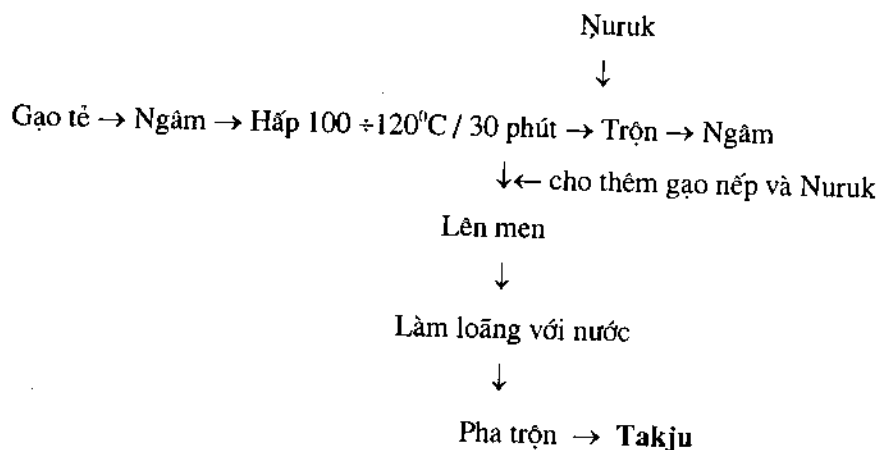
II.8. Takju

Tên chung: nước uống có cồn.

Tên địa phương (Triều Tiên): Takju.

Nguyên liệu: gạo hay lúa mạch làm sạch 95 - 98%; Nuruk 2 - 5%; bột mì, khoai lang (khoai ngọt).

Sơ đồ 95. Công nghệ sản xuất



Đặc tính vật lý: dạng lỏng, màu trắng đục, vị chua, ngọt.

Đặc tính hoá học: pH = 3,8 ÷ 4,0; etylic 5,0 ÷ 6,0; nước 94,5%.

Giá trị dinh dưỡng: protein 0,4%; đường 5,0%.

Vì sinh vật: *S. cerevisiae*, *Hansenula anoloza*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*

Thời gian bảo quản và sử dụng: phụ thuộc nhiệt độ 2 ngày đầu ở 30°C.

Sản xuất công nghiệp: 1 246 000 lít.

III. Men làm rượu (Việt Nam)

Tên chung: Stater.

Tên địa phương: men rượu, men thuốc bắc (Việt Nam).

Bài 1:

Bột gạo 1kg, thuốc bắc 20,5g, men giống 50g, nước 580ml.

Thuốc bắc:

Quế (<i>Cinnamomum cassia</i> Blume)	7 g
Đại hồi (<i>Illicium verum</i> Hook)	6 g
Tiểu hồi (<i>Noeniculum vulgare</i> Will)	5 g
Thảo quả (<i>Amomum Tsao - Ko</i> Grev et L)	1,5 g
Sa nhân (<i>Amomum villoxum</i> Lour)	1 g

Bài 2:

Bột gạo 1kg, thuốc bắc 49,6 g, men giống 50 g, nước 580 g

Thuốc bắc:

Đại hồi (<i>Illicium verum</i> Hook)	8 g
Quế (<i>Cinnamomum cassia</i> Blume)	8 g
Cam thảo (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch)	8 g
Qui (<i>Angelica sinensis</i> Diels)	4,8 g
Bạch linh (<i>Poria cocos</i> Wolf)	4,8 g
Thăng ma (<i>Cimicifuga foetida</i> L.)	4 g
Bạch đàn (<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook)	4 g
Hồ tiêu (<i>Piper nigrum</i> Linn)	4 g
hoặc ớt (<i>Capsium frutescens</i> Linn)	
Xuyên khung (<i>Ligusticum wallichii</i> Fr)	4 g

Và các bài thuốc bắc khác từ 4 ÷ 30 vị khác nhau theo kinh nghiệm nhưng bảo đảm chất lượng:

Đủ chất dinh dưỡng cho vi sinh vật phát triển.

Đủ hương thơm cho rượu.

Tạo kháng sinh chống vi sinh vật tạp nhiễm.

Yếu cầu thành phẩm:

Đặc tính vật lý và cảm quan: dạng rắn, trắng, xốp, thơm mùi men thuốc bắc.

Đặc tính hoá học: chưa xác định.

Số lượng vi sinh vật trong nấm men: nấm men : $100 \div 300 \times 10^6$ tế bào / 1g.

Vi sinh vật: *Hansenula anomala*, *H. cifferri*, *H. dimennae*, *H. fabianii*, *Pichia fabianii*, *P. fermentans*, *P. olmeri*, *P. terricola*, *Saccharomyces aceti*, *S. cerevisiae*, *S. diastaticus*, *S. fermentati*, *S. exiguas*, *S. globus*, *S. heterogenicus*, *S. rouxii*, *Candida javanica*, *C. mensenterica*,

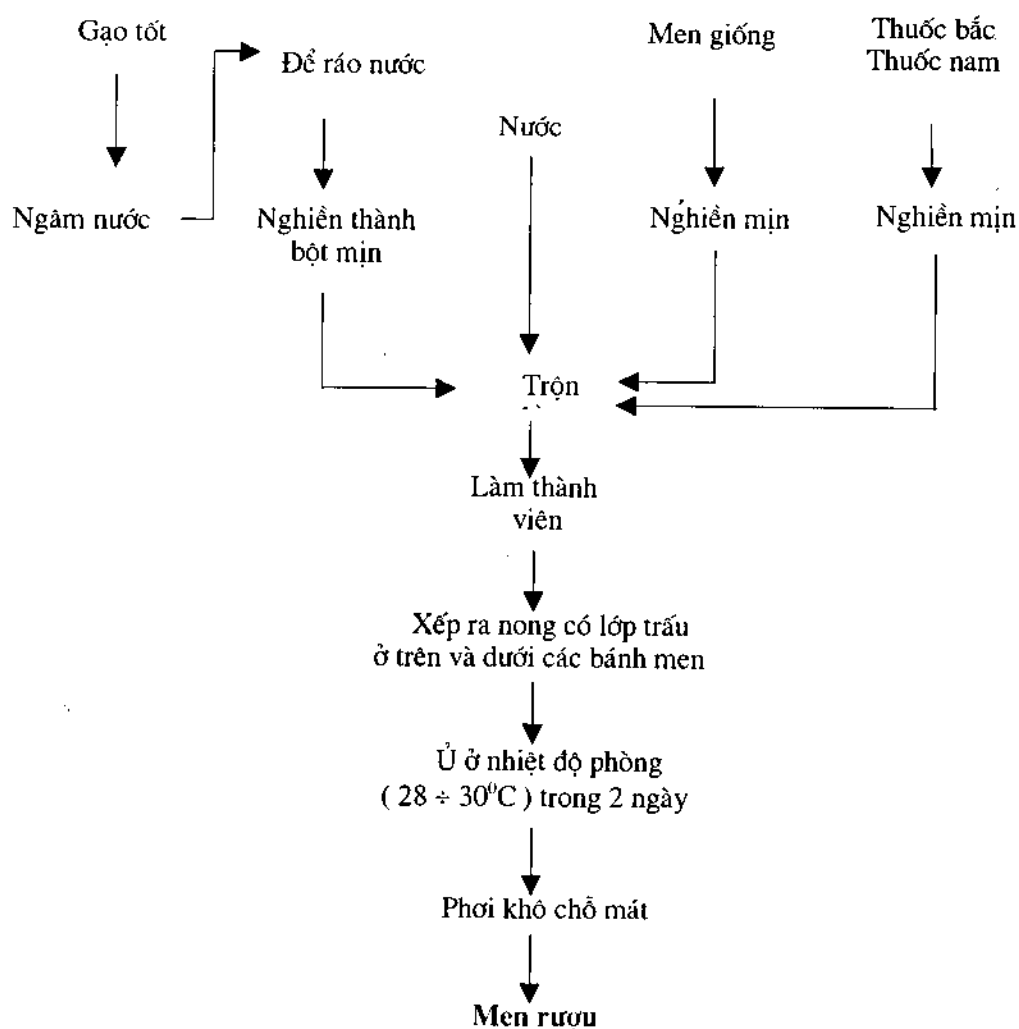
C. pelliculosa, *Rhodotorula glutinis*, *Turolopsis candida*, *T. etchellsii*, *T. mogii*, *T. stelia*, *T. utilis*, *T. versatilis*, *Trichosporon cutaneum*, *Tr. fermentans*, *Tr. variabile*. (Theo Lê Văn Nhung 1991)

Thời hạn sử dụng: 1 năm.

Sản xuất: gia đình.

Sử dụng: dùng trong nấu rượu, làm cơm rượu, nước uống có rượu.

Sơ đồ 96. Công nghệ sản xuất



IV. RƯỢU NẾP

Tên chung: Alcoholic beverage.

Tên địa phương (Việt Nam): rượu nếp, rượu trắng, rượu ngang, rượu đế.

Nguyên liệu: gạo nếp hoặc gạo tẻ 99%, nấm men, men thuốc bắc 1%.

Cách làm:

Gạo → Vo → Để ráo nước → Nấu cơm → Để nguội → Trộn men thuốc bắc đã giã nhỏ → Cho vào chum sành → Nuôi 48 ÷ 72 h ở nhiệt độ 28 ÷ 32°C → Cho nước sạch ngập cơm rượu → Cho lên men tiếp (Có thể bổ sung nấm men *Saccharomyces cerevisiae*) ở nhiệt độ 28 ÷ 32°C trong 48h → Cất rượu → Pha trộn → Rượu nếp.

Yêu cầu thành phẩm: rượu trong, đôi khi hơi đục, đặc trưng của rượu nếp, độ rượu ethanol 30 ÷ 45%

Vì sinh vật: *Endomycopsis* sp., *Endomycopsis fibuligera*, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* sp.,...

Thời hạn sử dụng: 1 năm.

Quy mô sản xuất: gia đình.

Sử dụng: nước uống.

CHƯƠNG 10

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT NƯỚC UỐNG LÊN MEN TỪ CÀ PHÊ VÀ CA CAO

I. LÊN MEN CÀ PHÊ

Hạt cà phê là một loại hạt được lấy từ cây cà phê (coffea). Tất cả có 40 giống cây cà phê. Trong đó có các loại cà phê nổi tiếng sau: coffea arabia, coffea canephora, coffea arabusta, coffea liberia và coffea axelsa. Trong chế biến, người ta chỉ lấy hạt cà phê chín.

I.1. Các quá trình chuyển hoá trong lên men

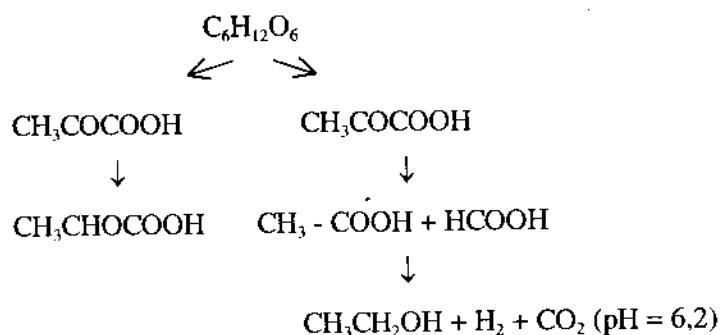
Trong quá trình lên men, nhờ hoạt động của các enzym, hạt cà phê có sự thay đổi rất sâu sắc về tính chất vật lý và tính chất hoá học. Các enzym này không chỉ có trong hạt cà phê mà còn do các vi sinh vật tự nhiên có trên bề mặt hạt cà phê.

Thời gian lên men cà phê thường kéo dài từ 20 đến 100 giờ. Thời gian lên men dài, ngắn, phụ thuộc vào nhiệt độ khi lên men và độ chín của hạt cà phê, giá trị pH khối hạt lên men. Kết quả các thử nghiệm cũng như trong thực tế sản xuất cho thấy rằng:

1. Lên men hiếu khí nhanh và tốt hơn lên men yếm khí (Menchu and Rolz, 1973).
2. Nếu trong quá trình lên men người ta cho thêm Ca^{++} sẽ làm tăng hoạt tính enzym. Kết quả là quá trình lên men sẽ nhanh hơn.
3. Hiện nay người ta sử dụng các enzym được sản xuất công nghiệp để lên men cà phê. Trong đó có các loại enzym như Benefax, Pectozime, cofepec. Kết quả sử dụng các chế phẩm enzym này đều chứa enzym pectinaza, hemixenluloza và xenlulaza.

Trong quá trình lên men thành phần hoá học của cà phê được thay đổi khá sâu sắc. Sự thay đổi đó có thể xem bảng 21.

Menchu và Rolza (1973) cho thấy ngoài các axit hữu cơ, có etanol là sản phẩm được tạo thành trong quá trình lên men. Quá trình tạo thành etanol như sau:



Bảng 21. Sự thay đổi thành phần hoá học của hạt cà phê trước và sau khi lên men

Thành phần	% chất khô	
	Trước lên men	Sau lên men
Nước	35,3	50
Lipit	6,0	4,0
Pectin	47,0	36,2
Homoxenlulaza	9,4	8,0
Các chất khác	2,3	1,1

I.2. Vi sinh vật trong lên men cà phê

Có rất nhiều loài vi sinh vật tham gia trong quá trình lên men cà phê. Có thể tóm tắt như sau:

1. Các loài vi khuẩn lactic: tìm thấy rất nhiều vi khuẩn lactic thuộc *Leuconostoc* và *Lactobacillus*.
2. Các loài cầu khuẩn thuộc *Acetobacter* và *Escherichia*.
3. Các loài *Bacillus* chứa nhiều pectinaza.
4. Các loài nấm men.
5. Các loài nấm sợi như *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillin*.
6. Các loài thuộc *Erwinia*.

Trong quá trình lên men, nhiều tác giả cho thấy lượng enzym pectinaza được tổng hợp khá nhiều. Các enzym này tham gia phản ứng sau: $\text{Pectin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{peroxit pectic} + \text{CH}_3\text{OH}$

Enzim pectinaza được tạo thành nhờ vi khuẩn và nhờ nấm mốc. Trong đó, lưu ý rằng các pectinaza của vi khuẩn thường hoạt động ở pH cao hơn của nấm mốc (ở vi khuẩn pH = 5 + 6 và

ở nấm mốc pH = 4 + 5). Các enzym pectinaza thường bị mất hoạt tính ở nhiệt độ 95°C trong 20 phút).

II. LÊN MEN CA CAO

Cacao và Sôcôla được sản xuất từ hạt của cây *Theobroma cacao*. Đây là loài cây được trồng ở vùng Trung Mỹ thời gian rất lâu, trước khi người Tây Ban Nha đặt chân tới vùng đất này (1519). Dần dần cây cacao được người Tây Ban Nha chuyển về trồng tại Châu Âu, sau đó được trồng tại các nước Châu Á.

II.1. Phương pháp lên men hạt cacao

Có ba phương pháp chính lên men hạt cacao.

a. Phương pháp của vùng Tây Phi

Phương pháp này không đòi hỏi thiết bị phức tạp. Theo phương pháp này, hạt cacao được lên men thành từng đồng, trên bề mặt và dưới đồng hạt được phủ một lớp lá chuối. Quá trình lên men kéo dài khoảng 6 ngày. Cứ 2 hoặc 4 ngày được đảo trộn một lần để tăng nhanh quá trình lên men.

b. Phương pháp lên men của người Nam Mỹ

Phương pháp này được thực hiện như sau: hạt cacao được chứa vào các thùng với khối lượng 1,5 tấn. Xung quanh và phía dưới thùng có các lỗ. Có khi người ta phủ lá chuối trên bề mặt thùng hoặc xếp ở dưới đáy thùng.

c. Phương pháp lên men dưới lòng đất

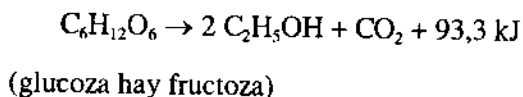
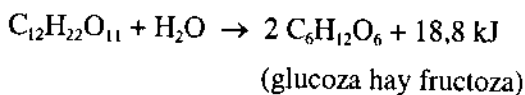
Người ta đào một cái hố dưới lòng đất và đổ hạt cacao xuống để tiến hành lên men.

II.2. Vi sinh vật trong quá trình lên men

a. Nấm men

Trong khối cacao lên men thấy sự có mặt của các loài nấm men (loài tạo cồn và hương thơm). Các loài nấm men thấy ở hầu hết các lớp cacao từ đáy đến bề mặt khối lên men. Thường thấy hai loài *Kluyveromyces* và *Saccharomyces* với số lượng rất lớn.

Các loài nấm men này tham gia chuyển hoá các chất theo phương trình sau:



Ngoài hai loài trên còn thấy rất nhiều loài nấm men khác như: *Hansenula*, *Kloeckera*, *Torulopsis*, *Candida*, *Pichia*, *Shizosaccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Hanseniospora*.

b. Vi khuẩn lactic

Trong khối lên men, người ta thấy có rất nhiều loài vi khuẩn lactic khác nhau như *Betabacterium*, *Streptobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. Các loài vi khuẩn lactic chuyển hoá đường thành axit lactic và các loại axit hữu cơ khác.

c. Vi khuẩn axetic

Các vi khuẩn axetic phát triển sau nấm men. Chúng chuyển hoá etanol thành axit axetic theo phương trình sau:



Thường thấy trong đồng cacao lên men các loài vi khuẩn axetic sau: *Acetobacter raneer*, *A. ascendens*, *A. suboxydans*, *A. xylinoides*, *A. orleanense*.

d. Các loài vi khuẩn khác

Ngoài ba nhóm vi sinh vật trên, trong đồng cacao lên men thấy có mặt của *B. coagulans*, *B. Puumidus*, *B. Stearothermophilus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Zymomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* và *Proteus*.

Trong đồng cacao lên men, người ta cũng phát hiện thấy nhiều loài nấm sợi như *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*.

Trong quá trình lên men, các loài vi sinh vật sẽ làm tăng nhiệt độ khối lên men, làm giảm pH từ 6,5 xuống còn 4,5 lượng axit axetic có thể đạt 2% và lượng axit lactic tăng từ 0,01 đến 0,22%. Người ta cũng phát hiện được 17 loại enzym được tạo thành trong quá trình lên men.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tài liệu nước ngoài

1. Continuous production of GA in a vertical rotating immobilized cell reactor of the bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Bioresource technology, Vol. 47/1994/p.113 - 119.
2. Azuma,T., and Kuratsu,Y
Process for producing L-glutamic acid;
European Patent Application No.91112712.4 (1991)
3. Das, K., Rosma,A., Anis, M. and Ismail,N
Production of GA by *Brevibacterium lactofermentum* from palm waste hydrolysate.
In Proceeding of the Asian - Australian Biotechnology Co-op under the 11th Australia Biotechnology conference, Perth Western Australia 1993/p.222-223.
4. Fujii, M., Nakajo, Y., Fujino K.,Takeda, H.
Novel glutamic acid -producing coryneform bacteria and production of L- GA using said bacteria.
JP 63214189A/1998.
5. Hattori, K. and Kotani, K.
Process for L- AG -production by fermentation and Mutant Microorganisms for use therein.
European patent application No.899115775/1984
6. Continuous production of GA in a three phases fluidized bed with immobilized *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13058.
Food Tech nol (New York) Vol. 4/1990/p.149-154.
7. Hirose, Y., Sonoda, H., Kinoshita, K., Okada,H.
Studies on oxygen transfer in submerged fermentation. Part V: The effect of aeration on glutamic acid fermentation.
Agr . Biol. Chem.30/No.6/1996/p.585-593.

8. Hirose, Y., Sonoda, H., Kinoshita, K., Okada, H.

Studies on oxygen transfer in submerged fermentation. Part IX: Oxygen demand in glutamic acid fermentation

Agri. Biol. Chem. Vol 32/No. 7/1968/p.855-859.

9. Hong, K.T, Ho Park., S., Heung Lee, J., Yong Chou, C.

Control of sugar feeding for AG Fermentation.

J. ferment. Technol. Vol 62/No.1/1984/p.49-54.

10. Hongo, M. and Iwahara, M.

Application of Electro-energizing method to L-glutamic acid fermentation.

Agri. Biol. Chem. Vol 43/No.10/p.2075-2081.

11. Ikeda, S., Hirose, Y., Kobayashi, K. and Kinoshita, K.

Accumulation of L-GA from dibasic carboxylic acids by a hydrocarbon, utilizing Bacterium.

Agri. Biol. Chem. Vol. 33/1969/p.1042-1056.

12. Kanzaki, T., Isobe, K., Okada, H., Motizuki, K., Fukuda H.

L-glutamic acid fermentation. Part I. Selection of an acid requiring mutant and its properties.

Agri. Biol. Chem. Vol. 31/1967/p.1307.

13. Kawai, Y. and Uemura, T.

Studies on Metabolism of Pyrrolidone Carboxylic acid in Bacteria. Part II. L- AG Formation from Pyrrolidone carboxylic acid by *Pseudomonas alcaligenes*.

Agri. Biol. Chem. Vol.30/1996/p.438-486.

14. Kinoshita, S., Ueda, S. and Shimoto, M.

Studies on Amino acid fermentation Part I: Production of L-GA by various Microorganisms.

J. Gen. Appl. Microbiol. Vol.3/1957/p.193.

15. Production of amino acids by Fermentation process.

In Advances in Applied Microbiology. Vol 1/1959/p. 201-214.

Academic Press, New York, London. Edited by Wayne WW, Umbreit.

16. Kimura, K.

Using organic acids for production of L-GA by *Micrococcus glutamicus*.

J. Gen. Appl. Microbiol. Vol.10/1964/p.23

17. Kikuchi, M. and Nakao, Y.

Microbial production of L-GA by glycerol auxotroph. Part V. Relation between fatty acid composition of cellular phospholipids and the excretion of L-GA by a glycerol auxotroph of *Corynebacterium alkanolyticum*.

Arg. Biol Chem. Vol. 37/1973/ p.509-514.

18. Kikuchi, M., Kanamaru, T. and Nakao, Y.

Relation between the Extracellular accumulation of L-GA and the Excretion of Phospholipids by Penicillin treated *Corynebacterium alkanolyticum*

Arg. Biol Chem. Vol. 37/1973/ p.2405-2408.

19. Kobayashi, K., and Kishimoto, M.

Production of L-GA from Hydrocarbon by Penicillin – resistant mutants of *Corynebacterium hydrocarbostatus*.

Arg. Biol. Chem. Vol. 35/1971/p.1241-1247.

20. Nakao, Y., Kanamaru, T., Kikuchi, M., Yamatodani, S.

Action of Penicillin on the membrane Permeability barrier to L-GA. Part I. Extracellular accumulation of phospholipids, UDP – N-Acetylhexosamine prevative and L-glutamic acid by Penicillin – treated *Corynebacterium alkanolyticum*

Arg. Bio. Chem. Vol. 37/no.10/1973/ p.2399-2404.

21. Ogbadu LJ., Okagbue RN., Ahmad AA.

Glutamic acid production by *Bacillus* isolates from Nigerian fermented Vegetable proteins.

World journal of Microbiol & biotechnol. Vol. 6/1990/ p.377-382.

22. Okabe, S., Shibukawa, M., Ohsawa, T.

L-glutamic acid fermentation with molasses. Part IX. Relation between lipid content of cell membrane from *Mammoniaphilum* and extracellular L-GA Accumulation.

Arg. Biol. Chem. Vol.31/1967/p.389.

23. Oki, T., Matsui, T and Ozaki, A.

Bacteriophages of L- glutamic acid producing *Bacteria* Part VIII. Growth Characteristics of *Brevibacterium* phages.

Arg. Biol. Chem. Vol.31/1967/ p. 1466-1473.

24. Qian, Z and Xue, L.

Real time control system for glutamic acid fermentation process.

In Conference Publication No .309, Published by IEE Michael Faraday House Stevenage, Engl/ 1989/p. 228-232.

25. Qi, C. and Lin-ge, L.

Studies on L-GA producing Bacteria AS 1542 Part II. Growth factors of *Corynebacterium crenatum* and their effect on the accumulation of L-GA.

Acta microbiological Sinica Vol. 16/1976/p.39-40.

26. Shibukawa, M., Kimura,M. And Ohuchi, S.

L-glutamic acid fermentation with molasses. Part XII: Relationship between the kind of phospholipids and their fatty acid composition in the Mechanisms of Extracellular accumulation of L-glutamate.

Arg. Biol.Chem. Vol. 34/No.8/1970/p. 1136-1141.

27. Shio, S., Ozaki, H.and Mori, M

Glutamate Metabolism in a glutamate – producing *Bacterium*, *Brevibacterium flavum*.

Arg. Biol. Chem. Vol. 46/1982/p. 493-500.

28. Tomita, K.

Correlation between Intracellular L-Proline. Concentration and IMP productivity in *Corynebacterium ammoniagenes*.

Biotech. Vol. 56. p. 1347-1348, 1992.

29. Tsuchida, T., Miwa,K., Nakamori, S. and Momose, H.

Preparation of L-Glutamic acid by fermentation method. JP-56148295A/1981.

30. Tujimoto, N., Kikuchi, Y., Kurahashi, O. and Kawahara, Y.

Mutant *Escherichia Coli* capable of enhanced L-GA production by fermentation.

US-Patent No.5,378,616/1995.

31. Yamada, K., and Komagata,K.

Taxonomic Studies on *Corynebacteria*. Part V. Classification of *Coryneform bacteria*,

J. gen. Appl. Microbiol. Vol. 18/1972/p. 417-431.

32. Yamada, K., and Seto, A.

Microorganisms for production of glutamic acid. US-patent No. 5,250,434/1993.

33. Yamamoto, m., Nishida, H., T. and Ozaki, A.

Microbial production of amino acids from aromatic compounds. Part II. Production of GA from Benzoate.

J. Ferment. Technol. Vol. 50/1972/ p. 876-883.

34. Yoshii, H., Yoshimura, M., Nakamori, S, and Inour, S.

L-glutamic acid fermentation on a commercial scale by use of cane molasses with inverted sucrose.

Nippon Nogeikagaku Kaishi Vol. 67/1993/p. 955-960.

35. Yoshii, H., Koyama, Y., Obana, H., Ikeda, S.

Trapping material for immobilized invertase system for hydrolysis of sucrose in cane molasses before L-GA fermentation.

Nippon Nogeikagaku Kaishi Vol. 67/1993/p. 1271-1276.

36. Yoshimura, M. and Koyama, Y.

Preparation of L-GA by fermentation process. US- Patent 4,529,697/1985.

37. Zhang, K.

Question and Answer about the manufacture of Monosodium glutamate.

Light Industry publisher Beijing 1989, p. 168.

38. Brian J.B. Wood (1985).

Microbiology of fermented foods. Vol. 1

Elsevier Applied Science publishers Ltd. in Great Britain.

39. S. Saono; R.R. Hull. B. Dhamcharee. (1986).

A concise Handbook of Indigenous Fermented Foods in the Asean Countries.

Published by the Indonesian Institute of Science (LIPI) Jakarta, Indonesia, 1986.

40. C.M. Bourgeois J-P. Carpent (1989).

Microbiologie Alimentaire (Tome 2). Aliments fermentés de Fermentations alimentaires.

Londres Tec. Doc. New York Technique of Documentation Lavoisier, 1989.

II. Tài liệu tiếng việt

1. Giang Thế Bình

Kỹ thuật sản xuất axit glutamic.

Viện Công nghiệp Thực Phẩm- Hà Nội 2000.

2. Nguyễn Thị Hiền

Công nghệ sản xuất mì chính – nước chấm.

Đại học Công nghiệp nhẹ, 1970.

3. Nguyễn Văn Hiệu

Nghiên cứu sản xuất chế phẩm men cổ truyền và hệ sinh vật trong quá trình sản xuất rượu gạo và rượu cẩm bằng chế phẩm men cổ truyền.

Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm 10,11/1992

4. Nguyễn Thị Hiền

Thành phần gi đường mía Việt Nam và ứng dụng trong công nghiệp lên men ở nước ta.

Báo Lương thực- Thực phẩm, số 4; số 9 (1979).

5. Nguyễn Thiện Luân và cộng sự

Nghiên cứu sử dụng nguồn superphosphat trong nước thay thế các nguồn photphat nhập ngoại để sinh tổng hợp L-AG

LTTP số 5/1986.

6. Nguyễn Đức Lương (1998)

Công nghệ vi sinh vật.

ĐHBK Thành phố Hồ Chí Minh.

7. Lê Văn Nhung

Biotechnology in Food production by Traditionnal fermentation Method in Vietnam.

International workshop, Hanoi 9-12/December, 1991.

8. Lương Đức Phẩm

Sinh tổng hợp axit glutamic nhờ chủng *Brevibacterium flavum*.

Luận văn PTS, Mạc Tư Khoa, 1972.

9. Nguyễn Hữu Phúc (1996)

Các phương pháp lên men thực phẩm truyền thống ở Việt Nam và các nước trong vùng.

Nhà xuất bản Nông nghiệp – Thành phố Hồ Chí Minh.

10. Quãn Văn Thịnh

Sản xuất tương và nước chấm.

Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1980.

MỤC LỤC

Lời nói đầu	3
Lời cảm ơn	4
Phần I. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MÌ CHÍNH	
Chương 1 : Tổng quan về mì chính	
I. Khái quát về mì chính	7
I.1. Khái niệm	7
I.2. Vai trò của mì chính và L-AG	7
I.2.1. Vai trò của L-AG	7
I.2.2. Vai trò của mì chính	8
I.2.3. Mì chính là gia vị an toàn	9
II. Tính chất của mì chính	11
II.1. Tính chất lý học	11
II.2. Tính chất hoá học	11
II.2.1. Phản ứng mất nước	12
II.2.2. Phản ứng phân huỷ ở nhiệt độ cao	12
II.2.3. Tác dụng của pH	13
II.2.4. Tác dụng của các yếu tố khác	14
II.2.4.1. Tác dụng của axit vô cơ	14
II.2.4.2. Tính hoạt quang	14
III. Lịch sử mì chính	15
IV. Tình hình sản xuất mì chính trên thế giới và ở Việt Nam	16
Chương 2: Các phương pháp sản xuất mì chính	
I. Các phương pháp sản xuất mì chính	19
I.1. Phương pháp tổng hợp hoá học	19
I.2. Phương pháp thuỷ phân protit	20
I.3. Phương pháp lên men	20
I.4. Phương pháp kết hợp	22
II. Nguyên liệu sản xuất mì chính	22
II.1. Nguyên liệu dùng cho phương pháp thuỷ phân	22
II.2. Nguyên liệu dùng cho phương pháp lên men	24

II.2.1. Tinh bột sắn	24
II.2.1.1. Thành phần và cấu tạo của tinh bột sắn	24
II.2.1.2. Thu nhận glucoza từ tinh bột sắn	24
II.2.2. Rỉ đường mía	25
II.2.2.1. Thành phần rỉ đường mía	25
II.2.2.2. Thành phần các chất sinh trưởng	28
II.2.2.3. Vi sinh vật trong rỉ đường mía	28
II.2.2.4. Lực đệm của rỉ đường mía	29
II.2.2.5. Một số phương pháp xử lý rỉ đường mía	29
II.2.3. Nguyên liệu khác	29
Chương III : Sản xuất mì chính bằng phương pháp thủy phân	
I. Phương pháp trao đổi ion	31
II. Phương pháp muối hydric axit glutamic	32
II.1. Giải thích các điều kiện kỹ thuật trong quy trình	35
II.1.1. Xử lý các nguyên liệu	35
II.1.1.1. Chế biến keo protit của đậu	35
II.1.1.2. Chế biến keo protit của bột mì	36
II.1.2. Chế biến nguyên liệu	39
II.1.2.1. Thủy phân	39
II.1.3. Lọc	48
II.1.4. Cô đặc	50
II.1.5. Làm lạnh - kết tinh	53
II.1.6. Hút lọc	59
II.1.7. Tẩy rửa	60
II.1.8. Trung hoà 1	61
II.1.9. Trung hoà 2 và khử tạp chất	62
II.1.10. Tinh chế	64
II.1.11. Làm lạnh kết tinh	64
II.1.12. Ly tâm - rửa	65
II.1.13. Sấy khô	65
II.1.14. Nghiền và rây	65
II.1.15. Đóng gói - bảo quản	66
III. Phương pháp điểm đẳng điện	67
III.1. Nguyên lý chung	67
III.2. Quy trình sản xuất	67
III.2.1. Phối liệu và thủy phân	67

III.2.2. Làm nguội	67
III.2.3. Trung hoà 1	68
III.2.4. Lọc	68
III.2.5. Trung hoà 2	68
III.2.6. Cô đặc	68
III.2.7. Làm nguội	68
III.2.8. Lọc	70
III.2.9. Gia nhiệt axit hoá	70
III.2.10. Ép lọc	70
IV. Phương pháp sinh tổng hợp axit amin hoặc phương pháp lên men thực tế	70
IV.1. Tách chúng từ tự nhiên	70
IV.2. Định tính và định lượng tạo thành	71
IV.2.1. Phương pháp vi sinh vật	71
IV.2.2. Dùng khoanh giấy nhỏ	71
IV.2.3. Phương pháp đo độ đục	72
IV.2.4. Dùng phương pháp sắc ký lỏng hoặc điện di	72
IV.3. Kết quả nghiên cứu trên thế giới	73
IV.4. Nghiên cứu sinh lý các chủng hoạt động	77
IV.4.1. Nguồn cacbon	77
IV.4.2. Nguồn nitrogen	79
IV.4.3. Các chất sinh trưởng	81
IV.4.4. Các muối khoáng	83
IV.4.5. Nhiệt độ nuôi cấy	83
IV.4.6. pH môi trường	83
IV.4.7. Ảnh hưởng của penicilin và các chất tương tự	85
IV.4.8. Lượng oxy hoà tan	86
IV.4.9. Ảnh hưởng của dầu phá bọt	88
V. Quy trình sản xuất axit glutamic tại hai Nhà máy Thẩm Dương- Thượng Hải, Trung Quốc	90
V.1. Giống vi khuẩn và cách giữ giống	90
V.2. Nhân giống cấp 1	90
V.3. Nhân giống cấp 2	90
V.4. Nhân giống cấp 3	90
V.5. Lên men công nghiệp	91
V.6. Cô đặc	91
V.7. Kết tinh axit glutamic và chế tạo mì chính	91

Chương 4 : Nghiên cứu hoàn chỉnh sản xuất mì chính theo phương pháp lên men

I. Quá trình lên men L-AG	92
I.1. Các vi sinh vật có khả năng sinh L-AG	92
I.1.1. Các vi sinh vật có nguồn gốc tự nhiên	92
I.1.2. Các vi sinh vật đột biến	95
I.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành L-AG	97
I.2.1. Nguồn cacbon	97
I.2.2. Nguồn nitơ	98
I.2.3. Nguồn muối vô cơ khác	98
I.2.4. Nguồn các chất điều hoà sinh trưởng	99
I.2.5. Nguồn các chất khác	99
I.2.6. Ảnh hưởng của pH	100
I.2.7. Ảnh hưởng của nhiệt độ	100
I.2.8. Ảnh hưởng của hệ thống gió và khuấy	101
I.2.9. Ảnh hưởng của việc cung cấp điện tử	102
I.2.10. Ảnh hưởng của thực khuẩn thể	102
I.3. Các yếu tố điều hoà quá trình lên men	103
I.3.1. Biotin	103
I.3.1.1. Sự hấp thụ biotin của tế bào	103
I.3.1.2. Tác dụng của biotin	104
I.3.1.3. Biotin và con đường trao đổi glucoza	104
I.3.1.4. Biotin và chu trình glyoxylat	105
I.3.1.5. Các chất thay thế biotin	107
I.3.2. Các chất kháng biotin	108
I.3.2.1. Penicilin G (PG)	108
I.3.2.2. Các chất có tác dụng tương tự PG	109
I.3.3. Điều chỉnh khả năng bán thấm của tế bào	110
I.3.3.1. Sự giải phóng axit amin tự do nội bào	110
I.3.3.2. Biến tính tế bào dẫn đến khả năng sinh L-AG	111
I.3.3.3. Sự thay đổi lipid ở màng tế bào	111
I.4. Cơ sở khoa học của sự hình thành L-AG	112
I.4.1. Từ đường glucoza	112
I.4.2. Từ axetat	116
I.4.3. Từ benzoat	117
I.4.4. Từ <i>n</i> -alkan	117
I.4.4.1. Từ <i>n</i> -dodecan	117

I.4.4.2. Từ n - tetradecan	117
I.5. Cơ chế tạo axit glutamic của chủng <i>Micrococcus glutamicus</i>	118
I.5.1. Từ nguồn cacbon là sacarit theo chu kỳ Embden- Mayerhaf	118
I.5.2. Các sản phẩm của quá trình lên men L-AG	120
I.5.2.1. Sản phẩm chính	120
I.5.2.2. Sản phẩm phụ	120
I.5.2.2.1. Axit lactic	121
I.5.2.2.2. Axit succinic	121
I.5.2.2.3. Axit α - xetoglutaric	121
I.5.2.2.4. Glutamin và sản phẩm khác	123
I.5.2.3. Sự chệch hướng tạo sản phẩm chính	123
I.6. Các phương pháp vận hành quy trình lên men L-AG	123
I.6.1. Phương pháp lên men	123
I.6.1.1. Phương pháp lên men gián đoạn	124
I.6.1.2. Phương pháp lên men liên tục	125
I.6.2. Lên men trong môi trường nghèo biotin không bổ sung cơ chất	132
I.6.3. Lên men dưới điều kiện nghèo amoniac	135
I.6.4. Lên men trong môi trường giàu biotin	135
I.6.4.1. Kỹ thuật điều khiển sinh khối trong môi trường giàu biotin	137
I.6.4.2. Kỹ thuật lên men bổ sung cơ chất	138
I.6.4.3. Lên men bổ sung cơ chất trong môi trường giàu biotin	141
I.6.5. Kỹ thuật lên men bổ sung cơ chất trong môi trường nghèo biotin	143
I.7. Phương pháp nâng cao hiệu suất lên men L-AG	143
I.8. Một số hiện tượng bất thường trong lên men axit glutamic và biện pháp xử lý	143
I.8.1. Thời kỳ tiềm phát kéo dài	143
I.8.1.1. Giống quá già	144
I.8.1.2. Thanh trùng môi trường không tốt	145
I.8.2. Quá trình lên men chậm chạp do môi trường chứa nhiều sắt	146
I.8.3. Sử dụng ure không đúng mức	147
I.8.3.1. Dư ure ban đầu	147
I.8.3.2. Thiếu ure ban đầu	147
I.8.4. Môi trường thiếu biotin	147
I.8.5. pH ban đầu thấp	148
I.8.6. Thiếu oxy hoà tan	148
I.8.7. Nhiều dầu phá bọt	149
I.8.8. Giống chết hoặc kém phát triển	

I.8.9. Tạp trùng trong lên men axit glutamic và biện pháp phòng chống	149
I.8.9.1. Đặc điểm một số tạp khuẩn	149
I.8.9.1.1. Vi khuẩn sinh bào tử	149
I.8.9.1.2. Thực khuẩn thể (Bacterophage hay phage)	150
I.8.9.2. Một số biện pháp phòng, chống nhiễm trùng	152
I.8.9.2.1. Biện pháp thiết bị	152
I.8.9.2.2. Phương pháp công nghệ	153
I.8.9.2.3. Sử dụng hoá chất	154
I.8.10. Các yếu tố ảnh hưởng tới tác dụng của hoá chất	155
I.8.10.1. Nồng độ	155
I.8.10.2. Thời điểm bổ sung hoá chất	156
I.9. Điều kiện khử trùng môi trường	158
I.10. Hiện tượng nhiễm thực khuẩn thể ôn hoà	160
I.10.1. Giống nhiễm thực khuẩn thể ôn hoà	160
I.10.2. Phương pháp phòng ngừa và xử lý dịch men nhiễm thực khuẩn thể ôn hoà	166
I.10.2.1. Xử lý lại môi trường và tiếp giống mới	166
II. Dây chuyền công nghệ sản xuất mì chính theo phương pháp lên men	167
II.1. Sơ đồ dây chuyền	167
II.2. Thuyết minh dây chuyền	168
II.2.1. Công đoạn thuỷ phân	169
II.2.1.1. Phương pháp thuỷ phân bằng enzym	169
II.2.1.2. Phương pháp thuỷ phân bằng H_2SO_4	169
II.2.1.3. Phương pháp thuỷ phân bằng HCl	169
II.2.2. Trung hoà	170
II.2.3. Ép lọc	170
II.2.4. Công đoạn lên men	171
II.2.4.1. Giống - chủng	171
II.2.4.2. Môi trường	171
II.2.4.3. Bảo quản giống	172
II.2.4.4. Thuần hoá	172
II.2.4.5. Lên men	172
II.2.4.6. Lên men cấp II	173
II.2.4.7. Xử lý ure và dầu phá bọt	173
II.2.4.8. Xử lý không khí	174
II.2.4.9. Lên men lớn	174

II.2.5. Công đoạn trao đổi ion	177
II.2.5.1. Pha chế dịch men	178
II.2.5.2. Xử lý hạt nhựa resin	178
II.2.5.3. Trao đổi ion	179
II.2.5.4. Sơ đồ thiết bị trao đổi ion	186
II.2.6. Tách axit glutamic	187
II.2.7. Axit hoá axit glutamic	188
II.2.8. Làm lạnh kết tinh	188
II.2.9. Công đoạn trung hòa kết tinh	188
II.2.9.1. Trung hòa 1	189
II.2.9.2. Trung hòa 2	189
II.2.10. Cô đặc kết tinh	190
II.2.11. Sấy mì chính	191
II.2.12. Sàng mì chính	192
II.2.13. Bao gói	192
III. Sơ đồ quá trình sản xuất mì chính (Phụ lục)	192

Phần II : CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MỘT SỐ SẢN PHẨM LÊN MEN CỔ TRUYỀN

Lời giới thiệu	202
Mở đầu	203

Chương 5: Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men từ thủy sản

I. Công nghệ sản xuất nước mắm	205
I.1. Tình hình nghiên cứu và sản xuất nước mắm	205
I.2. Nguyên liệu sản xuất nước mắm	206
I.3. Công nghệ sản xuất nước mắm	207
I.3.1. Công nghệ sản xuất nước mắm dài ngày	208
I.3.2. Công nghệ sản xuất vùng Cát Hải (Hải Phòng)	209
I.3.3. Phương pháp gài, nén của miền Trung	210
I.3.4. Phương pháp sản xuất nước mắm ở Phú Quốc	211
I.3.5. Công nghệ sản xuất nước mắm ngắn ngày	212
I.4. Thành phần hóa học của nước mắm	214
I.4.1. Thành phần axit amin	214
I.4.2. Các vitamin	214
I.4.3. Hợp chất vô cơ	215
I.4.4. Thành phần nitơ	215

II. Công nghệ sản xuất một số sản phẩm lên men từ thủy sản trên thế giới	216
II.1. Balao Balao	216
II.2. Burong bangus	217
II.3. Burong isda	218
II.4. Itoi malangpu	218
II.5. Ika Shiokara	219
II.6. Kung chom	219
II.7. Kusaya	220
II.8. Pla chao	220
II.9. Pla chom	221
II.10. Pla paeng Daeng	221
II.11. Pla Ra	222
II.12. Plasom	222
II.13. Saeoojeot	223
II.14. Som Fug	223
II.15. Tai Pla	224
II.16. Nước mắm và các sản phẩm tương tự	224
II.16.1. Bagoong	224
II.16.2. Belacan	225
II.16.3. Budu	226
II.16.4. Nam Pla	226
II.16.5. Patis	227
II.16.6. Shotsuru	228
II.16.7. Mắm nêm Việt Nam	228
II.16.8. Mắm cá thu Việt Nam	228

Chương 6 : Công nghệ sản xuất các sản phẩm từ thịt và sữa

I. Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men từ thịt	230
I.1. Công nghệ sản xuất nem chua	230
I.2. Một số công nghệ sản xuất sản phẩm thịt lên men ở các nước Châu Á	231
I.2.1. Longanisa	231
I.2.2. Nham	232
I.2.3. Salami	232
I.2.4. Tapa	233
I.2.5. Tocino	233
I.2.6. Nem chua Việt Nam	234
II. Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men từ sữa	235

II.1. Phomat và các sản phẩm tương tự	235
II.1.1. Phomat Camembert	235
II.1.2. Phomat Cheddar	235
II.1.3. Phomat Cottage	236
II.1.4. Phomat Cottage (Philippin)	236
II.1.5. Gouda	237
II.1.6. Kesong Puti	238
II.1.7. Kesong puti 2	239
II.1.8. Mozzarella	240
II.1.9. Romano	240
II.1.10. Phomat Thụy Sĩ	241
II.2. Sữa chua và những sản phẩm tương tự	242
II.2.1. Curd	242
II.2.2. Dadhi	242
II.2.3. Yoghurt	243
Chương 7 : Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men từ đậu nành và hạt ngũ cốc	
I. Thành phần hóa học của hạt đậu nành	244
II. Công nghệ lên men hạt đậu nành	247
II.1. Sản xuất đậu phụ	247
II.2. Sản xuất chao	252
II.2.1. Công nghệ sản xuất chao	253
II.2.2. Quy trình sản xuất chao bánh	253
II.2.3. Giải thích quy trình công nghệ	254
II.2.4. Chao (Việt Nam)	257
II.3. Sản xuất nước chấm	259
II.3.1. Vi sinh vật trong sản xuất nước chấm	259
II.3.2. Công nghệ sản xuất	259
II.3.3. Tane Koji	263
III. Công nghệ sản xuất tương	263
III.1. Nguyên liệu sản xuất tương	264
III.1.1. Nguyên liệu giàu glucit	264
III.1.2. Muối	265
III.1.3. Nước	265
III.2. Vi sinh vật dùng trong sản xuất tương	266
III.3. Kỹ thuật sản xuất tương thủ công	266
III.4. Kỹ thuật sản xuất tương công nghiệp	269
III.4.1. Các giai đoạn sản xuất	269

III.4.2. Giá trị dinh dưỡng của tương	274
III.5. Một số sản phẩm tương cổ truyền	275
III.5.1. Mốc tương (Việt Nam)	275
III.5.2. Tương bắc (Việt Nam)	277
III.5.3. Tương nam (Việt Nam)	278
III.5.4. Tương đặc (Việt Nam)	279
IV. Một số công nghệ lên men các sản phẩm truyền thống Châu Á	279
IV.1. MISO và các sản phẩm tương tự	279
IV.1.1.Hishiho Miso	280
IV.1.2.Kome Ama Miso	280
IV.1.3.Kome Kara Miso	281
IV.1.4.Mame miso	282
IV.1.5.Miso	283
IV.1.6.Mugi miso	284
IV.1.7.Tao Chiew	284
IV.2. Natto và những sản phẩm tương tự	284
IV.2.1. Hama natto	285
IV.2.2.Itoniki natto	286
IV.2.3. Thừa Nao	287
IV.3. Các sản phẩm đậu nành lên men dạng paste và các sản phẩm tương tự khác	287
IV.3.1.Doenjang	287
IV.3.2.Kochujang	288
IV.3.3.Tao si	288
IV.3.4. Tauco cair	289
IV.3.5. Tauco Padat	290
IV.3.6. Tausi	291
IV.4. Nước chấm và các sản phẩm tương tự từ đậu nành	291
IV.4.1. Ce Iew	292
IV.4.2. Kecap asin	293
IV.4.3. Kecap manis	294
IV.4.4. Kicap Kacang Soya	295
IV.4.5. Koikuchi Shoyu	296
IV.4.6. Saichikomi Shoyu	297
IV.4.7. Soya sauce	
IV.4.8. Toyo	297

IV.5. Tempeh và những sản phẩm tương tự	298
IV.5.1. Dage	298
IV.5.2. Oncom Hitam	299
IV.5.3. Tenpeh	300
IV.5.4. Tempeh (Singapor)	301
IV.5.5. Tempeh Benguk	301
IV.5.6. Tempeh Kedelai	302
IV.6. Đạm tương	303
IV.6.1. Phương pháp sản xuất	304
IV.6.2. Lưu ý các công đoạn chính	304
IV.6.2.1. Xử lý nguyên liệu	304
IV.6.2.2. Nuôi nấm mốc <i>A. oryzae</i>	304
IV.6.2.3. Thủy phân	304
IV.6.2.4. Lên men phụ	305
IV.7. Nước chấm (Việt Nam)	305
Chương 7 : Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men từ rau quả	
I. Công nghệ sản xuất rau, quả muối chua Việt Nam	307
I.1. Cơ sở lý thuyết của quá trình muối chua rau quả	307
I.2. Một số công nghệ muối chua rau, quả	308
I.2.1. Muối chua bắp cải	308
I.2.2. Muối chua cải bẹ	308
I.2.3. Muối cà	309
I.2.4. Muối cà chua	309
I.2.5. Muối dưa leo (dưa chuột)	310
II. Công nghệ sản xuất các sản phẩm lên men từ rau, quả ở các nước Châu Á	310
II.1. Atchara	310
II.2. Baechoo kim chi	311
II.3. Dongchimi	311
II.4. Gundruk	312
II.5. Kakdugi	312
II.6. Pak gaad dong	313
II.7. Sayur Asin	314
II.8. Takana Zuke	314
II.9. Takuan Zuke	315
II.10. Burong mango	316
II.11. Burong Prutas	316

III. Cà muối	317
IV. Dưa chuột muối	317
V. Dưa muối	318
VI. Thạch dừa	319
Chương 9: Công nghệ sản xuất nước uống lên men	
I. Công nghệ sản xuất một số loại rượu đặc sản của Việt Nam	320
I.1. Công nghệ sản xuất rượu nếp than	320
I.2. Công nghệ sản xuất rượu “đế”, rượu “làng Vân”	326
I.3. Công nghệ sản xuất rượu cần	327
II. Công nghệ các loại đồ uống lên men trên thế giới	328
II.1. Brem Bali	328
II.2. Bubod	329
II.3. Bubju	330
II.4. Lambanog	330
II.5. Mirin	331
II.6. Sake	331
II.7. Shochu	332
II.8. Takju	333
III. Men làm rượu (Việt Nam)	333
IV. Rượu nếp	336
Chương 10: Công nghệ sản xuất nước uống lên men từ cà phê và ca cao	
I. Lên men cà phê	337
I.1. Các quá trình chuyển hoá trong lên men	337
I.2. Vi sinh vật trong lên men cà phê	338
II. Lên men ca cao	339
II.1. Phương pháp lên men hạt cacao	339
II.2. Vi sinh vật trong quá trình lên men	339
Tài liệu tham khảo	341
Mục lục	347

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT MÌ CHÍNH VÀ CÁC SẢN PHẨM LÊN MEN CỔ TRUYỀN

Tác giả: PGS. TS. Nguyễn Thị Hiền (Chủ biên)

Chịu trách nhiệm xuất bản :

Biên tập và sửa bài:

Trình bày bìa :

PGS. TS. TÔ ĐĂNG HẢI
ThS. NGUYỄN HUY TIẾN
NGỌC LINH
HƯƠNG LAN

**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70, TRẦN HUNG ĐẠO – HÀ NỘI**

In 800 cuốn, khổ 19 x 27cm, tại Xí nghiệp in 19 - 8 số 3 đường
Nguyễn Phong Sắc - Nghĩa Tân - Cầu Giấy - Hà Nội.
Giấy phép xuất bản số: 6-217, ngày 21 tháng 6 năm 2004.
In xong và nộp lưu chiểu tháng 8 năm 2004.

2001142

công nghệ sx môi chính và



1 004090 600538

59.000 VNĐ

9 935048 941423

Giá: 59.000đ