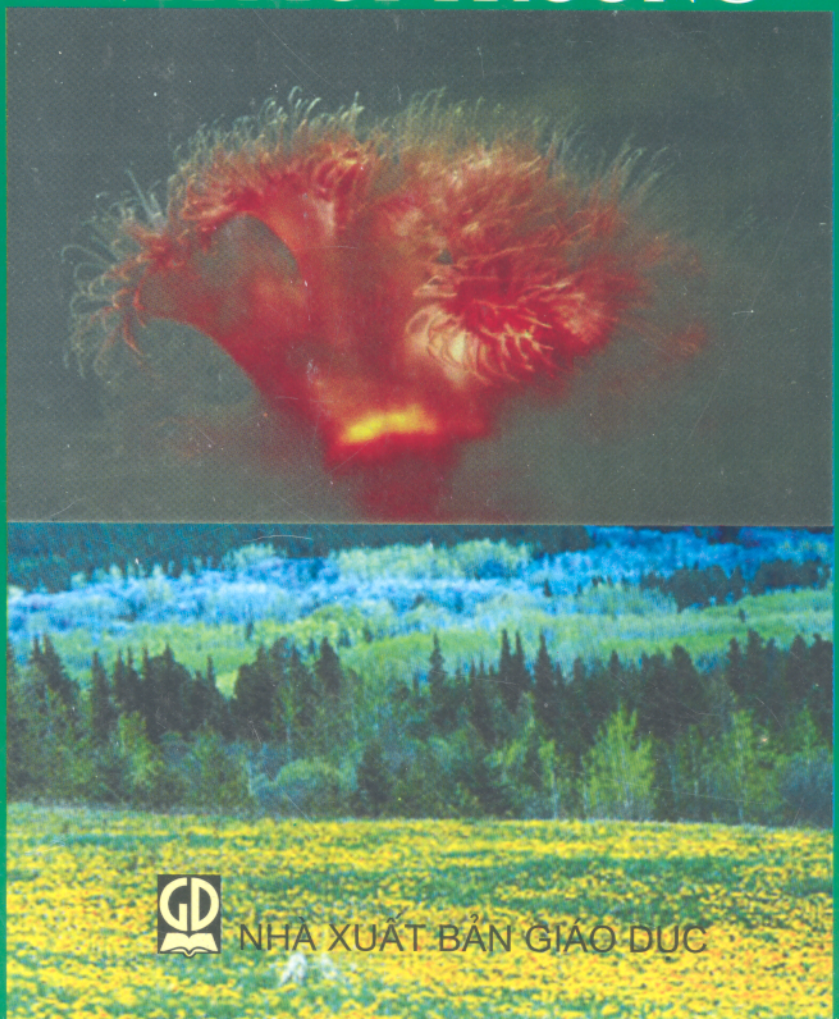
GS.TS. PHẠM VĂN TY
TS. VŨ NGUYÊN THÀNH

Công nghệ SINH HỌC

TẬP NĂM

CÔNG NGHỆ VI SINH VÀ MÔI TRƯỜNG



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

PGS. TS. PHẠM VĂN TY – *TS.* VŨ NGUYÊN THÀNH

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TẬP NĂM

CÔNG NGHỆ VI SINH VÀ MÔI TRƯỜNG

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

Lời nói đầu

Công nghệ sinh học là công nghệ sử dụng các hệ thống sinh học, các tế bào vi sinh vật, động vật, thực vật và các dẫn chất của chúng để tạo ra các sản phẩm cải biến hoặc các quá trình chuyên hoá phục vụ lợi ích con người. Công nghệ vi sinh được coi là một trong những ngành mũi nhọn của công nghệ sinh học có tác động to lớn đến đời sống con người do việc sử dụng vi sinh vật để tạo ra hàng loạt các sản phẩm như rượu, bia, acid hữu cơ, acid amin, các chất điều vị, dung môi hữu cơ, vitamin, kháng sinh, vacxin,... Công nghệ vi sinh cũng còn được dùng để xử lý phế thải và làm sạch môi trường. Tính ưu việt của công nghệ vi sinh là có thể tạo ra hoạt chất trong nồi lên men trong thời gian ngắn mà không cần phụ thuộc vào thời vụ, đất đai, thời tiết như ở cây trồng. Vi sinh vật đã trở thành công cụ chuyển gen lý tưởng mà giá trị của nó là cùng một công cụ nhưng có thể tạo ra các sản phẩm có chất lượng cao và giá thành rẻ.

Đối tượng nghiên cứu của công nghệ vi sinh rất rộng lớn. Trong cuốn sách nhỏ này chúng tôi chỉ giới thiệu một số lĩnh vực điển hình.

Một số ứng dụng kinh điển và quen thuộc của công nghệ vi sinh như sản xuất rượu gạo, bia không được trình bày trong phạm vi quyển sách này. Thông tin liên quan đã được trình bày rất đầy đủ trong các tài liệu chuyên ngành.

Các chương "Sản xuất Insulin", "Trợ sinh", "Phục hồi sinh học" được viết với sự tham gia của Nguyễn Thị Thanh Dịu và chương "Thuốc trừ sâu vi sinh" với sự tham gia của Vũ Phương Ly. Các chương "Ứng dụng vi sinh vật trong chế biến thực phẩm", "Công nghệ sản xuất acid hữu cơ", và "Bảo tàng giống vi sinh vật" được biên dịch chủ yếu dựa theo: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel P.D. (2000) Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press.

Sách xuất bản lần đầu chắc không tránh được sai sót. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự đóng góp ý kiến của bạn đọc để lần xuất bản sau được hoàn thiện hơn.

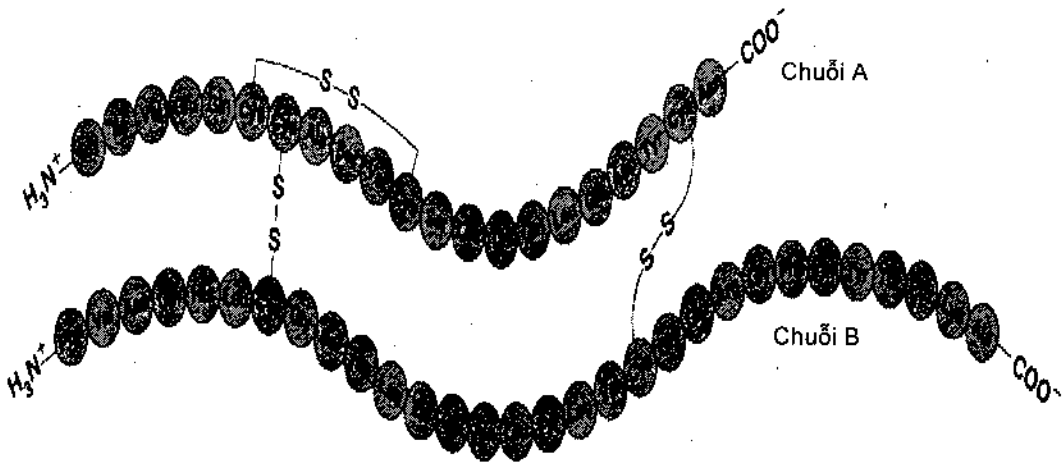
Các tác giả

Chương I
CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT INSULIN

1. INSULIN

1.1. Cấu trúc phân tử insulin

Insulin là một hormon protein do các tế bào *beta* của tiểu đảo Langerhans trong tuyến tụy sinh ra. Phân tử protein insulin tương đối nhỏ, có khối lượng khoảng 6000 Dalton (Da), được cấu tạo bởi 2 chuỗi polypeptid A và B. Các chuỗi A và B liên kết với nhau bằng các cầu disulfua, ngoài ra còn có một cầu disulfua nữa nằm trong chuỗi A. Ở hầu hết các loài, chuỗi A bao gồm 21 acid amin còn chuỗi B có 30 acid amin. Mặc dù trình tự acid amin của insulin khác nhau giữa các loài nhưng một số đoạn nhất định của phân tử lại có tính bảo tồn cao, các đoạn đó có chứa vị trí của 3 cầu disulfua, cả hai đầu của chuỗi A và các nhánh bên của đầu COOH của chuỗi B. Sự tương đồng trong trình tự acid amin dẫn đến cấu trúc 3 chiều của insulin ở các loài khác nhau rất giống nhau. Insulin tách chiết từ một động vật có khả năng hoạt động sinh học cao trong nhiều loài khác. Các phân tử insulin có xu hướng tạo thành dạng dime trong dung dịch do hình thành các liên kết hydro giữa các đầu COOH của các chuỗi B. Ngoài ra, khi có mặt các ion kẽm, các dime insulin liên kết tạo thành hexame. Các mối tương tác này có ý nghĩa rất quan trọng trong điều trị. Dạng



Hình 1.1. **Cấu trúc phân tử insulin dạng phẳng**

monome và dạng dime dễ dàng khuếch tán vào máu, trong khi đó dạng hexame khuếch tán rất kém. Do đó, sự hấp thụ các thuốc chứa hàm lượng hexame cao thường bị chậm và ngừng hẳn. Vấn đề này đã thúc đẩy sự ra đời của một số loại chất insulin giả tái tổ hợp. Loại chất đầu tiên như thế được bán trên thị trường là insulin lispro, phân tử chất này có trật tự lysin và prolin trên đầu COOH của chuỗi B bị đảo ngược; sự cải biến đó không làm mất khả năng gắn với thụ thể của insulin nhưng làm giảm tối đa khuynh hướng hình thành dạng dime và hexame.

1.2. Vai trò sinh học của insulin

Insulin là một trong những hormon điều hòa nồng độ glucose trong máu. Chức năng cân bằng nội môi và năng lượng sinh học này cực kỳ quan trọng bởi vì glucose là nguồn nhiên liệu chính của hô hấp tế bào và nguồn khung cacbon quyết định cần cho tổng hợp các hợp chất hữu cơ. Cân bằng trao đổi chất phụ thuộc vào việc duy trì glucose máu ở gần một điểm ổn định, khoảng 90mg/ml ở người (theo Campbell).

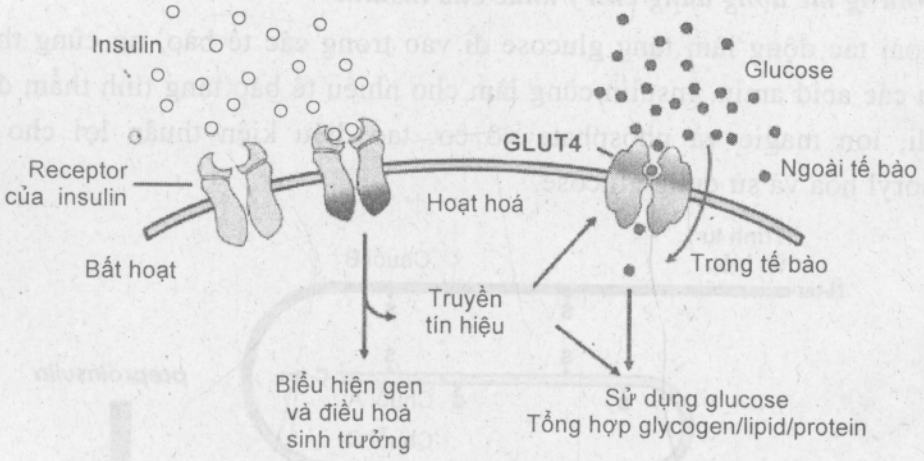
1.2.1. Insulin và trao đổi hydratcacbon

Glucose được giải phóng từ tinh bột, saccarose, v.v... nhờ thủy phân khi tiêu hóa thức ăn, sau đó được hấp thụ vào máu ở ruột non. Nồng độ glucose cao trong máu kích hoạt sự giải phóng insulin và insulin hoạt động trong các tế bào khắp cơ thể nhằm thúc đẩy sự hấp thụ, sử dụng và dự trữ glucose. Tác động của insulin lên trao đổi glucose thay đổi tùy theo mô đích.

Các phân tử insulin tuần hoàn trong dòng máu cho tới khi chúng gắn với thụ thể của chúng trên màng tế bào. Khi đó, phức hợp thụ thể-insulin khởi phát một chuỗi truyền tín hiệu mang thông tin được phát ra bởi insulin: chuyển glucose ra khỏi huyết tương. Trong một loạt các đáp ứng tế bào do sự hoạt hóa của insulin gây ra thì bước chìa khóa trong trao đổi chất glucose là bước làm tăng sự hoạt động của protein vận chuyển glucose GLUT4 glucose transporter. Nhờ sự vận chuyển thuận lợi glucose vào trong các tế bào, các GLUT4 đã loại glucose ra khỏi dòng máu một cách hiệu quả. Những thay đổi như vậy kéo dài từ vài phút đến vài giờ. GLUT4 có mặt trên màng tế bào của nhiều loại mô trong cơ thể như mô cơ xương (đốt cháy glucose làm năng lượng), mô mỡ (chuyển glucose thành triglyxerit để dự trữ) và mô gan.

Insulin thúc đẩy gan dự trữ glucose để hình thành glycogen. Phần lớn glucose được hấp thụ ngay từ ruột non vào các tế bào gan, để chuyển hóa thành chất dự trữ glycogen. Insulin có nhiều tác động trong gan thúc đẩy sinh tổng hợp glycogen. Đầu tiên, nó hoạt hóa enzyme hexokinase, chất này phosphoryl hóa glucose, nhờ đó

glucose bị bẫy vào trong tế bào. Insulin còn ức chế hoạt động của glucose-6-phosphatase. Insulin cũng hoạt hóa nhiều enzyme liên quan trực tiếp đến sinh tổng hợp glycogen, bao gồm phosphofructokinase và glycogen syntase. Khi không có mặt insulin, tổng hợp glycogen trong gan bị dừng lại và các enzyme chịu trách nhiệm phân hủy glycogen sẽ hoạt động.



Hình 1.2. **Hoạt động của Insulin**

Vì insulin ngăn cản mức độ tăng quá cao của đường máu nên không được phép có quá nhiều insulin. Một bước trong kiểm soát mức độ insulin là enzyme insulinase (được tìm thấy trong gan và thận) phân hủy insulin đang tuần hoàn trong máu, làm cho hormon này phân hủy với thời gian bán rã khoảng 6 phút. Quá trình này bảo đảm mức độ insulin lưu hành trong máu được điều chỉnh và mức độ glucose máu không giảm xuống thấp đến mức nguy hiểm.

1.2.2. Insulin và trao đổi lipid

Insulin có tác động quan trọng lên quá trình trao đổi lipid. Các tác động đó bao gồm:

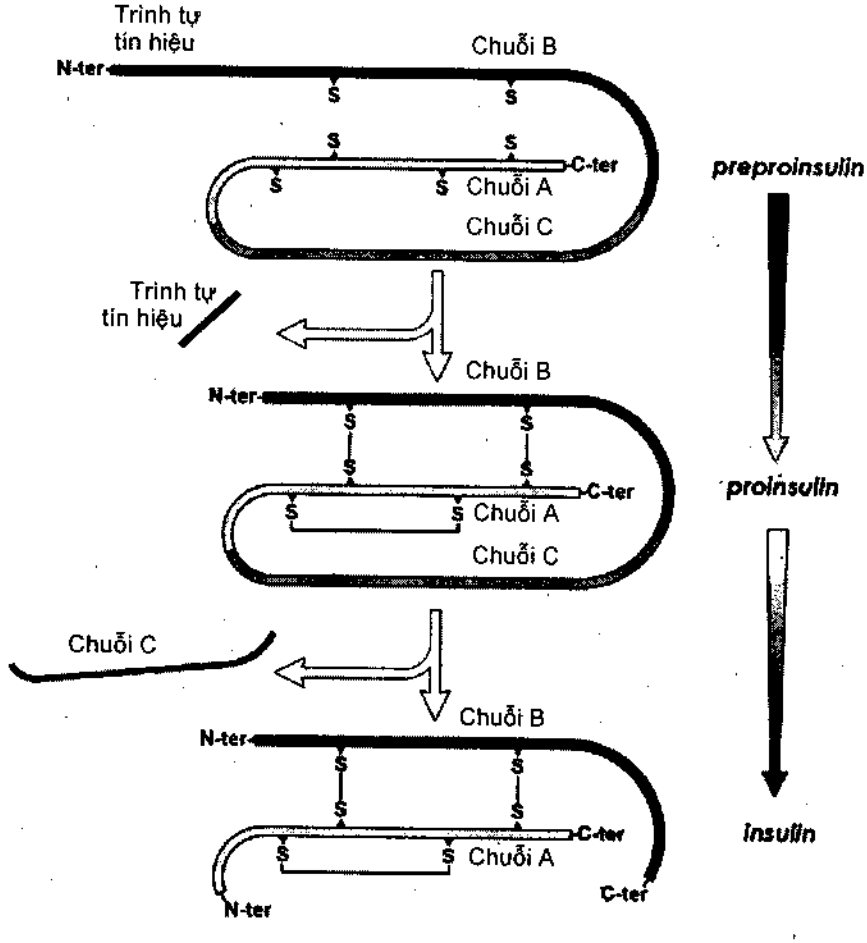
a) Insulin thúc đẩy sinh tổng hợp acid béo trong gan

Như đã nói ở trên, insulin hoạt hóa sinh tổng hợp glycogen trong gan. Tuy nhiên, khi glycogen tích tụ ở mức cao (≥ 5% khối lượng thô của gan), thì quá trình tổng hợp bị ức chế. Khi gan bão hòa glycogen thì bất kỳ lượng glucose nào được hấp thụ thêm vào tế bào gan dưới đều phải chuyển sang con đường tổng hợp acid béo, sau đó được vận chuyển ra khỏi gan ở dạng lipoprotein. Các lipoprotein này một phần đi vào vòng tuần hoàn, cung cấp các acid béo tự do cho các mô khác, như mô mỡ (tế bào tạo mỡ) để tổng hợp triglyxerit.

b) Insulin ức chế phân hủy chất béo trong mô mỡ bằng cách ức chế quá trình thuỷ phân triglycerit thành glycerol và acid béo tự do. Enzyme nhạy cảm với hormon này trở lên hoạt động khi được phosphoryl hoá. Insulin ngăn cản quá trình này khi nó kết hợp với các thụ thể trên màng tế bào, nhờ đó làm tăng sự tích tụ triglyxerit trong các tế bào mỡ.

1.2.3. Những tác động đáng chú ý khác của insulin

Ngoài tác động làm tăng glucose đi vào trong các tế bào, nó cũng thúc đẩy sự hấp thụ các acid amin. Insulin cũng làm cho nhiều tế bào tăng tính thấm đối với các ion kali, ion magie và phosphate vô cơ, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phosphoryl hóa và sử dụng glucose.



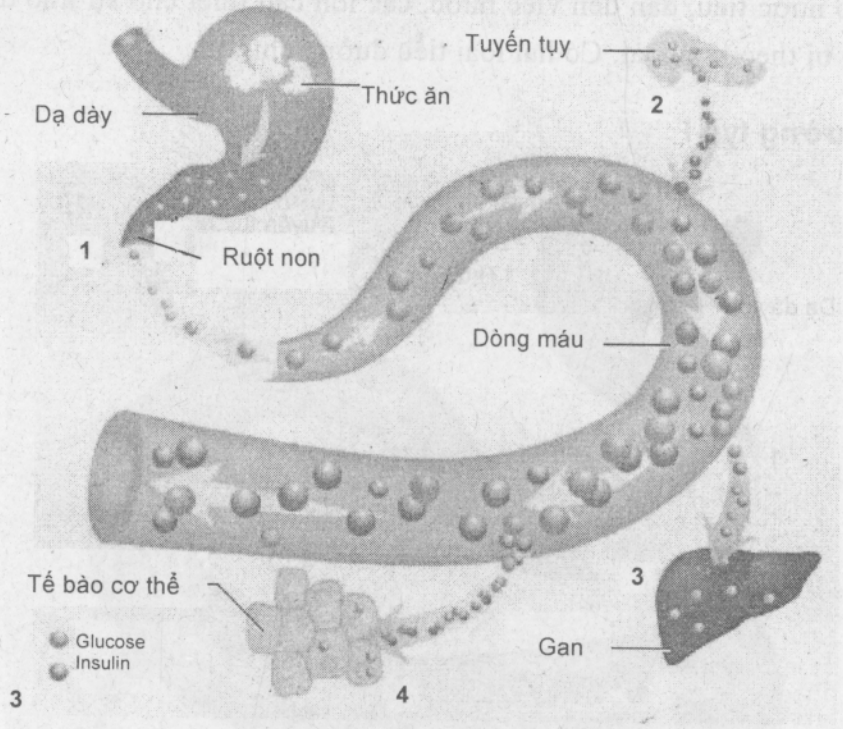
Hình 1.3. **Các bước cải biến sau dịch mã của phân tử insulin**

1.3. Tổng hợp insulin trong cơ thể

Insulin được tổng hợp bởi các tế bào tụy beta. Các tế bào *beta* sắp xếp thành các bó gọi là các đảo Langerhan trong tụy. Insulin được tạo ra từ một phần của một

protein lớn hơn để đảm bảo sự gấp nếp đúng. ARN thông tin tiến hành dịch mã một protein gọi là preproinsulin. Preproinsulin bao gồm một trình tự tín hiệu đầu amin, cần thiết để tiền chất hormon này đi qua được màng lưới nội chất tham gia vào quá trình sau dịch mã. Quá trình sau dịch mã loại đi những phần không cần thiết cho hormon hoạt động sinh học. Khi đã vào mạng lưới nội chất thì trình tự tín hiệu của preproinsulin không còn cần thiết nữa nên nó bị thủy phân để tạo thành dạng proinsulin. Ngay khi hình thành 3 cầu disulfua là thiết yếu đối với insulin thì một số peptidase sẽ phân cắt proinsulin. Sản phẩm cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp này là insulin hoàn chỉnh và hoạt động. Cuối cùng, insulin được đóng gói và chứa trong các hạt tiết tích tụ trong tế bào chất cho đến khi được kích hoạt để giải phóng.

2. GIỚI THIỆU VỀ BỆNH TIỂU ĐƯỜNG



Hình 1.4. **Sử dụng glucose và insulin ở người bình thường**

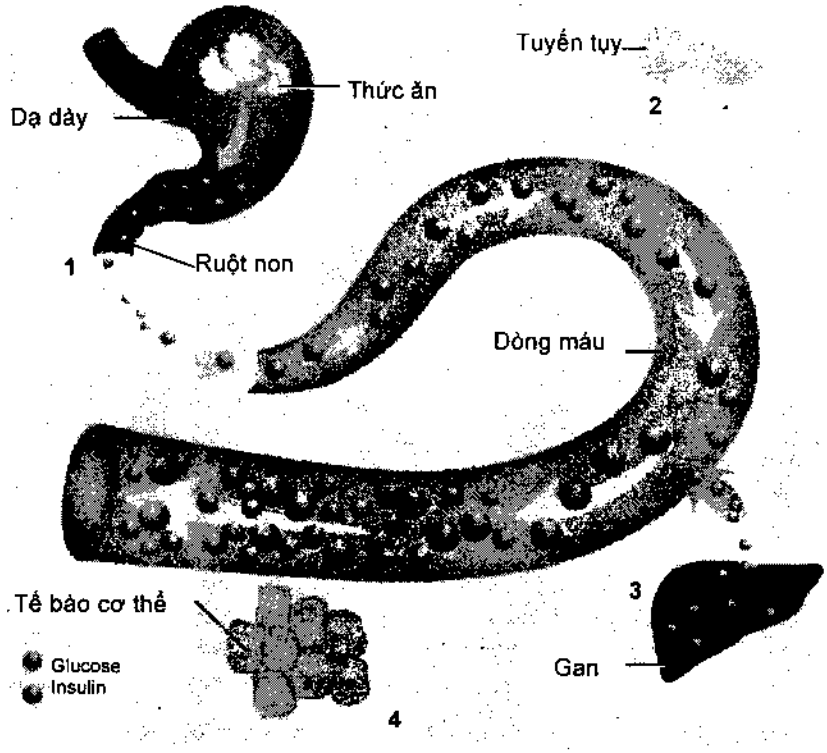
1. Glucose trong thức ăn được hấp thụ vào dòng máu; 2. Insulin được giải phóng từ tuyến tuỵ; 3. Glucose được hấp thụ và dự trữ trong các tế bào gan nhờ tác dụng của insulin; 4. Glucose được hấp thụ và sử dụng trong các tế bào cơ thể nhờ tác dụng của insulin.

Tiểu đường hay đái tháo đường (diabetes) là bệnh rối loạn về chuyển hóa cacbonhydrat, trong đó đường trong máu không bị oxy hóa để sinh năng lượng mà tích tụ trong máu ở mức cao (> 1,2g/l), gọi là tăng đường huyết. Ở Mỹ, hằng năm có khoảng 17 triệu người (6% dân số) mắc bệnh tiểu đường. Hằng năm, khoảng 1 triệu

người biết mình mắc bệnh. Tiểu đường gây tử vong cho trên 400000 cư dân Hoa Kỳ và đứng thứ 6 trong các bệnh gây chết người. Ở Canada, hơn 2,2 triệu người mắc tiểu đường, và hằng năm nó gây ra cái chết của hơn 25000 người. Tiểu đường phổ biến nhất ở tuổi trên 45, đối với những người béo phì hoặc ít hoạt động, những người có người thân bị tiểu đường; và những người ở Châu Phi, Tây Ban Nha, Bồ Đào Nha và những người Mỹ bản xứ. Tỷ lệ tiểu đường cao nhất trên thế giới là ở những người Mỹ bản xứ. Phụ nữ thường có tỷ lệ mắc bệnh cao hơn nam giới. Theo một số công trình nghiên cứu ở Việt Nam, tỷ lệ tiểu đường chiếm 1,5 – 3% dân số.

Ở những bệnh nhân tiểu đường, hàm lượng glucose trong máu cao, lắm tăng áp lực thẩm thấu, tuy nhiên quá trình hấp thụ glucose vào tế bào lại kém. Khi hàm lượng glucose trong máu cao vượt quá ngưỡng hấp thụ của thận thì cơ quan này sẽ đào thải glucose theo nước tiểu, dẫn đến việc nước, các ion cần thiết cho sự trao đổi chất qua màng tế bào bị theo ra ngoài. Có hai loại tiểu đường chính:

2.1. Tiểu đường typ I



Hình 1.5. **Tiểu đường Typ I**

1. Glucose trong thức ăn được hấp thụ vào dòng máu; 2. Insulin không được giải phóng từ tuyến tụy; 3. Glucose giải phóng ra khỏi tế bào gan do thiếu insulin; 4. Glucose không được hấp thụ vào tế bào do thiếu insulin.

Tiểu đường typ I hay còn gọi là tiểu đường phụ thuộc insulin (IDDM- Insulin Dependent Diabetes Mellitus). Các triệu chứng thường xuất hiện đột ngột, rầm rộ, như: ăn nhiều, uống nhiều, sút cân nhanh, giảm thị lực, nóng tính, mệt mỏi,... thường gặp ở tuổi dưới 20 (con gái từ 10 đến 12 tuổi, con trai từ 12 đến 14 tuổi). Loại tiểu đường typ I thường phát triển trước tuổi 30 và chiếm từ 10 đến 15% số ca tiểu đường.

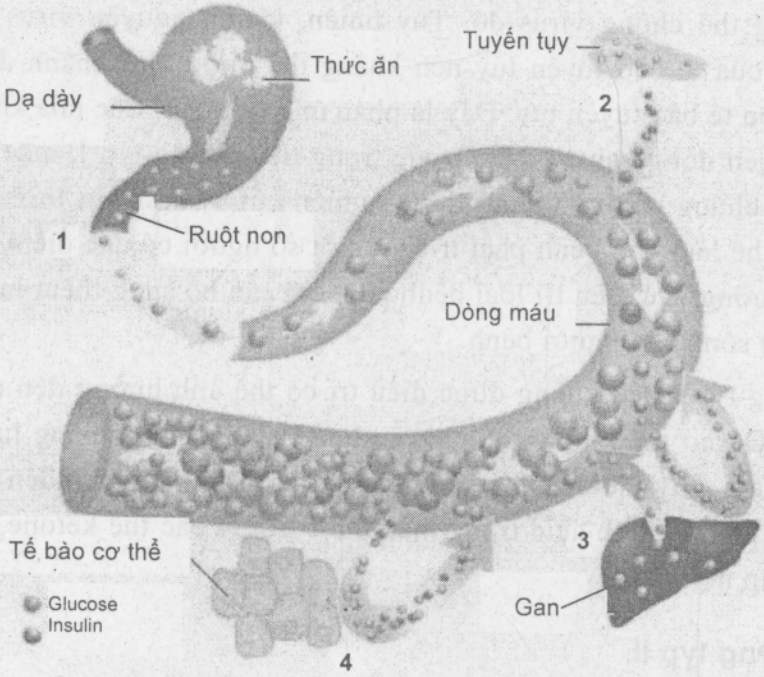
Nguyên nhân tiểu đường typ I là do các tế bào *beta* ở tuyến tuỵ bị phá huỷ, dẫn đến thiếu hụt tổng lượng insulin. Các tế bào này bị phá huỷ có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau: do bệnh tự miễn - các nhà khoa học cho rằng sự kết hợp giữa các yếu tố di truyền và các yếu tố môi trường có thể dẫn đến các bệnh tự miễn như phá huỷ các tế bào tuỵ đảo, hoặc do một số cơ chế khác vẫn chưa được biết đến. Gần đây, người ta cho rằng, khi bị nhiễm một loại virus tiềm ẩn nào đó, cơ thể đáp lại bằng cách tạo kháng thể chống virus đó. Tuy nhiên, kháng nguyên virus lại giống với kháng nguyên của tế bào tuyến tụy nên kháng thể được hình thành để chống virus cũng chống luôn tế bào tuyến tụy. Đây là phản ứng tự miễn. Các nhà khoa học đã xác định được 20 gen đóng vai trò quan trọng trong tiểu đường typ I, mặc dù chức năng chính xác của chúng vẫn còn đang được nghiên cứu. Các nhân tố môi trường như virus cũng có thể làm cho bệnh phát triển ở một số người có đặc điểm di truyền mẫn cảm với tiểu đường. Để điều trị loại bệnh này, chỉ cần bổ sung thêm insulin là có thể duy trì được sự sống cho người bệnh.

Tiểu đường typ I nếu không được điều trị có thể ảnh hưởng đến cơ chế chuyển hoá chất béo. Do cơ thể không thể chuyển hoá glucose thành năng lượng, nên chất béo sẽ được dùng thay thế để cung cấp năng lượng. Điều này dẫn đến việc tăng hàm lượng các hợp chất có tính acid trong máu được gọi là các thể ketone, can thiệp vào quá trình hô hấp nội bào.

2.2. Tiểu đường typ II

Tiểu đường typ II, còn gọi là tiểu đường không phụ thuộc insulin (NIDDM-non-insulin-dependent-diabete mellitus). Giải phẫu bệnh lý vi thể ở tụy đảo cho thấy: chỉ có 25% bệnh nhân tiểu đường có giảm tiết insulin, 25% không giảm tiết và 50% còn lại thì hình ảnh tế bào beta cho phép kết luận tăng tiết. Như vậy, tiểu đường typ II đặc trưng bởi sự thiếu hụt insulin, hoặc phổ biến hơn là giảm tính đáp ứng của các tế bào đích đối với insulin do một số thay đổi ở thụ thể dành cho nó trên màng tế bào. Triệu chứng của loại tiểu đường này bao gồm cả các triệu chứng của tiểu đường typ I, còn có thêm các triệu chứng như viêm da, sự hồi phục vết thương chậm hoặc khó phục hồi. Loại này chiếm khoảng 90% số ca bệnh tiểu đường.

Tiểu đường typ II thường xuất hiện nhiều ở lứa tuổi trên 45. Do các triệu chứng của nó xuất hiện chậm nên người bệnh có thể không nhận biết được ngay là họ đang mắc bệnh. Các nhà khoa học thấy rằng, có một số lượng lớn gen cùng hoạt động gây ra bệnh tiểu đường typ II. Họ cũng tin rằng có một mối liên quan rất chặt chẽ giữa béo phì và tiểu đường typ II. Khoảng 80% số người béo phì bị tiểu đường typ II. Việc chữa trị loại bệnh này phải kết hợp giữa tập luyện và chế độ ăn uống để giảm sự kháng insulin và tăng cường việc tiết insulin. Chỉ dùng đủ lượng hydratcacbon cho nhu cầu cơ thể. Ngoài ra còn sử dụng thuốc hạ đường huyết như sulfamid hay biguanid. Trong trường hợp thất bại, cần phải điều trị bằng tiêm insulin đơn thuần hay phối hợp với thuốc viên uống.



Hình 1.6. **Tiểu đường Typ II**

1. Glucose trong thức ăn được hấp thụ vào dòng máu; 2. Insulin được giải phóng từ tuyến tuỵ; 3. Tế bào gan không đáp ứng với insulin do đó glucose vẫn được giải phóng ra khỏi tế bào gan; 4. Tế bào cơ thể không đáp ứng với insulin do đó glucose không được hấp thụ vào tế bào cơ thể.

2.3. Biến chứng

Nếu không được chữa trị, tiểu đường có thể gây ra nhiều biến chứng đe dọa sự sống. Tiểu đường typ I có thể dẫn đến hôn mê đường huyết (một trạng thái vô thức gây ra do lượng đường cực kỳ cao trong máu) hoặc tử vong. Cả tiểu đường typ I và II

đều có các biến chứng mù, thận hư và bệnh tim. Tiểu đường có thể khiến cho các mạch máu nhỏ bị tắc; nếu điều này xảy ra ở các mạch máu của mắt thì sẽ gây bệnh võng mạc do tiểu đường, dẫn đến mù. Bệnh tiểu đường có thể khiến cho thận mất khả năng lọc các chất độc. Khoảng 40% trường hợp thận hư có nguyên nhân từ tiểu đường. Tắc các mạch máu lớn ở những bệnh nhân tiểu đường dẫn đến nhiều vấn đề về tim mạch, bao gồm cao huyết áp, nhồi máu cơ tim và đột quỵ. Mặc dù những trường hợp như thế này cũng xuất hiện ở những người không mắc tiểu đường nhưng ở người mắc tiểu đường có nguy cơ mắc các bệnh tim mạch cao gấp 2 đến 4 lần. Tiểu đường còn có thể gây tổn thương thần kinh ngoại biên, mất cảm giác, đặc biệt ở chân, tổn thương thần kinh thực vật và nhiễm trùng.

3. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT INSULIN

Trước khi các nhà nghiên cứu khám phá ra cơ chế hoạt động của insulin, những người mắc tiểu đường typ I không có cơ hội hưởng một cuộc sống khỏe mạnh. Sau đó, năm 1921, hai nhà khoa học người Canada là Frederick G. Banting và Charles H. Best đã tinh sạch thành công insulin từ tụy của một con chó. Năm 1936, các nhà nghiên cứu đã tìm ra cách làm cho insulin giải phóng chậm hơn vào máu. Một bước đột phá nữa vào năm 1950, khi các nhà nghiên cứu sản xuất được một dạng insulin hoạt động nhanh hơn và không tồn tại lâu trong dòng máu. Vào thập kỷ 70 thế kỷ XX, các nhà nghiên cứu bắt đầu cố gắng sản xuất ra một loại insulin hoạt động giống insulin tự nhiên hơn: giải phóng từng lượng nhỏ trong suốt cả ngày và dâng lên tại thời điểm của các bữa ăn.

Các nhà khoa học tiếp tục cải tiến insulin nhưng phương pháp sản xuất cơ bản thì vẫn không thay đổi trong nhiều thập kỷ. Insulin được tách chiết từ tụy bò, lợn và được tinh sạch. Cấu trúc hóa học của insulin ở các động vật này chỉ sai khác đôi chút so với insulin người, đó là lý do nó hoạt động khá tốt trong cơ thể người, mặc dù đã có một số người có phản ứng dị ứng. Sau đó vào thập kỷ 80 thế kỷ XX, công nghệ sinh học đã làm một cuộc cách mạng trong tổng hợp insulin. Trước đó, người ta đã có những cơ sở đầy đủ để thực hiện cuộc cách mạng này. Cấu trúc hóa học của insulin được giải mã vào giữa những năm 50 thế kỷ XX. Gen mã hóa insulin được xác định nằm trên nhiễm sắc thể số 11. Năm 1977, một nhóm nghiên cứu đã ghép thành công gen insulin của chuột vào vi khuẩn để vi khuẩn này sau đó đã tổng hợp insulin. Năm 1982, Tập đoàn Eli Lilly đã sản xuất được insulin người và đó là dược phẩm sản xuất bằng kỹ thuật di truyền đầu tiên được phê chuẩn. Không cần nhờ đến các động vật, các nhà nghiên cứu đã có thể sản xuất insulin bằng kỹ thuật di truyền với số lượng không giới hạn. Sản phẩm này cũng không chứa bất kỳ tạp chất nào từ

động vật. Sử dụng insulin người cũng phá bỏ đi mối lo ngại về các bệnh lây nhiễm tiềm tàng từ động vật. Số người sử dụng insulin sản xuất bằng kỹ thuật di truyền ngày một tăng. Năm 2001, 95% số bệnh nhân tiểu đường trên thế giới sử dụng insulin người (theo hãng Eli Lilly). Hầu hết các công ty đã ngừng hẳn việc sản xuất insulin động vật.

3.1. Nhược điểm của việc sản xuất insulin tách chiết từ động vật

Ban đầu, việc sản xuất insulin dùng trong lâm sàng chủ yếu có nguồn gốc động vật (bò và lợn). Tuỵ của các động vật này sẽ được dùng để tách chiết insulin, vì thế cần một lượng lớn tuỵ mới có thể sản xuất được một lượng nhỏ insulin. Việc sản xuất insulin trực tiếp từ động vật có nhiều nhược điểm:

- Insulin động vật có cấu trúc không hoàn toàn giống với insulin của người.
- Hoạt động chức năng trong cơ thể kém hơn so với insulin của người.
- Khả năng hấp thụ kém.
- Có thể gây ra các phản ứng miễn dịch trong cơ thể người (có thể gây dị ứng).
- Trong quá trình tách chiết, không thể loại bỏ hết các tác nhân gây bệnh từ động vật.
- Quá trình tách chiết đòi hỏi kỹ thuật cao.
- Chi phí đắt (do cần lượng lớn tuỵ để sản xuất insulin).
- Khó có thể sản xuất lượng lớn trên quy mô lớn.
- Giá thành cao.

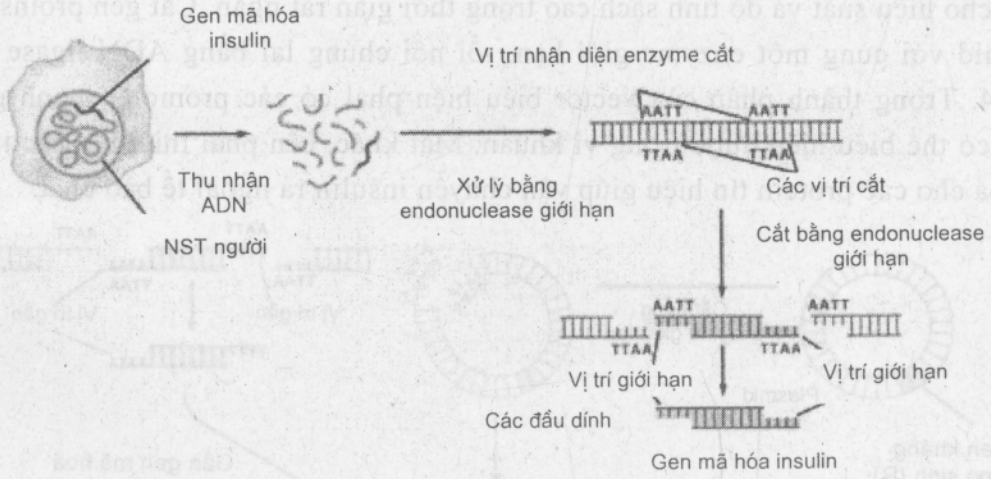
3.2. Sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp để sản xuất insulin

3.2.1. Tổng hợp insulin

Việc tổng hợp insulin người là một quá trình sinh hóa gồm nhiều bước. Mỗi nhà sản xuất theo đuổi một phương pháp riêng, tuy nhiên có hai phương pháp cơ bản.

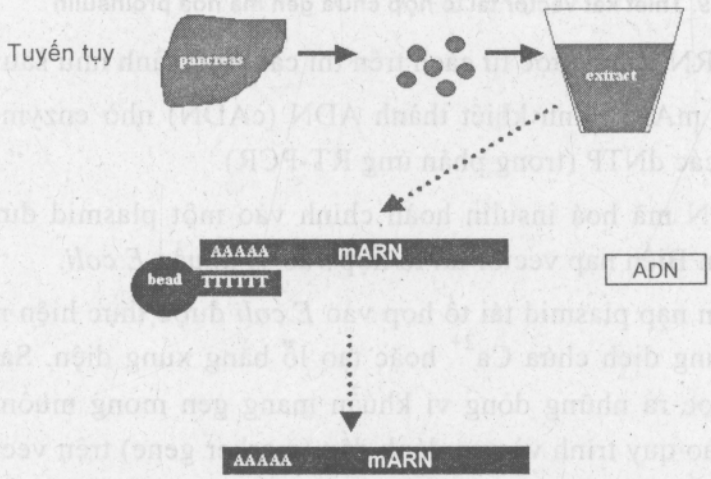
a) Phương pháp thứ nhất, nó có thể được sản xuất bằng cách tạo ra các chuỗi riêng biệt, sau đó kết hợp hóa học lại hoặc bằng cách tạo ra một tiền chất chuỗi đơn proinsulin người, sau đó phân cắt để tạo thành insulin hoàn chỉnh. Để sản xuất thuốc thì con đường tổng hợp proinsulin thích hợp hơn vì nó chỉ đòi hỏi một khâu lên men và tách.

Bước 1. Tách gen mã hóa cho proinsulin (tiền thân của insulin) của người. Gen này nằm trên nhiễm sắc thể số 11. Gen mã hoá cho proinsulin có thể được tách ra từ ngân hàng gen bằng các kỹ thuật sinh học phân tử.



Hình 1.7. **Sơ đồ tách và cắt gen mã hóa proinsulin**

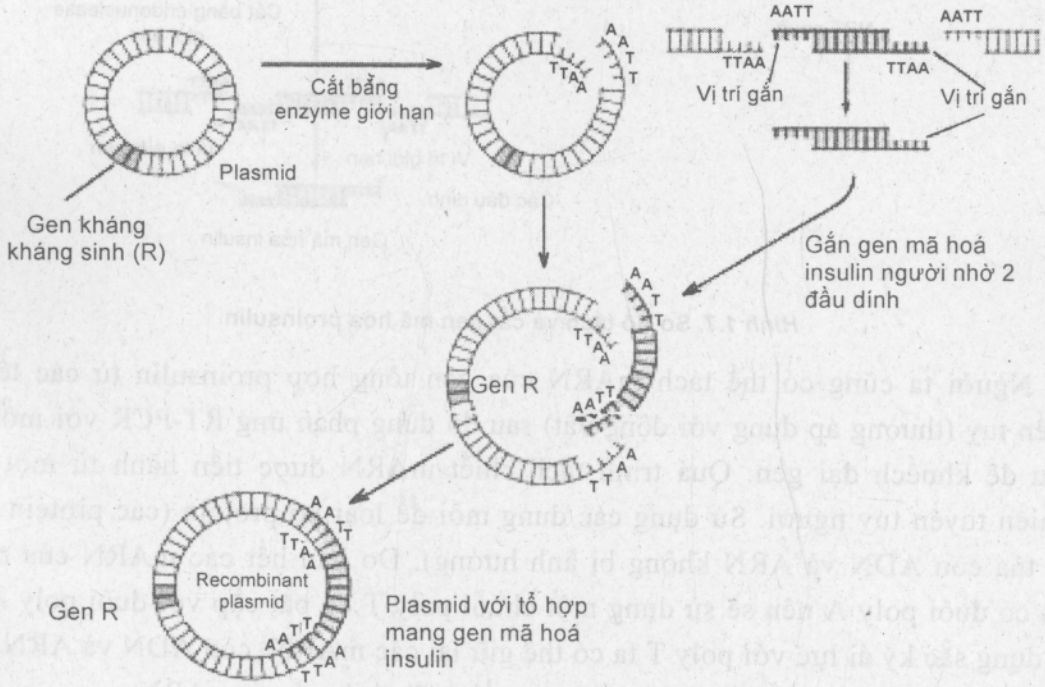
Người ta cũng có thể tách mARN của gen tổng hợp proinsulin từ các tế bào tuyến tuỵ (thường áp dụng với động vật) sau đó dùng phản ứng RT-PCR với mồi đặc hiệu để khuếch đại gen. Quá trình tách chiết mARN được tiến hành từ một mẫu nghiền tuyến tuỵ người. Sử dụng các dung môi để loại bỏ protein (các protein sẽ bị kết tủa còn ADN và ARN không bị ảnh hưởng). Do hầu hết các mARN của người đều có đuôi poly A nên sẽ sử dụng một chuỗi poly T để bắt cặp với đuôi poly A đó. Sử dụng sắc ký ái lực với poly T ta có thể giữ lại các mARN, còn ADN và ARN khác sẽ bị loại bỏ. Sau đó tiến hành loại bỏ cầu nối A-T sẽ thu được mARN.



Hình 1.8. **Sơ đồ tách mARN insulin**

Bước 2. Tách và thiết kế plasmid tái tổ hợp. Tiến hành tách plasmid của *E.coli* theo phương pháp thông thường. Hiện nay, đã có rất nhiều kit thương mại để tách

plasmid cho hiệu suất và độ tinh sạch cao trong thời gian rất ngắn. Cắt gen proinsulin và plasmid với cùng một enzyme giới hạn, rồi nối chúng lại bằng ADN ligase của phage T4. Trong thành phần của vector biểu hiện phải có các promoter mạnh giúp cho gen có thể biểu hiện được trong vi khuẩn. Mặt khác, cần phải thiết kết các trình tự mã hoá cho các protein tín hiệu giúp vận chuyển insulin ra ngoài tế bào chất.

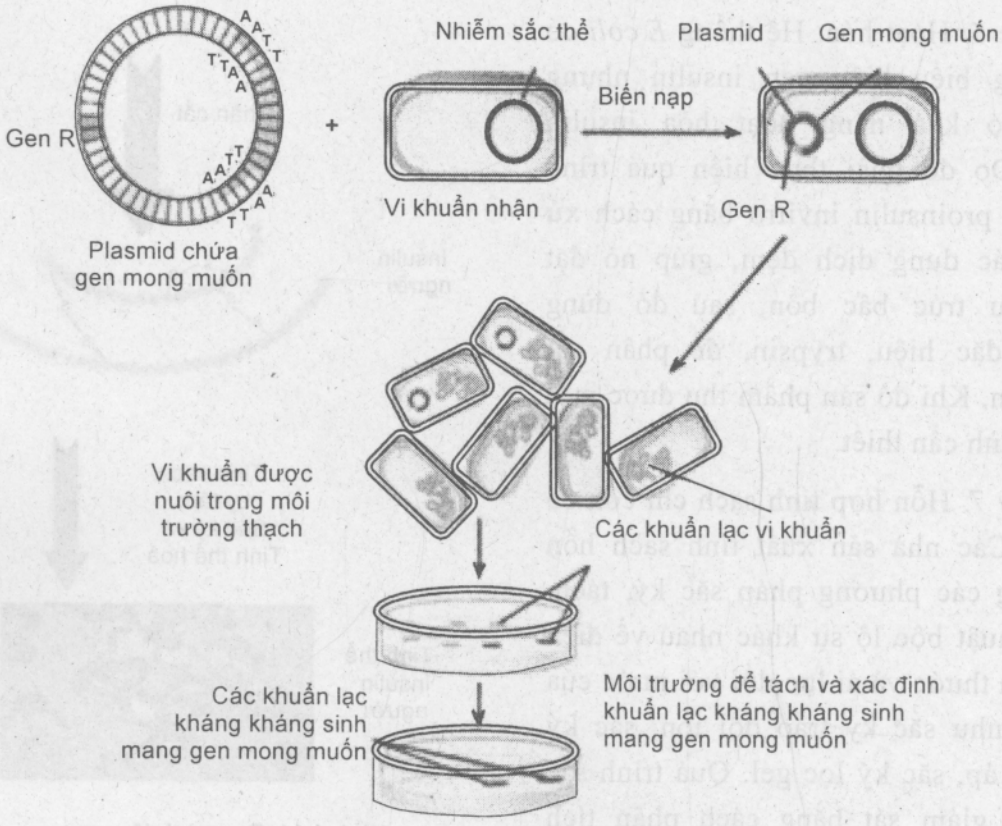


Hình 1.9. **Thiết kết vector tái tổ hợp chứa gen mã hóa proinsulin**

Nếu sử dụng mARN nhận được từ cách trên thì cần tiến hành như sau:

- Tiến hành sao mARN tinh khiết thành ADN (cADN) nhờ enzyme phiên mã ngược và nhờ các dNTP (trong phản ứng RT-PCR).
- Cài đoạn cADN mã hoá insulin hoàn chỉnh vào một plasmid đứng sau một promoter mạnh. Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi khuẩn *E.coli*.

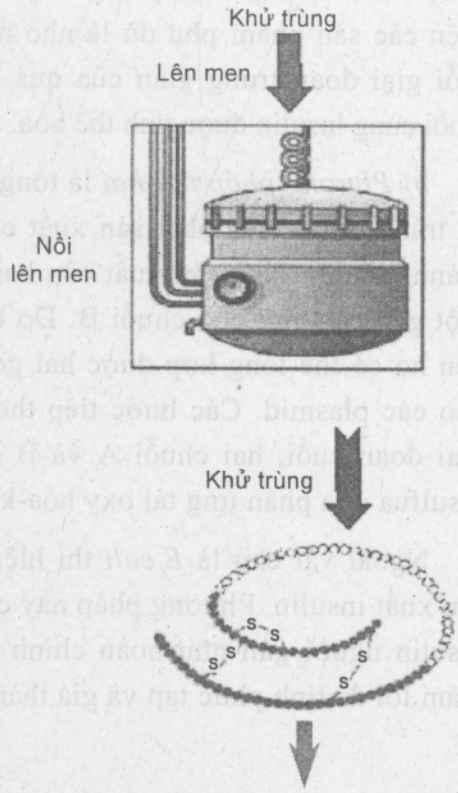
Bước 3. Việc biến nạp plasmid tái tổ hợp vào *E.coli* được thực hiện nhờ phương pháp như trộn với dung dịch chứa Ca^{2+} hoặc tạo lỗ bằng xung điện. Sau quá trình biến nạp, cần chọn lọc ra những dòng vi khuẩn mang gen mong muốn. Quá trình chọn lọc phụ thuộc vào quy trình và gen đánh dấu (marker gene) trên vector được sử dụng. Thông thường người ta sử dụng các gen kháng kháng sinh ampixilin (Amp^r) hoặc tetraxilin (Tet^r) để chọn lọc. Và nếu vector đó có kiểu chọn lọc được ngay thông qua khuẩn lạc xanh, trắng. Tiếp theo cần kiểm tra những dòng đã chọn lọc bằng nhiều cách khác nhau. Tốt nhất là giải trình tự nucleotid của đoạn gen cài vào vector tái tổ hợp và so sánh với trình tự gốc.



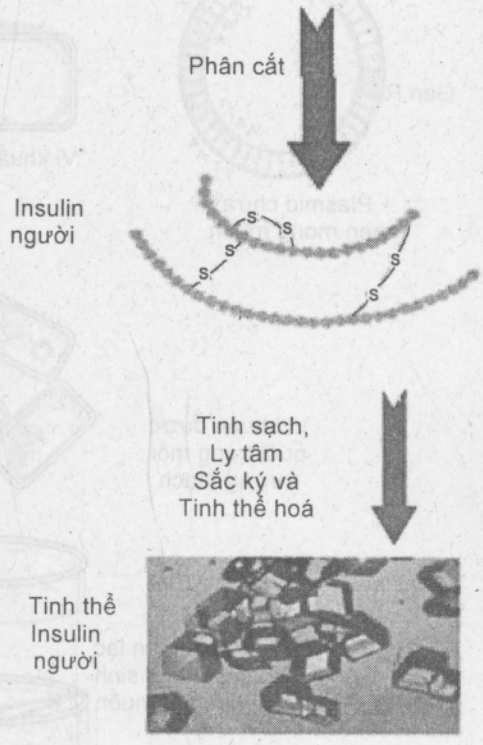
Hình 1.10. **Biến nạp và chọn lọc vi khuẩn chứa vector chuyển gen insulin**

Bước 4. Các vi khuẩn chuyển gen sau đó được đưa vào lên men. Nuôi chúng trong các nồi lên men với các điều kiện tối ưu. Sử dụng phương pháp nuôi cấy liên tục, theo đó các chất dinh dưỡng liên tục được bổ sung để bảo đảm sự tăng trưởng của vi khuẩn theo hàm mũ. Cứ 20 phút lại có hàng triệu vi khuẩn được nhân lên qua nguyên phân. Như vậy chỉ sau một thời gian ngắn, sinh khối sẽ tăng lên rất nhanh và gen insulin sẽ được tổng hợp.

Bước 5. Tiền tinh sạch. Sau lên men tiến hành tách tế bào và khử trùng nhiệt. Dùng lizozyme để phá vỡ màng tế bào, sau đó dùng một hỗn hợp chất tẩy rửa để tách lớp màng lipid. Proinsulin được tách ra khỏi các mảnh vỡ tế bào bằng phương pháp ly tâm và lọc.



Bước 6. Hoạt hóa. Hệ thống *E.coli* có khả năng biểu hiện gen insulin nhưng không có khả năng hoạt hóa insulin invivo. Do đó phải thực hiện quá trình hoạt hoá proinsulin invitro bằng cách xử lý với các dung dịch đệm, giúp nó đạt được cấu trúc bậc bốn, sau đó dùng enzyme đặc hiệu, trypsin, để phân cắt proinsulin. Khi đó sản phẩm thu được mới có hoạt tính cần thiết.

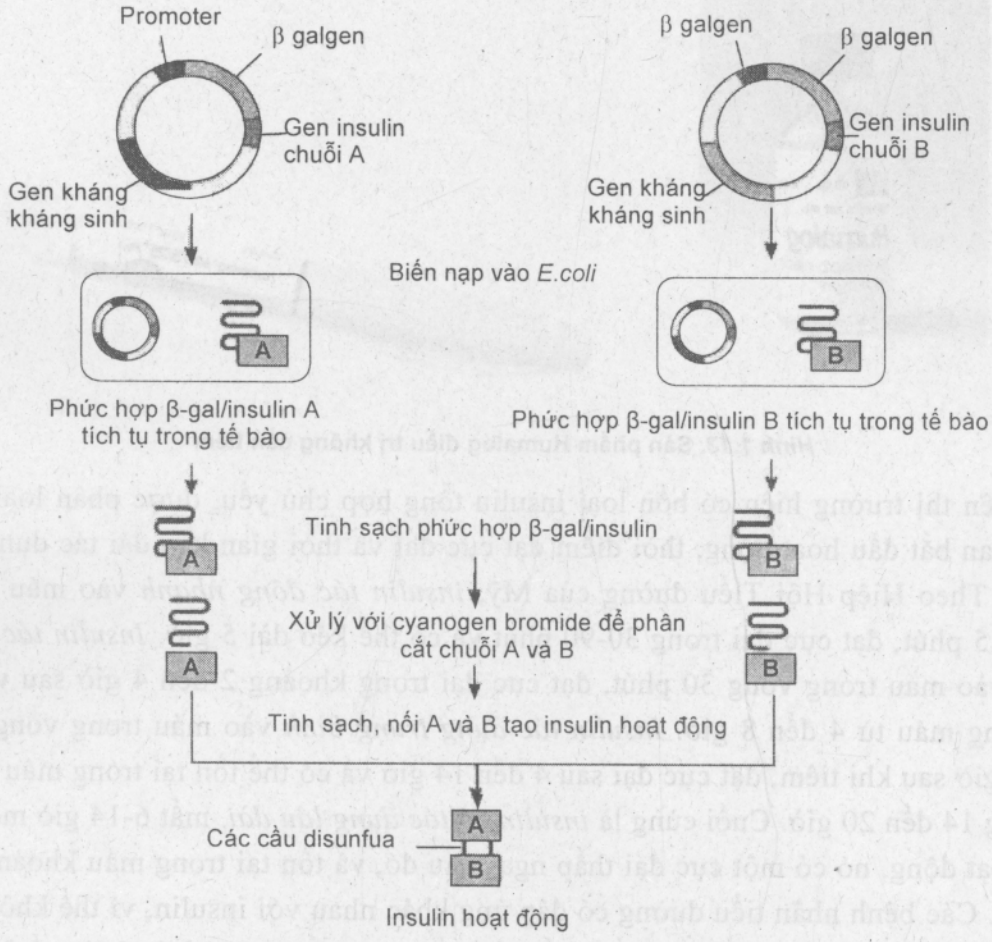


Hình 1.11. **Quy trình lên men sản xuất insulin**

Bước 7. Hỗn hợp tinh sạch chỉ còn có insulin. Các nhà sản xuất tinh sạch hỗn hợp bằng các phương pháp sắc ký, tách, các kỹ thuật bộc lộ sự khác nhau về điện tích, kích thước và ái lực đối với nước của phân tử như sắc ký trao đổi ion, sắc ký lỏng cao áp, sắc ký lọc gel. Quá trình sắc ký được giám sát bằng cách phân tích protein đặc hiệu nhờ sử dụng các phương pháp miễn dịch gắn enzyme cho phép phát hiện các sản phẩm phụ dù là nhỏ nhất. Độ tinh sạch của insulin được đánh giá qua mỗi giai đoạn trung gian của quá trình sản xuất nhờ phòng thí nghiệm chuyên hóa. Cuối cùng insulin được tinh thể hóa.

b) Phương pháp thứ hai là tổng hợp riêng rẽ hai chuỗi A và B. Phương pháp này sẽ tránh được việc phải sản xuất các enzyme đặc hiệu cần thiết để biến proinsulin thành insulin. Nhà sản xuất cần hai gen nhỏ: một gen cần cho sản xuất chuỗi A và một gen cần cho cho chuỗi B. Do biết được chính xác trình tự ADN của mỗi chuỗi nên họ có thể tổng hợp được hai gen nhỏ này. Mỗi phân tử ADN sau đó được chèn vào các plasmid. Các bước tiếp theo tương tự như sản xuất proinsulin, tuy nhiên ở giai đoạn cuối, hai chuỗi A và B sau đó được trộn với nhau và nối bằng các cầu disulfua qua phản ứng tái oxy hóa-khử nhờ một chất oxy hóa.

Ngoài vật chủ là *E.coli* thì hiện nay nấm men cũng có thể được sử dụng trong sản xuất insulin. Phương pháp này có nhiều ưu điểm: tế bào nấm men tạo các phân tử insulin người gần như hoàn chỉnh với cấu trúc không gian hoàn hảo. Điều đó làm giảm tối đa tính phức tạp và giá thành của các giai đoạn tinh sạch.



Hình 1.12. **Sơ đồ sản xuất insulin theo phương pháp hai chuỗi riêng biệt**

3.2.2. Giả insulin

Vào giữa những thập kỷ XX của thế kỷ trước, các nhà nghiên cứu bắt đầu cải tiến phương thức hoạt động của insulin người trong cơ thể bằng cách thay đổi trình tự acid amin của nó và tạo ra một chất tương tự, tức là một chất hóa học bắt chước insulin ở mức độ đủ để đánh lừa tế bào. Insulin giả ít dính kết với nhau hơn và khuếch tán vào máu dễ dàng hơn, cho phép insulin bắt đầu hoạt động ngay sau khi tiêm vài phút. Có nhiều dạng insulin giả. Humulin không có những liên kết chặt với insulin khác nên được hấp thụ nhanh hơn. Một chất insulin giả khác, có tên là Glargine, cấu trúc hóa học của nó cho phép giải phóng với tốc độ tương đối ổn định trong suốt 24 giờ mà không có các thời điểm cực đại rõ rệt nào.

Thay vì tổng hợp chính xác trình tự ADN mã hóa cho insulin chính xác, các nhà sản xuất lại tổng hợp một gen insulin với trình tự biến đổi đi chút ít. Quy trình sản xuất tương tự như quy trình đã mô tả ở trên.

Hình 1.13. **Sản phẩm Humalog điều trị không cần tiêm**

Trên thị trường hiện có bốn loại insulin tổng hợp chủ yếu, được phân loại theo thời gian bắt đầu hoạt động, thời điểm đạt cực đại và thời gian kéo dài tác dụng của thuốc. Theo Hiệp Hội Tiểu đường của Mỹ, *insulin tác động nhanh* vào máu trong vòng 15 phút, đạt cực đại trong 30-90 phút và có thể kéo dài 5 giờ. *Insulin tác dụng ngắn* vào máu trong vòng 30 phút, đạt cực đại trong khoảng 2 đến 4 giờ sau và tồn tại trong máu từ 4 đến 8 giờ. *Insulin tác dụng trung bình* vào máu trong vòng từ 2 đến 6 giờ sau khi tiêm, đạt cực đại sau 4 đến 14 giờ và có thể tồn tại trong máu trong khoảng 14 đến 20 giờ. Cuối cùng là *insulin có tác dụng lâu dài,* mất 6-14 giờ mới bắt đầu hoạt động, nó có một cực đại thấp ngay sau đó, và tồn tại trong máu khoảng 20-24 giờ. Các bệnh nhân tiểu đường có đáp ứng khác nhau với insulin, vì thế không có một loại insulin nào hoạt động tốt nhất cho tất cả mọi người bệnh. Một số insulin được bán trên thị trường dưới dạng hỗn hợp hai loại cùng đóng trong một lọ.

Hiện nay công nghệ sinh học đã trở thành một phương tiện rất hữu hiệu và có nhiều ứng dụng vô cùng to lớn. Sản xuất insulin bằng công nghệ sinh học là một bước nhảy vọt trong việc chữa trị bệnh tiểu đường.

Chương II
VACXIN

1. VÀI NÉT LỊCH SỬ

Ngay từ xa xưa, vào đầu thế kỷ XII các thầy thuốc Trung Hoa đã nhận thấy rằng, những đứa trẻ đã bị mắc bệnh đậu mùa thì sẽ không bao giờ bị mắc lại bệnh đó nữa. Từ đó họ nghĩ ra nhiều biện pháp như cho trẻ hít một chút bột nghiền từ vẩy mụn đậu, hoặc lấy bông chấm thứ bột này rồi nút vào mũi trẻ. Họ còn lấy quần áo của trẻ đã mắc bệnh để mặc cho trẻ khỏe mạnh trong vài ngày. Bằng các cách như vậy họ đã làm giảm đáng kể các ca tử vong do đậu mùa ở Trung Hoa thời bấy giờ. Các biện pháp này về sau theo chân các thương nhân Trung Hoa phổ biến khắp vùng Trung Á.

Mary Montagu, phu nhân đại sứ Anh tại Vương quốc Ohoman đã học được phương pháp này để áp dụng cho các con của mình và sau đó cho nhiều người khi bà quay trở về nước Anh vào năm 1721. Tuy nhiên, biện pháp này cũng có thể gây bệnh cho 1-2 đứa trẻ được chủng đậu. Bác sĩ nông thôn người Anh, Edward Jenner (1749-1823) nhận thấy các cô gái vắt sữa bò chỉ bị bệnh đậu bò dạng rất nhẹ. Da dẻ các cô luôn mịn màng vì không bao giờ bị bệnh đậu mùa. Một ý tưởng xuất hiện là liệu có thể dùng đậu bò để phòng bệnh đậu mùa? Sau rất nhiều lần quan sát và tìm hiểu, cuối cùng ông quyết định lấy mủ mụn ở núm vú bò để chủng cho đứa con trai mười tám tháng tuổi của mình. Mấy ngày sau, đứa bé bị sốt nhẹ, xuất hiện một số ít mụn sau đó nhanh chóng qua khỏi. Năm con trai lên 2 tuổi, ông chủng như vậy lần nữa nhưng chỉ thấy bị viêm nhẹ nơi vết chủng.

Ngày 14 tháng 5 năm 1796 được coi là ngày đáng ghi nhớ khi lấy mủ mụn từ cô gái vắt sữa bò chủng cho một cháu bé 8 tuổi. Sau bảy ngày cháu bé chỉ bị sốt nhẹ, vết chủng viêm nhẹ rồi đóng vẩy. Một năm sau, ông lấy mủ mụn đậu mùa thực sự chủng cho cháu bé và thật sự vui mừng khi thấy cháu bé hoàn toàn không bị mắc bệnh. Ông tiếp tục chủng cho 23 người khác và khẳng định sự thành công của mình. Ông đặt tên cho phương pháp của mình là "vaccination" (tiêm chủng), xuất phát từ tiếng Latinh, vacca là con bò cái. Mặc dù không ai giải thích được nguyên lý, nhưng phương pháp này nhanh chóng được phổ biến ra toàn nước Anh và Châu Âu. Năm 1805, Napoleon Bonaparte ra lệnh tiêm chủng cho toàn bộ quân đội Pháp. Ở Nga và Mỹ cũng có sắc

lệnh tương tự. Edward Jenner mất ngày 16 tháng 1 năm 1823 và được chôn cất tại quê hương ông, làng Berkeley, miền Tây Nam nước Anh.

Các công trình tiếp theo về tiêm chủng đã được Louis Pasteur (1822-1895) phát triển. Ông nhận thấy, nếu lấy ống giống vi khuẩn tả gà để qua 2-3 tháng tiêm cho gà thì chỉ thấy gà bị bệnh nhẹ. Các chủng đã già ít gây bệnh hơn. Sau đó, ông dùng các chủng đã làm giảm độc lực để tiêm chủng. Khi đã nắm được các nguyên tắc cơ bản, ông phát triển thêm vacxin chống bệnh than ở gia súc và bệnh dại. Ngày 4 tháng 7 năm 1885, lần đầu tiên Pasteur và cộng sự đã tiến hành tiêm chủng 13 lần virus dại lấy từ tủy sống thỏ với độc tính tăng dần cho cậu bé 9 tuổi, Joseph Meister đã bị chó dại cắn đến 14 vết thương. Vào thời kỳ bấy giờ, nếu bị chó dại cắn coi như đã cầm chắc cái chết, nhưng kỳ diệu thay cậu bé đã thoát khỏi bàn tay tử thần. Ngày 20 tháng 10 năm 1885, Pasteur lại điều trị cho một cậu bé 15 tuổi bị chó dại cắn 6 ngày trước đó và cũng lại thành công. Ngày 14 tháng 10 năm 1885, Viện Pasteur đã được thành lập. Chỉ trong vòng 2 năm, Viện này đã điều trị cho trên 5000 người.

Như vậy, Pasteur là người mở ra kỷ nguyên đấu tranh chống các bệnh nhiễm trùng bằng việc tiêm chủng dự phòng. Ngày nay vacxin được coi là chế phẩm kháng nguyên, nhưng không có khả năng gây bệnh, được đưa vào cơ thể để kích thích đáp ứng miễn dịch bảo vệ chủ động chống lại tác nhân gây bệnh. Vacxin kích thích đáp ứng miễn dịch nguyên phát (đáp ứng lần 1) để tạo ra các tế bào nhớ. Khi có tác nhân gây bệnh thực sự xâm nhập vào cơ thể, các tế bào nhớ sẽ hoạt động để tạo đáp ứng miễn dịch thứ phát (đáp ứng lần 2) với thời gian nhanh hơn và cường độ mạnh hơn, đủ sức bảo vệ cơ thể chống lại sự xâm nhập ồ ạt của các tác nhân gây bệnh.

Đã 200 năm trôi qua kể từ công trình đầu tiên của Edward Jenner, y học thế giới đã tiến những bước nhảy vọt. Nhiều loại vacxin truyền thống đã được cải tiến và sản xuất ở quy mô công nghiệp, phục vụ cho chương trình tiêm chủng mở rộng, làm giảm về cơ bản tỷ lệ tử vong ở trẻ em đối với nhiều loại bệnh nguy hiểm. Nhờ có vacxin mà từ 1978, bệnh đậu mùa đã vĩnh viễn bị xóa bỏ trên phạm vi toàn cầu và sắp tới là bệnh bại liệt. Ở Việt Nam, bệnh này cũng đã được thanh toán từ năm 2000. Mặc dù đã có nhiều cố gắng, nhưng nhiều loại bệnh hiểm nghèo cho đến nay vẫn chưa có vacxin dự phòng như sốt Dengue, HIV/AIDS, sốt rét,...

2. PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN

2.1. Các phương pháp truyền thống

Vacxin ngày nay được sản xuất bằng cả phương pháp truyền thống và phương pháp hiện đại.

2.1.1. Vacxin giảm độc lực (attenuated vaccine) hay vacxin sống, là vacxin chế từ tác nhân gây bệnh đã làm giảm tính độc bằng các tác nhân vật lý, hóa học, hoặc bằng các phương pháp khác như cấy truyền vào các mô không phải truyền thống nên không gây bệnh, nhưng vẫn còn giữ khả năng sinh sản và kích thích cơ thể tổng hợp kháng thể bảo vệ. Ví dụ điển hình là vacxin bại liệt Sabin V (OPV) được sản xuất từ năm 1950 gồm 3 serotyp virus polio có khả năng nhân lên trong tuyến nước bọt và đường tiêu hóa, nhưng không nhân lên được trong mô thần kinh nên không gây chứng liệt. Do virus có thể nhân lên nên không cần phải đưa lượng kháng nguyên lớn vào cơ thể. Tuy nhiên, vacxin sống đôi khi không ổn định do virus hồi phục tính độc, gây ra các triệu chứng liệt, mặc dù với tỷ lệ 1 – 2 trường hợp trên 0,9 – 1 triệu người được tiêm chủng. Năm 2000, hai vụ bại liệt xảy ra tại Cộng hòa Dominica và Haiti do sử dụng vacxin Sabin. Do vậy, nhiều nước đã quyết định thay vacxin Sabin bằng vacxin Salk-vacxin bất hoạt dạng tiêm (IPV).

2.1.2. Vacxin bất hoạt (inactivated vaccine)

Vacxin chứa các tác nhân gây bệnh đã bị giết chết bằng hóa chất (ox-propiolacton hoặc formalin), hoặc đun nóng. Do vi sinh vật đã chết, không nhân lên được nữa nên lượng kháng nguyên đưa vào cơ thể phải lớn, có nghĩa là phải tiêm nhắc lại nhiều lần, nhưng bù lại là dễ sản xuất, giá thành hạ và không cần bảo quản lạnh hay đông khô. Ví dụ điển hình là vacxin bại liệt Salk (IPV) dùng để tiêm.

2.1.3. Vacxin dưới đơn vị (subunit/ subvirion vaccine) hay vacxin thành phần

Loại vacxin này không dùng toàn bộ tế bào vi khuẩn hay toàn bộ hạt virus mà chỉ dùng một số thành phần có tính kháng nguyên của chúng, ví dụ HBsAg của virus viêm gan B, hay hemaglutinin của virus cúm. Vacxin này rất an toàn nhưng tính công hiệu không thật cao.

2.1.4. Vacxin giải độc tố

Một số vi khuẩn gây bệnh, ví dụ vi khuẩn bạch hầu hay vi khuẩn uốn ván sinh ra ngoại độc tố. Khi bị nhiễm, các độc tố này sẽ gây triệu chứng bệnh. Do vậy cần tạo đáp ứng miễn dịch (ĐƯMD) chống độc tố chứ không phải chống kháng nguyên (KN) của tế bào. Có thể dùng nhiệt hoặc formaldehyt làm biến đổi hóa học để mất tính độc, nhưng vẫn còn tính kháng nguyên. Lúc đó gọi là giải độc tố (toxoid). Cũng như vacxin chết, giải độc tố kích thích ĐƯMD thể dịch. Vì giải độc tố có một số quyết định KN nên muốn tạo miễn dịch MD có hiệu quả, cần phải tiêm nhắc lại nhiều lần.

2.1.5. Vacxin kháng kháng thể idiotyp (anti-idiotypantibody)

Kháng thể (KT) idiotyp là KT có quyết định KN (gọi là idiotop) nằm ở vùng siêu biến của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Ví dụ, khi tiêm Salmonella, cơ thể sẽ tạo KT

kháng Salmonella (anti-Salmonella). Nếu dùng KT kháng Salmonella làm KN thì cơ thể sẽ tạo kháng-kháng thể kháng Salmonella (anti-Salmonella antibody). KT này có cấu tạo giống như epitop của Salmonella. Bởi vì cả Salmonella và kháng-kháng thể kháng Salmonella đều kết hợp đặc hiệu với anti-Salmonella. Do vậy, thay vì dùng Salmonella-vi khuẩn gây bệnh làm KN để chế vacxin thì người ta dùng kháng-kháng thể kháng Salmonella thì sẽ an toàn hơn.

2.2. Vacxin tổng hợp

Mặc dù vacxin giảm độc lực hay bất hoạt đã thu được thành công lớn trong kiểm soát dịch bệnh nhưng các nhà nghiên cứu vẫn luôn tìm kiếm các phương pháp mới với mục tiêu là tìm ra vacxin công hiệu hơn, giá thành rẻ hơn và nhất là an toàn hơn. Sau đây là một số loại vacxin được sản xuất bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

2.2.1. Vacxin sống giảm độc lực sản xuất bằng kỹ thuật di truyền

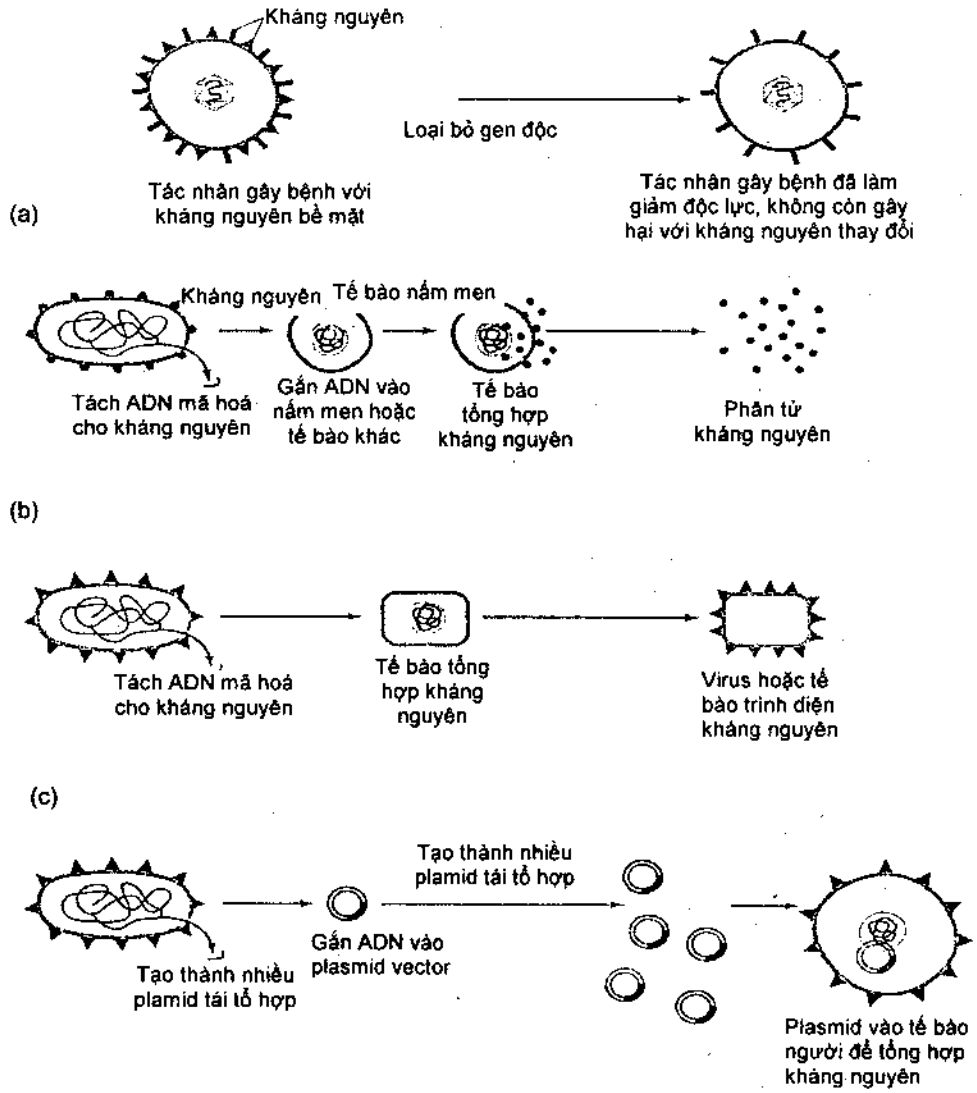
Tách genom khỏi capsid. Dùng enzyme giới hạn loại bỏ các gen độc. Tạo virus không còn gen độc làm vacxin để đưa vào cơ thể. Virus sẽ nhân lên trong tế bào và gây ĐƯMD qua trung gian tế bào.

2.2.2. Vacxin chứa KN sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp

- Vacxin viêm gan B: Tách gen mã hóa cho KN bề mặt HBs Ag khuếch đại bằng PCR, gắn gen vào plasmid nhờ ADNligaee. Biến nạp plasmid vào *S.cerevisae*. Nuôi nấm men trong nồi lên men để nhận KN dùng cho sản xuất vacxin.
- Vacxin lở mồm long móng: Virus aptơ gây bệnh có genom là ARN và có protein vỏ capsid là VP_3. Tách gen mã hóa cho VP_3, khuếch đại bằng RT-PCR, gắn vào plasmid, biến nạp vào *E.coli*. Nuôi *E.coli* trong nồi lên men rồi tách KN.

2.2.3. Vacxin vector

Vacxin sống tái tổ hợp. Có thể dùng virus như vaccinia, pox, adeno,... và các tế bào như Salmonella, *E.coli*,... làm vector. Ví dụ, gen mã hóa cho KN mong muốn được gắn vào plasmid nằm sát promoter của virus vaccinia và kẹp giữa gen mã cho protein timidin kinase (gen TK). Cho plasmid đã ghép gen và vaccinia vào tế bào mô nuôi cấy. Gen mã hóa cho KN và promoter sẽ cài xen vào genom của vaccinia nhờ tái tổ hợp tại vị trí không quan trọng của genom vaccinia. Đây là vị trí gen TK nên sẽ tạo virus tái tổ hợp TK^-. Thêm Bromodeoxyuridin (BRdr) để diệt các tế bào TK^+, chỉ còn lại dòng TK^-. Virus vaccinia cải biến di truyền sẽ biểu hiện gen cài xen và được dùng làm vacxin vector. Vacxin này thường được đưa vào da gây nhiễm tại chỗ. Nếu gen cài xen mã cho protein capsid ngoài thì protein này sẽ gắn vào màng tế bào và gây cả ĐƯMD tế bào lẫn ĐƯMD thể dịch.

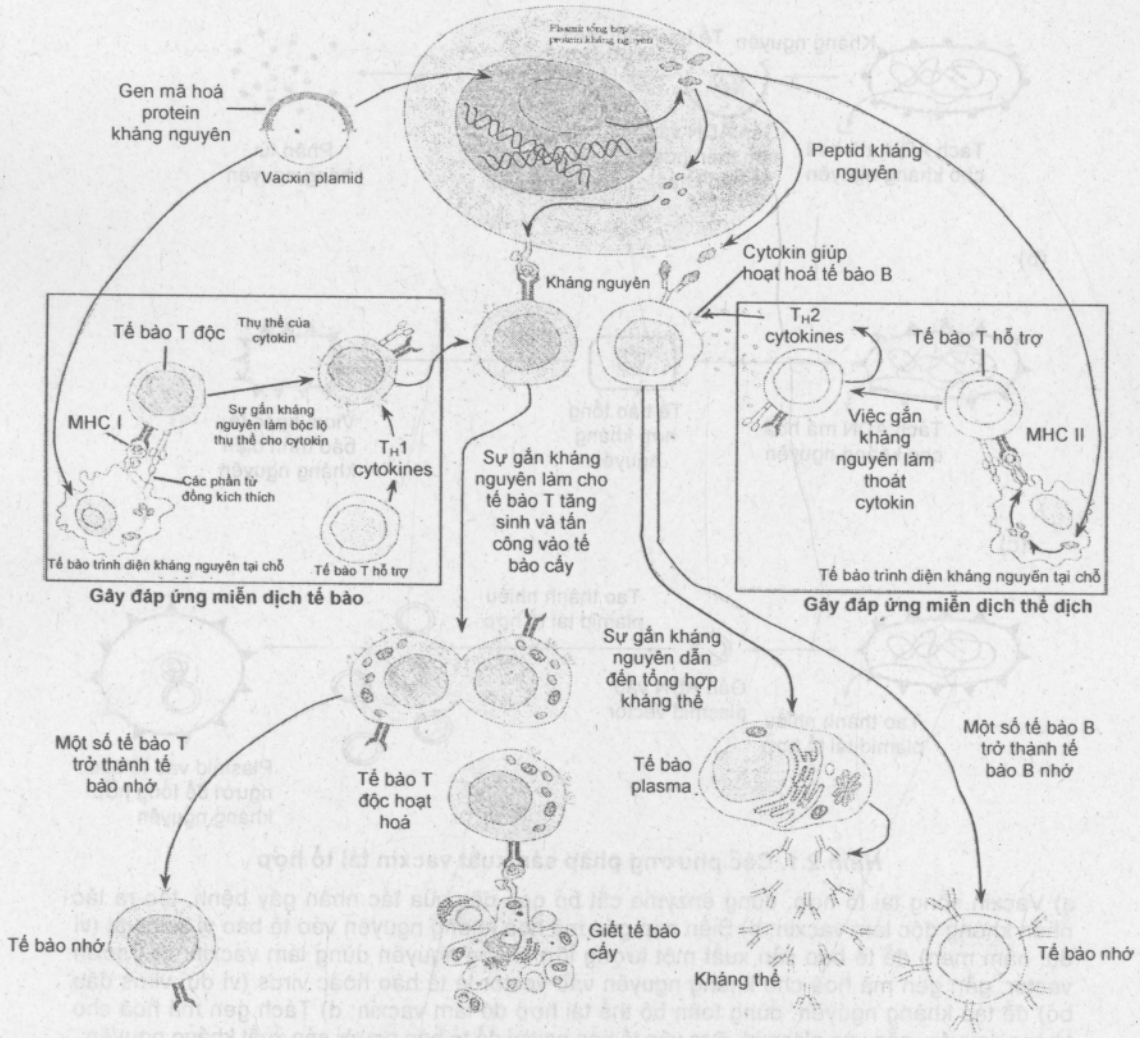


Hình 2.1. **Các phương pháp sản xuất vacxin tái tổ hợp**

a) Vacxin sống tái tổ hợp: dùng enzyme cắt bỏ gen độc của tác nhân gây bệnh, tạo ra tác nhân không độc làm vacxin; b) Biến nạp gen mã hoá kháng nguyên vào tế bào vi sinh vật (ví dụ, nấm men) để tế bào sản xuất một lượng lớn kháng nguyên dùng làm vacxin; c) Vacxin vector: gắn gen mã hoá cho kháng nguyên vào vector là tế bào hoặc virus (ví dụ, virus đậu bò) để tạo kháng nguyên, dùng toàn bộ thể tái hợp đó làm vacxin; d) Tách gen mã hoá cho kháng nguyên, gắn vào plasmid, đưa vào tế bào người để tế bào người sản xuất kháng nguyên.

Một virus khác được dùng làm vacxin giảm độc lực là canarypox, đây là virus pox gây nhiễm ở chim truyền qua bọn chân khớp. Virus này có kích thước lớn có thể tiến hành gắn xen đoạn gen lớn. Khác với vaccinia, canarypox không gây độc với cả những người bị ức chế miễn dịch. Ngoài ra còn có thể dùng các cơ thể khác làm vacxin giảm độc lực như *Salmonella typhimurium* nhưng đã tách gen độc gây bệnh thương hàn. Salmonella gây nhiễm tế bào màng nhày ruột nên kích thích tạo IgA miễn dịch chống thương hàn, lậu,... tuỳ thuộc vào sự sản xuất sIgA ở bề mặt màng nhày.

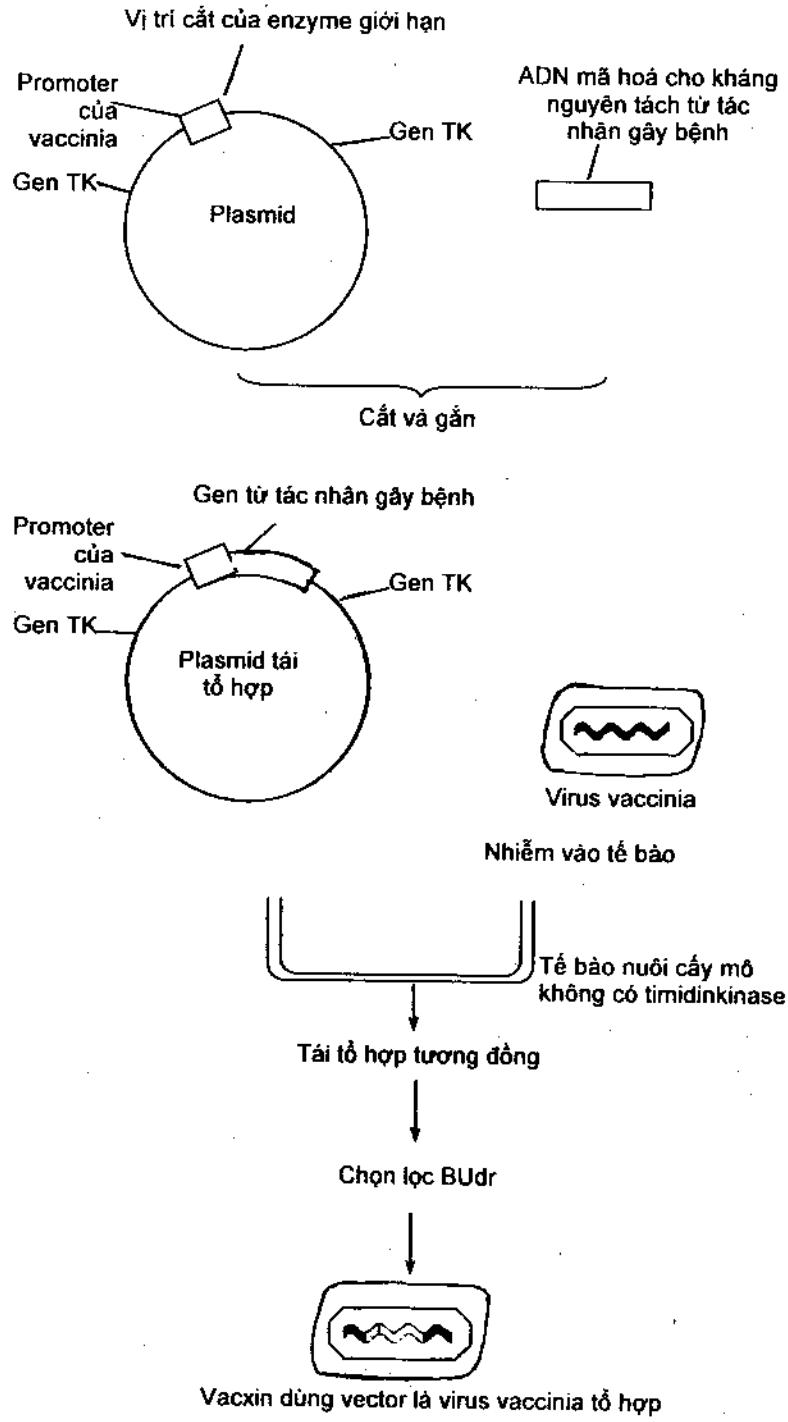
Một chủng virus polio dùng trong vacxin Sabin cũng được dùng làm vacxin vector an toàn và công hiệu. Trong trường hợp này gen mã hoá cho protein capsid ngoài của virus polio được thay bằng gen mã cho epitop mong muốn. Virus polio lắp ráp này sẽ biểu hiện epitop mong muốn nhô ra khỏi nucleocapsid trong quá trình trình diện.



Hình 2.2. **Vacxin ADN tạo cả miễn dịch thể dịch và miễn dịch tế bào. Gen được tiêm vào tế bào cơ**

2.2.4. Vacxin ADN

Phương pháp đổi mới là không đưa KN có sẵn vào cơ thể mà đưa ADN mã hóa cho KN vào cơ thể để biến tế bào trở thành "lò phản ứng sinh học" (bioreactor) tổng hợp KN. Gen mã hóa cho KN được gắn vào plasmid và đưa trực tiếp vào tế bào qua da nhờ súng bắn gen.

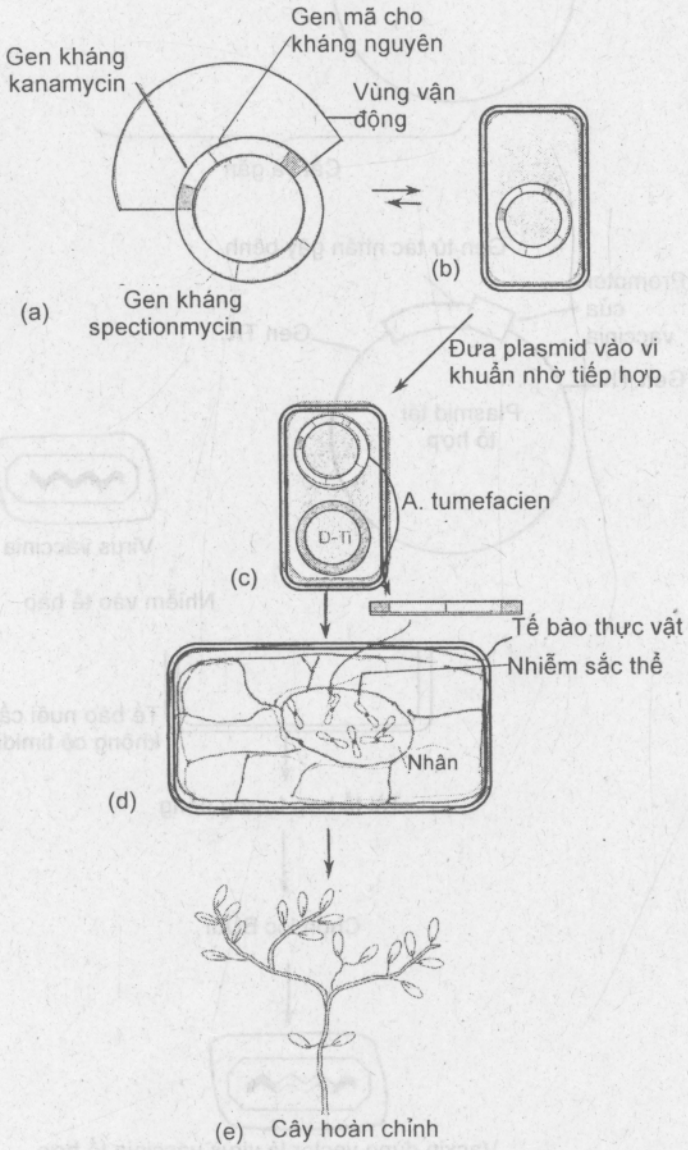


Hình 2.3. **Sơ đồ sản xuất vacxin vector nhờ virus đậu bò**

Súng bắn gen được nạp vi đạn làm bằng các hạt vàng hay tungsten cực nhỏ (1 – 4nm) được bao bởi ADN plasmid. Khi đạn được bắn vào tế bào, các plasmid chui vào nhân tiến hành sao chép, phiên mã rồi dịch mã tổng hợp protein KN. KN sẽ được gắn với MHC-I để trình cho tế bào T_C gây ĐƯMD tế bào. KN cũng có thể

ngấm qua màng sinh chất bị tế bào APC thâu tóm, chế biến và gắn với MHC-II để trình diện cho tế bào T_H2 tiết lymphokin kích thích tế bào plasma sản xuất KT.

2.2.5. Vacxin dựa trên cơ thể chuyển gen. Sản xuất cây chuyển gen nhờ Agrobacter tumefaciens



Hình 2.4. **Sản xuất cây chuyển gen nhờ *Agrobater tumefaciens***

(a) Vectơ chuyển gen ở thực vật chứa hai đầu ADN-T, ADN mã hóa cho kháng nguyên, đoạn bắt nguồn từ *E.coli*, đoạn bắt nguồn từ *A.tumefaciens* và các marker kháng kanamycin và spectinomycin có thể được lựa chọn trong tế bào thực vật.

(b) Biến nạp vector vào *E.coli* để nhân dòng sau đó đưa vào *A.tumefaciens* bằng tiếp hợp. *(c)* Plasmid (D-T_i) dùng để chuyển vector vào cây (D-T_i) tự biến đổi di truyền để loại bỏ gen gây bệnh chủ yếu. *(d)* Tuy nhiên, D-T_i có thể cố định vùng ADN-T của vector để chuyển cho tế bào nuôi cấy mô thực vật. Từ các tế bào tái tổ hợp sẽ mọc được cây hoàn chỉnh *(e)* thì sẽ gây ĐƯMD tế bào và ĐƯMD thể dịch (hình 2.4).

2.2.6. Vacxin bào tử (spore vaccine)

Bào tử là dạng nghỉ của vi khuẩn có cấu trúc đặc biệt gồm nhiều lớp màng dày khó thấm bao bọc. Bào tử có khả năng đề kháng cao với các tác nhân vật lý, hóa học và đặc biệt có khả năng chịu nhiệt do có chứa canxi dipicolinat. Bào tử vi khuẩn lần đầu tiên được Lê.H.Đức và Simong M. Cutting sử dụng làm vật tải vacxin. Họ tiến hành gắn kháng nguyên làm mảnh C của độc tố uốn ván TTFC (tetanus toxin fragment C) vào vỏ bào tử *Bacillus subtilis* để gây miễn dịch theo đường uống và đường hô hấp (hít) cho chuột và đã tạo được đáp ứng miễn dịch ở niêm mạc và miễn dịch hệ thống. Nồng độ IgG đặc hiệu với TTFC trong huyết thanh khi xác định bằng ELISA đạt mức độ đáng kể sau 33 ngày uống, trong khi đáp ứng miễn dịch chống kháng nguyên vỏ bào tử là rất thấp. Mức độ kháng thể kháng độc tố đủ bảo vệ chuột khi thử thách với liều gây chết ($20LD_{50}$) độc tố uốn ván. Ưu điểm của bào tử *Bacillus* là dễ nhân lên, bảo quản lâu dài, thao tác di truyền đơn giản nên sẽ trở thành một loại chất tải vacxin rất hấp dẫn.

Bảng 2.1. **Ưu điểm và nhược điểm của các loại vacxin đang lưu hành**

Loại vacxin	Ưu điểm	Nhược điểm
Vacxin giảm độc lực (sống)	Đơn giản, dễ sản xuất Giá thành rẻ, tương đối ổn định Gây miễn dịch kéo dài Không cần tiêm nhiều lần	Có thể gây bệnh nhẹ Có thể chuyển thành dạng gây bệnh Virus có thể bị chết, cần bảo quản lạnh Có thể bị nhiễm virus Chứa genom virus có thể gây bệnh hoặc ung thư
Vacxin bất hoạt (chết)	Đơn giản, dễ sản xuất Giá thành rẻ, ổn định Không cần bảo quản lạnh Khả năng nhiễm virus sống rất thấp	Cần nuôi tạo lượng virus lớn, có thể cần tá chất bổ trợ Tính miễn dịch có thể không cao Có thể phải tiêm nhắc lại nhiều lần Chứa genom virus có thể gây bệnh hoặc ung thư

Loại vacxin	Ưu điểm	Nhược điểm
Vacxin từng phần tinh sạch	Gây ĐƯMD định hướng với từng phần của virus Không trở lại thành virus để lây nhiễm Ổn định, có thể không cần bảo quản lạnh	Sản xuất phức tạp, cần chất bổ trợ Giá thành thường cao Cần hệ thống nuôi để thu lượng virus lớn Tính miễn dịch có thể không cao Có thể phải tiêm nhắc lại nhiều lần Có thể chứa cả hạt virus hoặc genom virus
Vacxin tách dòng	Gây ĐƯMD định hướng với từng phần của virus Không trở lại thành virus để lây nhiễm Khả năng nhiễm virus sống thấp Ổn định, có thể không cần bảo quản lạnh	Nghiên cứu phức tạp, chi phí cao Cần chất bổ trợ Tính miễn dịch có thể không cao Có thể cần tiêm nhắc lại nhiều lần

2.3. Phối hợp vacxin

Vacxin lý tưởng là vacxin có tính KN cao, có hiệu lực hoàn toàn chỉ trong 1 lần tiêm, không có phản ứng phụ và tạo được miễn dịch bảo vệ suốt đời. Loại vacxin như thế còn lâu mới đạt được, ngoại trừ một vài loại vacxin virus sống giảm độc lực, còn hầu hết đều cần một vài lần tiêm và một vài lần củng cố nếu muốn tạo được sự bảo vệ lâu dài.

Cuối thế kỷ trước đã có 20 loại và hiện nay đã có 27 loại vacxin được đưa vào sản xuất. Tất cả đều để tiêm trừ 3 loại để uống là vacxin bại liệt (OPV), tả, thương hàn. Trong chương trình tiêm chủng ở các nước đang phát triển, ít nhất cũng phải có 5 – 6 mũi tiêm. Ở Việt Nam, trẻ em được tiêm 3 mũi vacxin bạch hầu, uốn ván, ho gà; 3 mũi vacxin viêm gan B, 3 lần uống vacxin bại liệt. Riêng 3 mũi vacxin viêm màng não mủ Hib thì tùy sự lựa chọn của phụ huynh và phải trả tiền, vì chương trình không cung cấp vacxin này. Như vậy để hoàn thành chương trình tiêm chủng, trẻ em Việt Nam phải chịu đựng 9 lần tiêm và 3 lần uống trong khoảng 6 tháng đầu đời. Rõ ràng trẻ em đang bị quá tải vì những mũi tiêm. Các thầy thuốc và đặc biệt là phụ huynh cũng phải chịu đựng sự quá tải này vì luôn phải nhớ đưa con đi tiêm đúng ngày.

Việc phối hợp nhiều loại vacxin vào một mũi tiêm là nhằm đơn giản hóa công tác tiêm phòng, làm giảm số lần tiêm, cũng có nghĩa là giảm số lần cha mẹ phải đưa con đi tiêm, giảm số lần bỏ tiêm do quên hoặc đi không đúng ngày, giảm đau cho trẻ

và nhất là giảm phản ứng phụ có thể xảy ra. Có 2 loại tạo miễn dịch khi sử dụng vacxin phối hợp, đó là:

- Tạo miễn dịch kết hợp: Trộn lẫn nhiều loại vacxin trong một bơm tiêm và tiêm tại một vị trí duy nhất trên cơ thể
- Tạo miễn dịch đồng thời: Cùng một lúc đưa vacxin vào cơ thể tại nhiều vị trí khác nhau, hoặc theo nhiều đường khác nhau: trong cơ, dưới da hoặc rạch trên da.

Vacxin phối hợp phải đạt được hiệu quả cao. Đáp ứng miễn dịch với mỗi loại vacxin ít nhất cũng phải bằng đáp ứng với vacxin khi dùng riêng lẻ. Trong nhiều trường hợp có thể xảy ra sự tác động qua lại giữa các kháng nguyên mang tính hiệp đồng nên đạt hiệu quả cao hơn so với dùng riêng lẻ. Tuy nhiên, trong một số trường hợp khác lại xảy ra sự cạnh tranh giữa một số kháng nguyên. Đáp ứng miễn dịch đối với một hoặc vài kháng nguyên có thể bị ức chế hoặc suy giảm, nên sự phối hợp giữa chúng là không có hiệu quả. Cho đến nay chưa thấy có phản ứng xấu nào do vacxin phối hợp mang lại. Để cho ra đời một loại vacxin phối hợp phải có nguồn kinh phí lớn từ 100 đến 200 triệu USD để giải quyết hàng loạt khâu công nghệ như nghiên cứu bản chất kháng nguyên và sự tương tác giữa chúng trong hỗn hợp, hiệu quả miễn dịch, độ an toàn, kiểm định invitro và in vivo theo từng vùng dân cư, đánh giá hiệu quả,...

Nhu cầu sử dụng vacxin ở mỗi quốc gia không giống nhau, tùy thuộc vào kiểu bệnh của địa phương. Ở một số nước đang phát triển, đối với các bệnh không phải là tối nguy hiểm thì không được đưa vào chương trình tiêm chủng mở rộng do kinh phí hạn hẹp. Phụ huynh phải trả tiền nếu muốn tiêm vacxin ngoài chương trình cho con em mình. Do vậy, phải có nhiều loại vacxin để cung cấp cho các chương trình quốc gia và các bậc phụ huynh có nhiều cơ hội lựa chọn phù hợp. Ngày nay trên thị trường đã có các loại vacxin phối hợp sau đây:

- Bạch hầu - uốn ván.
- Bạch hầu - ho gà.
- Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào (tế bào nguyên vẹn).
- Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào.
- Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào - bại liệt tiêm.
- Viêm gan B - Hib.
- Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào - Hib.
- Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào - Hib - bại liệt tiêm.

– Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào - Hib - bại liệt tiêm.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào - Hib - viêm gan B.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào - Hib.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào - viêm gan B - Hib.
– Rubella - quai bị.
– Rubella - sởi.
– Quai bị - sởi.
– Sởi - quai bị - Rubella.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào - phế cầu.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào - não cầu.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào - viêm gan B.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào - viêm gan B-Hib.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà vô bào - viêm gan B - viêm gan B-Hib-bại liệt tiêm.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào - phế cầu.
– Bạch hầu - uốn ván - ho gà toàn tế bào - não cầu.
– Não cầu - phế cầu.
– Hib - phế cầu.
– Hib - não cầu.
– Hib - phế cầu - não cầu.
– Viêm gan B - bại liệt tiêm.
– Bại liệt tiêm - phế cầu.
– Bại liệt tiêm - phế cầu - não cầu.
– Hib - viêm gan A và B - bại liệt tiêm.
– Sởi - Rubella - quai bị - thủy đậu.

Các kiểu phối hợp không thực hiện gồm TAB + bại liệt uống hoặc tiêm; tiêu chảy + sốt vàng. Vacxin ho gà toàn tế bào thường chứa nhiều kháng nguyên, có khi lên tới hàng nghìn, nên có thể gây sốt do tác dụng phụ, trong khi vacxin vô bào chỉ chứa vài kháng nguyên cơ bản, có thể gây đáp ứng miễn dịch nên hầu như phản ứng phụ bị loại trừ.

Ba nhà sản xuất lớn nhất giành được 60% thị phần vacxin thế giới là Aventis, Glaxo Smith Kline (GSK) và Chiron. Họ đưa ra chiến lược cải cách từ phương pháp cổ điển với chi phí và lợi nhuận thấp, đã được sử dụng trong các chương trình tiêm chủng mở rộng, sang các phương pháp sản xuất vacxin hỗn hợp với chi phí và lợi nhuận cao. Ví dụ, gần đây tập đoàn Glaxo Smith Kline đưa ra một loại vacxin phối

hợp mới "6 trong 1" mang tên Infarix Hexa để chống 6 bệnh phổ biến là bạch hầu, uốn ván, ho gà, viêm gan B, bại liệt và viêm màng não. Hib (do Haemophilus influenza typ B) trong cùng một mũi tiêm. Ví dụ khác, hãng Aventis Pasteur đưa ra vacxin "5 trong 1" để chống 5 bệnh là bạch hầu, uốn ván, ho gà, bại liệt Hib, đạt hiệu quả miễn dịch cao, các phản ứng nhẹ như tiêm vacxin DTP đơn lẻ.

Ở Đông Nam Á, ba nước Indonesia, Việt Nam và Thái Lan được coi là 3 nhà sản xuất vacxin thực thụ, đủ sức không những cung cấp hầu hết vacxin cho chương trình tiêm chủng mở rộng của mình mà còn cung cấp cho các nước trong vùng, được Tổ chức Y tế thế giới đánh giá cao. Trong số 10 vacxin dùng trong tiêm chủng mở rộng thì Việt Nam tự sản xuất được 9 loại, trong đó có vacxin được sản xuất bằng công nghệ mới như vacxin viêm gan B tái tổ hợp.

***Bảng 2.2.* Các vacxin chính phòng bệnh ở người**

Vacxin	Tác nhân gây bệnh	Bệnh	Loại vacxin
Do CDC giới thiệu			
Viêm gan B	Virus viêm gan B	Viêm gan	Dưới đơn vị bất hoạt
Bạch hầu/ho gà/ uốn ván	Độc tố bạch hầu Độc tố vi khuẩn than *Bordetella pertussis*	Bạch hầu Than Ho gà	Giải độc tố Giải độc tố Dưới đơn vị bất hoạt Cũng có thể dùng cả tế bào làm KN
Haemophilus influenzae typ B	*Haemophilus influenzae*	Viêm màng não Viêm phổi	Dưới đơn vị bất hoạt
Polio bại liệt	Virus Polio	Bại liệt	Bất hoạt (Salk) Giảm độc lực (Sabin)
Sởi/quai bị/rubella (MMR)	Virus sởi Virus quai bị Virus rubella	Sởi Quai bị Sởi Đức	Giảm độc lực Giảm độc lực Giảm độc lực
Thủy đậu	Virus thủy đậu	Thủy đậu	Giảm độc lực
Viêm phổi *Pnuemococcus*	*Strepcoccus Pneumonia*	Viêm phổi	Dưới đơn vị bất hoạt
Viêm gan A	Virus viêm gan A (HAV)	Viêm gan	Bất hoạt (cả hạt)
Cúm	Virus cúm	Cúm	Dưới đơn vị bất hoạt

Vacxin	Tác nhân gây bệnh	Bệnh	Loại vacxin
Không được giới thiệu cho toàn cộng đồng			
Bệnh than	*Bacillus anthracis*	Bệnh than	Bất hoạt cả tế bào
BCG (Bacillus of Calmette and Guerin) (Vacxin lao)	*Mycobacterium tuberculosis* *M.leprae*	Bệnh lao, phong	Giảm độc lực
Sốt vàng	Virus sốt vàng	Bệnh sốt vàng	Giảm độc lực
Dại	Virus dại	Bệnh dại	Bất hoạt (cả hạt)
Đậu bò (dùng virus đậu bò)	Virus đậu mùa	Đậu mùa	Giảm độc lực

Bảng 2.3. **Lịch tiêm chủng**

Tháng tuổi	Vacxin	Mũi tiêm
Sơ sinh hoặc bất kỳ lúc nào sau đó	BCG (phòng lao) Viêm gan B	Mũi 1: Tiêm trong da Mũi 1: Tiêm bắp
2 tháng	Bại liệt (OPV) Bạch hầu, ho gà, uốn ván (DTP) Viêm gan B	Lần 1: Uống Mũi 1: Tiêm bắp Mũi 2: Tiêm bắp
3 tháng	Bại liệt (OPV) Bạch hầu, ho gà, uốn ván (DTP) Bại liệt (OPV)	Lần 2: Uống Mũi 2: Tiêm bắp Lần 3: Uống
4 tháng	Bạch hầu, ho gà, uốn ván (DTP) Sởi	Mũi 3: Tiêm bắp Mũi 1: Tiêm dưới da Mũi 2: Nhắc lại trong chiến dịch tiêm chủng
1-5 tuổi	Viêm não Nhật Bản B	Mũi 1: Tiêm bắp Mũi 2: Sau 1-2 tuần Mũi 3: Sau mũi 2 một năm
2-5 tuổi	Tả (chỉ tiêm vùng có nguy cơ)	Hai lần uống cách nhau 2 tuần
3-5 tuổi	Thương hàn	Một mũi

Chương III
INTERFERON

Interferon (IFN) là các glycoprotein do các tế bào của nhiều loại động vật tiết ra để chống lại một cách không đặc hiệu sự tấn công của các virus khác vào các tế bào cùng loài. Năm 1957, Alick Isaacs, người Scotlen và Jean Lindermann, người Thụy Sĩ, tại Viện Y học Quốc gia Luân Đôn, đã tiến hành tiêm virus cúm đã làm bất hoạt từ trước bằng nhiệt vào màng đệm tách rời của phôi gà, sau đó tiêm tiếp virus cúm sống vào cùng chỗ thì virus cúm sống không nhân lên được, kể cả nếu tiêm các virus khác loại cũng cho kết quả như vậy. Hai ông cho rằng, sau khi tiêm lần đầu, trong tế bào nhiễm virus đã hình thành một chất ức chế và đặt tên là interferon.

1. SỰ TẠO THÀNH INTERFERON

Trong đa số các trường hợp, sự tạo thành IFN không chỉ để đáp lại sự xâm nhập của virus và các sản phẩm của nó (glycoprotein, ARN mạch kép) mà còn để đáp lại sự xuất hiện của nhiều loại tác nhân khác như vi khuẩn và các sản phẩm của chúng (nội độc tố, lông), các chất phân bào polynucletid tổng hợp (poly IC, poly GC), một số loại thuốc như theophillin, pirydamol, dibazol, một số loại vacxin (Sabin, DPT...).

Các chất cảm ứng tạo thành IFN được gọi là interferonogen. IFN được tạo thành với số lượng lớn, nếu tế bào bị nhiễm virus có độc lực thấp, ngược lại chỉ tạo được một lượng nhỏ, nếu tế bào bị nhiễm virus có độc lực cao. Các virus có độc lực mạnh ức chế sự tổng hợp protein của tế bào trước khi IFN được tạo thành. IFN được tổng hợp mạnh khi có mặt ARN mạch kép tự nhiên cũng như ARN mạch kép tổng hợp. Loại ARN này không có trong các tế bào bình thường mà chỉ có trong tế bào nhiễm virus ARN, chúng tồn tại ở dạng sao chép RF (replication form). ARN mạch kép là tín hiệu chứng tỏ virus đang nhiễm trong tế bào động vật. Có 3 loại IFN: IFN *alpha* do bạch cầu, IFN *beta* do nguyên bào sơ và IFN *gamma* do các tế bào T hoạt hoá và tế bào giết tự nhiên (NK) tiết ra. Chỉ có 1 gen mã cho IFN - beta, 1 gen mã cho IFN-alpha, bao gồm khoảng 15 protein chức năng. Tất cả các gen IFN *alpha* nằm thành cụm trên nhiễm sắc thể số 9 gần gen IFN beta. Gen IFN *beta* nằm trên nhiễm sắc thể số 12. Ở trạng thái bình thường, các gen này bị đóng. Chính các chất cảm ứng có tác dụng giải kìm hãm, hoạt hoá các gen để chúng tổ hợp IFN.

2. TÍNH CHẤT CỦA INTERFERON

Cũng như các protein khác, IFN bị bất hoạt bởi các enzyme protease như trypsin, pepsin, papain. IFN tương đối bền nhiệt, hoạt tính bị mất khi đun ở 60-75^{0}C trong 1 giờ, hoặc 100°C trong 5 phút. Ở 4^{0}C có thể bảo quản IFN trong nhiều tháng, IFN *alpha* và *beta* bền ở pH thấp. Ở pH 2 hoạt tính không bị mất. Các điểm cơ bản được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 3.1. **Một số đặc tính của interferon**

Tính chất	IFN- alpha	IFN- beta	IFN- gamma
Nguồn gốc	Bạch cầu, biểu mô	Nguyên bào sợ	Tế bào T hoạt hoá, Tế bào NK
Tác nhân cảm ứng	Virus	Virus	ĐƯMĐ đặc hiệu
Cơ chế tác dụng	Kích thích sản xuất protein kháng virus	Kích thích sản xuất protein kháng virus	Kích thích hoạt động đại thực bào, BC trung tính.
Phân tử lượng Glycosyl hoá Bền ở pH 2	16- 23 (kDa) Không Có	23 (kDa) Có Có	20 – 25 (kDa) Có Không
Tên khác	IFN bạch cầu	IFN nguyên bào sơ	IFN miễn dịch, yếu tố hoạt hoá đại thực bào

IFN có tính kháng nguyên yếu. Chúng được tạo thành sau mấy giờ tế bào bị nhiễm. Sự tác động của IFN không mang tính đặc hiệu, vì IFN do một loại virus cảm ứng tạo thành có thể ngăn cản sự nhân lên của nhiều loại virus khác. Tuy nhiên IFN lại có tính đặc hiệu loài cao. IFN do một loài sinh vật sinh ra chỉ có thể nhận diện được thụ thể trên màng sinh chất của chính loài đó. Do vậy IFN do một loài động vật, ví dụ gà, hình thành để chống virus cúm chỉ có thể ngăn cản sự nhân lên của virus cúm và các virus khác ở gà (cùng loài) chứ không phải ở các động vật khác (khác loài).

3. TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA INTERFERON

IFN có tác dụng ngăn cản sự nhân lên của nhiều loại virus như cúm, sởi, sốt Dengi, xuất huyết, viêm não Nhật Bản, viêm gan, do vậy chúng được coi là chất đóng vai trò quan trọng hàng đầu trong việc bảo vệ cơ thể chống sự nhiễm virus. Trong những ngày đầu sau khi nhiễm virus, lượng IFN trong máu tăng dần và nhờ đó

lượng virus sinh ra giảm dần. IFN được hình thành tại chỗ, nơi virus nhiễm với nồng độ tương đối cao để kích thích tạo thành protein kháng virus. IFN cũng được tạo thành sớm hơn so với kháng thể, còn kháng thể được hình thành sau và có tác dụng lâu dài chống tái nhiễm. Do vậy, việc sử dụng chất kháng virus lý tưởng này còn tuỳ thuộc vào việc đưa IFN vào đúng vị trí cần thiết trong cơ thể. IFN còn được quan tâm vì khả năng chống một số loại tế bào ung thư của người, đặc biệt là ung thư các tế bào hệ tạo máu, do chúng có khả năng phá huỷ mARN dẫn đến ngăn cản quá trình tổng hợp protein. IFN có khả năng làm thay đổi đáp ứng miễn dịch (ĐƯMD) thông qua các sự kiện:

– Thay đổi sự biểu hiện các phân tử bề mặt của tế bào hệ miễn dịch.

– Thay đổi sự tạo thành và tiết các protein (cytokin) của các tế bào nói trên.

– Tăng cường, hoặc ức chế chức năng của các tế bào hiệu ứng (effector) - tế bào trực tiếp tạo ĐƯMD.

Một trong những tác động của IFN vào ĐƯMD là tăng cường sự biểu hiện của phân tử MHC–I và MHC–II (phức hợp hoà hợp mô chính – major histocompatibility complex). Các gen MHC–I được tăng cường hoạt động bởi cả 3 loại IFN, còn các gen MHC–II được tăng cường hoạt động bởi IFN *gamma*. IFN cũng tác động để tăng cường sự biểu hiện của receptor dành cho F_c của kháng thể và receptor dành cho nhiều loại cytokin khác. Các hoạt động này sẽ tăng cường hiệu quả của sự nhận diện kháng nguyên và do đó làm cho ĐƯMD có hiệu quả hơn. IFN tác động lên các tế bào hiệu ứng của tế bào miễn dịch để tăng khả năng giết các tế bào nhiễm virus, tăng khả năng diệt tác nhân gây bệnh của đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào T độc và các tế bào NK. IFN – γ do tế bào TH1 tiết ra có khả năng hoạt hoá đại thực bào để giết vi khuẩn nội sinh. Loại lymphokin này mang tính chất hoạt hoá đại thực bào (MAF macrophage activating factor). Tế bào NK có khả năng phá huỷ hàng loạt tế bào đích, có thể là tế bào đồng loại (cùng gen), khác loại (dị gen) hoặc các tế bào khác gen, khác loại (xenogeneic) mà không bị giới hạn bởi MHC. Khi xảy ra sự tương tác giữa tế bào NK và tế bào đích dẫn đến sự tạo thành IFN *alpha* và IFN beta. IFN cũng có thể kích thích tạo thành yếu tố hoại tử ung thư – TNF (tumour necrosis factor). Chất này có hoạt tính diệt virus giống như IFN *gamma* nhưng theo cơ chế khác. Tuy nhiên nếu dùng phối hợp 2 loại sẽ có tác dụng hiệp đồng.

3.1. Các typ interferon

Ngày nay ngoài 3 loại IFN chính, nhiều loại đồng phân và các IFN khác cũng đã được tách chiết và nghiên cứu. Có 3 typ IFN:

3.1.1. Typ I gồm các IFN

– IFN *anpha*, gồm 13 typ phụ IFN – A, khác nhau đôi chút về tính đặc hiệu (các IFN – A1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17 và 21).

– IFN *beta*, chỉ có 1 loại duy nhất là IFN – B1.

– IFN *omega:* IFN – W1.

– IFN *epsilon:* IFN – E1.

– IFN *kappa:* IFN – K.

Các phân tử đồng dạng được tìm thấy ở nhiều loài như chuột (và hầu hết ở động vật có vú), chim, bò sát, lưỡng cư, cá. Ngoài ra các IFN *zeta* ở chuột, IFN *nu* ở mèo, IFN *tau* ở động vật nhai lại, IFN *delta* ở lợn cũng đã được xác định.

Tất cả các IFN typ I đều gắn được vào phức hợp receptor dành cho chúng nằm trên bề mặt tế bào. Đó là IFN– AR, gồm IFN– AR1 và IFN– AR2.

3.1.2. Typ II chỉ có 1 loại là IFN *gamma* (IFN– G), gắn vào receptor dành cho nó là IFN– GR, bao gồm IFN– G1 và IFN– G2

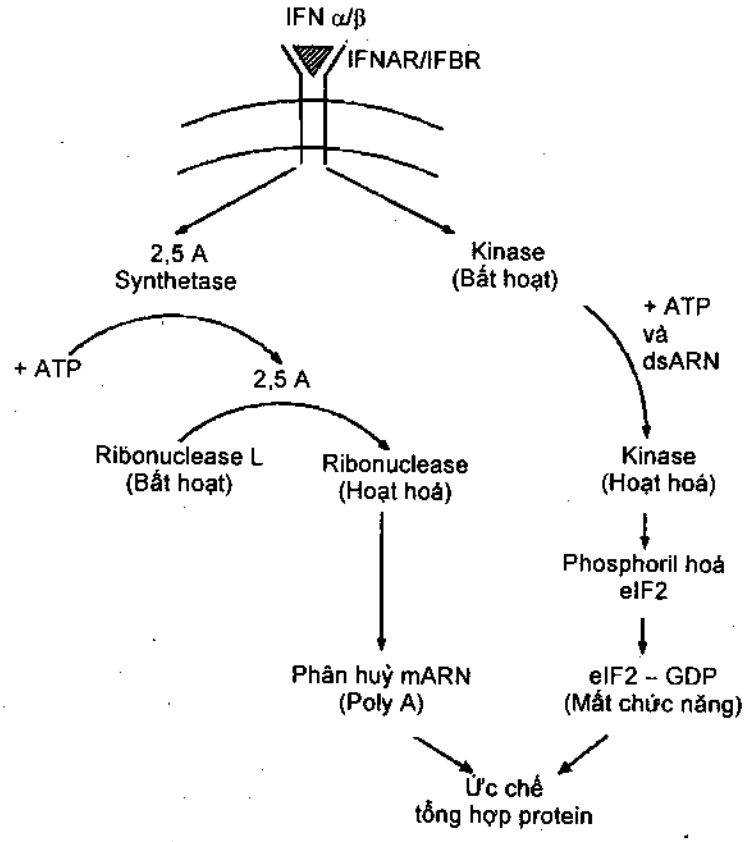
3.1.3. Typ III: IFN mới được phát hiện gần đây là IFN *lamda* (IFN – L, gồm 3 typ phụ là các interleukin IL– 29, IL– 28A và IL– 28B, gắn được vào các receptor dành cho chúng là IL– 10R2 và IFN- LR1).

3.2. Cơ chế tác dụng của IFN

Dưới tác động của virus hoặc các chất cảm ứng khác, sau vài giờ, thậm chí vài ngày, tế bào sẽ tổng hợp IFN. IFN thấm qua màng sinh chất tới gắn lên receptor dành cho nó trên bề mặt các tế bào lân cận, cảm ứng để các tế bào này tổng hợp các protein kháng virus, chủ yếu là 2 loại enzyme ức chế tổng hợp protein:

1) Enzyme cảm ứng kinase sau khi tạo thành sẽ được ARN mạch kép (sản phẩm trung gian do virus tạo ra trong tế bào) hoạt hoá. Khi ở dạng hoạt hoá, kinase sẽ phosphoryl hoá yếu tố khởi đầu dịch mã eIF2. Yếu tố này trở nên bất hoạt, nên không thể tham gia vào tổng hợp protein.

2) Cả 3 loại IFN đều có thể cảm ứng để hình thành trong tế bào enzyme 2,5 oligoadenylate synthetase (2,5 – A – synthetase). Khi có mặt ATP và ARN mạch kép, enzyme này sẽ được hoạt hoá để tạo thành 2,5A, tức oligoadenylate ppp (A2'p) nA. Chất này hoạt hoá endonuclease tiềm ẩn của tế bào để phân huỷ cả mARN và ARN riboxom dẫn đến ức chế tổng hợp protein.



Hình 3.1. **Sơ đồ ức chế tổng hợp protein do IFN cảm ứng**

4. TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA INTERFERON

Trong lúc chưa tìm được kháng sinh chống virus thì IFN được coi là chất chống virus có triển vọng nhất. Cho đến năm 1980, IFN vẫn còn hiếm và đắt. Nhờ kỹ thuật tái tổ hợp, gen mã cho IFN được tách dòng và biến nạp vào tế bào vi khuẩn, nuôi vi khuẩn trong nồi lên men và tách IFN từ dịch lên men, do đó IFN trở nên rẻ và phổ biến hơn. Ngày nay các loại IFN khác nhau đã được sử dụng để điều trị nhiều bệnh cho người. Liệu pháp IFN thường được dùng phối hợp với hoá trị liệu và xạ trị liệu để chữa nhiều loại ung thư hệ thống. IFN *alpha* và IFN *beta* thường được tiêm trong cơ. Khi tiêm trong cơ, tiêm ven hay dưới da, thuốc đều dung nạp tốt. Tuy nhiên, khi sử dụng IFN đôi khi xuất hiện các phản ứng phụ nhẹ như mệt mỏi, nhức đầu, đau cơ, chóng mặt. Cũng thường thấy ban đỏ, nổi cục cứng ở chỗ tiêm. Các triệu chứng này sẽ mất sau vài ngày dừng tiêm.

IFN *alpha* đã được cơ quan quản lý dược phẩm và thực phẩm (FDA) của Hoa Kỳ cấp giấy phép năm 1991 dùng để chữa viêm gan C với tên thương phẩm là Roferon

và IntronA. Nhiều dạng IFN khác nhau như IFN *alpha* 2a, IFN *alpha* 2b và IFN alphacon 1 đã được cho phép sử dụng để chữa viêm gan khác do virus và IFN *alpha* 2b được dùng để chữa bệnh bạch cầu dạng tuỷ. U tuỷ là bệnh ác tính của tuỷ xương, thường được chữa bằng hoá trị liệu hoặc chiếu xạ toàn thân, thì nay cũng được dùng phối hợp với IFN alpha. U lympho T (u ác tính ở hạch bạch huyết) cũng được chữa bằng IFN alpha, dùng riêng hoặc phối hợp như đã nêu trên.

Ung thư Kaposi do virus Herpes thường xuất hiện trên da ở bệnh nhân AIDS, mặc dù xạ trị liệu là phương pháp rất tốt, nhưng sử dụng IFN *alpha* cũng cho kết quả tốt. Gần đây IFN *alpha* có gắn thêm polyethylane glycol để kéo dài sự tồn tại trong cơ thể. Loại IFN *alpha* có gắn thêm này đã được FDA cấp phép sử dụng năm 2002, chỉ cần tiêm 1 tuần 1 lần thay vì 1 tuần 3 lần như đối với IFN thông thường, IFN–*beta* (IFN – B1a, IFN – B1b) được sử dụng để điều trị bệnh đa xơ cứng (xơ cứng lan toả), một bệnh mạn tính của hệ thần kinh trung ương thường thấy ở lứa tuổi trẻ, do bao myelin bao quanh dây thần kinh bị tổn thương, dẫn đến giảm sút chức năng của dây thần kinh liên quan. Đặc điểm của bệnh là thường xuyên tái phát sau khi bệnh thuyên giảm. Sử dụng IFN *beta* có thể ngăn chặn được tái phát trong một thời gian dài. IFN *gamma* được dùng trong lâm sàng để chữa bệnh u hạt mạn tính (CGD). Đây là bệnh do nhiễm trùng hoặc nhiễm các vật lạ, làm giảm nghiêm trọng khả năng thực bào trong việc giết các vi khuẩn xâm nhập (khả năng tiết các chất oxy hoá như H_2O_2, superoxide... bị giảm), IFN *gamma* có tác dụng khôi phục chức năng của đại thực bào và làm giảm mức độ nhiễm trùng. Việc sử dụng IFN cũng thu được kết quả rất tốt trong các bệnh đường hô hấp (cảm lạnh, cúm), phối hợp với các thuốc khác trong điều trị AIDS, chống ung thư vòm họng, ung thư cổ tử cung, virus herpes gây bệnh mụn rộp... Chắc chắn trong thời gian tới, các hãng dược phẩm sẽ tập trung nhiều hơn vào IFN nhằm tìm ra các dạng thuốc mới, mở rộng phạm vi ứng dụng của chúng đối với các bệnh khác nhau.

5. SẢN XUẤT IFN

Phương pháp chế tạo IFN đầu tiên do Carry Canter, nhà khoa học Phần Lan đưa ra. Ông tách bạch cầu từ máu rồi nhiễm virus để các tế bào này cảm ứng tạo IFN. Phương pháp này cho năng suất thấp, giá thành cao và không có khả năng mở rộng quy mô sản xuất do nguồn nguyên liệu cung cấp hạn chế.

Năm 1980, hai nhà khoa học Mỹ là Boyer và Coken đã tách được gen mã cho IFN, tách dòng rồi biến nạp vào *Saccharomyces cerevisiae*, sau này dùng *E.coli* thay

cho nấm men. Trước đây khi dùng phương pháp cũ, mỗi tế bào bạch cầu chỉ cho khoảng 100 – 1000 phân tử IFN. Ngày nay bằng kỹ thuật tái tổ hợp, mỗi tế bào vi khuẩn có thể cho 200.000 phân tử IFN, nghĩa là tăng hiệu suất lên từ 100 - 1000 lần. Công nghệ này nhanh chóng được ứng dụng ở nhiều nước. Trong các nước đang phát triển, Cuba là nước đi đầu trong nghiên cứu và sản xuất IFN. Năm 1982, Trung Quốc cũng bắt đầu sản xuất IFN bằng công nghệ này. Năm 2000, Viện Vacxin Nha Trang cũng phối hợp với các nhà khoa học Ucraina để cho ra đời IFN bằng công nghệ mới sử dụng phage gắn gen mã cho IFN rồi cho phage nhân lên trong *E. coli*.

Chương IV

ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM

1. SẢN XUẤT PHOMAT

Phomat có lẽ là phương thức hiệu quả nhất để bảo quản sữa, một dạng thực phẩm rất giàu dinh dưỡng nhưng mau hỏng. Sản xuất phomat là công đoạn chuyển hóa sữa sang một dạng tương đối khó phân hủy và dễ bảo quản. Xuất xứ chính xác của phomat rất khó xác định. Tuy nhiên, những nghiên cứu về khảo cổ cho thấy phomat đã được sản xuất từ thời kỳ tiền sử và vào khoảng 7000 năm trước Công nguyên. Công nghệ sản xuất phomat hiện đại bao gồm hai công đoạn chính. Trong công đoạn thứ nhất, sữa được lên men chua nhờ vi khuẩn lactic nhằm làm giảm pH tới điểm đẳng điện của casein và khiến chúng đông tụ. Công đoạn tiếp theo là loại bỏ dịch trong và làm đặc phần sữa đông tụ. Phần dịch trong có thể được dùng để sản xuất một loại đồ uống khá hấp dẫn. Trong quá trình sản xuất phomat, người ta còn bổ sung muối nhằm mục đích bảo quản và cải thiện hương vị. Phomat sau khi bớt nước có thể được bảo quản trong nước muối. Phương pháp sản xuất phomat dạng này đôi khi còn gọi là phomat muối. Phomat muối với các thương hiệu Feta, Domiati, Akkawi và Halloumi hiện đang được sản xuất khá phổ biến tại Trung Đông.

Một bước ngoặt lớn trong công nghệ sản xuất phomat được thực hiện khi người ta bắt đầu sử dụng enzyme (rennet) để kết tủa protein. Rennet là một enzyme thủy phân protein có trong dạ dày động vật. Việc phát hiện ra đặc tính ứng dụng của rennet không thực sự là một điều bất ngờ bởi dạ dày gia súc trước kia vốn vẫn được dùng làm túi đựng sữa. Không chỉ enzyme động vật, một số loại enzyme có nguồn gốc thực vật đã được người La Mã sử dụng để sản xuất phomat. Dĩ nhiên, những người đầu tiên sử dụng enzyme trong sản xuất phomat khó có thể biết gì nhiều về bản chất của enzyme ngoài công năng mà chúng mang lại. Kết tủa sữa bằng rennet rất khác so với kết tủa bằng acid. Quá trình kết tủa bằng rennet diễn ra rất hiệu quả và ngày nay, phần lớn phomat được sản theo công nghệ này.

1.1. Protein trong sữa

Sữa bò và có lẽ hầu hết các loại sữa khác đều có chứa hai nhóm protein, đó là casein (phosphoprotein không tan ở pH 4,6) và các protein còn lại (whey). Nhóm cuối bao gồm các protein như β-lactoglobulin, α-lactalbumin, một lượng nhỏ albumin, immunoglobulin, vi lượng lactotransferrin và khoảng 40 loại enzyme khác nhau. Trong sữa bò, casein chiếm khoảng 80% nitơ tổng số và bao gồm 4 loại protein là α_{s1}, α_{s2}, β và κ-casein với tỷ lệ tương ứng là 40:10:35:12. Các protein α_{s1}, α_{s2}, β chứa 8 – 9, 10 – 13, 4 – 5 gốc phosphate trong phân tử. Những gốc phosphate này có khả năng liên kết với Ca^{2+} và kết tủa mạnh khi nồng độ Ca^{2+} > 6mM. Riêng phân tử κ-casein chỉ chứa một nhóm phosphate và tồn tại ở dạng hòa tan kể cả khi có mặt một lượng tương đối lớn Ca^{2+}. κ-casein tương tác kỵ nước với α_{s1}, α_{s2}, β-casein và giúp các protein này tan trong nước. Cứ mỗi phần κ-casein có thể tạo dạng hạt keo tan với 10 phần α_{s1}, α_{s2}, và β-casein. Mỗi hạt keo có kích thước 50-300nm và chứa khoảng 5000 phân tử protein. Ngoài ra, mỗi hạt keo còn chứa một khối lượng nước lớn gấp đôi so với khối lượng protein. Về mặt cấu trúc, các casein nhạy cảm với Ca^{2+} (α_{s1}, α_{s2}, và β-casein) liên kết kỵ nước với nhau và tạo thành phần nhân của hạt keo. Phân tử κ-casein có 2/3 kỵ nước và phần này sẽ liên kết với nhân hạt keo. Phần hiếu nước hướng ra ngoài tạo nên một cấu trúc dạng "lông nhím" khiến các hạt keo không thể tiếp xúc với nhau và do vậy đảm bảo độ tan của protein. Như vậy, nhờ có một cấu trúc phức tạp, protein của sữa vừa đảm bảo là nguồn acid amin và lại có thể cung cấp được nguồn phospho và canxi (thành phần rất dễ kết tủa) để xây dựng xương mà vẫn có khả năng tồn tại bền vững ở dạng keo.

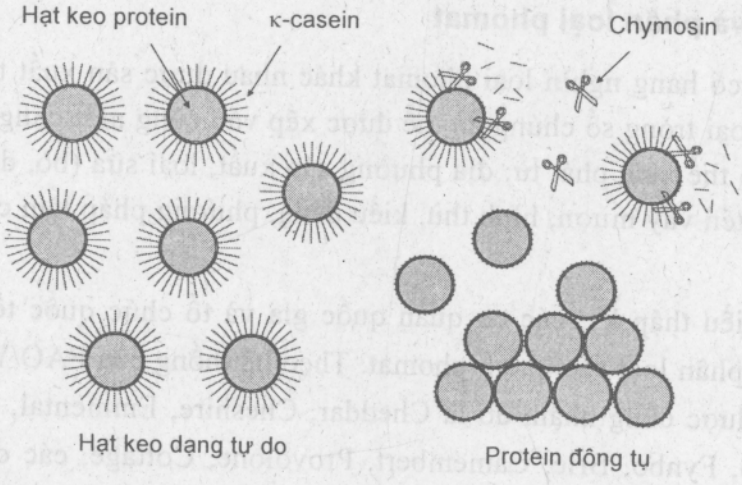
Trong sản xuất phomat, về mặt bản chất, mục đính chính của việc sử dụng rennet là loại, hoặc hạn chế tác dụng của κ-casein. Rennet với thành phần chủ chốt là chymosin, trên thực tế là các protease có khả năng thủy phân hạn chế κ-casein trong sữa. Khi mất thành phần hiếu nước (κ-casein), các hạt keo casein có thể liên kết với nhau và kết tủa. Song song với việc sử dụng rennet, các tác nhân khác như Ca^{2+}, hoặc lên men lactic có thể được sử dụng. Những ion hóa trị 2 như Ca^{2+} ảnh hưởng tích cực tới quá trình đông tụ sữa thông qua việc tạo các cầu nối liên kết giữa các phân tử protein. Lên men lactic nhằm đưa pH môi trường về giá trị pH đẳng điện của casein (pH 4,6). Khi đó các hạt protein trung hòa điện tích sẽ không đẩy nhau và do vậy dễ dàng bị kết tủa bởi tác động của liên kết kỵ nước.

Trong công nghệ truyền thống, rennet được tách chiết từ mô ruột của động vật bằng dung dịch muối NaCl 10%. Sau đó enzyme được bảo quản trong dung dịch muối NaCl 20% có bổ sung benzoate natri hoặc propionate natri. Rennet bò thuộc loại phẩm chất tốt thường có chứa 90% chymosin và phần còn lại là pepsin (tính theo protein).

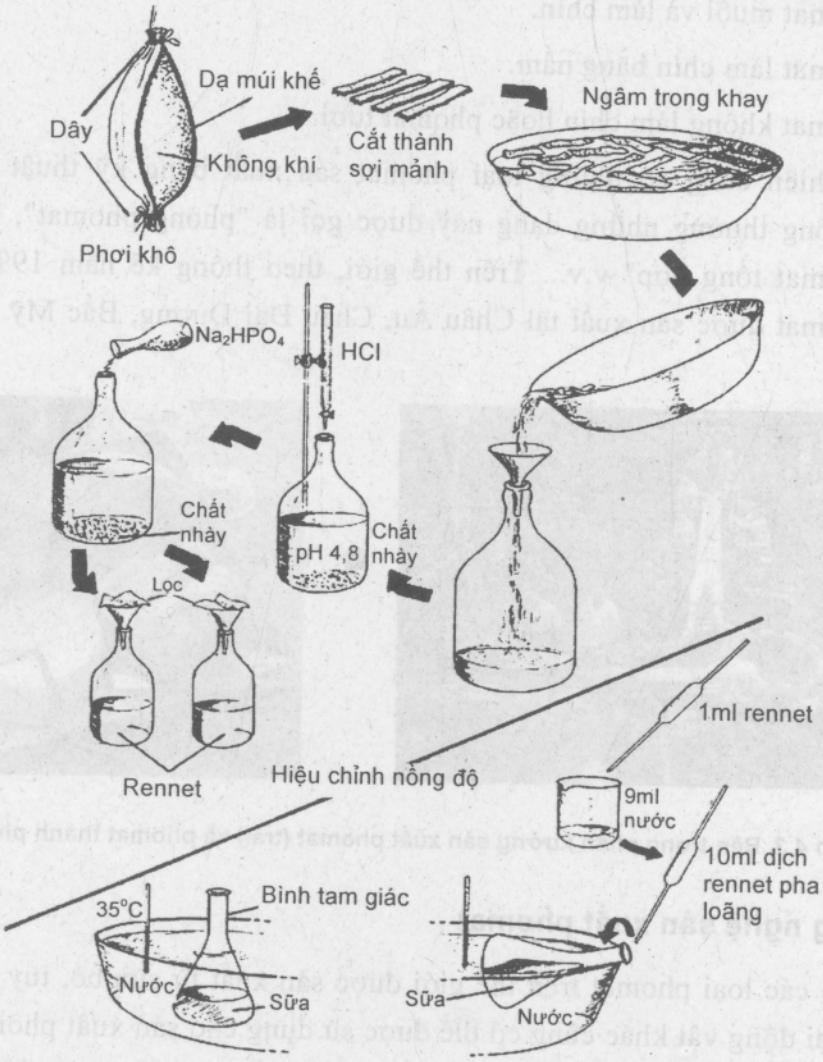
Theo thời gian, đặc biệt là khi bê chuyển sang sử dụng thức ăn rắn, lượng chymosin tiết ra giảm dần và thay vào đó là pepsin. Lúc này chất lượng của rennet không còn đảm bảo nữa. Chymosin được nghiên cứu khá kỹ ở mức độ phân tử. Chymosin là một peptid có phân tử lượng 35,6kDa và chứa 320 acid amin. Rennet bò có tới 3 dạng chymosin là A, B, và C với hoạt tính tương đối là 100, 120, và 50RU/mg. Chymosin A và B khác nhau ở một acid amin tại vị trí 244 trong phân tử. Chính vì vậy, pH tối ưu của chúng cũng có khác biệt (pH 4,2 và 3,7).

Tăng trưởng của công nghiệp sản xuất phomat (khoảng 4%/năm trong 20 năm gần đây) và việc hạn chế giết mổ gia súc non khiến sản lượng rennet từ bê non không đáp ứng đủ nhu cầu. Việc tìm kiếm enzyme thay thế là điều tất yếu. Trong số những enzyme thay thế, người ta thường sử dụng pepsin từ bò, lợn, gà, hoặc protease từ các loại nấm như *Rhizomucor miehei*, *R. pusillus* và *Cryphonectria parasitica*. Các enzyme này tuy hữu dụng nhưng về mặt chất lượng còn thua kém nhiều so với rennet từ bê non. Trong công nghiệp sản xuất enzyme nói chung, rennet có lẽ là loại enzyme chiếm thị phần lớn nhất (khoảng 170 triệu USD). Chính vì vậy, công nghiệp sản xuất rennet đã thu hút sự chú ý của công nghệ gen. Gen mã hóa prochymosin (chymosin B) đã được chuyển cho một loạt vi sinh vật như *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus nidulans*, *A. niger* và *Trichoderma reesei*. Mặc dù chỉ có chứa một trong hai dạng A hoặc B, hoạt tính của enzyme tái tổ hợp không khác gì so với chymosin từ bò. Về khía cạnh công nghệ, enzyme tái tổ hợp cũng không thua kém gì enzyme truyền thống. Hiện nay có ba loại chymosin tái tổ hợp đã được cấp phép và sản xuất ở quy mô thương mại, đó là Maxiren (của Gist Brocades, Hà Lan, sản xuất bằng *Kluyveromyces marxianus* tái tổ hợp), Chymogen (Hansen's, Đan Mạch, sử dụng *A. niger*), Chymax (Pfizer, Mỹ, sử dụng *E. coli*). Gen phục vụ sản xuất Maxiren và Chymogen được tách dòng từ dạ túi khế của bò, trong khi đó gen phục vụ sản xuất Chymax được tổng hợp mới. Hiện nay enzyme chymosin tái tổ hợp đang lấn dần thị phần của chymosin tự nhiên và đã lấn lướt hầu như hoàn toàn thị phần enzyme từ nấm.

Chymosin trong tự nhiên phục vụ quá trình đông tụ sữa ở dạ dày của bê non. Do vậy các đặc tính của chymosin không thể là tối ưu cho sản xuất phomat. Điều này cũng có nghĩa là chymosin còn có thể được cải biến để thích ứng tốt hơn nữa cho công nghệ sản xuất phomat. Hướng phát triển hiện nay trong nghiên cứu chymosin là thay đổi cấu trúc enzyme nhằm gia tăng hiệu suất thủy phân một số liên kết nhất định trong casein và hạn chế đối với những liên kết khác. Trong quá trình làm chín phomat, phản ứng thủy phân protein không kiểm soát có thể dẫn tới những tác động bất lợi, ví dụ như làm đắng phomat.



Hình 4.1. **Nguyên lý hoạt động của enzyme chymosin trong quá trình đông tụ sữa**



Hình 4.2. **Quy trình sản xuất rennet theo công nghệ truyền thống**

1.2. Tên gọi và phân loại phomat

Hiện nay có hàng nghìn loại phomat khác nhau được sản xuất trên thế giới, tuy nhiên, nhiều loại trong số chúng có thể được xếp vào cùng một dạng. Nguồn gốc của tên phomat có thể xuất phát từ: địa phương sản xuất, loại sữa (bò, dê, cừu, trâu), tên tự biên, hoặc tên vay mượn, hình thù, kiểu dáng, phương pháp làm chín, loại phụ gia bổ sung.

Trong nhiều thập kỷ, các cơ quan quốc gia và tổ chức quốc tế đã tìm cách hệ thống hóa và phân loại các nhóm phomat. Theo hệ thống của FAO/WHO, hiện có 35 loại phomat được công nhận, đó là Cheddar, Cheshire, Emmental, Gruyère, Gouda, Edam, Danbo, Fynbo, Brie, Camembert, Provolone, Cottage, các dạng phomat vân xanh, phomat cứng. Cũng theo FAO/WHO, có các dạng phomat chính như sau:

– Phomat muối và làm chín.

– Phomat làm chín bằng nấm.

– Phomat không làm chín hoặc phomat tươi.

Tuy nhiên cũng có những loại phomat sản xuất bằng kỹ thuật không truyền thống. Thông thường những dạng này được gọi là "phỏng phomat", "phomat nhân tạo", "phomat tổng hợp" v.v... Trên thế giới, theo thống kê năm 1995 có tới 85% lượng phomat được sản xuất tại Châu Âu, Châu Đại Dương, Bắc Mỹ và chủ yếu từ sữa bò.

Hình 4.3. **Bên trong phân xưởng sản xuất phomat (trái) và phomat thành phẩm (phải)**

1.3. Công nghệ sản xuất phomat

Đa số các loại phomat trên thế giới được sản xuất từ sữa bò, tuy nhiên, sữa của một số loại động vật khác cũng có thể được sử dụng cho sản xuất phomat, đặc biệt là sữa cừu. Chất lượng sữa phục vụ sản xuất phomat ở quy mô công nghiệp và bán công

nghiệp thông thường phải được kiểm định rất nghiêm ngặt. Phần lớn phomat được sản xuất từ sữa đã thanh trùng. Với sữa không thanh trùng, phomat phải được ủ cho chín muồi trong thời gian ít nhất là 60 ngày ở nhiệt độ không dưới 4°C nhằm bất hoạt vi sinh vật gây bệnh. Công nghệ sản xuất các loại phomat khác nhau có nhiều khác biệt, tuy nhiên đều thông qua một số giai đoạn chính. Sữa sau thanh trùng thường được bổ sung với một số chủng giống vi khuẩn tùy thuộc loại phomat và sau đó xử lý bằng enzyme rennet. Enzyme rennet làm sữa đông tụ thành những mảng gel. Gel đông tụ được cắt ra bằng dụng cụ chuyên dụng thành những hình khối nhỏ hơn nhằm loại phần dịch trong (còn gọi là whey). Trong giai đoạn tiếp theo diễn ra quá trình sản sinh acid lactic bởi vi sinh vật. Phần gel được khuấy trộn cơ học và gia nhiệt. Kết quả của cả ba quá trình (a) - sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, (b) - tác động cơ học của khuấy trộn, (c) - tác động của nhiệt, góp phần tách nước trong (whey) khỏi gel và hình thành phomat tươi. Phomat tươi sẽ được chuyển vào các khuôn bằng kim loại, gỗ, hoặc nhựa nhằm định hình sản phẩm và sau đó được nén bằng áp lực. Các phương pháp khác nhau trong quá trình xử lý gel và nén phomat sẽ quyết định hương vị và đặc điểm của phomat. Các công đoạn cụ thể của quá trình sản xuất phomat có thể được trình bày cụ thể hơn như sau:

1.3.1. Thanh trùng Pasteur

Quá trình thanh trùng đòi hỏi phải diệt được nhóm vi sinh vật gây bệnh, trong đó quan trọng nhất là nhóm coliform. Sự có mặt của nhóm này gây ra sự tạo bọt sớm và hương vị khó chịu trong sản phẩm. Thông thường, sữa được thanh trùng ở nhiệt độ 72-73°C trong 15-20 giây. Tuy nhiên, một số vi khuẩn tạo bào tử, đặc biệt là *Clostridium tyrobutyricum* có thể tồn tại được trong điều kiện này. *C. tyrobutyricum* là một tác nhân nghiêm trọng trong quá trình làm chín phomat. Chúng lên men acid lactic tạo acid butyric và sản sinh một lượng lớn khí hydro. Chỉ nguyên lượng khí này được tạo ra đã làm thay đổi hoàn toàn cấu trúc vật lý của phomat, chưa nói đến mùi vị khó chịu của acid butyric. Việc tăng nhiệt độ xử lý có thể hạn chế được nguy cơ kể trên, tuy nhiên, nhiệt độ cao sẽ ảnh hưởng tới chất lượng của sữa. Chính vì vậy kỹ thuật làm giảm khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn lại là phương pháp được lựa chọn. Trong công nghệ truyền thống, người ta thường bổ sung một số loại hóa chất nhằm làm giảm khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn sinh bào tử (cụ thể là *Clostridium tyrobutyricum*). Hóa chất thường được sử dụng nhất là nitrate natri (KNO_3). Với một số loại phomat, đôi khi nước oxy già (H_2O_2) lại được sử dụng. Hiện nay, việc sử dụng hóa chất bị phê phán và nhiều nhà sản xuất buộc phải quay lại với phương pháp vật lý.

1.3.2. Giống khởi động

Giống khởi động đóng vai trò quan trọng trong sản xuất phomat. Có hai dạng giống khởi động chủ yếu, đó là:

Các chủng ưa nhiệt độ ôn hòa trong dải từ 20 – 40°C;

Các chủng ưa nhiệt với nhiệt độ thích hợp nhất trên 45°C.

Thông thường người ta sử dụng hỗn hợp các chủng giống bao gồm cả những chủng ưa nhiệt và những chủng chịu nhiệt kém hơn. Giống đưa vào không chỉ sinh acid lactic mà còn sinh khí cacbonic (CO_2). Khí cacbonic tạo ra có vai trò quan trọng trong việc hình thành những hốc nhỏ hình cầu trong một số loại phomat. Đôi khi người ta cũng chỉ dùng một chủng duy nhất, điều đó xảy ra trong trường hợp mà khả năng sinh acid lactic và phân hủy protein mới là vấn đề chủ chốt. Phomat thuộc nhóm Cheddar là một ví dụ. Vi sinh vật hoặc nhóm vi sinh vật làm giống khởi động cần đáp ứng những yêu cầu sau:

– Có khả năng sinh acid lactic.

– Có khả năng phân hủy protein.

– Có khả năng sinh khí cacbonic.

Khi sữa đông tụ, các tế bào vi sinh vật được giữ bởi gel và trở thành thành phần của phomat. Acid lactic do chúng sinh ra làm giảm pH môi trường và góp phần thúc đẩy quá trình đông tụ cũng như loại nước khỏi gel. Trong quá trình này các muối canxi và phospho được giải phóng và làm tăng độ cứng của phomat. Acid lactic sinh ra bởi giống khởi động còn đóng vai trò là chất ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây thối. Quá trình chuyển hóa đường lactose thành acid lactic cũng cắt đi nguồn dinh dưỡng của nhiều loại vi sinh vật không mong muốn. Lên men lactic diễn ra khá nhanh chóng và chỉ dừng lại khi lượng đường lactose cạn kiệt. *Propionibacterium* là một nhóm vi sinh vật khá đặc biệt trong số các vi sinh vật khởi động. Chúng có khả năng lên men acid lactic tạo acid propionic và CO_2 theo phương trình sau:

$$\underset{\text{acid lactic}}{3CH_3CHOHCOOH} \rightarrow \underset{\text{acid propionic}}{2CH_3CH_2COOH} + \underset{\text{acid axetic}}{CH_3COOH} + CO_2 + H_2O$$

Ban đầu, khí CO_2 tạo ra sẽ hòa tan trong pha lỏng của phomat, tới khi bão hòa khí sẽ thoát ra và tạo thành các hốc hình cầu trong một số dạng phomat đặc biệt, ví dụ như phomat Emmenthal.

1.3.3. Các chất bổ sung khi đông tụ sữa

a) Chlorit canxi ($CaCl_2$)

Với những loại sữa không đạt tiêu chuẩn, phomat tươi tạo ra sẽ mềm và lượng protein thất thoát là rất lớn. Thông thường người ta bổ sung khoảng 5 – 20g $CaCl_2$

cho 100 lít sữa nhằm đảm bảo sự đồng đều trong thời gian đông tụ cũng như độ cứng của phomat. Nếu bổ sung quá dư thừa $CaCl_2$, phomat tươi sẽ quá cứng và gây khó khăn trong các công đoạn tiếp theo. Đối với các loại phomat nghèo mỡ, Na_2HPO_4 có thể được bổ sung trước $CaCl_2$. Động thái này làm tăng độ mềm dẻo của phomat tươi thông qua sự hình thành Ca_3PO_4 dạng colloid thay thế vai trò của các hạt mỡ bắt giữ trong gel như ở phomat thông thường.

b) Khí cacbonic (CO_2)

Thông thường trong sữa đã có sẵn một lượng CO_2 nhất định. Lượng khí này mất đi trong quá trình xử lý nhiệt. Việc bổ sung CO_2 vào sữa góp phần làm giảm pH môi trường khoảng 0,1 – 0,3 đơn vị và điều này giúp làm giảm thời gian đông tụ cũng như lượng rennet cần bổ sung.

c) Muối nitrate

Các muối nitrate như KNO_3 hoặc $NaNO_3$ có thể được bổ sung vào sữa nhằm hạn chế sự phát triển của nhóm vi khuẩn tạo bào tử (*Clostridium*) và vi khuẩn đường ruột (coliform). Lượng nitrate bổ sung phụ thuộc vào đặc tính của sữa cũng như dạng phomat mong muốn. nitrate dư thừa có thể ức chế sự phát triển của giống khởi động và làm mất màu phomat, tạo những vạch đốm hồng và vị lạ. Lượng nitrate tối đa được phép sử dụng là 30g cho 100 lít sữa. Trong những năm gần đây, việc sử dụng nitrate trong phomat bị chỉ trích và thậm chí bị cấm ở một số nước.

1.3.4. Rennet

Protein trong sữa có thể được kết tủa bằng acid lactic sinh ra bởi vi sinh vật, hoặc bằng enzyme rennet. Hầu hết các loại phomat hiện nay được sản xuất dựa trên đồng thời cả hai cơ chế này. Giai đoạn đầu của quá trình đông tụ được thực hiện bởi rennet. Acid lactic đóng vai trò hỗ trợ trong giai đoạn sau. Hiệu suất kết tủa protein phụ thuộc vào các yếu tố như nhiệt độ, pH và nồng độ ion canxi. Nhiệt độ tối ưu cho kết tủa casein là 40°C, tuy vậy nhiệt độ thấp hơn lại thường được sử dụng nhằm giảm độ cứng của gel. Rennet chiết rút từ dạ dày bê non thường có mặt trên thị trường ở dạng dung dịch đậm đặc. Thông thường sữa được kết tủa ở 35°C trong thời gian 30 phút bằng dung dịch rennet bổ sung theo tỷ lệ 1 : 10000, hoặc 1 : 15000 (1ml rennet cho 10 – 15 lít sữa). Rennet dạng bột thường có hoạt độ gấp 10 lần so với dạng dung dịch.

1.3.5. Cắt gel

Quá trình đông tụ sữa thường kéo dài khoảng 30 phút. Trước khi cắt gel, người ta thường kiểm tra chất lượng đông tụ bằng dao. Nếu vết cắt gọn và bóng, có nghĩa là

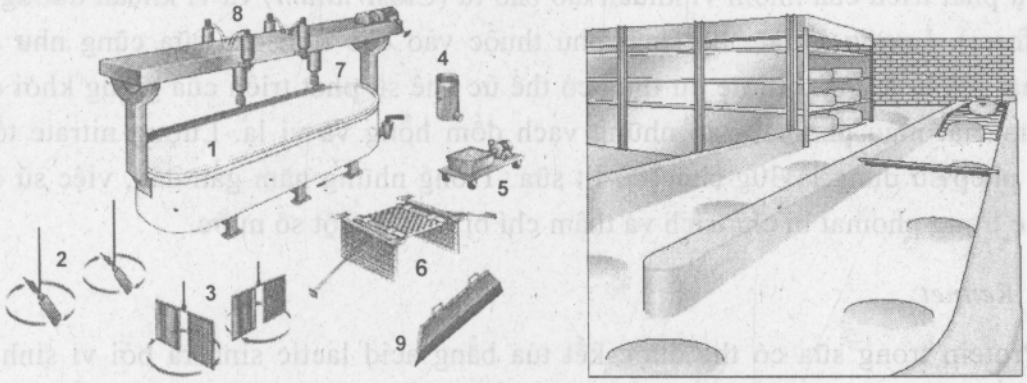
quá trình đông tụ đã hoàn thành. Gel lúc này được cắt nhẹ nhàng thành những miếng kích thước khoảng 3-15mm, phụ thuộc vào loại phomat. Miếng cắt càng nhỏ lượng nước thoát ra sẽ càng lớn.

1.3.6. Khuấy trộn ban đầu

Gel mới cắt rất mẫn cảm với tác động cơ học do vậy việc đảo trộn phải được thực hiện nhẹ nhàng. Tuy vậy, tốc độ khuấy cũng cần phải đủ nhanh để các miếng gel không bị kết lắng xuống đáy. Gel từ sữa gầy có xu hướng kết lắng nhanh hơn và do vậy cần được khuấy mạnh hơn.

1.3.7. Rút nước ban đầu

Trong một số trường hợp, lượng nước tách ra từ gel được rút bớt nhằm giảm thể tích cần gia nhiệt cũng như lượng lactose trong phomat tươi. Dịch thường được rút theo mẻ và khoảng 35-50% mỗi lần.



Hình 4.4. **Bể làm phomat cùng một số dụng cụ cơ bản liên quan (hình trái) và bể muối phomat (hình phải)**

1) Bể hai lớp kèm môtơ và công cụ phục vụ sản xuất phomat; 2) Cánh khuấy; 3) Dụng cụ cắt; 4) Thiết bị lọc; 5) Máy bơm và bể chứa dịch trong (whey) ; 6) Tấm bản ép ban đầu cho phomat tươi; 7) Hệ thống đỡ và lắp dụng cụ; 8) Hệ thống áp lực phục vụ nén phomat; 9) Dao cắt phomat.

1.3.8. Gia nhiệt và nấu

Gia nhiệt trong sản xuất phomat nhằm điều chỉnh mật độ và pH của gel. Quá trình phát triển của vi khuẩn lactic bị hạn chế bởi nhiệt và do vậy có thể dùng nhiệt độ để điều tiết lượng acid tạo ra. Ngoài hiệu ứng vi sinh, gia nhiệt còn kích thích quá trình thu nhỏ kích thước gel đông tụ và loại nước. Gia nhiệt có thể được thực hiện thông qua việc tăng nhiệt độ nồi nấu hoặc bổ sung trực tiếp nước nóng. Việc gia nhiệt tới trên 40°C thường gọi là nấu và quá trình này được chia làm hai giai đoạn.

Tại nhiệt độ 37 – 38°C, hoạt động của vi khuẩn lactic ưa nhiệt độ ôn hòa sẽ bị ngưng trệ. Vào thời điểm này cần kiểm tra pH và nồng độ acid sau đó tiếp tục làm nóng tới nhiệt độ cần thiết. Khi nhiệt độ lên trên 44°C, toàn bộ vi khuẩn ưa nhiệt độ ôn hòa sẽ bị bất hoạt và sau đó chết khi giữ ở 52°C trong 10 – 20 phút.

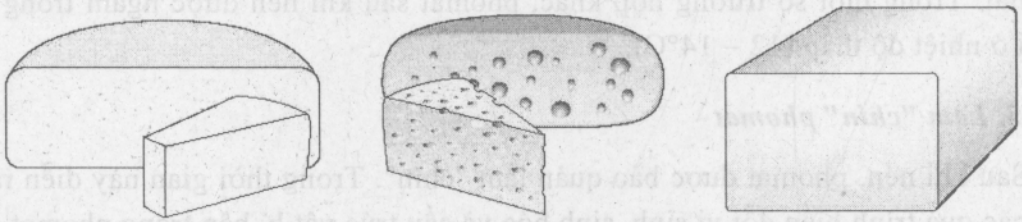
Đối với một số loại phomat như Emmenthal, Gruyère, Parmesan và Grana, nhiệt độ nấu có thể lên tới 50 – 56°C. Ở nhiệt độ này chỉ có những chủng vi khuẩn bền nhiệt nhất mới có thể tồn tại. Trong số đó cần kể tới *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. Đây là loại vi khuẩn có khả năng lên men acid lactic tạo acid propionic, sinh khí và tạo nên hương vị cũng như cấu trúc đặc trưng của loại phomat với những bọt rỗng hình cầu.

1.3.9. Khuấy trộn lần cuối

Trong quá trình gia nhiệt và khuấy, tính mẫn cảm của gel sữa đông tụ giảm dần. Quá trình lên men lactic, tác động của nhiệt và khuấy cơ học sẽ loại dần nước khỏi khối gel. Thời gian khuấy được xác định bởi độ chua và hàm lượng nước mong muốn có được trong phomat tươi.

1.3.10. Loại bỏ nước trong (whey) và xử lý phomat tươi

Sau khi gel sữa đạt được độ cứng và độ acid cần thiết, lượng nước tồn dư (whey) sẽ được loại bỏ theo các phương pháp khác nhau tùy theo dạng phomat cần sản xuất.



Hình 4.5. **Các dạng phomat khác nhau tạo ra phụ thuộc vào quá trình xử lý loại bỏ nước trong cũng như bản chất của giống khởi động**

Theo thứ tự từ trái qua phải: phomat cấu trúc hạt rỗng, phomat có bọt khí và phomat đặc.

Phần dịch trong có thể được loại bỏ trực tiếp từ bể làm phomat. Sau khi loại bỏ nước, phomat tươi được chuyển vào khuôn và ép thành bánh. Khi phomat tươi tiếp xúc với không khí, chúng sẽ khó kết dính lại với nhau và do vậy bên trong sẽ hình thành những cấu trúc rời rạc. Trong quá trình lên men tiếp theo, những khoảng trống này lớn dần lên do CO_2 sản sinh ra. Phomat có cấu trúc bọt rỗng được làm tương đối khác. Quá trình ép loại nước được thực hiện trực tiếp trong bể nấu và sau đó mới chuyển vào khuôn nhằm tránh phomat tươi tiếp xúc với không khí. Khí CO_2 sinh ra

trong thời gian tiếp theo sẽ tích tụ và tạo những bọt khí hình cầu bên trong khối phomat. Trong trường hợp phomat đặc, người ta sử dụng một chủng vi khuẩn lên men lactic đồng hình (không tạo khí) duy nhất. Đây có thể là *Lactococcus cremonis* hoặc *Lactococcus lactis*. Khi độ acid trong dịch đạt khoảng 0,2 – 0,22% (sau khoảng 2 giờ), phần dịch trong bị loại bỏ, còn lại phần phomat tươi tiếp tục lên men và kết dính. Sau khoảng 2 – 2,5 giờ, phomat tươi được nén lại thành các khối đặc..

1.3.11. Nén phomat

Sau khi phomat tươi được chuyển vào khuôn, chúng được nén lại. Mục đích nén nhằm loại nốt phần dịch dư, tạo độ cứng và hình dạng của khối phomat. Ngoài ra, việc nén phomat còn giúp hình thành phần vỏ đặc biệt cần thiết trong quá trình làm chín lâu dài.

1.3.12. Muối phomat

Trong sản xuất phomat, muối không chỉ phục vụ mục đích làm gia vị mà còn có tác dụng làm chậm lại quá trình lên men tiếp theo. Muối phomat cũng góp phần loại bỏ lượng nước dư thừa trong phomat. Các loại phomat khác nhau có nồng độ muối khác nhau nằm trong dải từ 0,5 tới 2%. Cá biệt, một số loại phomat có hàm lượng muối tới 3 – 7%. Quá trình muối thường diễn ra trong vòng 5 – 6 giờ ở pH 5,3 – 5,6. Muối có thể được bổ sung đồng đều ở dạng khô sau khi loại nước và trước khi nén phomat. Trong một số trường hợp khác, phomat sau khi nén được ngâm trong nước muối ở nhiệt độ thấp (12 – 14°C).

1.3.13. Làm "chín" phomat

Sau khi nén, phomat được bảo quản làm "chín". Trong thời gian này diễn ra một loạt các quá trình biến đổi vi sinh, sinh hóa và cấu trúc vật lý bên trong phomat. Phần lớn lượng đường lactose tại thời điểm này đã được chuyển thành acid lactic và muối lactat. Trong quá trình làm chín, acid lactic có thể tiếp tục bị lên men tạo acid propionic, acid acetic và khí cacbonic. Nếu trong phomat có mặt vi khuẩn *Clostridium tyrobutyricum* chúng sẽ chuyển acid lactic thành acid butyric và khí hydro. Ngoài hương vị không mong muốn, khí hydro sinh ra có thể làm vỡ khối phomat. Khi làm chín, một lượng nhất định protein sẽ được phân hủy thành acid amin và các peptid dưới tác động của rennet cũng như enzyme vi sinh vật. Phomat được làm chín trong vòng vài tuần cho tới 10 tháng ở nhiệt độ tương đối thấp (4 – 12°C). Với một số loại phomat, bề mặt khối phomat được phủ bằng parafin, nilon... Phomat sau khi sản xuất có thể được bảo quản lâu dài và là một nguồn dinh dưỡng quan trọng.

2. SỮA KEFIR

2.1. Nguồn gốc

Kefir là sản phẩm sữa lên men đã được sử dụng hàng nghìn năm. Kefir có nguồn gốc từ vùng núi Capcaz, ở đây sản phẩm được lên men tự nhiên trong các túi làm bằng da động vật. Trong nửa cuối của thế kỷ XIX, sản phẩm này được du nhập tới Đông, Trung Âu và sau đó lan đến các khu vực khác trên thế giới. Kefir hiện nay được sản xuất ở quy mô lớn tại các nước thuộc Liên Xô, Ba Lan, Đức, Thụy Điển, Rumani và nhiều nước khác. Sản phẩm được sản xuất theo phương pháp truyền thống với nhiều tên gọi khác nhau như kefir, kefer, kiaphur, knapon, kepi và kippi. Để sản xuất kefir, người ta sử dụng "nấm" kefir, một hỗn hợp cộng sinh đặc biệt giữa nhiều loại vi khuẩn và nấm men. Khi ngâm vào sữa, "nấm" ngày càng phát triển, một phần tế bào vi sinh vật sẽ chuyển sang dung dịch sữa và là tác nhân của quá trình lên men hỗn hợp đặc thù trong kefir. Sau khi kết thúc lên men, nấm thường được vớt ra, rửa sạch, phơi khô và bảo quản cho tới khi cần sử dụng. Thành phần tương đối ổn định của hệ cộng sinh đã tạo nên hương vị đặc thù của sản phẩm. "Nấm" kefir được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác và đây có lẽ là một sản phẩm cộng sinh độc đáo nhất mà con người đã tạo ra.

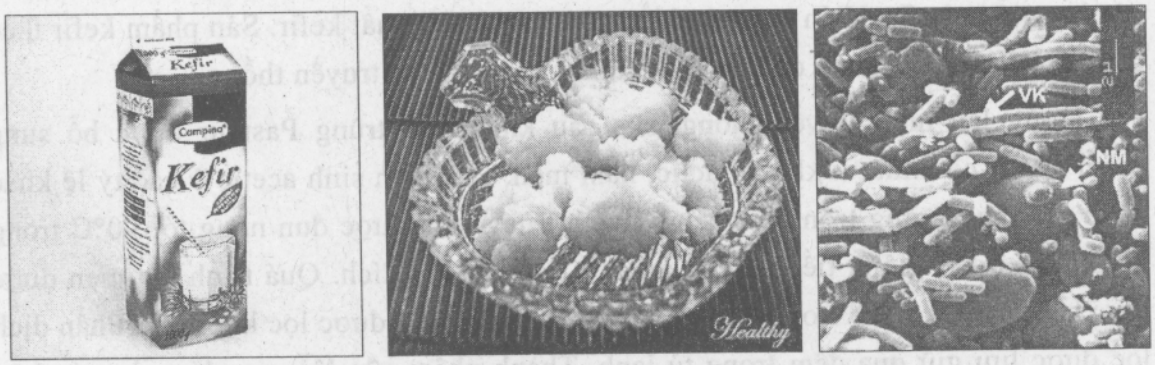
2.2. Sản xuất kefir

Sữa bò và dê ở dạng gốc, tách mỡ, hoặc hỗn hợp thường được dùng cho sản xuất kefir. Thành phần của sản phẩm được quyết định chủ yếu bởi thành phần nguyên liệu và hệ vi sinh vật. Kefir sau lên men có chứa khí cacbonic, 0,8 – 1% acid lactic và 1 – 2% cồn. Trong quá trình lên men, nấm men lên men lactose sản sinh ethanol và CO_2, trong khi đó vi khuẩn lactic sẽ chuyển hóa lactose thành acid lactic. Tại đây cũng xảy ra quá trình thủy phân protein và do vậy sản phẩm có chút hương nấm men. Kefir có vị cồn nhẹ, men chua và sủi tăm. Điều này được quyết định bởi thành phần của hạt giống kefir. Hiện nay có nhiều công nghệ sản xuất kefir. Sản phẩm kefir theo công nghệ hiện đại cũng có hương vị tương tự như kefir truyền thống.

Trong lên men truyền thống, sữa sau khi thanh trùng Pasteur được bổ sung "nấm" kefir có chứa vi khuẩn lactic, nấm men, vi khuẩn sinh acetic ở các tỷ lệ khác nhau. Thông thường trong quá trình thanh trùng, sữa được đun nóng tới 90°C trong 30 phút. Lượng giống tiếp chiếm khoảng 2 – 10% thể tích. Quá trình lên men được thực hiện ở 20 – 25°C trong 24 giờ. "Nấm" kefir sau đó được lọc khỏi sữa. Phần dịch lọc được lưu giữ qua đêm trong tủ lạnh. Thành phẩm sữa lên men lúc này có chứa hỗn hợp các vi sinh vật khác nhau.

Với một cải biến có xuất xứ từ Nga, hệ vi sinh vật trong "nấm" kefir được kích hoạt nhằm tăng tốc độ các biến đổi xảy ra trong sữa. Quá trình bao gồm hai bước. Ở bước thứ nhất, nấm kefir được đưa vào sữa với tỷ lệ 2 – 3% (khối lượng/thể tích) và lên men ở 20 – 25°C trong 24 giờ nhằm chuẩn bị dịch giống. Những hạt "nấm" kefir sau đó được loại bỏ và dịch lọc được sử dụng để tiếp giống với tỷ lệ 1-3%. Giai đoạn lên men thứ hai kéo dài khoảng 12 – 18 giờ ở nhiệt độ 20 – 25°C.

Quy trình sản xuất dựa trên công nghệ truyền thống chỉ phù hợp với quy mô sản xuất nhỏ lẻ và gặp nhiều khó khăn khi thực hiện ở quy mô công nghiệp. Ngoài ra, khí CO_2 sinh ra bởi nấm men có thể làm phình các bình chứa và điều này dẫn tới sự ngộ nhận của người tiêu dùng là sản phẩm đã bị hỏng. Thời gian bảo quản của sữa kefir sản xuất theo công nghệ truyền thống là khoảng 2 – 3 ngày. Hiện nay, việc ứng dụng chủng khởi động chủ yếu chứa streptococci ngày càng phổ biến. Việc ứng dụng giống khởi động dạng này đã khắc phục nhiều khó khăn của công nghệ truyền thống và cho phép sản xuất kefir ở quy mô công nghiệp. Trong những năm gần đây, việc ứng dụng chủng giống thuần khiết trong sản xuất kefir nhận được nhiều sự quan tâm. Việc ứng dụng chủng thuần khiết khiến việc kiểm soát quá trình lên men trở nên dễ dàng hơn, đồng thời nâng cao độ ổn định của sản phẩm. Ngoài ra, thời hạn bảo quản của kefir sau lên men cũng dài hơn (khoảng 10-15 ngày ở 4°C). Chủng giống lên men có thể tùy biến nhằm tạo ra những giá trị cao về dinh dưỡng và bổ trợ sinh học. Thông thường, chủng giống được phân lập từ nấm kefir và quá trình lên men có thể được thực hiện theo hai phương pháp. Trong phương pháp thứ nhất, cả vi khuẩn và nấm men được bổ sung vào sữa sau thanh trùng. Trong phương pháp thứ hai, sữa sau thanh trùng ban đầu được lên men sử dụng vi khuẩn lactic và sau đó nấm men được bổ sung để hoàn thiện quá trình lên men. Một trong những khó khăn khi lên men sử dụng chủng thuần khiết là phải cân đối được quá trình lên men lactic và quá trình lên men sinh ethanol sao cho sản phẩm tương đồng với sản phẩm truyền thống cả về hương vị lẫn giá trị dinh dưỡng.



Hình 4.6. **Sản phẩm sữa kefir (trái), "nấm" kefir (giữa), và vi sinh vật trong kefir (phải, NM - nấm men; VK - vi khuẩn)**

2.3. Thành phần vi sinh của "nấm" kefir

Nấm kefir là những hạt dạng gel, đường kính 2-15mm, có chứa hỗn hợp của các quần thể vi sinh vật được tổ chức chặt chẽ. "Nấm" kefir có thành phần hóa học bao gồm 89 – 90% nước, 0,2% lipid, 3% protein, 6% đường (chủ yếu là polysaccharide) và 0,7% chất tro. "Nấm" có thể được phơi khô ở nhiệt độ phòng trong vòng 36 – 48 giờ mà vẫn giữ hoạt tính sau 12 – 18 tháng. Nấm dạng ướt cần được bảo quản ở 4°C và có thể giữ được hoạt tính trong 8 – 10 ngày. "Nấm" kefir cũng có thể được bảo quản ở –20°C.

Tế bào vi khuẩn và nấm men trong "nấm" kefir được bao bọc và bảo vệ bởi các dạng polysaccharide nhày với thành phần monomer chủ chốt là glucose và galactose (khoảng 50% mỗi loại). Vi khuẩn nào sản sinh ra những polysaccharide này vẫn còn là điều tranh cãi. Những nghiên cứu ban đầu cho thấy *Lactobacillus brevis* có khả năng sinh những polysaccharide trong "nấm" kefir. Tuy nhiên sau đó một dạng vi khuẩn lactic lên men đồng hình có khả năng tạo màng nhày *Lactobacillus kefiranofaciens* được phát hiện và cho là tác nhân chủ chốt. Về mặt hình thái, những hạt nấm kefir có thể liên tưởng tới một rừng bạt ngàn của những bông súp lơ tí hon. Cơ chế nào đã tạo ra và gìn giữ sự ổn định của hệ cộng sinh với tên gọi "nấm" kefir cho đến nay vẫn là điều bí ẩn. Chưa có ai thành công trong những thử nghiệm tạo "nấm" kefir từ các chủng thuần khiết, hoặc thậm chí những hỗn hợp thô. Phần vỏ ngoài của "nấm" tập trung các tế bào vi khuẩn lactic dạng que, còn trong phần nhân, nấm men là thành phần chủ chốt. Ở vùng đệm, tỷ lệ vi khuẩn và nấm men thay đổi và phụ thuộc vào khoảng cách tới bề mặt "nấm". Nhóm vi khuẩn streptococci lên men đồng hình ưa nhiệt độ ôn hòa (*Lactococcus lactis* subspp. *lactis* và *cremoris*) là thành phần tích cực nhất trong "nấm" kefir. Chúng là tác nhân sinh acid mạnh mẽ trong những giờ đầu của quá trình lên men. Nhóm vi khuẩn lactic lên men dị hình như *Lactobacillus brevis* và *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* cũng thường xuyên có mặt trong "nấm" kefir. Nhóm lactobacilli ưa nhiệt độ ôn hòa trong "nấm" kefir thường không lớn hơn 10^2–10^3cfu ml^{-1} và được cho là không có vai trò quan trọng trong kefir. Những vi khuẩn streptococci lên men dị hình ưa nhiệt độ ôn hòa (*Leuconostoc mesenteroides* và *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*) là tác nhân tạo hương trong kefir và sinh khí cùng nấm men. Nấm men tham gia vào quan hệ cộng sinh chặt chẽ với các vi sinh vật khác. Chúng sinh ethanol, CO_2 và góp phần tạo nên hương vị đặc biệt của kefir. Trong kefir, lượng L (+)-lactic tạo ra lớn, khoảng gấp 10 lần so với D (–)-lactic. Nồng độ ethanol trong kefir giao động trong khoảng 1 – 2% (v/v) và phụ thuộc vào loại "nấm" kefir cũng như điều kiện sản xuất. Ethanol được tiếp tục tạo ra kể cả khi nấm men và vi khuẩn lên men dị hình ngừng phát triển. Một số vitamin được tạo ra

bởi cả nấm men và vi khuẩn trong quá trình lên men. Hàm lượng của một số vitamin có thể tăng dần (chủ yếu là vitamin nhóm B, P) nhưng một số khác lại giảm đi do bị hấp thụ. Trong quá trình lên men kefir, acid orotic của sữa (nguyên nhân tích lũy mỡ trong gan) được sử dụng hoàn toàn. Giá trị năng lượng của kefir tương tự như sữa ban đầu, chỉ khác là khoảng một phần tư lượng đường lactose được chuyển thành acid lactic và rượu. Quá trình thủy phân protein thành acid amin, sự tích lũy một số vitamin, một số chất kháng khuẩn, sự có mặt của cồn, acid lactic, CO_2 tạo ra hương vị đặc biệt, tính năng kích thích tiêu hóa và giá trị đối với sức khỏe của kefir.

Bảng 4.1. **Một số nhóm vi sinh vật thường gặp trong "nấm" kefir**

Vi khuẩn lactic	Nấm men
Nhóm *Leuconostoc*	*Kluyveromyces lactis*
L. dextranicum	*Klyveromyces marxianus* var. *marxianus*
L. mesenteroides	*Kluyveromyces fragilis*
L. kefir	*Candida kefir*
Nhóm *Lactococcus*	*Candida holmii*
L. lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*	*Saccharomyces cerevisiae*
L. lactis subsp. *cremoris*	*Zygosaccharomyces florentinus*
L. filant	*Torulaspora delbrueckii*
Nhóm *Lactobacillus*	*Saccharomyces exiguus*
L. caucasicus	*Candida pseudotropicalis*
L. brevis	*Saccharomyces globus*
L. kefir	*Saccharomyces dairensis*
L. casei	*Saccharomyces unispores*
L. plantarum	*Candida friedrichii*
L. acidophilus	*Candida valida*
L. kefiranofaciens	
L. cellobiosus	
L. helveticus subsp. *jugurti*	
L. lactis subsp. *lactis*	
L. rhamnosus	
L. fermentum	
L. paracasei	
L. parakefir	
L. viridescens	
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	

3. LÊN MEN RAU, QUẢ

Thực phẩm lên men là một phần trong khẩu phần ăn của con người ở hầu hết các quốc gia. Trong phần này chúng tôi chỉ đưa ra một số loại rau, quả lên men, chủ yếu nhằm giới thiệu những quá trình vi sinh vật, hóa học xảy ra đối với dạng sản phẩm này. Quá trình lên men rau, quả bị ảnh hưởng bởi nhiều nhóm vi sinh vật khác nhau. Sau khi đã thu hoạch, rau, quả sẽ chịu tác động phân hủy của vi khuẩn, nấm mốc, nấm men, và enzyme. Những vi sinh vật và enzyme này phân hủy các chất hữu cơ phức tạp thành những chất đơn giản hơn. Bằng cách triệt tiêu hoặc điều khiển những tác nhân này có thể giữ rau, quả được lâu hơn.

Trong quá trình chế biến rau, quả, việc cho thêm muối và lên men là hai quá trình liên quan chặt chẽ. Mặc dù có rất nhiều loại rau, quả muối trên thị trường, những sản phẩm như rau cải muối, dưa chuột muối mới thực sự có ý nghĩa về mặt kinh tế. Lên men rau, quả là một quá trình phức tạp bao gồm các tác nhân vi sinh, sinh hóa, hóa lý tương tác và bổ trợ. Lên men lactic là một công cụ quý giá cho việc bảo quản và chế biến một phổ rộng các loại rau, quả khác nhau. Mặc dù có thể đã có những chủng vi khuẩn lactic biến đổi gen với nhiều ưu thế vượt trội, cho tới hiện nay, các chủng vi khuẩn lactic có mặt trong thiên nhiên vẫn được sử dụng trong lên men. Lý do chủ yếu là đại đa số người tiêu dùng không chấp nhận những vi sinh vật biến đổi gen này. Vì bản chất của các loại rau, quả khá khác nhau, công nghệ lên men của chúng cũng có nhiều điểm khác biệt khá rõ ràng.

3.1. Bắp cải muối

Bắp cải muối chua là một trong những loại thực phẩm lên men khá phổ biến và được sản xuất ở quy mô công nghiệp tại nhiều nước. Quá trình lên men bắp cải là một quá trình tự phát, trong đó vi khuẩn chuyển hóa đường có mặt trong nguyên liệu thành acid, rượu và khí cacbonic. Cùng trong quá trình đó, protein của bắp cải cũng bị biến đổi. Sản phẩm chủ chốt của quá trình lên men bắp cải là acid lactic và một lượng nhỏ các acid khác. Vi khuẩn lactic là nhóm vi sinh vật quan trọng nhất trong lên men bắp cải. Các đặc tính cảm quan và dinh dưỡng chính của bắp cải muối là: lượng calo thấp, hàm lượng chất xơ cao, giàu các yếu tố vi lượng và hầu như không có chất béo.

3.1.1. Công nghệ sản xuất

Sản xuất bắp cải muối ở quy mô công nghiệp vẫn mang tính kinh nghiệm dựa trên cơ sở hệ vi sinh vật có sẵn trong nguyên liệu. Trong những năm gần đây, để đảm bảo độ ổn định của sản phẩm và giảm thời gian lên men, một số cơ sở đã áp dụng

chủng giống thuần khiết. Quá trình lên men cũng được tiến hành trong điều kiện kỵ khí tốt hơn.

Sau khi thu hoạch, lá xanh và lõi bắp cải được loại bỏ. Bắp cải được rửa sạch và cắt nhỏ thành từng sợi có bề ngang khoảng 2,5cm. Khối nguyên liệu được xếp thành từng lớp, cứ một lớp nguyên liệu, một lớp muối (lớp đầu tiên và lớp cuối cùng là muối). Lượng muối bổ sung vào khoảng 2,5% so với nguyên liệu sẽ giúp cho quá trình co tế bào và thoát dịch mô ra môi trường. Để tạo điều kiện yếm khí, bắp cải được nén chặt. Dịch bắp cải có chứa các loại đường có thể lên men được cũng như các chất dinh dưỡng khác cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật. Chính điều kiện yếm khí tạo thuận lợi cho vi khuẩn lactic. Quá trình lên men được thực hiện tốt nhất trong 1 tháng ở nhiệt độ 14°C. Cứ sau 2 – 4 ngày cần phải kiểm tra các thông số cơ bản của quá trình lên men một lần. Những thông số cần thiết bao gồm: nồng độ acid ascorbic (vitamin C), nồng độ đường, độ pH, nồng độ acid, muối. Các thông số về vi sinh vật cũng cần được quan tâm (tổng số tế bào, loại vi sinh vật).

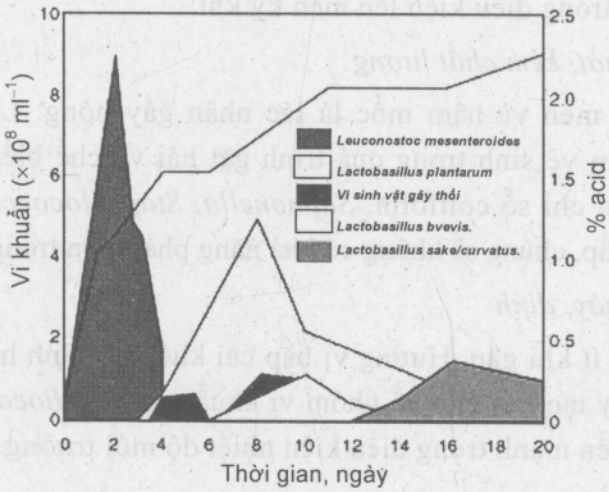
3.1.2. Các quá trình sinh học

Chỉ sau vài giờ lên men, các chủng vi sinh vật sinh khí như *Leuconostoc mesenteroides* bắt đầu lên men và sinh acid. Khi nồng độ acid trong dịch đạt khoảng 0,25 – 0,3% (theo acid lactic), nhóm cầu khuẩn bắt đầu phát triển chậm lại và chết dần. Tuy nhiên, enzyme của chúng thoát ra do tự phân vẫn tiếp tục tham gia vào quá trình lên men. Khi nồng độ acid đạt khoảng 0,7 tới 1,0%, hầu như không còn dạng cầu khuẩn nữa. Lúc này *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus brevis* hoạt động và nâng độ acid lên tới 1,5 – 2,0%. Cuối cùng, các loài *Lactobacillus sake* và *Lactobacillus curvatus* kết thúc quá trình lên men và nâng độ acid tới khoảng 2,0 – 2,5%.

Sản phẩm tạo ra trong quá trình lên men bắp cải chứa một lượng lớn acid lactic (không bay hơi), một lượng nhỏ acid acetic, acid propionic (bay hơi), hỗn hợp khí trong đó chủ yếu là CO_2, một lượng nhỏ ethanol và nhiều loại ester thơm. Ethanol trong tương tác với nhiều loại acid sẽ sinh ra các ester đặc trưng của dưa chua. Acid lactic tạo ra có tác dụng kiểm soát quá trình lên men thông qua việc ức chế những vi sinh vật gây thối. Chất lượng của sản phẩm được quyết định rất nhiều bởi lượng acid tạo ra cũng như loại ester hình thành.

Tới khi kết thúc quá trình lên men, lượng đường sót còn lại hầu như không đáng kể, trong khi đó nồng độ acid lactic lại khá lớn. Acid acetic và ethanol được sinh ra bởi *Leuconostoc mesenteroides* trong giai đoạn đầu của quá trình lên men. Acid lactic được tạo ra chủ yếu bởi các loài vi khuẩn Lactobacillus lên men đồng hình và không sinh khí. Bất kỳ thay đổi nào trong thứ tự của các quá trình sẽ ảnh hưởng lên

hương vị và chất lượng của sản phẩm. Động học phát triển của các loại vi khuẩn trong quá trình lên men bắp cải được trình bày trong hình 4.7.



Hình 4.7. **Động học của quá trình lên men bắp cải**

3.1.3. Giống khởi động

Việc sử dụng các chủng khởi động phân lập từ nguồn thực vật ngày càng được quan tâm nhiều hơn. Cũng giống như trong lên men các sản phẩm sữa, giống khởi động góp phần làm tăng sự ổn định của sản phẩm. Sử dụng giống khởi động có thể làm giảm sự hình thành một số amin độc hại trong sản phẩm như putrescine hoặc histamine. Bổ sung các chủng *Leuconostoc mesenteroides*, thành phần quan trọng trong giai đoạn đầu của quá trình lên men, có thể góp phần nâng cao chất lượng hương vị của sản phẩm. Tuy nhiên, điều này làm ảnh hưởng tới trình tự phát triển các loài liên quan. Việc bổ sung *Lactobacillus curvatus* và *Lactobacillus sake* sẽ làm tăng lượng acid acetic, giảm lượng acid lactic và quá trình lên men sẽ không thể hoàn tất. Tương tự như vậy, khi sử dụng *Lactobacillus plantarum* làm giống khởi động, quá trình lên men sẽ không hoàn tất được, đồng thời sản sinh các vị đắng và sản phẩm cũng dễ bị nấm men xâm nhập. Nhìn chung, dịch lên men chất lượng cao từ mẻ trước có thể sử dụng thay giống khởi động. Chất lượng của sản phẩm phụ thuộc vào hệ vi sinh vật và độ acid của dịch. Dịch lên men làm giống khởi động không được quá chua.

3.1.4. Sự thối hỏng của bắp cải muối

Quá trình thối hỏng bắp cải muối chủ yếu do vi sinh vật hiếu khí gây nên. Chúng ít tác động lên thành phần đường mà chủ yếu lên protein và do vậy tạo ra nhiều hậu quả không mong muốn. Rất may là những vi sinh vật này nhanh chóng bị ức chế

trong quá trình lên men lactic. Nấm men không bị ảnh hưởng bởi acid và do vậy có thể là nguyên nhân gây thối hỏng. Nấm mốc cần oxy cho sinh trưởng và phát triển, do vậy sẽ bị ức chế trong điều kiện lên men kỵ khí.

a) Bắp cải bị nhớt, kém chất lượng

Vi khuẩn, nấm men và nấm mốc là tác nhân gây hỏng. Lý do là nguyên liệu không được bảo đảm vệ sinh trong quá trình gặt hái và chế biến. Các chỉ tiêu đánh giá vệ sinh bao gồm chỉ số coliform, *Salmonella*, *Staphylococcus*. Nấm men có thể có mặt ở số lượng thấp, chúng sẽ không có khả năng phát triển trong quá trình lên men.

b) Bắp cải bị nhày, dính

Hiện tượng này ít khi gặp. Hương vị bắp cải không bị ảnh hưởng nhiều. Nguyên nhân là do chất nhày tạo bởi một số nhóm vi khuẩn như *Pediococcus acidilactici*. Vi sinh vật này phát triển mạnh trong điều kiện nhiệt độ môi trường cao.

c) Bắp cải bị mềm

Hiện tượng này có một loạt nguyên nhân, ví dụ như lượng oxy (không khí) cao, lượng muối cho vào không đủ (dưới 0,8%) và do sự thay đổi nhiệt độ.

d) Bắp cải bị tối màu

Đây là hiện tượng phổ biến nhất và gây ra bởi vi sinh vật gây thối. Để tránh hiện tượng này, cần đảm bảo độ đồng đều của dịch trong khối lên men.

e) Bắp cải ngả hồng

Nguyên nhân chủ yếu là do sự phát triển của một số chủng nấm men có khả năng tạo sắc tố đỏ (ví dụ như *Rhodotorula glutinis*).

f) Bắp cải có hương vị kém

Nguyên nhân là do vi khuẩn lactic lên men dị hình bị ức chế (không tạo ra acid acetic và một số sản phẩm lên men khác).

3.2. Dưa chuột muối

Dưa chuột muối là một loại thực phẩm được nhiều người ưa chuộng. Để sản xuất dưa chuột muối cần thu hoạch dưa chuột từ khi chúng còn non. Dưa cần được bảo quản tránh va đập và nên còn lại phần cuống dài 1 – 2cm. Không nên bảo quản dưa chuột quá 6 – 8 giờ kể từ khi thu hoạch cho tới khi muối, vì quá trình thối hỏng diễn ra khá nhanh.

3.2.1. Muối dưa chuột

Dưa chuột có thể được muối trong các dụng cụ bằng gỗ, sành sứ, hoặc thủy tinh. Đầu tiên pha dung dịch nước muối 10 – 15%. Dưa chuột sau khi rửa được ngâm vào

dung dịch muối và nhấn chìm bằng một miếng gỗ. Dưa chuột chứa 90% nước và do vậy trong quá trình muối, nồng độ muối trong dung dịch sẽ giảm dần. Dung dịch cần được điều chỉnh về độ muối 40° để ức chế các vi sinh vật gây thối. Tuy nhiên, nồng độ muối cũng không được giữ quá cao vì có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn lactic. Sau khoảng 5 – 6 tuần, nồng độ muối cần được chỉnh về 60°. Trong quá trình muối, dưa sẽ chuyển màu từ xanh sáng sang vàng xanh do tác dụng của acid lên chlorophyl. Thịt quả sẽ chuyển thành trong suốt do các bọt khí trong quả bị loại dần.

3.2.2. Quá trình lên men

Vi sinh vật có sẵn trên quả sẽ bắt đầu quá trình lên men. Trong quá trình này có những vi sinh vật sau tham gia: *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* và *Lactobacillus plantarum*. Trong số đó những vi sinh vật như *Pediococcus* và *Lactobacillus plantarum* là quan trọng, còn những vi sinh vật như *Lactobacillus brevis* không được mong đợi bởi chúng có khả năng sinh khí. *Lactobacillus plantarum* là nhóm không thể thiếu được. Trong giai đoạn đầu của quá trình lên men, một số lượng lớn các loài vi khuẩn, nấm men và nấm mốc không liên quan có thể có mặt trong dịch lên men. Trong lên men tự nhiên, vi sinh vật nhóm này có số lượng lớn hơn nhiều so với vi khuẩn lactic và có nguồn gốc từ môi trường xung quanh. Chính vì lẽ đó, giai đoạn đầu tiên này đóng vai trò rất quan trọng quyết định chất lượng của sản phẩm. Trong thời gian này, số lượng vi khuẩn lactic và nấm men (cả nhóm lên men và nhóm oxy hóa) phát triển nhanh chóng về số lượng. Các vi sinh vật gây thối giảm số lượng cũng rất nhanh và thậm chí có thể biến mất hoàn toàn. pH của môi trường cũng giảm nhanh khi lượng acid tạo ra ngày càng nhiều. Trong giai đoạn giữa của quá trình lên men, hỗn hợp vi sinh vật thuộc nhóm chịu acid thấp *Leuconostoc* và nhóm chịu acid cao như *Lactobacillus* và *Pediococcus* đóng vai trò chủ chốt. Các vi sinh vật thuộc nhóm coliform ở hàng thứ yếu và biến mất sau 10 – 14 ngày. Một số lượng nhỏ nấm men vẫn có mặt trong môi trường trong khi nồng độ acid vẫn tiếp tục tăng. Các loại vi sinh vật như *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* và *Lactobacillus plantarum* hoàn thành giai đoạn cuối cùng của quá trình lên men và đưa nồng độ acid tới đỉnh điểm. Các loại nấm men oxy hóa vẫn tồn tại nhưng không phát triển tiếp trong giai đoạn này.

3.2.3. Các yếu tố làm giảm chất lượng dưa muối

a) Phồng nở

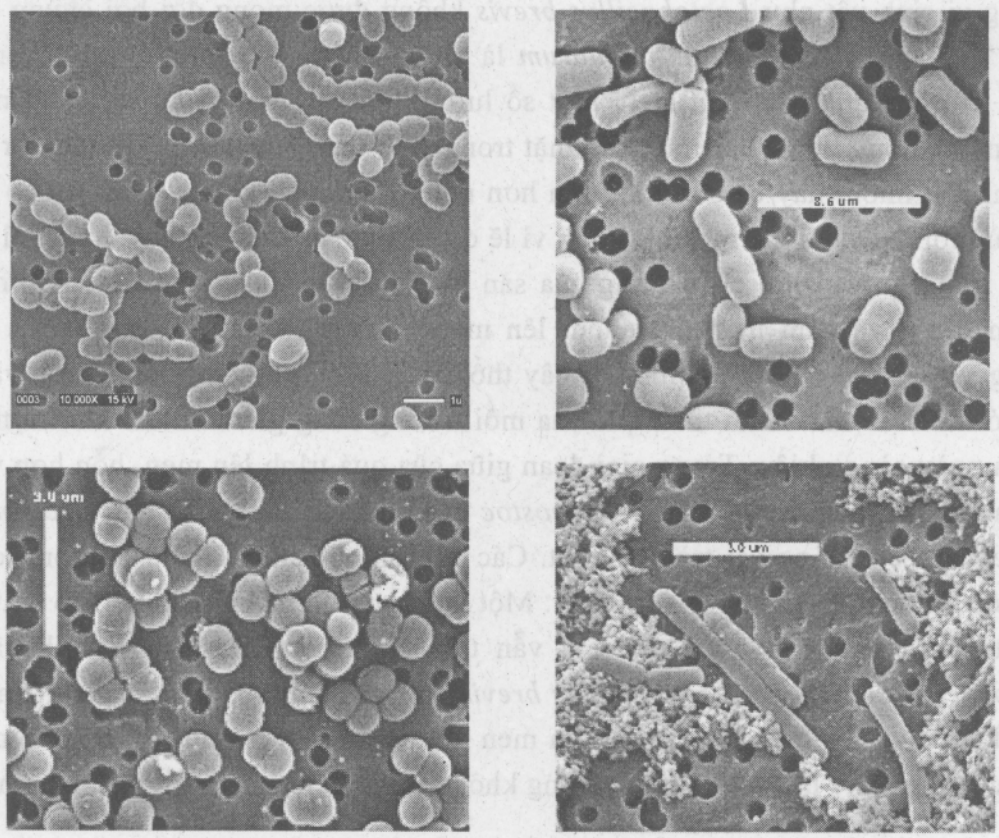
Đây là vấn đề nghiêm trọng trong lên men dưa chuột và nhìn chung thường xảy ra nặng nề hơn đối với các loại dưa kích thước lớn, nhiệt độ lên men cao. Nguyên nhân là do sự tích lũy khí cacbonic trong dịch lên men. Để làm giảm lượng khí

cacbonic tạo ra, có thể thổi khí nitơ hoặc khuấy trộn nhẹ dịch lên men. Một số chủng vi khuẩn lactic lên men đồng hình trong quá trình lên men, acid malic có thể sản sinh acid lactic và CO_2, và điều này còn làm trầm trọng thêm vấn đề. Một số chủng *Lactobacillus plantarum* đột biến không có khả năng sinh CO_2 trong quá trình lên men malolactic đã được thử nghiệm trong phòng thí nghiệm nhằm giảm hiện tượng phồng nở của dưa. Tuy nhiên, việc ứng dụng chúng vào thực tế sản xuất vẫn chưa được triển khai.

b) Dưa mềm hoặc nhăn

Nguyên nhân có thể do một lượng lớn acid tạo ra bởi *Leuconostoc mesenteroides*. Sự phát triển của một số vi sinh vật oxy hóa acid hữu cơ như *Mycoderma* cũng có thể là vấn đề bởi chúng làm thay đổi giá trị pH và ảnh hưởng tới trật tự của quá trình lên men.

3.2.4. Một số khía cạnh an toàn thực phẩm



Hình 4.8. **Một số vi sinh vật điển hình trong sản phẩm lên men lactic từ hoa, quả**
Từ trái qua phải, từ trên xuống dưới: *Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis, Pediococcus pentosaceus, Lactobacillus casei.*

Hàm lượng nitrate trong rau, quả lên men phụ thuộc vào yếu tố canh tác và điều kiện lên men. Vi sinh vật chuyển hóa nitrate thành nitrite khi lên men rau, quả. Trong

môi trường acid, nitrit có thể tương tác với các amin hoặc amid tạo ra nitrosamin, một dạng chất gây ung thư. Việc giảm lượng nitrat ban đầu có thể làm tăng độ an toàn của sản phẩm. Trong khía cạnh này, nhiều loại vi sinh vật, trong đó có vi khuẩn lactic có thể được sử dụng. Một số chủng thuộc các loài *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* hay *Leuconostoc mesenteroides* có chứa enzyme nitrit reductase. Tuy nhiên, ở giá trị pH thấp, quá trình khử nitrit, hoặc nitrat không thể diễn ra triệt để, và do vậy vai trò của chúng không rõ nét trong lên men rau, quả.

4. SẢN XUẤT RƯỢU VANG

4.1. Lịch sử và công nghệ sản xuất rượu vang

Rượu vang là loại đồ uống lên men ethylic sản xuất từ quả nho. Mặc dù nho là nguyên liệu chính nhưng một số loại nguyên liệu khác như táo, đào, dâu ... đôi khi cũng được sử dụng. Thông thường rượu vang có chứa 85-89% nước, khoảng 10-14% ethanol, dưới 1% acid (nguồn gốc hoa, quả) và hàng trăm loại chất tạo hương khác nhau ở nồng độ rất thấp. Khác với đa số các loại đồ uống khác, rượu vang rất khó hỏng và hầu như không bao giờ là tác nhân truyền nhiễm bệnh tật. Nồng độ cồn có trong rượu vang ở mức có thể diệt đa số các loại vi sinh vật gây bệnh và nhìn chung, uống rượu vang an toàn hơn uống nước, hoặc sữa (tất nhiên, nếu không uống quá mức cần thiết). Chính vì lý do này, nhiều nền văn minh đã coi rượu vang là quà của Thượng đế ban tặng nhằm chống lại bệnh tật. Yếu tố ảnh hưởng tới hương và vị của rượu vang bao gồm loại quả, nơi trồng trọt và phương pháp sản xuất.

Giống nho dùng trong sản xuất rượu vang phần lớn có nguồn gốc từ Châu Âu (*Vitis vinifera*). Loài nho này vốn mọc hoang dã trên các lãnh địa ven bờ biển Đen, Caspi, Địa Trung Hải. Hiện nay có tới trên 5000 giống nho khác nhau đang được trồng trọt trên toàn thế giới. Cây nho ưa điều kiện khí hậu khô và ấm vào mùa hè, nhiệt độ không thấp quá vào mùa đông, việc trồng trọt chúng chỉ thuận lợi tại các vùng ôn đới thuộc cả Bắc và Nam bán cầu. Điều kiện tự nhiên mới chính là tác nhân tạo ra sự độc đáo trong rượu vang của mỗi vùng. Những tác nhân này bao gồm các yếu tố khí hậu (nhiệt độ, lượng mưa, ánh sáng), loại đất (cấu trúc, thành phần, khả năng thoát nước) và vị trí địa lý (độ cao và độ dốc). Nhìn chung, nho có chất lượng cao ở các vùng khí hậu ôn hòa, nhiều nắng, đêm lạnh nhưng không đóng băng, trên các nền đất đồi núi có độ thông thoáng và khả năng thoát nước cao. Nho là cây lâu năm và có thể thu hoạch vụ đầu sau 3 năm trồng trọt. Với những gốc đã trồng, việc thu hoạch có thể kéo dài từ 20 tới 100 năm. Chu kỳ phát triển của nho bắt đầu vào mùa xuân khi cây bắt đầu nảy chồi, sau đó nở hoa, tạo quả. Quả phát triển và bắt đầu

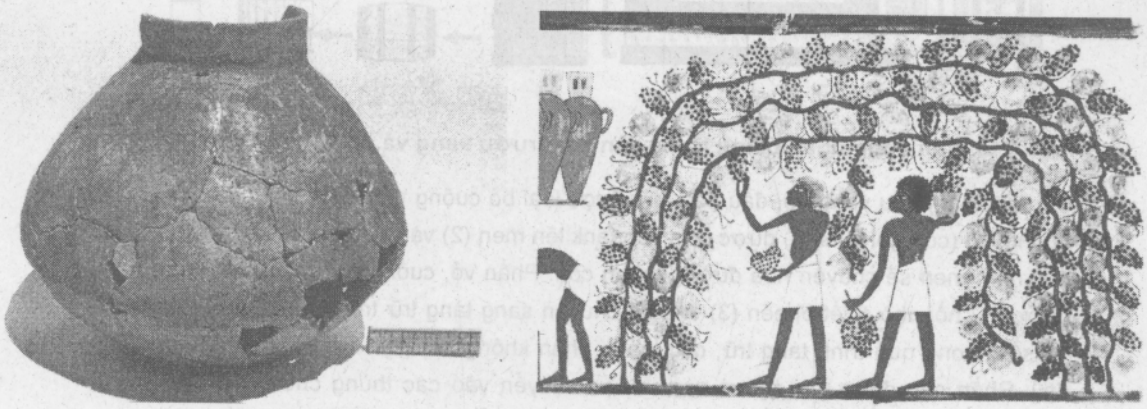
chín vào giữa mùa hè. Nửa đầu của mùa thu là mùa thu hoạch nho. Cuối mùa thu, cây rụng lá và trơ trụi cho tới mùa xuân năm sau. Nho phục vụ sản xuất rượu vang phải thật sự chín, khi ấy lượng đường trong quả là cao nhất. Lượng đường cao sẽ quyết định nồng độ cồn đạt được trong lên men sau này.

Bảng 4.2. **Thành phần chủ chốt trong dịch quả nho**

Thành phần	Nồng độ, đặc điểm
Nguồn cacbon	
Glucose	75 – 150gl^{-1}
Fructose	75 – 150gl^{-1}
Sucrose	Vết
Pentose	Không lên men được bởi *Saccharomyces cerevisiae*
Pectins	Lượng nhỏ
Nguồn nitơ	
Acid amin tự do	0,2 – 2,5gl^{-1}
Ion ammoni	Lượng nhỏ, thường thiếu cho nấm men
Protein	Lượng nhỏ
Acid hữu cơ	
Acid tartaric	2 – 10$g1^{-1}$: nấm men rượu vang không dùng được
Acid malic	1 – 8gl^{-1}: có thể sử dụng một phần bởi nấm men
Khoáng chất	
P, K, Mg, S, nguyên tố vi lượng	Các yếu tố vi lượng và đa lượng đều đầy đủ
Vitamin	Nồng độ thấp nhưng đủ cho nấm men
Những thành phần khác	Nồng độ sulphite thường cao
	Acid decanoic và octanoic có thể ức chế nấm men
	Sterol và acid béo không no có thể là yếu tố hạn chế

Lịch sử phát triển của rượu vang đã đồng hành cùng lịch sử nhân loại. Các nhà khảo cổ học cho rằng, rượu vang có xuất xứ từ khu vực Capcazơ và Trung Đông khoảng 8000 năm về trước. Các di chỉ khảo cổ tại Ai Cập và Phênixi cho thấy sản xuất rượu vang đã có tại đây từ 5000 năm trước Công nguyên (TCN). Cho tới khoảng năm 2000 TCN, sản xuất rượu vang được du nhập tới Hy Lạp và sau đó truyền bá khắp Địa Trung Hải bởi đế chế La mã. Vào thế kỷ XVI, các nhà thám hiểm Châu Âu

đã mang nho tới Châu Mỹ. Năm 1530, những người Tây Ban Nha xâm chiếm Trung và Nam Mỹ bắt đầu trồng nho ở Mexico, Argentina, Peru và Chile. Năm 1655, nho được người Hà Lan trồng trọt trên thuộc địa của mình tại Mũi Hảo Vọng (Nam Phi). Việc trồng nho ở Úc và New Zealand được tiến hành vào năm 1813, tức là gần một thế kỷ, chậm hơn so với tại các vùng lãnh địa xâm chiếm khác. Có thể nói, ngành sản xuất rượu vang được phát triển ở tất cả những nơi mà thực dân Châu Âu đặt chân tới. Tại Bắc Mỹ, khoảng giữa thế kỷ XIX, nghề trồng nho và làm rượu mới thực sự phát triển. Trong thời gian này, nho từ Bắc và Nam Mỹ được chuyển ngược lại Châu Âu và mang theo loại rệp rễ tệ hại *Phylloxera*. Chúng tàn phá gần như hoàn toàn các vườn nho lâu đời của Châu Âu. Rất may mắn, người ta phát hiện ra rằng, một số chủng loại nho Mỹ lại chống chịu được *Phylloxera*. Lúc này chỉ có công nghệ ghép gốc nho Mỹ với cành nho Châu Âu mới cứu được nghề sản xuất rượu vang ở đây. Các vườn nho của cả Châu Âu và Mỹ sau đó được trồng lại bằng nho ghép.

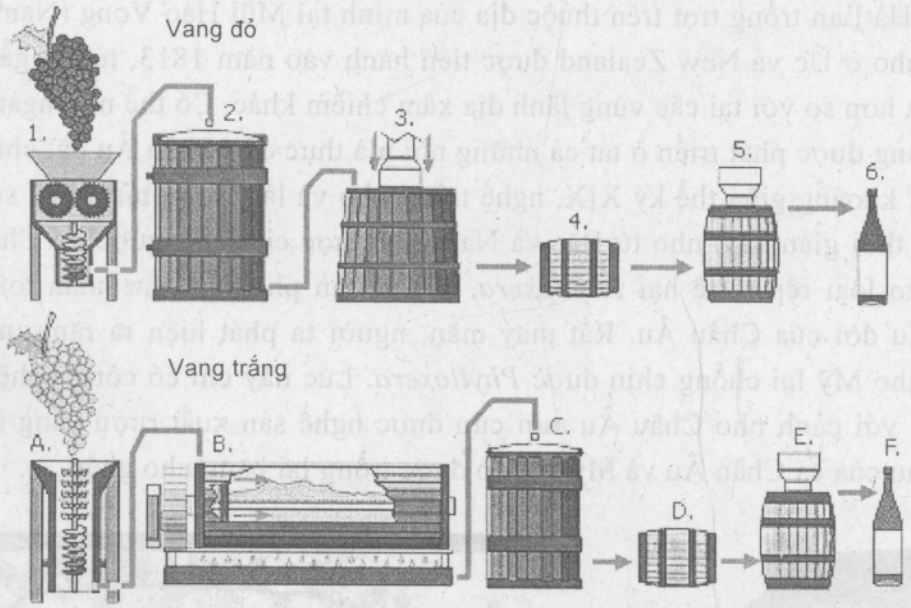


Hình 4.9. **Một số bằng chứng khảo cổ về nghề sản xuất rượu vang thời kỳ đầu**

Hình trái - chiếc bình miệng nhỏ này là một trong 6 bình khai quật được từ "căn bếp" của cư dân thời kỳ đồ đá mới tại Hajji Firuz Tepe (Iran) có niên đại 5400 – 5000 năm TCN. Đáy bình sót lại cặn màu đỏ chứa tartarat canxi và nhựa cây terebinth (một loại cây ở Trung Đông có họ với cây điều). Căn cứ vào kích thước tương đối nhỏ và dài của miệng bình, vết lắng nằm ở nửa dưới có thể kết luận chiếc bình vốn được dùng để chứa dung dịch. Acid tartaric ở hàm lượng lớn tại Trung Đông chỉ tìm thấy trong quả nho và do vậy bình được cho là chứa rượu vang. Nhựa cây terebinth có thể đã được dùng làm chất bảo quản chống lại vi sinh vật làm chua rượu. Điều kiện yếm khí được đảm bảo bằng những chiếc nút đất sét tìm thấy bên cạnh đó. Đây là bằng chứng trực tiếp và sớm nhất về sản xuất rượu vang của nhân loại. *Hình phải* - Cảnh hái nho vẽ trên mộ của Nakht, Thebes, 1500 năm TCN.

Ngày nay, trồng nho và sản xuất rượu vang đã trở thành một thành phần không thể thiếu trong văn hóa và kinh tế nhân loại. Hằng năm có tới trên 26 tỷ lít rượu vang được sản xuất ra. Cạnh tranh hàng hóa đã dẫn tới sự đa dạng đặc biệt của các chủng

loại rượu vang. Tuy vậy, nguyên lý của công nghệ sản xuất rượu vang thực ra cho tới nay không có nhiều thay đổi.

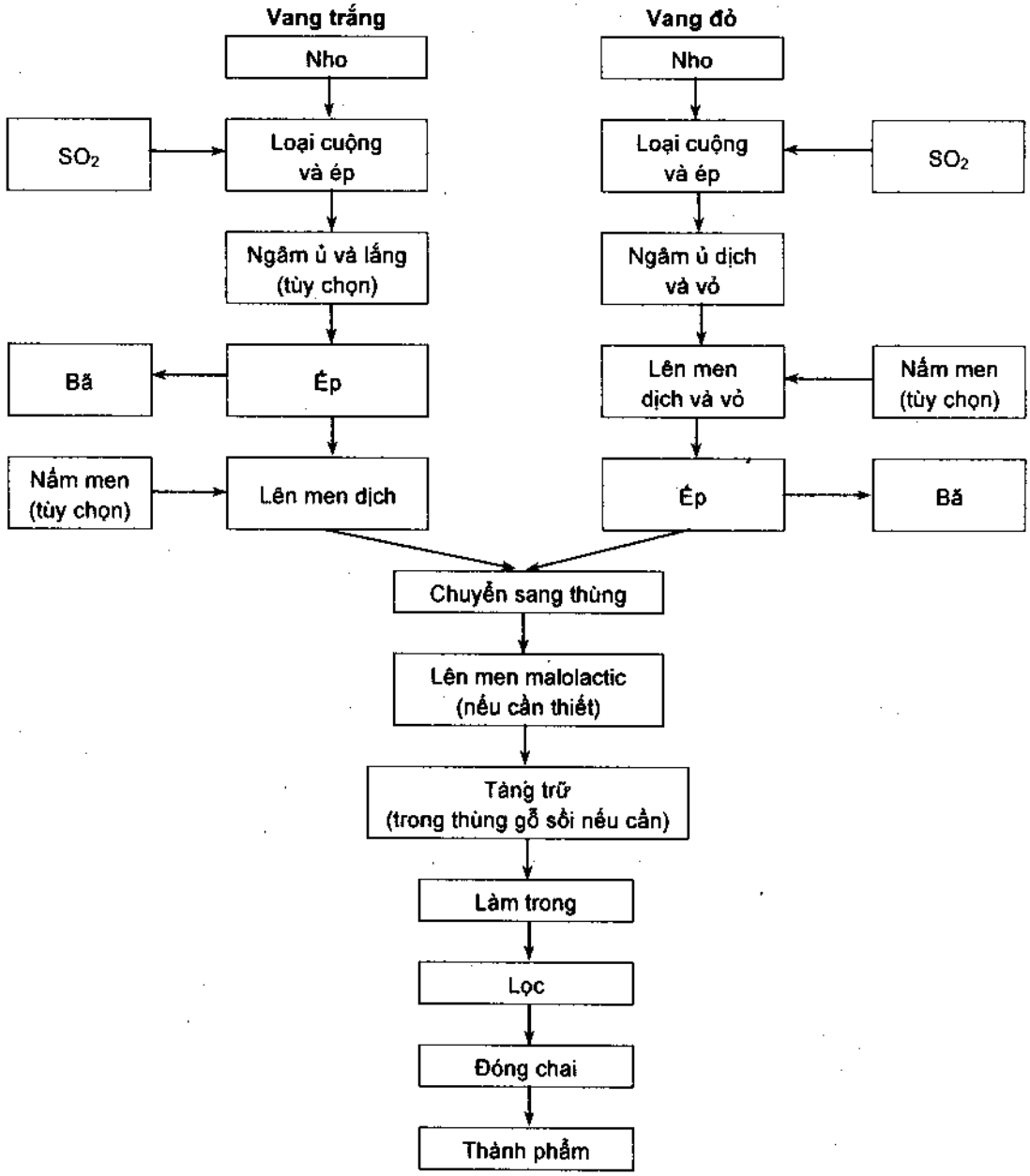


Hình 4.10. **Sáu công đoạn chính trong sản xuất rượu vang và những thiết bị tương ứng**

Để sản xuất rượu vang đỏ, đầu tiên nho được loại bỏ cuộng và ép (1). Hỗn hợp dịch quả, cuống, vỏ (còn gọi là hèm) được đưa vào tank lên men (2) và giữ trong khoảng 14 ngày. Ở đây nấm men sẽ chuyển hóa đường thành cồn. Phần vỏ, cuống được loại bỏ, phần rượu được thu hồi nhờ thiết bị nén (3) sau đó chuyển sang tàng trữ trong các thùng (4) làm từ gỗ sồi. Trong quá trình tàng trữ, các thành phần không tan (cặn rượu) sẽ kết lắng xuống đáy. Phần cặn được loại bỏ và rượu được chuyển vào các thùng chứa (5). Cuối cùng, rượu vang được chiết vào chai (6), đóng nút và phân phối. Trong sản xuất rượu vang trắng, vỏ và cuống được loại bỏ khỏi dịch quả trước khi lên men. Sau khi loại cuống và nghiền ép (A), hèm được chuyển ngay vào thiết bị nén (B) nhằm tách vỏ và cuống khỏi dịch quả. Các công đoạn lên men (C), tàng trữ (D), loại cặn (E), và đóng chai (F) được thực hiện tương tự như trong sản xuất rượu vang đỏ.

Nguyên lý làm rượu vang tương đối đơn giản, tuy nhiên việc xử lý nho, lên men rượu vang để tạo hương vị mong muốn là cả một nghệ thuật. Trong quá trình sản xuất, các nhà nấu rượu cần cân đối những hương dễ chịu như hương anh đào, sôcôla, vani và hạn chế những mùi khó chịu, thường được gọi với những cái tên xấu như "mùi hôi chó", "mùi nhựa", "mùi trứng thối". Nồng độ rượu và acid cũng cần được điều tiết, nếu nhiều acid quá rượu có vị chua, nếu nhiều cồn quá rượu sẽ sốc. Có lẽ tác nhân quan trọng nhất trong sản xuất rượu vang là chủng loại và chất lượng nho. Nguyên liệu chính này sẽ quyết định hương vị, nồng độ cồn, độ chua và màu sắc của thành phẩm. Vang trắng có màu vàng rơm hoặc vàng kim được sản xuất từ nho trắng còn vang đỏ được sản xuất từ nho đỏ. Công nghệ sản xuất vang trắng và vang đỏ gần

như nhau, sự khác biệt duy nhất là sự có mặt hay vắng mặt của vỏ quả trong quá trình lên men. Với rượu vang trắng, nho trắng được nghiền và dịch được tách khỏi vỏ trước khi lên men. Vang đỏ được lên men cùng vỏ. Chất màu đỏ (anthocyanin) và một số chất khác từ vỏ quả được chiết tách trong quá trình lên men và tạo ra màu đỏ cùng hương vị đặc trưng của vang đỏ. Vang hồng có màu hồng nhạt được làm từ nho đỏ theo công nghệ lên men rượu vang trắng (không lên men cùng vỏ). Lượng chất màu được chiết ra trong quá trình ép quả chỉ đủ làm hồng rượu, tức là ít hơn nhiều so với khi lên men cùng vỏ.



Hình 4.11. **Sơ đồ công nghệ lên men rượu vang**

Với công nghệ sản xuất rượu vang hiện đại, đầu tiên nho được thu hoạch, vận chuyển về nhà máy, đưa vào thiết bị loại cuống và sau đó ép thu hồi dịch. Để sản xuất vang trắng, hèm được chuyển tới thiết bị nén. Dưới tác dụng của áp lực, dịch quả được tách khỏi vỏ. Thông số áp lực sử dụng quyết định nồng độ chất tạo hương thu được. Sau khi ép, dịch quả được chuyển vào thiết bị lên men. Trong sản xuất vang đỏ, hèm được chuyển thẳng tới thiết bị lên men. Thùng lên men thường được làm từ thép không gỉ hoặc gỗ. Loại chất liệu làm thùng, nhiệt độ lên men ảnh hưởng đáng kể tới chất lượng rượu. Nhiều hương liệu của vang có bản chất dễ bay hơi và có thể bị mất trong khi lên men. Nhiệt độ càng cao quá trình bay hơi càng mạnh. Do vậy, nhằm giữ lại các hương đặc trưng của quả nho, nhiệt độ lên men cần được kiểm soát thông qua việc làm lạnh các thùng lên men. Các tank bằng thép không gỉ dẫn nhiệt tốt hơn so với thùng gỗ nên thường là lựa chọn ưu tiên trong lên men.

Quá trình lên men có thể được thực hiện bởi hệ vi sinh vật có sẵn trên quả, trên bề mặt thiết bị hoặc bởi giống thuần chủng. Giống thuần chủng sử dụng thông thường thuộc các loài *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Saccharomyces bayanus*. Nấm men quyết định sự hình thành các hương vị dễ chịu cũng như khó chịu của vang. Ví dụ, nấm men ở trạng thái stress sản sinh ra khí H_2S, có mùi trứng thối. Để giảm hiệu ứng này, có thể sẽ phải bổ sung chất dinh dưỡng vào thùng lên men. Độ dài thời gian lên men ảnh hưởng khá nhiều tới chất lượng của rượu vang. Ngoài ra, sự phát triển của nhiều loại vi sinh vật khác có sẵn trong hèm cũng góp phần quyết định hương vị của thành phẩm. Ví dụ, vi khuẩn lactic có thể sử dụng các acid trong dịch quả và làm giảm độ chua, đồng thời sản sinh ra hương bơ trong vang. Đôi khi, người nấu rượu phải chủ động hạn chế sự phát triển của vi khuẩn lactic nếu độ acid của quả vốn đã thấp, hoặc khi hương bơ phối hợp không tốt với các hương vị khác. Vi khuẩn *Acetobacter* là một tác nhân gây hỏng rượu vang bởi chúng có khả năng chuyển hóa ethanol thành acid acetic.

Khi quá trình lên men kết thúc, dịch vang đỏ được tách khỏi vỏ nhờ sử dụng thiết bị ép. Cả vang đỏ và vang trắng đều ở trạng thái đục sau khi lên men. Trong giai đoạn tiếp theo, rượu vang được tàng trữ. Lúc này, tế bào nấm men và các thành phần lơ lửng khác sẽ kết lắng xuống đáy tạo cặn rượu. Phần rượu trong được tách cặn và chuyển sang những thùng mới. Người ta có thể bổ sung chất phụ trợ nhằm loại bỏ những thành phần không mong muốn, ví dụ như protein (tác nhân gây đục rượu vang). Những thành phần bổ sung nhanh chóng kết lắng và có thể dễ dàng loại bỏ khỏi rượu. Sau khi lên men, nhà sản xuất rượu cần quyết định rượu vang sẽ được tàng trữ như thế nào. Tàng trữ có ảnh hưởng lớn tới hương vị rượu. Vang tàng trữ trong các thùng gỗ sồi sẽ hấp thụ nhiều hương từ gỗ và tạo nên sự đặc sắc của một số

chủng loại vang. Rượu vang cũng có thể được tàng trữ ở những chế độ đặc biệt với mục đích loại bỏ hương hoa quả và thu nhận những hương mới (ví dụ như hương bánh nướng). Sự tiếp xúc của vang với không khí trong quá trình tàng trữ dẫn tới phản ứng trùng hợp các thành phần phenol (chủ yếu có nguồn gốc từ vỏ và hạt nho) tạo ra các hợp chất cao phân tử gọi là tannin. Theo thời gian, tannin tạo một lớp kết lắng đỏ dưới đáy thùng tàng trữ. Kết tủa tannin làm giảm vị đắng của vang. Thời gian tàng trữ quyết định mức độ và hiệu quả của những phản ứng kể trên. Vang sau khi tàng trữ sẽ được đóng chai. Lúc này, các phản ứng của quá trình tàng trữ sẽ vẫn diễn ra chập chạm trong nhiều năm. Trong sản xuất, đôi khi người ta tiến hành lên men malolactic nhằm chuyển hóa acid L-malic thành acid L-lactic. Quá trình này góp phần làm giảm độ chua của rượu. Như đã nêu ở trên, yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhất tới chất lượng rượu vang là phẩm chất của nho, kế tiếp là vai trò của nấm men và vi khuẩn. Ngoài ra, hoạt tính enzyme vi sinh vật và bản thân quả nho cũng góp phần tạo nên hương vị của vang.

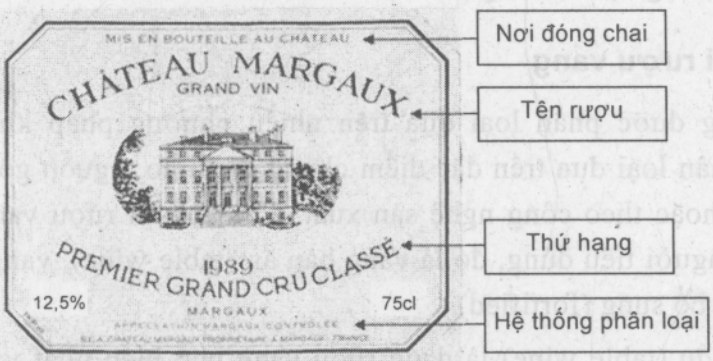
4.2. Phân loại rượu vang

Rượu vang được phân loại dựa trên nhiều phương pháp khác nhau. Đôi khi chúng được phân loại dựa trên đặc điểm chủng loại nho, nguồn gốc địa lý, màu sắc, nhà sản xuất, hoặc theo công nghệ sản xuất. Có 3 nhóm rượu vang có thể dễ dàng phân biệt bởi người tiêu dùng, đó là vang bàn ăn (table wine), vang có ga (sparkling wine), và vang bổ sung (fortified).

Vang bàn ăn (table wine) là dạng rượu vang phổ biến nhất và có thể được sản xuất bằng nhiều phương pháp khác nhau. Những loại vang này thường chứa khoảng 10-14% cồn và được sử dụng trong thành phần của bữa ăn. Vang bàn ăn còn được phân loại tiếp dựa trên màu sắc, nồng độ đường, chủng loại nho và nguồn gốc của nho. Phụ thuộc vào chủng loại nho, công nghệ sản xuất, vang bàn ăn được chia theo màu như vang trắng, vang đỏ và vang hồng. Thông thường, vang được lên men cho tới khi toàn bộ lượng đường chuyển thành cồn (trạng thái này gọi là "khô", kiệt đường hay "dry", theo tiếng Anh). Vang hơi ngọt (off-dry) được sản xuất bằng cách dừng quá trình lên men trước khi toàn bộ lượng đường bị chuyển hóa thành cồn, hoặc thông qua việc bổ sung dịch nho vào vang sau lên men.

Tại các vùng lãnh thổ ngoài Châu Âu (Mỹ, Úc), vang bàn ăn thường được gọi dựa vào chủng loại nho sử dụng. Ví dụ, *Chardonnay* được sản xuất với thành phần chủ chốt (trên 75%) là nho *Chardonnay*. Tương tự như vậy là các loại vang *Riesling, Cabernet Sauvignon,* và *Merlot*. Tại Châu Âu, vang được phân loại theo địa phương và vùng sản xuất. Những địa danh nổi tiếng thế giới tập trung chủ yếu ở Pháp, đó là

Burgundy (miền Trung nước Pháp) và Bordeaux (bờ biển Tây Nam nước Pháp). Bordeaux hiện lưu hành hệ thống phân loại đã có từ năm 1855 (*Appellation d'Origine Contrôlée*). Bordeaux xếp loại các nhà máy (*châteaux*, nghĩa gốc là "lâu đài") và vườn nho (*crus*) tốt nhất của mình theo 5 hạng (*grand crus*). Hạng cao cấp nhất (*premier grand crus*) được giữ bởi năm nhà máy đó là Château Margaux, Château Latour, Château Mouton-Rothschild và Château Lafite-Rothschild ở Pauillac, và cuối cùng là Château Haut-Brion ở Graves. Nho ở những vùng này được đánh giá là có chất lượng cao nhất trên thế giới. Hằng năm, các nhà máy của Pháp xuất xưởng khoảng 2,4 tỷ chai rượu vang bàn ăn. Hệ thống phân loại rượu vang của Pháp (*Appellation d'Origine Contrôlée*) được chấp nhận bởi hầu hết các quốc gia sản xuất rượu vang. Tại Mỹ, ngoài tên gọi theo chủng loại nho, các nhà máy còn bổ sung một nhãn nhỏ ghi địa danh và nguồn nguyên liệu. Địa danh có thể là quốc gia, bang, hoặc vùng. Ít nhất, 85% nho sử dụng phải có nguồn gốc như ghi trên nhãn.



Hình 30. **Một số thông số ghi trên nhãn vang bàn ăn của Pháp**

Ngoài những nội dung đã chú thích ở trên, một số thông số như năm sản xuất (1989), nồng độ cồn (12,5%), thể tích (75cl = 750ml), nước sản xuất (France) cũng được ghi rõ trên nhãn.

Vang có ga (sparkling wine) được sản xuất từ vang bàn ăn nhưng được lên men lần hai nhằm tạo ga. Để lên men lần thứ hai, người ta bổ sung đường và nấm men vào vang đã lên men lần thứ nhất (dry wine). Lên men lần hai có thể được thực hiện trong thùng kín hoặc ngay trong chai như trường hợp sản xuất champagne, loại vang có ga nổi tiếng nhất của Pháp. Khí cacbonic sinh ra trong quá trình lên men đường bổ sung được giữ lại trong chai ở trạng thái bão hòa. Khi rót vang có ga vào ly, khí cacbonic thoát ra và tạo bọt trên bề mặt. Theo hệ thống phân loại *Appellation d'Origine Contrôlée*, chỉ có loại vang có ga sản xuất tại vùng Champagne (Đông Bắc Pháp) mới được gọi là *champagne*. Tất cả các loại rượu vang có ga khác, kể cả những loại sản xuất theo công nghệ champagne truyền thống, chỉ được gọi là vang có ga.

Vang bổ sung (fortified wine) là loại vang mà trong quá trình sản xuất người ta có cho thêm cồn từ bên ngoài. Loại vang này thường được sử dụng ở liều lượng nhỏ trước (*aperitifs*) hoặc sau (*dessert wines*) bữa ăn. Hai loại vang phổ biến thuộc nhóm vang bổ sung là *port* và *sherry*. Trong công nghệ sản xuất *port* vốn có nguồn gốc từ Bồ Đào Nha, nho được ép và lên men, sau đó quá trình lên men được dừng lại bằng việc bổ sung cồn. Lượng cồn bổ sung sẽ diệt nấm men. Sản phẩm có vị ngọt với nồng độ cồn cao hơn so với vang bàn ăn từ 5-10%. Với vang *sherry* có nguồn gốc từ Tây Ban Nha, cồn được bổ sung vào dịch đã lên men kiệt đường trong các thùng gỗ sồi. Trong quá trình lên men, một loại nấm men đặc biệt (flor yeast) phát triển trên bề mặt dịch và tạo hương (hazelnut, *Corylus* spp.) đặc trưng cho *sherry*.

Brandy được sản xuất từ rượu vang nhưng thông qua chưng cất và không được xếp vào nhóm rượu vang. Brandy được chưng cất từ rượu vang nhằm làm tăng nồng độ cồn. Cũng giống như việc chưng cất rượu ở Việt Nam, để sản xuất brandy, rượu vang được đun trong các nồi đồng, hơi thoát ra được làm lạnh trong ống và dịch thu được sẽ được tàng trữ trong các thùng gỗ sồi nhiều năm. Brandy thường có nồng độ cồn khoảng 40%.

4.3. Vi sinh trong sản xuất rượu vang

Vi sinh vật liên quan tới sản xuất rượu vang có thể được chia làm hai dạng, dạng nội sinh (từ quả nho, bề mặt thiết bị) và dạng đưa vào (các chủng giống khởi động phục vụ lên men). Cả nấm men và vi khuẩn đều có thể đóng vai trò tích cực và tiêu cực trong sản xuất. Trong lên men truyền thống, người ta chỉ sử dụng nhóm vi sinh vật nội sinh, tức là nhóm có sẵn trong nguyên liệu nho và quan trọng hơn là nhóm vi sinh vật trên bề mặt thiết bị (với thành phần chủ chốt là *Saccharomyces cerevisiae*). Những vi sinh vật chính có trong/trên bề mặt quả nho bao gồm:

– Nấm men: chủ yếu là *Kloeckera/Hanseniaspora*, và một lượng nhỏ hơn các đại diện như *Candida*, *Metchnikowia*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Kluyveromyces* và một lượng rất nhỏ *Saccharomyces cerevisiae*.

– Vi khuẩn lactic: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

– Vi khuẩn sinh acid acetic: *Gluconobacter*, *Acetobacter*.

– Nấm mốc: *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Ucinula* và *Cladosporium*.

Mật độ tế bào vi sinh vật trên quả nho trung bình vào khoảng 10^3 – 10^5cfu/g. Trong giai đoạn đầu của quá trình lên men, nhóm nấm men khác với *Saccharomyces* đóng vai trò chủ đạo. Nhóm này khá mẫn cảm với ethanol và giảm dần số lượng (chết) sau 4 ngày lên men khi nồng độ cồn đạt khoảng 5%. Trong giai đoạn tiếp theo,

quá trình lên men được thực hiện chủ yếu bởi các chủng men rượu *S. cerevisiae* có thể chống chịu được nồng độ cồn cao (tới khoảng 15% (v/v)).

Bảng 4.3. **Biến đổi của nấm men trong quá trình lên men rượu vang theo công nghệ truyền thống**

Giai đoạn lên men	Nồng độ cồn (% v/v)	Nhóm nấm men chủ chốt
Giai đoạn đầu (ngày 1 – 3)	0 – 3	*Kloeckera apiculata* *Hanseniaspora valbyensis*
Giai đoạn giữa (ngày 3 – 4)	3 – 5	*Candida stellata* *Torulaspora delbrueckii* *Kluyveromyces* spp. *Pichia* spp.
Giai đoạn cuối (ngày 5 – 10)	5 – 12	*Saccharomyces cerevisiae*

Bảng 4.4. **Một số thành tựu trong nghiên cứu chủng giống và công nghệ lên men rượu vang**

Hướng nghiên cứu	Thành tựu cụ thể
Xác định chủng giống	Đánh giá đa hình di truyền sử dụng RFLP, RAPD-PCR và karyotyping (PFGE) được ứng dụng trong việc phân biệt các chủng *S. cerevisiae*
Lai giống	Khả năng kết lắng của chủng giống được cải thiện
ADN tái tổ hợp	Nhiều gen từ các vi sinh vật khác hoặc các chủng khác được chuyển vào nấm men *S. cerevisiae*, trong đó có các gen mã hóa: K1 (killer) toxin, nhằm đối phó với các chủng hoang dại. Pectinase nhằm cải thiện khả năng lọc trong rượu vang. Glucanase nhằm giải phóng các hợp chất thơm terpenes từ dạng glucoside. Lactate dehydrogenase, nhằm cải thiện lên men hỗn hợp và acid hóa. Malolactic enzyme, nhằm nâng cao khả năng lên men malolactic. Malic enzyme, nhằm nâng cao khả năng lên men maloethanolic. Glycerol phosphatase, nhằm tăng nồng độ glycerol.
Công nghệ lên men	Vang có ga đã có thể được sản xuất sử dụng tế bào nấm men cố định trong gel alginate hoặc carrageenan

(PFGE = pulse-field gel electrophoresis; PCR = polymerase chain reaction; RAPD = random amplification of polymorphic DNA; RFLP = restriction fragment length polymorphism)

Bảng 4.5. **Vi sinh vật làm hỏng hoặc giảm chất lượng rượu vang**

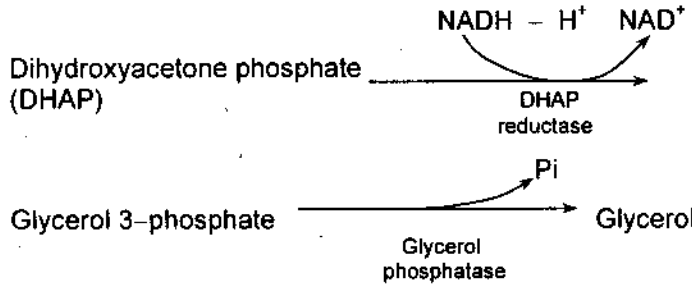
Vi sinh vật	Hiệu ứng gây hỏng
Nấm men nội sinh	Biến chất theo hướng ester, tạo quá nhiều ethyl acetate (> 200mg/l) và methylbutyl acetate (gây ra chủ yếu bởi *Hanseniaspora* spp.). Tạo màng trên bề mặt và làm hỏng hương (*Candida*, *Pichia* và *Metchnikowia*).
Nấm men từ bên ngoài	
Zygosaccharomyces bailii	Phát triển và lên men đường sót trong vang tàng trữ, gây đục và mất hương.
Brettanomyces spp.	Gây đục, mùi acid, tạo mùi hôi khó chịu trong vang tàng trữ. Đôi khi gây nổ chai vang ga bởi khí CO_2.
Schizosaccharomyces pombe	Nấm men chịu áp suất thẩm thấu cao, gây đục rượu bảo quản.
Saccharomyces cerevisiae	Tái lên men đường sót.
Vi khuẩn	
Vi khuẩn acetic: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*	Mùi dấm, khi nồng độ acid acetic > 1,2g/l. Một số ester và acid khác sinh ra trong quá trình sinh trưởng hiếu khí. Làm quánh nhớt vang.
Vi khuẩn lactic	Những vi khuẩn này tương đối mẫn cảm với ethanol nhưng cũng có thể làm tăng độ acid (acid acetic và acid lactic) chủ yếu bởi nhóm lên men dị hình *Lactobacillus* và *Leuconostoc* spp.). Tạo vị mannitol (chủ yếu bởi *Lactobacillus brevis*). Quánh nhớt (*Pediococcus cerevisiae*). Sinh diacetyl (*Pediococcus* và *Lactobacillus* spp.). Mùi hôi (*Lactobacillus* spp.). Vị đắng (*Leuconostoc* spp.). Phân hủy acid tartaric (*Lactobacillus* spp.).
Clostridium spp.	Ít khi làm hỏng vang nhưng đôi khi có thể tạo mùi acid *n*-butyric trong rượu có độ acid thấp.
Bacillus spp.	Một số loài có thể mọc trong vang và sinh acid.
Actinomyces spp., *Streptomyces* spp.	Sinh mùi đất ẩm.
Bacteriophages	Ngăn cản lên men malolactic.
Nấm mốc	Mùi đất ẩm, do nấm mọc trên thùng gỗ hoặc trên nút.

4.3.1. Vai trò của nấm men

Với thành phần của dịch quả trình bày trong bảng 4.2, nấm men có thể sử dụng đường glucose và fructose trong dịch nho và chuyển hóa chúng theo con đường Embden–Meyerhof–Parnas thành pyruvate. Quá trình này cung cấp năng lượng và chất khử phục vụ sinh tổng hợp cho tế bào. Trong điều kiện kỵ khí, nấm men loại CO_2 khỏi pyruvate trong phản ứng xúc tác bởi enzyme pyruvate decarboxylase tạo ra acetaldehyde và CO_2. Trong bước tiếp theo, acetaldehyde được khử thành ethanol dưới tác động của enzyme alcohol dehydrogenase và NADH. Quá trình chuyển hóa glucose thành ethanol bởi *S. cerevisiae* có thể được diễn giải trong phương trình sau:

$$C_6H_{12}O_6 + 2Pi + 2ADP + 2H^+ \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$$

Ngoài ethanol và CO_2, còn một sản phẩm quan trọng nữa của quá trình lên men là glycerol. Nồng độ glycerol trong rượu vang có thể thay đổi trong khoảng từ 2-10g/l, tùy thuộc vào chủng loại nấm men và điều kiện lên men. Glycerol được tạo ra trong phản ứng sau:



Mặc dù glycolysis là quá trình cơ bản trong đồng hóa nguồn cacbon, một số chu trình khác cũng xảy ra trong quá trình lên men dịch nho. Trong số đó phải nhắc tới con đường pentose phosphate và chu trình acid citric. Hoạt động tương đối hạn chế của chu trình acid citric cũng tạo ra một nồng độ đáng kể acid succinic trong rượu vang (khoảng 0,5g/l). Quá trình đồng hóa các hợp chất chứa nitơ, lưu huỳnh cùng với các quá trình cơ bản kể trên tạo ra hàng trăm những hợp chất bay hơi, không bay hơi và sản phẩm phụ. Tổng thể tác dụng của những chất này tạo nên hương vị của rượu vang. Chúng bao gồm những nhóm sau:

- Cồn bậc cao: isoamyl alcohol, amyl alcohol, isobutanol, propanol, 2-phenylethanol.
- Ester: ethyl acetate, ethyl lactate, phenylethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl octanoate, ethyl hexanoate.
- Acid hữu cơ: succinic, tartaric, malic, lactic, acetic, citric.
- Aldehyde và ketone: acetaldehyde, diacetyl, acetoin.
- Hợp chất chứa lưu huỳnh: H_2S, SO_2, dimethyl sulphide.

Nồng độ tương đối của những thành phần kể trên phụ thuộc vào chủng giống nấm men sử dụng và điều kiện lên men, đặc biệt là nhiệt độ. Lên men vang trắng thông thường được tiến hành ở nhiệt độ 10 – 18°C (trong 7 – 14 ngày hoặc dài hơn), còn vang đỏ thường ở 20 – 30°C (trong vòng khoảng 7 ngày).

4.3.2. Giống khởi động

Các nhà máy rượu vang quy mô lớn hiện nay thường sử dụng những chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lựa chọn kỹ lưỡng làm giống khởi động thay vì dựa vào hệ vi sinh vật tự nhiên. Giống khởi động dạng khô được cung cấp bởi nhiều hãng khác nhau. Giống nấm men thông thường được tiếp ở nồng độ 10^6-10^7 tế bào/ml và sulphite được bổ sung nhằm hạn chế hoạt động của nấm men hoang dại và vi khuẩn. Giống khởi động không loại trừ hoàn toàn được sự phát triển của các chủng nội sinh như nấm men *S. cerevisiae* (dính trên thiết bị) và nấm men *Kloeckera apiculata* từ quả nho. Tuy nhiên, do giai đoạn khởi động (lag phase) của giống đưa vào tương đối ngắn, chúng có thể nhanh chóng chuyển hóa đường trong dịch quả thành cồn và hạn chế đáng kể khả năng cạnh tranh của vi sinh vật tự nhiên. Giống khởi động cần có những đặc tính sau:

- Di truyền: đồng hình nhị bội (thường là đa bội).
- Phát triển: pha khởi động ngắn hoặc không có; đặc tính 'killer'; chịu SO_2.
- Trao đổi chất: lên men nhanh và ổn định; hiệu suất chuyển hóa đường thành ethanol cao.
- Hương vị: nồng độ acid bay hơi hợp lý; thành phần hương vị phù hợp (esters, terpenes, acid succinic, glycerol) ; acetaldehyde thấp; thành phần các hợp chất chứa lưu huỳnh cân đối.
- Đặc điểm khác: bài tiết urea ngoại bào thấp (nhằm hạn chế khả năng sinh hợp chất ethyl carbamate có khả năng gây ung thư).

Những thành tựu của công nghệ sinh học và công nghệ lên men đã ảnh hưởng lớn tới lên men rượu vang. Một số thành quả được liệt kê trong bảng 4.4. Công nghệ tái tổ hợp ADN có ý nghĩa đặc biệt quan trọng và có triển vọng to lớn đối với việc nâng cao chất lượng chủng giống và chất lượng sản phẩm.

4.3.3. Vi sinh vậy gây thối hỏng

Sinh trưởng, phát triển và sản phẩm trao đổi chất của một số vi sinh vật trong quá trình lên men, hoặc tàng trữ có thể làm hỏng, hoặc ảnh hưởng xấu tới chất lượng rượu vang. Nhiều công đoạn trong sản xuất cũng như bản thân nguyên liệu có thể bị đe dọa bởi vi sinh vật gây thối hỏng. Bảng 4.5 liệt kê một số nhóm vi sinh vật và

những ảnh hưởng không tốt của chúng với rượu vang. Đảm bảo vệ sinh trong quá trình sản xuất là một yếu tố quan trọng nhằm tránh vi sinh vật tạp nhiễm và kiểm soát chất lượng. Ngoài ra, người ta còn sử dụng các kỹ thuật như loại trừ O_2 và bổ sung SO_2 nhằm hạn chế tác động không tốt của vi sinh vật gây hỏng vang. Sulphur dioxide (bổ sung ở dạng metabisulphite kali, natri hoặc khí SO_2) có hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hóa đã được sử dụng hàng trăm năm trong việc bảo quản rượu vang chống lại sự phát triển của vi sinh vật không mong muốn. Sulphur dioxide được bổ sung ở nồng độ có thể ức chế vi khuẩn lactic gây hỏng và nhóm nấm men có hại, nhưng không ảnh hưởng tới vi khuẩn lên men malolactic và nấm men rượu vang (*S. cerevisisae*). Hoạt lực diệt khuẩn của sulphur dioxide thể hiện bởi khả năng ức chế enzyme, tương tác với coezyme, protein, acid nucleic, khả năng phân hủy vitamin (ví dụ, thiamin), và làm giảm thiểu ATP nội bào. Đây là chất diệt khuẩn được sử dụng rộng rãi ở tất cả các quốc gia sản xuất rượu vang với nồng độ cho phép tương đối khác nhau, trong khoảng vài trăm mg/l. Tuy nhiên với những người mắc bệnh hen, sulphur dioxide có thể sẽ gây dị ứng từ mức độ nhẹ tới dị ứng cấp. Sulphur dioxide cũng ảnh hưởng tới da, hệ hô hấp và đường tiêu hóa. Chính vì vậy, hiện nay một số nhà sản xuất rượu vang chỉ dùng sulphur dioxide ở nồng độ rất thấp và những nghiên cứu tìm kiếm chất diệt khuẩn, chất chống oxy hóa, chất giữ hương thay thế cho SO_2 đang được tiến hành tích cực.

4.4. Bảo quản và sử dụng rượu vang

Nếu bảo quản đúng cách, rượu vang có thể được tàng trữ trong nhiều năm mà không bị hỏng hoặc mất phẩm chất. Yếu tố quan trọng nhất là hạn chế tiếp xúc với không khí. Sự có mặt của oxy trong không khí có thể khiến vi sinh vật phát triển trên bề mặt và tạo những hương vị không mong muốn, ví dụ như tạo vị chua của dấm. Oxy cũng khiến rượu vang mất mùi và mất màu. Nhằm tránh những biến đổi không mong muốn kể trên, khả năng tiếp xúc của vang với không khí cần được hạn chế tối đa. Thông thường vang được chứa đầy kín trong các thùng chứa nhằm hạn chế khoảng trống (không khí) trong thùng. Trong quá trình tàng trữ, người ta thường bổ sung rượu vang vào các thùng chứa nhằm bù lấp những khoảng trống xuất hiện khi rượu vang bị bay hơi. Thông thường, chai rượu vang được bảo quản ở trạng thái nằm ngang nhằm đảm bảo tiếp xúc trực tiếp giữa rượu vang và nút. Điều này sẽ hạn chế việc nút bị khô và khả năng thẩm thấu của không khí qua các khe hở tạo ra trên nút khô nứt. Vang đã đóng chai có thể bảo quản hàng chục năm trong hầm chứa ở nhiệt độ thấp (khoảng 16°C). Trong thời gian này, vang có thể tiếp tục tạo cặn ở dạng kết tủa hoặc dạng tinh thể. Phần kết lắng không độc hại và sự có mặt của chúng không có nghĩa là vang bị hỏng hay phương pháp bảo quản không hợp lý. Tinh thể kết tinh

thường là acid tartaric, một thành phần luôn có trong dịch nho. Tinh thể acid tartaric kết lắng dễ dàng và đôi khi bị người sử dụng nhầm tưởng chúng với những vụn thủy tinh.

Vang trắng và vang hồng thường được thưởng thức ở trạng thái ướp lạnh (khoảng 4 – 10°C). Lý do chủ yếu là những loại vang này có nồng độ hương tương đối thấp và dễ bay hơi. Khi đã hả hơi, vang sẽ trở nên nhạt nhẽo và vô vị. Ngược lại, vang đỏ vốn có nồng độ hương cao thường được sử dụng ở nhiệt độ phòng. Khi đó hương của vang bốc ra tốt hơn và do vậy sẽ hấp dẫn hơn so với khi sử dụng lạnh. Theo truyền thống, người ta dùng những loại ly riêng biệt cho các loại vang khác nhau nhằm đạt được hiệu ứng cao nhất cho mỗi loại vang. Vang đỏ đậm có thể được rót vào những ly có bầu lớn và miệng nhỏ. Bầu lớn giữ cho vang cuộn xoáy bên trong mà không tràn ra ngoài, đồng thời tăng cường diện tích bề mặt bay hơi. Miệng ly nhỏ nhằm giữ cho hương tập trung phía trên và người dùng có thể thưởng thức chúng dễ dàng. Vang có ga thường được rót vào những ly cao và hẹp. Loại ly này làm nổi bật những tăm khí nổi lên bề mặt rượu. Tuy vậy, rượu vang có thể được thưởng thức trong tất cả các loại ly khác nhau, và sở thích cá nhân mới thực sự là điều quan trọng. Hương vị của các loại rượu vang khác nhau là khác nhau và một số loại sẽ phù hợp hơn với một số món ăn nhất định. Những loại vang có hương vị nhẹ nhàng sẽ tương thích với những món ăn không quá mạnh về mùi vị. Cũng theo logic này, hương vị rượu quá mạnh có thể làm món ăn tinh tế trở nên nhạt nhẽo. Những chủ bàn ăn khéo léo là người có thể kết hợp hài hòa các món ăn và rượu đi kèm nhằm nhấn mạnh những hương vị đặc trưng của từng loại.

Chương V
CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ACID HỮU CƠ

Acid hữu cơ hiện nay được sử dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm. Các acid sau được sắp xếp theo thứ tự giảm dần về tầm quan trọng, đó là acid citric, acetic, lactic, tartaric, malic, gluconic, propionic và fumaric. Acid hữu cơ được sử dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm và công nghệ đồ uống bởi các đặc tính như độ hòa tan cao, hiếu nước, khả năng duy trì pH, khả năng liên kết với các ion hóa trị cao. Acid hữu cơ có thể được sản xuất bằng phương pháp hóa học, sinh học (lên men hoặc sử dụng enzyme), tách chiết từ các phụ phẩm sau khi lên men rượu...

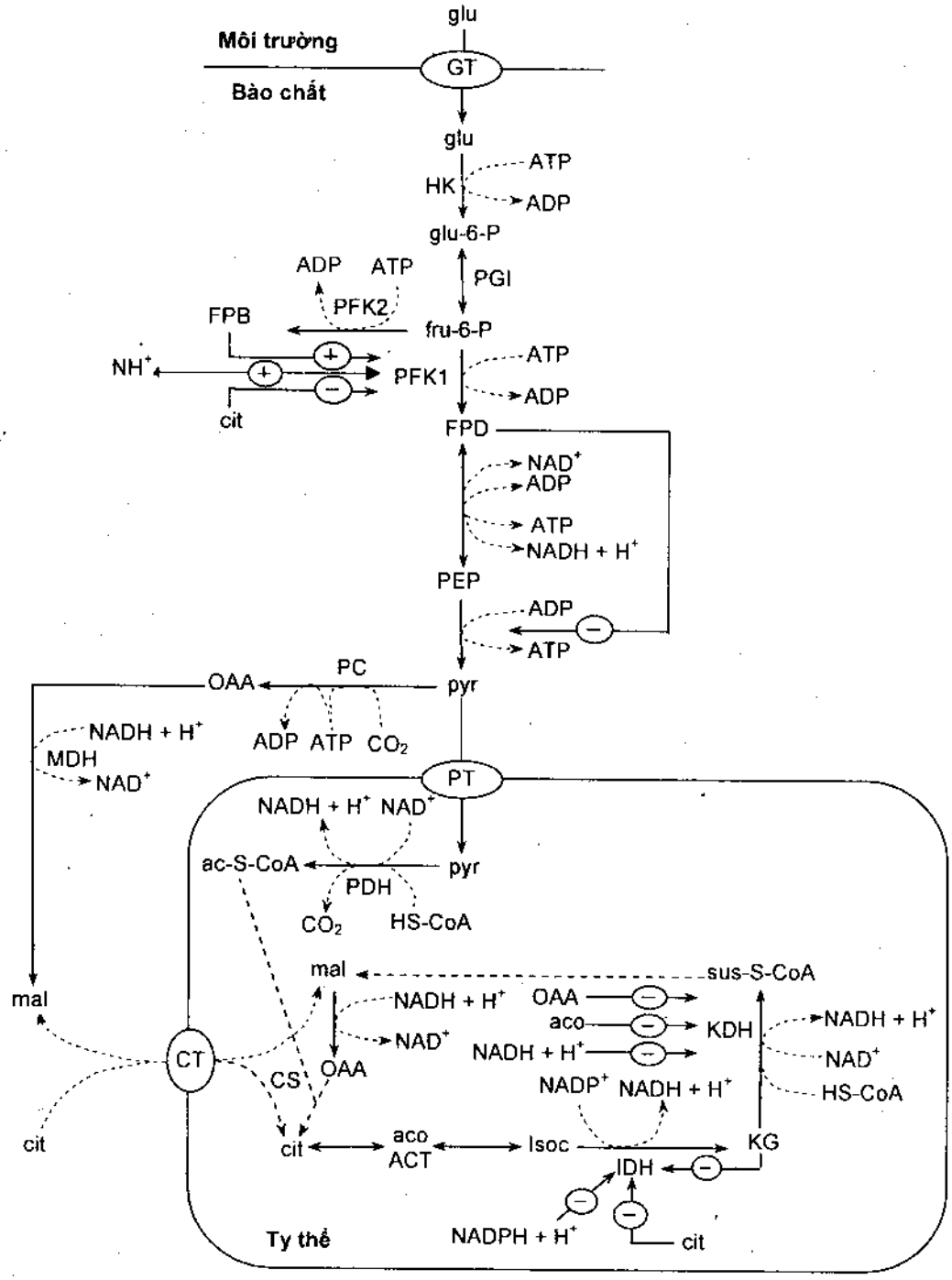
Về mặt sản lượng, acid citric và acid acetic chiếm khoảng ba phần tư tổng số acid hữu cơ sử dụng trong công nghiệp thực phẩm. Trong số đó acid citric có phổ ứng dụng lớn nhất. Trong phần này chúng tôi chỉ giới thiệu công nghệ sản xuất một số acid theo con đường lên men, đó là acid citric, acid gluconic và acid lactic.

1. ACID CITRIC

Acid citric (acid 2-hydroxy-1,2,3-propane-tricarboxylic: $C_6H_8O_7$) khá phổ biến trong các sản phẩm thiên nhiên như chanh, quả mâm xôi. Acid citric thương phẩm thường được cung cấp ở dạng ngậm một nước (phân tử lượng 210, tỷ trọng 1,542 ở 20°C). Đây là một acid mạnh với ba nhóm –COOH và hệ số phân ly tương ứng là $K_1 = 7{,}45.10^{-4}$; $K_2 = 1{,}73.10^{-5}$; $K_3 = 4{,}02.10^{-7}$. Acid citric tan trong nước và tạo vị chua dễ chịu. Acid citric lần đầu tiên được tinh chế vào năm 1784 bởi Scheele bằng phương pháp kết tủa citrat canxi khi bổ sung hydroxit canxi vào nước chanh. Trước năm 1920, acid citric được sản xuất chủ yếu ở Sicily từ chanh và công ty Arenella (Palermo) khi đó hầu như độc quyền về lĩnh vực này cho tới khi công nghệ lên men tạo acid citric được thực hiện ở Bỉ, năm 1919 và Mỹ, năm 1923.

1.1. Sinh tổng hợp acid citric

Acid citric được tổng hợp bởi một số loại vi nấm (*Penicillium* spp., *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *Trichoderma viride*), nấm men (*Yarrowia lipolytica*, *Candida guilliermondii*) và vi khuẩn (*Arthrobacter*) trên các môi trường khác nhau (glucose, sucrose, *n*-alkanes). Ở quy mô công nghiệp, acid citric được sản xuất từ đường (glucose, sucrose) sử dụng nấm *A. niger*, hoặc trên một số cơ chất khác (glucose, sucrose, *n*-alkanes) sử dụng nấm men. Các chủng công nghiệp là một phần của bí quyết công nghệ và khó có thể có được, tuy nhiên một số chủng từ các bảo tàng giống quốc tế cũng có thể ứng dụng cho sản xuất acid citric. Những chủng này bao gồm: *A. niger* NRRL 2270, NRRL 599, ATCC 11414 và ATCC 9142; hay *Y. lipolytica* ATCC 20346, ATCC 20390, NRRL Y-7576 và NRRL Y-1095.



Hình 5.1. **Quá trình trao đổi chất trong siêu tổng hợp acid citric ở *Aspergillus niger***

Các enzyme quan trọng, yếu tố ức chế (–) và kích thích (+) được thể hiện trong sơ đồ. *Enzyme và hệ thống vận chuyển*: GT - hệ thống vận chuyển glucose; HK - hexokinase; PGI, phosphoglucose isomerase; PFK1, phosphofructokinase; PFK2, 6-phosphofructo-2-kinase; PK, pyruvate kinase; PC, pyruvate carboxylase; MDH, malate dehydrogenase; PT, hệ thống vận chuyển pyruvate; CT, hệ thống vận chuyển citrate; PDH, pyruvate dehydrogenase; CS, citrate synthase; ACT, conitase; IDH, isocitrate dehydrogenase; KDH -ketoglutarate dehydrogenase. *Cơ chất và sản phẩm*: glu, glucose; glu-6-P, glucose-6-phosphate; fru-6-P, fructose-6-phosphate; FDP, fructose-1,6-bisphosphate; FBP, fructose-2,6-bisphosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; pyr, pyruvate; OAA, oxaloacetate; mal, malate; cit, citrate; ac-S-CoA, acetyl-coenzyme A; aco, *cis*-aconitate; isoc, isocitrate; KG -ketoglutarate; suc-S-CoA, succinyl-coenzyme A.

Sơ đồ chuyển hóa vật chất trong quá trình siêu tổng hợp acid citric ở *A. niger* được trình bày trong hình 5.1. Yếu tố quan trọng cho siêu tổng hợp acid citric là tốc độ chuyển hóa cao của cơ chất qua quá trình glycolys (5–10mmol.min^{-1}.mg protein^{-1}), hạn chế chu trình tricarboxylic acid (TCA) phân hủy citric acid, và cung cấp oxaloacetate cho tổng hợp citric acid. Các enzyme quan trọng điều hòa sinh tổng hợp acid citric là phosphofructokinase (PFK1), pyruvate carboxylase (PC), citrate synthase (CS) và ketoglutarate dehydrogenase (KDH). PFK1 bị ức chế bởi citrate, tuy nhiên quá trình này được hạn chế bởi nồng độ NH_4^+ cao và sự tích lũy fructose-2,6-biphosphate (FBP). Enzyme 6-phosphofructo-2-kinase (PFK2) chịu trách nhiệm cho sinh tổng hợp FBP ít bị điều hòa và chỉ ảnh hưởng bởi nồng độ cơ chất. Việc điều hòa enzyme pyruvate kinase (PK) ít ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp acid citric. Hoạt lực CS của *A. niger* bị ảnh hưởng bởi nồng độ OAA sản sinh ra trong phản ứng xúc tác bởi enzyme pyruvate carboxylase (PC), một enzyme nằm trong tế bào chất và được kích hoạt bởi nồng độ đường cao. Malate được tạo ra từ OAA bởi enzyme malate dehydrogenase trong tế bào chất. Malate tham gia vào vận chuyển trao đổi citrate qua thành ty thể. Trong ty thể, malate được oxy hóa trở lại thành OAA. Trong điều kiện bình thường (không có sự tích lũy của citrate), citrate được chuyển hóa trong ty thể bởi aconitase (ACT), isocitrate dehydrogenase (IDH) và KDH. Citrate, OAA và NADH có tác động ức chế lên KDH và IDH.

Mặc dù việc điều tiết hoạt động của enzyme là thiết yếu trong quá trình chuyển hóa dẫn tới siêu tổng hợp acid citric, để kiểm soát tốc độ chuyển hóa quan trọng nhất vẫn là điều tiết vận chuyển glucose và hoạt độ của hexokinase (HK). Hệ vận chuyển glucose ái lực thấp (K_m = 3,67mmol) được kích hoạt bởi nồng độ đường và hoạt động trong quá trình siêu tổng hợp acid citric. Hệ vận chuyển này chỉ bị ức chế một phần bởi pH thấp và nồng độ citrate cao. Việc nâng cao hoạt lực sinh acid citric chủ yếu được thực hiện thông qua đột biến và sàng lọc với luận điểm là khả năng thể hiện của HK và hệ vận chuyển glucose đóng vai trò chính trong siêu tổng hợp acid citric.

Các enzyme trong hệ oxy hóa cũng đóng vai trò trong quá trình siêu tổng hợp acid citric. Trong siêu tổng hợp acid citric, NADH tạo ra sau glycolys được oxy hóa lại thông qua một con đường mới mẫn cảm với acid salicyl hydroxamic (SHAM). Sự biến đổi này so với hoạt động thông thường xuất phát từ việc enzyme NADH–UQ-oxidoreductase và các enzyme khác trong hệ oxy hóa bị ức chế hoặc bất hoạt.

Điều kiện cần thiết cho siêu tổng hợp acid citric đối với *A. niger* bao gồm việc tăng nồng độ đường, giảm thiểu mangan. Ngoài ra, một số yếu tố khác cũng khá quan trọng như nồng độ phosphate, nitơ, kim loại vi lượng, pH thấp và nồng độ oxy hòa tan cao. Nồng độ rất thấp của mangan (< 10mg.m^{-3}) đóng vai trò quyết định trong

siêu tổng hợp acid citric bởi đây là nguyên nhân dẫn tới sự hạn chế hoạt động của con đường pentose phosphate, gia tăng glycolys, tăng nồng độ NH_4^+ nội bào, tăng sự quay vòng của protein và acid nucleic, biến đổi thành phần lipid màng, cấu trúc thành tế bào (hình thái tế bào do vậy cũng biến đổi).

Siêu tổng hợp acid citric ở nấm men không phụ thuộc nhiều vào nồng độ kim loại vi lượng mà chủ yếu được kích hoạt bởi hạn chế dinh dưỡng (nitơ, sulphur, phosphor hoặc magie) và sau đó là sự gia tăng sử dụng glucose. Tỷ lệ ATP/AMP cao lúc này sẽ dẫn tới sự ức chế của enzyme IDH. Những phản ứng quan trọng bao gồm việc tổng hợp OAA từ pyruvate (xúc tác bởi PC) khi sử dụng glucose và các phản ứng trong chu trình glyoxylate đối với cơ chất là *n*-alkanes. Với nấm men, isocitrate có thể tích lũy ở mức 10-50% so với tổng citrate tạo ra và điều này được lý giải bởi khả năng vận chuyển qua màng ty thể của isocitrate cao hơn so với citrate. Nồng độ citrate nội bào thấp cũng hạn chế được sự ức chế ngược của citrate đối với glycolys. Việc nâng cao hoạt lực chủng giống nấm men sinh acid citric được thực hiện thông qua việc lựa chọn chủng giống có hoạt lực isocitrate dehydrogenase và aconitase thấp.

1.2 Công nghệ sản xuất acid citric

Hiện nay acid citric được sản xuất bằng công nghệ lên men chìm hoặc lên men bề mặt sử dụng *A. niger* trên cơ chất là rỉ đường hoặc siro glucose. Cả hai công nghệ này đều cho kết quả tương đương. Tuy nhiên, hiện nay công nghệ lên men chìm được lựa chọn bởi công ty sản xuất acid citric lớn nhất thế giới (Bayer, ADM, Jungbunzlauer & Cargill) có lẽ do đòi hỏi đầu tư ban đầu và nhân công thấp. Công nghệ lên men bề mặt hiện được công ty Citrique Belge (Bi) và Cerestar (Italy) sử dụng bởi lý do là công nghệ này dễ kiểm soát và có tiêu hao năng lượng thấp.

Trong công nghệ lên men chìm, quá trình lên men được thực hiện trong những tank lên men có cánh khuấy dung tích 150 – 200m^3, hoặc trong những cột lên men thổi khí với dung tích 300 – 500m^3 (thậm chí tới 1000m^3 như một số công ty thông báo). Ưu thế nổi bật của công nghệ lên men chìm so với lên men bề mặt là khả năng chống tạp nhiễm, tự động hóa trong tiếp giống và lên men, thời gian lên men ngắn và năng suất cao.

Sản xuất acid citric sử dụng nấm men đã được thử nghiệm bằng phương pháp lên men chìm với cơ chất là đường, hoặc hydrocacbon và cho thấy nhiều ưu điểm so với lên men sử dụng nấm như không bị ảnh hưởng nhiều bởi kim loại vi lượng và tốc độ lên men cao hơn. Tuy nhiên cho tới nay, trên thực tế không có công ty nào sử dụng nấm men trong sản xuất acid citric. Nhà máy xây dựng trên công nghệ này ở Southport (NC, US) đã đóng cửa năm 1982 sau 3 – 4 năm hoạt động. Tương tự như vậy, nhà máy Liquichimica (Saline, Italy) cũng chưa bao giờ được đưa vào sản xuất.

1.2.1. Môi trường lên men

Như đã trình bày ở phần trên, siêu tổng hợp acid citric được thực hiện trên môi trường có nồng độ đường cao (rỉ đường hoặt siro) và sự phát triển của sợi nấm bị hạn chế bởi các yếu tố dinh dưỡng như phospho, mangan, sắt hoặc kẽm. Thành phần chung của môi trường được trình bày trong bảng 5.1.

Bảng 10. **Thành phần môi trường sử dụng trong phòng thí nghiệm và trong sản xuất acid citric bằng nấm mốc *Aspergillus niger***

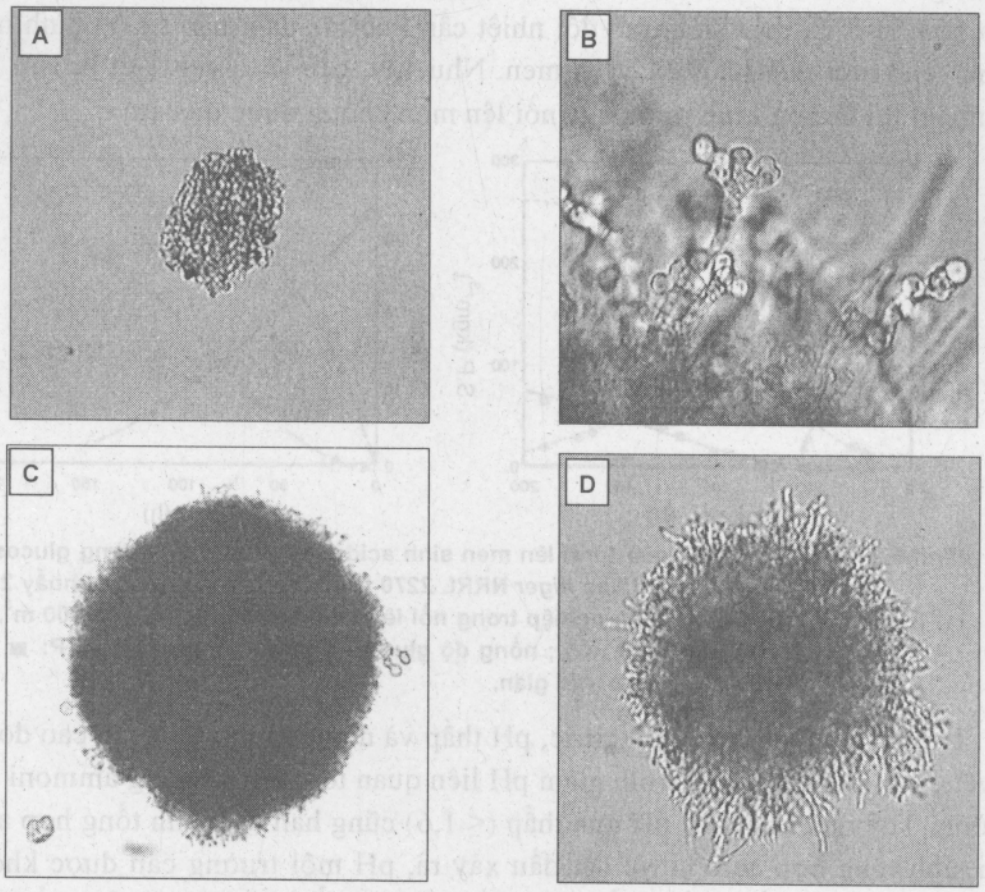
Thành phần	Khoảng giá trị	Giá trị chung
Sucrose hoặc glucose	125 – 225kgm^{-3}	180kgm^{-3}
NH_4NO_3 (hoặc muối NH_4^+ khác)	0,5 – 3,5kgm^{-3}	1,5kgm^{-3}
KH_2PO_4	0,5 – 2kgm^{-3}	0,5kgm^{-3}
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 – 2,0kgm^{-3}	0,25kgm^{-3}
Fe^{++}	2 – 1300mgm^{-3}	< 200mgm^{-3}
Zn^{++}	0 – 2900mgm^{-3}	200–1500*mgm^{-3}
Cu^{++}	1 – 10200mgm^{-3}	200–1500*mgm^{-3}
Mn^{++}	0 – 46mgm^{-3}	< 2mgm^{-3}

* Các giá trị ngưỡng trên sử dụng nhằm khắc phục các hiệu ứng bất lợi của sắt và mangan lên cấu trúc sợi và để đảm bảo hình thái chuẩn của nấm.

Nguồn nitơ thông thường được sử dụng là nitrate ammon hoặc sulphate ammon. Ion kim loại được loại ra khỏi môi trường trong bước xử lý nguyên liệu, đặc biệt với rỉ đường, bằng trao đổi cation hoặc/và bổ sung hexacyanoferrate kali (HCF). Nồng độ sắt tối ưu phụ thuộc vào từng chủng nấm, tuy nhiên nồng độ sắt trên 200mgm^{-3} được biết là có khả năng ức chế sinh tổng hợp acid citric. Hiệu ứng ức chế của ion sắt có thể được hạn chế bằng cách bổ sung thêm Cu^{2+} hoặc Zn^{2+} trong quá trình nuôi cấy giống, hoặc trong giai đoạn đầu trên môi trường tổng hợp acid citric. Nồng độ Mn^{2+} cần được giữ ở mức độ càng thấp càng tốt (<10mgm^{-3} trong môi trường phosphate loãng). Một số thành phần như 3 – 6% (w/v) methanol; 0,1 – 0,5% (w/v) dầu ngô, lạc hoặc oliu; 0,025 – 0,5% (w/v) tinh bột được biết là có tác dụng tốt lên sinh tổng hợp acid citric. Môi trường được thanh trùng theo mẻ ở 121°C trong 15 – 30 phút ở quy mô pilot và phòng thí nghiệm. Trong sản xuất công nghiệp, quá trình thanh trùng được thực hiện liên tục bằng sử dụng đĩa trao đổi nhiệt ba giai đoạn.

1.2.2. Quá trình lên men

Việc tiếp giống thông thường được thực hiện trong điều kiện vô trùng bằng cách chuyển bào tử từ giống gốc sang môi trường agar (trong các khay nông, đĩa petri, ống nghiệm). Sau 3 – 6 ngày nuôi cấy ở 30°C, bào tử được thu hoạch và nuôi cấy trên môi trường tinh bột để tạo khoảng 10^{11} bào tử cho một centimet khối môi trường. Sinh khối có thể được truyền trực tiếp vào nồi lên men dung tích 10 – 20m^3 để tạo giống dạng hạt chứa 1 – 5 × 10^5 hạt cho một lít môi trường. Mỗi hạt có đường kính khoảng 0,1 – 0,2mm. Giống dạng hạt được tiếp sang môi trường lên men công nghiệp với nồng độ (5 – 10% (v/v)).



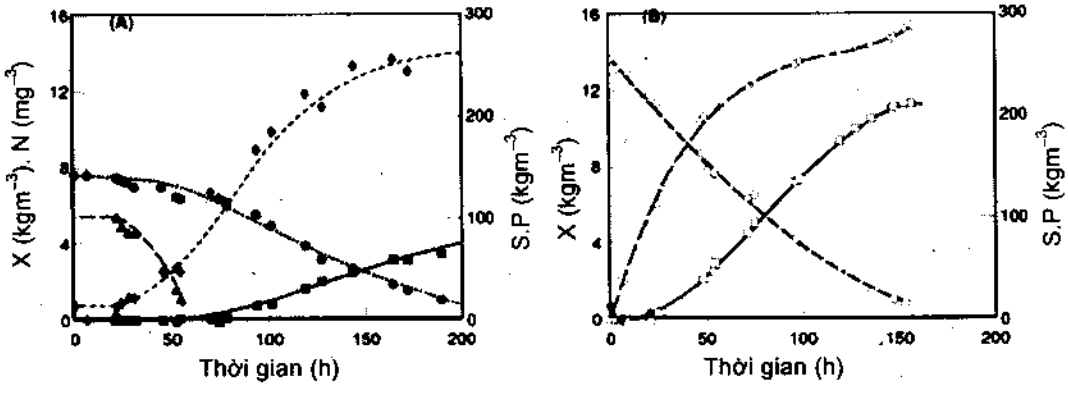
Hình 5.2. **Hình thái hạt nấm *Aspergillus niger* (NRRL 2270) trong quá trình sản xuất acid citric ở quy mô phòng thí nghiệm sử dụng thiết bị lên men cánh khuấy 2 lít**

(A) - hạt non (×100) ; (B) - Dạng sợi ngắn, mập và phân nhánh nhiều, thích hợp cho sinh tổng hợp acid citric; (C) - hạt chắc (×40) ; (D) - dạng hạt phân rã, với những sợi nấm ít phân nhánh, dài và thò ra khỏi hạt nấm (×100).

Nấm có thể phát triển với các đặc điểm hình thái khác nhau như trình bày trong hình 5.2. Việc hình thành các sợi nấm rời rạc dài và không phân nhánh cần phải tránh vì có thể làm tăng mạnh độ nhớt môi trường, giảm khả năng trao đổi oxy và lượng acid citric tạo ra thấp, thậm chí không tạo ra. Dạng hạt hình cầu, nhỏ với những sợi

ngắn và mập (hình 5.2B) thông thường được coi là tốt nhất cho sinh tổng hợp acid citric. Việc theo dõi thường xuyên hình thái của hạt nấm dưới kính hiển vi là điều cần thiết nhằm kiểm soát sự phát triển của sợi nấm. Trong trường hợp nấm phát triển theo hướng không mong muốn (Hình 5.2D), việc bổ sung một số chất ức chế như HCF, $ZnSO_4$, hoặc $CuSO_4$ là cần thiết. Trong thiết bị lên men cánh khuấy, tốc độ đẩy lớn có tác dụng tốt cho việc hình thành các hạt nấm nhỏ.

Quá trình lên men sẽ sản sinh nhiệt và cần thiết phải đảm bảo nhiệt độ lên men trong khoảng 28 – 35°C bằng các thiết bị làm lạnh. Nếu hệ số truyền nhiệt chung vào khoảng $500kJm^{-2}h^{-1}$ và chênh lệch nhiệt độ thực tế giữa dịch lên men và dung dịch làm lạnh là 5°C, diện tích trao đổi nhiệt cần thiết để đảm bảo sự ổn định nhiệt độ là $3,2m^2$ cho một mét khối dịch lên men. Như vậy, nếu sử dụng thiết bị làm lạnh bằng vỏ ngoài thì đường kính trong của nồi lên men không được quá 1m.



Hình 5.3. **Động học của quá trình lên men sinh acid citric trên môi trường glucose (A) bởi chủng *Aspergillus niger* NRRL 2270 trong nồi lên men cánh khuấy 2 lít và (B) bởi chủng công nghiệp trong nồi lên men thổi khí dung tích 400 m³. Sinh khối nấm sợi (X: ♦, ◊) ; nồng độ glucose (S: ●, ○), acid citric (P: ■ , □), ammoni (N: △) theo thời gian.**

Trong siêu tổng hợp acid citric, pH thấp và nồng độ oxy hòa tan cao đóng vai trò quyết định. Ban đầu, quá trình giảm pH liên quan tới việc sử dụng ammoni trong môi trường. Tuy nhiên, giá trị pH quá thấp (< 1,6) cũng hạn chế sinh tổng hợp acid citric. Khi sinh tổng hợp acid citric bắt đầu xảy ra, pH môi trường cần được khống chế ở giá trị 2,2 – 2,6 bằng việc bổ sung kiềm (NH_3). Ở pH dưới 3, sinh tổng hợp acid oxalic và acid gluconic sẽ được hạn chế. Với tốc độ sinh acid citric thông thường trong lên men công nghiệp (khoảng 1 – $1,5kgm^{-3}h^{-1}$) nấm mốc sẽ có nhu cầu oxy là 0,3 – $0,5\ kgm^{-3}h^{-1}$. Cung cấp oxy có thể được đảm bảo bằng cách bơm 0,1-0,4 thể tích không khí cho một đơn vị thể tích dịch trong một phút ($vv^{-1}min^{-1}$) với áp suất vào không nhỏ hơn 0,3 – 0,4MPa và áp suất phía trên của nồi lên men vào khoảng 0,25 – 0,35 hoặc 0,12 – 0,15MPa phụ thuộc vào loại nồi lên men được sử dụng (cánh khuấy hoặc thổi khí). Quá trình tạo bọt được khống chế bằng việc bổ sung các chất phá bọt thích hợp. Gián đoạn nhất thời trong việc cung cấp không khí không ảnh hưởng

nhiều tới quá trình nếu nồng độ oxy hòa tan lớn hơn giá trị 20% của nồng độ bão hòa. Nếu lượng oxy hòa tan dừng ở mức gần 0 trong 85 phút, sau đó việc cấp khí khôi phục lại bình thường, sinh trưởng và tổng hợp acid citric sẽ không vì thế mà mất hẳn, tuy nhiên sản lượng citric đạt được sẽ giảm khoảng 20%.

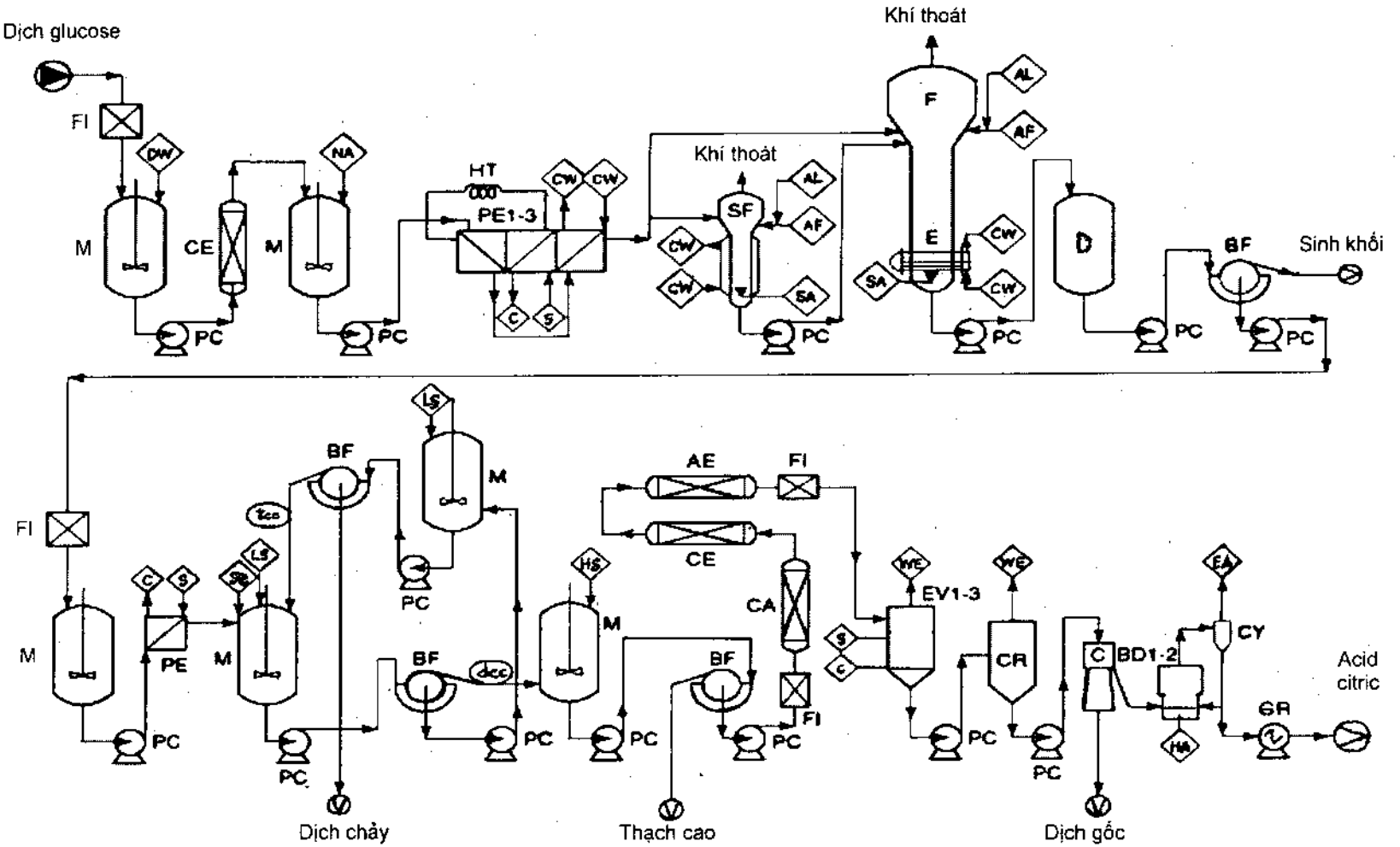
Giả thiết nếu nguồn cacbon không được chuyển hóa thành sinh khối, CO_2 hoặc các sản phẩm phụ khác thì cứ mỗi kilogram glucose sau lên men sẽ thu được 1,17kg acid citric ngậm một nước. Trên thực tế sản xuất công nghiệp, hiệu suất của quá trình chỉ đạt 57% tới 77% của hiệu suất chuyển hóa lý thuyết. Trong hai giá trị kể trên, giá trị thấp là giá trị đạt được trong lên men bề mặt.

1.2.3. Thu hồi và tinh chế acid citric

Dịch acid citric sau lên men ở cả phương pháp chìm và bề mặt đều được xử lý tương tự như nhau. Thu hồi acid citric có thể được thực hiện theo một trong 3 phương pháp: kết tinh trực tiếp khi cô đặc dịch lọc; kết tủa ở dạng tetrahydrate citrat canxi; hoặc bằng phương pháp chiết pha lỏng. Sự có mặt của tạp chất trong ri đường sẽ không cho phép kết tủa trực tiếp trừ khi môi trường tinh khiết được sử dụng. Phương pháp chiết tách lỏng chỉ được thực hiện bởi một công ty (Bayer). Phương pháp phổ biến nhất vẫn là kết tủa citrat. Lược đồ cơ bản của quá trình này được trình bày trong hình 5.4.

Sinh khối nấm và các chất không tan được lọc dùng hệ thống lọc băng liên tục. Citrat canxi được kết tủa từ dịch lọc bằng cách bổ sung hydroxit canxi (vôi). Nhiệt độ thực hiện quá trình này ảnh hưởng trực tiếp tới dạng sản phẩm. Ở 70°C, sản phẩm chủ yếu là tricalcium citrate tetrahydrate vô định hình. Ở 90°C, sản phẩm chủ yếu lại là dicalcium hydro citrate tinh thể. Trong trường hợp lên men chìm, việc loại bỏ acid oxalic là không cần thiết bởi trong quá trình này, pH môi trường có thể dễ dàng khống chế. Lượng acid citric còn sót lại trong dịch lọc có thể được kết tủa một lần nữa bằng cách bổ sung vôi cho tới khi pH đạt giá trị 5,8.

Phần kết tủa được lọc tiếp bằng một băng lọc khác và phần dịch được loại bỏ. Kết tủa ở dạng dicalcium hydro citrate sử dụng ít canxi hydroxit hơn và tương tự như vậy cũng cần ít acid sulfuric hơn trong quá trình chuyển hóa tiếp theo. Dicalcium hydro citrate cũng dễ lọc và rửa hơn do đặc tính tinh thể của nó. Tuy nhiên, để tạo tinh thể dạng này cũng cần lượng tinh thể mồi cao hơn (10 – 25% mồi). Việc rửa phần kết tủa nhằm loại các tạp chất bám theo như đường, protein thủy phân từ sinh khối nấm. Các tinh thể sau khi rửa và acid sulfuric 98% được chuyển đồng thời (nhưng riêng biệt) vào hỗn hợp chứa 40% acid citric pH 0,5 – 0,6. Phản ứng tiếp theo sẽ tạo ra acid citric và tủa dihydrate sulphate canxi (thạch cao). Trong bước tiếp theo, dịch lọc được xử lý loại màu bằng than hoạt tính. Sau đó các ion kim loại, sulphate canxi còn sót được loại bỏ bởi cột trao đổi cation mạnh và anion yếu (bước loại khoáng). Dung dịch (chứa 250 – 280kgm^{-3} acid citric khan) sau đó được cô tới nồng



Hình 5.4. **Sơ đồ công nghệ sản xuất acid citric theo phương pháp lên men sử dụng nấm *Aspergillus niger* trên môi trường glucose**

Thiết bị và phụ kiện: AE, thiết bị trao đổi anion; AF, chất phá bọt; AL, chất kiềm; BD, thiết bị sấy tầng sôi; BF, lọc băng chuyền; C, ly tâm; c, ngưng kết; CA, than hoạt tính; CE, trao đổi cation; CR, kết tinh chân không; cw, nước lạnh; CY, cyclone; D, thùng chứa; dcc, dicalcium citrate; DW, nước khử ion; E, trao đổi nhiệt; EA, khí thải; EV, cô; F, nồi lên men thổi khí; FI, màng lọc vô khuẩn; GR, nghiền; HA, khí nóng; HS, acid sulphuric; HT, ống lưu; LS, dịch vôi; M, máy khuấy; NA, dinh dưỡng và chất bổ trợ; PC, bơm ly tâm; PE, trao đổi nhiệt tấm; S, hơi áp suất thấp; SA, khí nén vô trùng; Se, mồi dicalcium citrate; SF, giống cho nổi lên men thổi khí; tcc, tricalcium citrate; WE, nước bay hơi.

độ 700kgm^{-3} và chuyển vào hệ thống kết tinh chân không hoạt động ở nhiệt độ 35°C hoặc 62°C, có nghĩa là trên hoặc dưới nhiệt độ chuyển hóa (36,6°C) giữa dạng khan và dạng monohydrate phụ thuộc vào dạng sản phẩm mong muốn. Tinh thể acid citric được tách bằng ly tâm và làm khô trong hệ thống sấy tầng sôi hai giai đoạn. Giai đoạn đầu sử dụng khí nóng 90°C và giai đoạn hai sử dụng khí ở 20°C với độ ẩm tương đối là 30 – 40% bởi các tinh thể tạo ra rất háo nước. Khoảng 20% dịch gốc được hòa loãng với nước rửa thiết bị, loại màu, và chuyển ngược về bước xử lý bằng canxi hydroxide. Phần còn lại của dịch gốc được loại màu, loại khoáng và quay về bộ phận kết tinh. Theo phương pháp này, acid citric tinh thể không đòi hỏi các bước tinh chế tiếp theo để đạt được các tiêu chuẩn USP (US Pharmacopeia) hay FCC (Food and Chemical Codex).

Trong quy trình tách chiết pha lỏng, acid citric được tách từ dịch lên men sử dụng hỗn hợp trilaurylamine, *n*-octanol và C_{10}- hoặc C_{11}-isoparafin. Dịch chiết được gia nhiệt và rửa bằng nước theo chiều ngược tạo ra sản phẩm là dịch acid citric. Dịch thu acid sau đó được xử lý bằng cột than hoạt tính, cô đặc và kết tinh như trong quy trình nêu trên.

1.3. Một số hướng tương lai trong sản xuất acid citric

Sản xuất acid citric không nhận được nhiều quan tâm của sinh học phân tử, một phần có lẽ đây là lĩnh vực đã khá hoàn thiện. Việc nâng cao hoạt lực chủng giống *A. niger* được thực hiện chủ yếu thông qua đột biến và chọn lọc. Hiện nay, với những hiểu biết tích lũy về các cơ chế điều hòa, việc cải biến quá trình chuyển hóa có thể thực hiện được. Công nghệ lên men mẻ có thể được thay bằng công nghệ lên men bán liên tục nhằm nâng cao năng suất và hạ giá thành. Tuy nhiên, đây là công việc không khả thi do hệ sợi của nấm bị phá hủy trong quá trình lên men. Lý do của vấn đề này vẫn chưa có lời giải đáp. Hiệu ứng của ammoni trong ngăn ngừa khả năng ức chế PFK_1 bởi acid citric đã được bàn luận trong phần sinh tổng hợp. Ngoài ra, khi nồng độ NH_4^+ nội bào giảm dưới mức 1mmol/g sinh khối khô, sinh tổng hợp acid citric bị ngưng lại, nấm thay đổi hình thái theo hướng bất lợi và có thể bắt đầu tạo bào tử và sắc tố. Điều này có thể được ngăn ngừa bằng cách bổ sung ion ammoni ở nồng độ thấp (30gm^{-3}, tương đương với 2mmol NH_4^+ nội bào/g sinh khối khô) trong quá trình lên men. Nếu điều này được khẳng định, chỉ cần ở quy mô pilot trong thời gian lên men dài nó có thể dẫn đến một sự thay đổi toàn diện trong sản xuất acid citric. Tương tự như vậy, khả năng cố định sinh khối nấm bằng vật liệu vô cơ hoặc hữu cơ và sử dụng trong thời gian nhiều tuần, hoặc vài tháng đang còn là một thách thức. Công nghệ thu hồi truyền thống làm phát sinh một số vấn đề liên quan tới việc

xử lý dịch thải (với COD khoảng 20kgm^{-3}) và chất thải rắn (cụ thể là khoảng 0,15kg sinh khối khô, 2kg thạch cao cho mỗi kilogram acid citric khan). Một số công nghệ đã được đề xuất nhằm giảm thiểu tác động đối với môi trường. Một trong số đó là thay thế nguyên liệu rỉ đường bằng tinh bột thủy phân, nhằm giảm độ phức tạp trong quá trình thu hồi. Acid citric có thể thu hồi thông qua một bước duy nhất nếu thu hồi tricalcium citrate từ dịch lên men đã lọc và loại màu bằng điện ly giải và acid citric được hấp phụ lên nhựa trao đổi anion yếu hoặc zeolite sử dụng kỹ thuật sắc ký trao đổi ion pha rắn chuyển động. Sản phẩm sau đó có thể được thu hồi bằng nước, acid loãng hoặc sử dụng màng lỏng. Hướng phát triển này sẽ hạn chế được lượng chất thải rắn tạo ra và do vậy sẽ giảm thiểu chi phí xử lý.

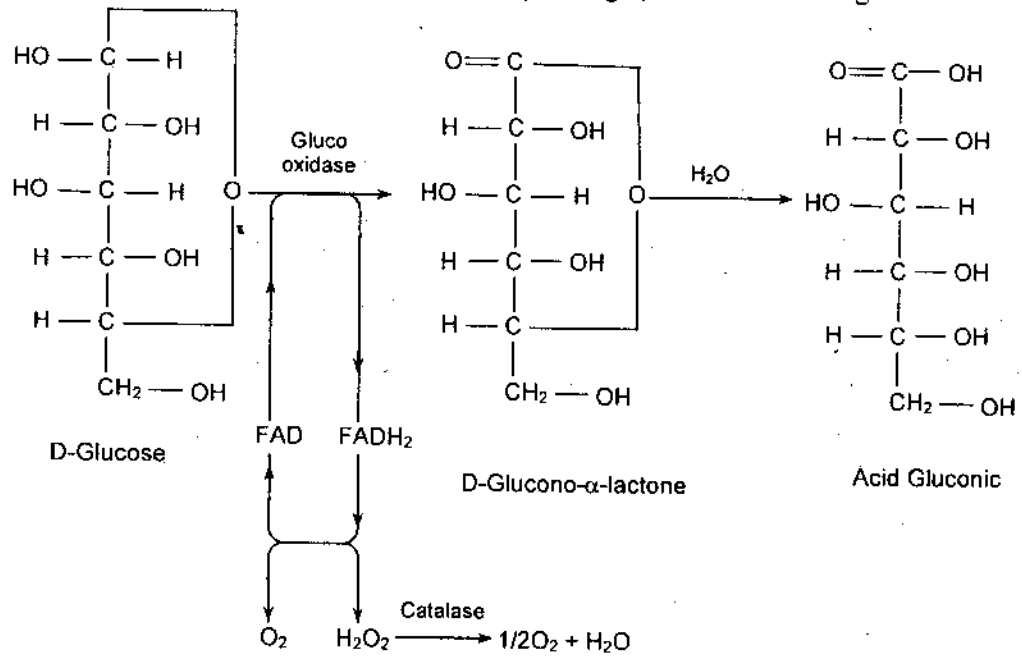
2. ACID GLUCONIC

Acid D-gluconic (acid 1,2,3,4,5 - pentahydroxypentane-1-carboxylic: $C_6H_{12}O_7$) là sản phẩm oxy hóa của D-glucose. Trong dung dịch, acid gluconic có xu hướng ester hóa tạo ra một hệ cân bằng phức tạp giữa acid gluconic và hai lactone là 1,5-lactone (D-glucono-δ-lactone) và 1,4-lactone (D-glucono-γ-lactone). Acid D-gluconic thương phẩm ở dạng 50% trong nước (tỷ trọng 1230kgm^{-3} ở 20°C; pH 1,82). Acid gluconic và các dạng của nó được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp dược phẩm, thực phẩm, trong thức ăn gia súc và trong công nghiệp hóa chất. Đặc tính ứng dụng quan trọng của acid gluconic bao gồm độc tính cực thấp, khả năng tạo phức tan với các ion kim loại (như Ca^{2+}, Fe^{3+}), đặc biệt khi có mặt của 5-10% hydroxit natri. Gluconat natri là sản phẩm công nghiệp chủ chốt. Nó được sử dụng như chất tẩy (trong rửa chai lọ, làm sạch bề mặt kim loại và tẩy gỉ), nó còn được sử dụng như tác nhân nhựa hóa và làm chậm lại quá trình đông cứng của xi măng. Gluconate sắt hoặc canxi còn được sử dụng để chữa các bệnh liên quan đến việc thiếu một trong những kim loại kể trên. D-Glucono-δ-lactone được sử dụng như một acid yếu trong bột bánh nướng, trong chế biến thịt và là một thành phần của bột nở hóa học cho bánh mỳ. D-glucono-γ-lactone chỉ được sản xuất ở quy mô rất nhỏ.

2.1. Tổng hợp acid gluconic

Phản ứng chuyển hóa glucose thành acid gluconic là một phản ứng oxy hóa đơn giản và trước kia phương pháp hóa học được sử dụng. Tuy nhiên, hiện nay ứng dụng lên men đang là công nghệ được lựa chọn. Gluconat canxi lần đầu tiên được phân lập năm 1880 từ dịch lên men glucose bởi nấm *Mycoderma aceti* với sự có mặt của carbonat canxi. Sản xuất acid gluconic công nghiệp bắt đầu vào năm 1923 bởi Chas. Pfizer & Co., New York. Sau đó nghiên cứu của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ đã đưa ra

công nghệ sản xuất gluconat natri theo phương pháp bán liên tục sử dụng chủng *A. niger* NRRL 67. Nhiều loại nấm thuộc chi *Penicillium, Aspergillus* và vi khuẩn (*Gluconobacter suboxydans*, *Pseudomonas ovalis*, *Gluconobacter* spp.) cũng có khả năng sinh acid gluconic trên môi trường glucose. Tuy nhiên, sản xuất acid gluconic ở quy mô công nghiệp cho tới nay chỉ được thực hiện đối với *Aspergillus niger* và sử dụng dịch glucose. Các chủng công nghiệp nói chung không dễ có được, tuy nhiên một số chủng sinh acid gluconic (*A. niger* NRRL 3 và NRRL 67, và *Penicillium variabile* P16 (ĐHTH Tuscia) có thể nhận được từ một số bảo tàng giống quốc tế. Nhìn chung các loài thuộc *Penicillium* sản sinh ít acid gluconic hơn so với *Aspergillus*, tuy nhiên chúng lại có khả năng sinh enzyme glucose oxidase ngoại bào (một sản phẩm phụ hữu ích) và thu nhận enzyme ngoại bào sẽ dễ dàng hơn.



Hình 5.5. **Sinh tổng hợp acid gluconic bởi *Aspergillus niger***

Sinh tổng hợp acid gluconic bởi *A. niger* được trình bày trong hình 5.5. Enzyme glucơ- oxidase chứa hai gốc flavin adenine dinucleotide (FAD), chịu trách nhiệm loại bỏ hai nguyên tử hydro từ glucose tạo ra $FADH_2$ và glucono-δ-lactone. Sản phẩm cuối sau đó được thủy phân ở mức độ nào đó và tạo ra acid gluconic. $FADH_2$ phản ứng với O_2 tạo ra H_2O_2 và sản phẩm này dưới sự xúc tác của catalase sẽ sản sinh nước và O_2. Ở *A. niger*, cả hai enzyme gluco-oxidase và catalase là enzyme nội bào.

2.2. Sản xuất acid gluconic

Trong phần này chỉ trình bày công nghệ sản xuất gluconat natri sử dụng nấm *A. niger* trên môi trường glucose. Dịch siro đường glucose 70°Brix thường được sử

dụng để chuẩn bị môi trường lên men. Bảng 5.2 trình bày công thức môi trường chung nhất cho sản xuất acid gluconic ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô công nghiệp.

Bảng 5.2.* Thành phần môi trường cho sinh tổng hợp acid gluconic bằng *Aspergillus niger

Thành phần	Môi trường nuôi giống	Môi trường sản xuất
Glucose	$40kgm^{-3}$	$120 - 350kgm^{-3}$
NH_4NO_3 (hoặc muối NH_4^+ khác)	$2,4kgm^{-3}$	$0,4 - 0,5kgm^{-3}$
KH_2PO_4	$1,5kgm^{-3}$	$0,1 - 0,3kgm^{-3}$
$MgSO_4.7H_2O$	$3,57kgm^{-3}$	$0,1 - 0,3kgm^{-3}$
Agar	$1kgm^{-3}$	$0kgm^{-3}$
Cao nấm men	$1kgm^{-3}$	$0kgm^{-3}$
Nước chiết ngô	$0kgm^{-3}$	$0,2 - 0,4kgm^{-3}$
$ZnSO_4.7H_2O$	$100mgm^{-3}$	$0mgm^{-3}$
$CuSO_4.5H_2O$	$20mgm^{-3}$	$0mgm^{-3}$
$FeCl_3.6H_2O$	$300mgm^{-3}$	$0mgm^{-3}$
$MnSO_4.7H_2O$	$0mgm^{-3}$	$30mgm^{-3}$
Giá trị pH ban đầu	6,5	6,0

pH môi trường đầu tiên được chỉnh về giá trị 4,5 sử dụng acid sulphuric và thanh trùng ở 121°C trong 15 – 30 phút, hạ nhiệt xuống 33°C và đưa vào nồi lên men. pH sau đó được chỉnh về 6 – 6,5 sử dụng hydroxit natri. Giống được tiếp ở khoảng 2 – 5%. Để chuẩn bị giống sản xuất, bào tử nấm được lấy từ môi trường ống thạch và chuyển vào môi trường nuôi cấy giống ở nồng độ khoảng 10^6 bào tử/ml. Sau khi nuôi cấy ở 30°C trong 15 – 24 giờ, các hạt nấm tạo ra được sử dụng cho phục vụ lên men với mật độ 20 – 50 hạt/ml môi trường. Quá trình lên men được thực hiện với sự điều tiết tự động các yếu tố bao gồm: khí cấp vô trùng ($1,0 - 1,5\ vv^{-1}min^{-1}$), nhiệt độ (33°C), áp suất phía trên (2 – 3 bar), pH (5,5 – 6,5) và mức bọt tạo ra. Giá trị pH được điều chỉnh bằng việc bổ sung dung dịch NaOH 30 – 50% để trung hòa acid gluconic tạo ra. Quá trình lên men kết thúc sau khoảng 30 giờ với 0,97 – 1kg acid gluconic cho một kilogram glucose sử dụng (lượng sản phẩm lý thuyết là 1,09kg) và với tốc độ tạo sản phẩm là $9 - 13kgm^{-3}h^{-1}$. Trong lên men mẻ, sinh khối nấm có thể tái sử dụng khoảng 5 lần với điều kiện hoạt tính của enzyme gluco-oxidase cũng như nồng độ các yếu tố vi lượng (sắt và mangan) được kiểm soát. Sinh khối nấm có thể

được lấy ra theo các phương pháp như kết lắng, ly tâm, hoặc sử dụng kỹ thuật lọc dòng chảy chéo (cross-flow filtration). Với việc bổ sung glucose dần theo từng bước, nồng độ gluconate trong dịch lên men có thể đạt mức 580kgm^{-3}. Sau khi kết thúc lên men, sinh khối nấm được lọc sử dụng máy lọc băng liên tục và thu hồi enzyme gluco-oxidase hoặc đốt bỏ. Dịch làm trong thông thường chứa khoảng 300kgm^{-3} gluconat natri sẽ được lọc, loại màu bằng cột than hoạt tính và cô đặc tới nồng độ 45–50% chất khô, trung hòa về pH 7,5 sử dụng NaOH và làm khô bằng sấy phun hoặc sấy trống. Trong trường hợp sản phẩm là dịch acid gluconic 50%, dung dịch sau khi cô có thể được bơm qua cột trao đổi cation để loại ion natri. Các bước kết tinh tiếp theo ở nhiệt độ 30 – 70°C hoặc >70°C sẽ tạo ra các tinh thể tương ứng là δ-lactone hoặc γ-lactone.

3. ACID LACTIC

Acid lactic (acid 2-hydroxypropionic: $C_3H_6O_3$) hiện nay được sản xuất thông qua tổng hợp hóa học hoặc theo phương pháp lên men. Trong hai dạng đồng phân đối ảnh acid L- (+) và D- (–) -lactic cơ thể người chỉ hấp thụ được dạng L- (+). Ngoài ra, dạng D- (–) cũng có độc tính nhất định, chính vì vậy dạng L- (+) thường được lựa chọn trong thực phẩm. Tuy vậy sản phẩm thương mại chủ đạo hiện nay là sản phẩm hỗn hợp DL tổng hợp bằng con đường hóa học. Acid lactic được sử dụng để tạo vị chua và làm chất bảo quản trong một số sản phẩm như phomat, thịt, jele và bia. Lactate ammoni được dùng làm nguồn nitơ phi protein trong thức ăn gia súc. Các muối natri, canxi stearoyl lactylat được sử dụng làm chất tạo nhũ, hoặc chất ổn định trong bột bánh. Gần đây người ta quan tâm đến acid lactic nhiều hơn bởi những ứng dụng trong sản xuất các loại nhựa và bao bì tự phân chống ô nhiễm môi trường.

3.1. Vi sinh vật và sinh tổng hợp acid lactic

Tất cả vi khuẩn lactic đều có khả năng tạo acid lactic thông qua lên men các loại đường. Tuy nhiên, chỉ có những loài lên men đồng hình mới được sử dụng trong sản xuất acid lactic. Nhóm Lactobacilli ưa nhiệt (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*) có thể chịu được nồng độ lactate và nhiệt độ cao hơn (48 – 52°C) so với những nhóm khác và do vậy có hiệu suất lên men cao và hạn chế được tạp nhiễm. Tuy nhiên, nhóm này sinh acid D- (–) hoặc DL-lactic và vì vậy không phù hợp lắm cho sản xuất thực phẩm, thức ăn gia súc và ứng dụng trong y tế. Nhóm Lactococci, Lactobacilli ưa nhiệt trung bình (*L. casei* subsp. *casei*, *L. amylophilus*) và Streptococci ưa nhiệt (*Streptococcus thermophilus*) có nhiệt độ phát triển tương đối thích hợp cho sản xuất và ngoài ra còn có khả năng phân hủy tinh bột. Mặc dù khả năng chịu acid lactic của chúng thấp hơn so với nhóm trước nhưng bù lại chúng chỉ sinh duy nhất L- (+) -lactic và do vậy vẫn phù hợp hơn

cả cho sản xuất acid lactic ứng dụng trong thực phẩm. Vi khuẩn lactic đồng hình lên men đường 6 cacbon thông qua con đường glycolis. Pyruvat được khử thành lactate với sự xúc tác của enzyme đặc hiệu quang học lactate dehydrogenase (L-LDH hoặc/và D-LDH). Với Lactococci, LDH là enzyme thay đổi hoạt tính (với chất điều biến là FDP và Mn^{2+}) còn với Lactobacilli lên men đồng hình, LDH là enzyme không thay đổi hoạt tính. Acid lactic dạng chưa phân ly là chất ức chế đối với quá trình sinh trưởng và sinh acid của vi khuẩn lactic. Nguyên nhân có lẽ do sự thẩm thấu qua màng và làm giảm pH nội bào. Việc điều chỉnh pH môi trường trong quá trình lên men có thể làm giảm độ ức chế, tuy nhiên lượng acid lactic tích lũy được thông thường không lớn hơn $150kgm^{-3}$.

Vi khuẩn lactic là vi sinh vật đòi hỏi nhiều vào điều kiện nuôi cấy. Thông thường, môi trường cần được bổ sung chất kích thích sinh trưởng và các peptid (chứa khoảng 5-12 acid amin là thích hợp nhất). *Bacillus* spp. có thể được sử dụng thay thế vi khuẩn lactic bởi yêu cầu dinh dưỡng đơn giản hơn cũng như khả năng đồng hóa nguồn nitơ vô cơ. Thậm chí nấm mốc *Rhizopus oryzae* cũng có thể được sử dụng, tuy nhiên loại nấm này còn sinh ethanol và do vậy làm giảm 25% lượng acid sinh ra.

3.2. Cơ chất, sản xuất và thu hồi

Acid lactic có thể sản xuất từ nhiều loại nguyên liệu khác nhau như củ cải đường, rỉ đường, dịch thủy phân tinh bột, cellulose. Các công ty hàng đầu như ADM và Purac Biochem hiện sử dụng dịch thủy phân ngô làm nguyên liệu trong sản xuất acid lactic. Một số loài vi khuẩn lactic như *L. amylophilus* có thể thủy phân tinh bột, tuy nhiên độ nhớt cao của môi trường khiến việc điều chỉnh pH gặp nhiều khó khăn và do vậy cũng hạn chế khả năng ứng dụng. Nguyên liệu cần được kết hợp với một số cơ chất khác như dịch thủy phân protein sữa ($5 - 10kgm^{-3}$) và cao nấm men ($20kgm^{-3}$). Quá trình sản sinh acid lactic thông thường xảy ra đồng thời với sinh trưởng. Tuy nhiên, lên men lactic không nhất thiết phải phụ thuộc vào sinh trưởng khi có một số yếu tố hạn chế sinh trưởng. Ứng dụng hiệu ứng này có thể giúp giảm thiểu được nguồn dinh dưỡng. Giá trị pH môi trường cần được giữ ở mức 5 – 6,5 bằng NaOH, Na_2CO_3 hoặc NH_4OH, sử dụng thiết bị điều khiển tự động. Lên men trong điều kiện yếm khí sẽ đem lại hiệu suất chuyển hóa cao hơn (có thể đạt 85 – 98%). Với phương pháp lên men mẻ, nồng độ acid lactic tạo ra cao hơn ($120–150kgm^{-3}$) nhưng tốc độ chuyển hóa lại chậm hơn ($2kgm^{-3}h^{-1}$). Tốc độ lên men có thể cải thiện rất đáng kể ($20 - 80kgm^{-3}h^{-1}$ ở quy mô phòng thí nghiệm và pilot) thông qua việc tái sử dụng sinh khối bằng vi lọc dòng chảy chéo hoặc cố định tế bào. Tuy nhiên, nồng độ lactate trong trường hợp này không cao (thường nhỏ hơn $50kgm^{-3}$). Ức chế ngược bởi sản phẩm có thể được hạn chế nếu sử dụng các biện pháp loại acid lactic như điện thẩm thấu, trao đổi ion, lọc nano.

Thu hồi acid lactic khá phức tạp bởi độ hòa tan cao của các muối lactate. Trong quy trình truyền thống, lactate được kết tủa ở dạng muối canxi, sau đó acid lactic được phục hồi bằng acid sulphuric. Tinh chế acid lactic trong các khâu tiếp theo bao gồm trao đổi ion và loại màu. Một số kỹ thuật mới như chiết sử dụng màng lỏng, điện thẩm thấu, và trao đổi ion cũng có thể được sử dụng trong thu hồi acid lactic.

4. ACID PROPIONIC

Acid propionic ($C_3H_6O_2$) và các muối của nó được sử dụng trong bảo quản thực phẩm (chất chống nấm) và trong một số lĩnh vực quan trọng khác. Acid propionic có thể sản xuất bằng các vi sinh vật thuộc chi *Propionibacterium* (*P. thoenii*, *P. acidipropionici*), *Veillonella*, *Clostridium* và *Selenomonas*. Tuy nhiên hiện nay, acid propionic chủ yếu được tổng hợp bằng con đường hóa học do còn tồn tại một số khó khăn trong công nghệ lên men như năng suất thấp (< $1kgm^{-3}h^{-1}$), nồng độ thấp (< $50kgm^{-3}$), khó tinh chế (acid acetic được sinh ra đồng thời khi sử dụng cơ chất là đường hoặc lactate). Tuy nhiên những thành tựu trong lên men liên tục sử dụng phương pháp cố định tế bào, hoặc nồi lên men quay vòng sinh khối sử dụng màng (năng suất 2 – $14kgm^{-3}h^{-1}$) cũng như khả năng sinh tổng hợp duy nhất acid propionic khi sử dụng các nguồn cơ chất khác (glycerol) có thể sẽ định hướng lại công nghiệp sản xuất acid propionic theo hướng lên men.

Bảng 5.3. **Sản lượng và phương thức sản xuất một số acid hữu cơ chủ chốt**

Loại acid	Sản lượng (tấn)	Phương pháp sản xuất		
		Lên men	Hóa học	Tách chiết
Acid gluconic (và glucono-δ-lactone)	50 000	67%	33%	–
Acid citric	840 000	100%	–	–
Acid malic	30 000	30%	70%	–
Acid tartaric	30 000	–	–	100%
Acid fumaric	20 000	–	100%	–
Acid lactic	35 000	50%	50%	–
Acid propionic	50 000	–	100%	–
Acid acetic	120 000	–	100%	–

Chương VI
CỒN NHIÊN LIỆU TỪ LIGNOCELLULOSE

1. XU THẾ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHIỆP CỒN NHIÊN LIỆU

Nhiên liệu hoá thạch (than đá và dầu mỏ) là nguồn năng lượng chính cho kinh tế thế giới trong suốt hai thế kỷ qua. Tuy nhiên, nguồn năng lượng được tích lũy hàng trăm triệu năm này sớm muộn sẽ cạn kiệt. Theo tính toán của BP, một trong những tập đoàn dầu mỏ hàng đầu thế giới, trữ lượng dầu mỏ toàn cầu đã thăm dò tới năm 2003 là khoảng 150 tỷ tấn. Mức tiêu thụ dầu mỏ toàn cầu vào cùng thời điểm là 3,6 tỷ tấn/năm. Với mức độ gia tăng của nhu cầu năng lượng tương đương với việc phát hiện các mỏ mới thì trữ lượng dầu mỏ toàn cầu chỉ còn đủ cho nhân loại trong vòng 4 thập kỷ nữa. Dầu mỏ lại tập trung chủ yếu ở các khu vực luôn có tình hình chính trị bất ổn như Trung Đông (chiếm 2/3 trữ lượng dầu thế giới), Trung Á, Trung Phi... Mỗi đợt khủng hoảng dầu mỏ, giá dầu tăng làm lay chuyển nền kinh tế của nhiều nước, nhất là các nước nghèo. Ngoài ra việc sử dụng nhiên liệu hóa thạch đã thải vào không khí một lượng rất lớn khí nhà kính (chủ yếu là CO_2). Nồng độ CO_2 hiện nay trong khí quyển đã tăng lên 30% so với thời kỳ tiền công nghiệp (từ 280ppmV lên 360ppmV). Hậu quả là nhiệt độ không khí trên trái đất đã tăng lên 0,6 tới 0,8°C và mực nước biển dâng cao 15 – 20cm. Nếu không tích cực hành động, lượng khí nhà kính có nguy cơ tăng lên 500ppmV vào cuối thế kỷ này, nhiệt độ trái đất có thể tăng 2 – 3°C. Thiên tai, bão, hạn hán, lũ lụt sẽ kéo dài ở quy mô rộng, thiếu nước sinh hoạt và sản xuất nông nghiệp, thiếu lương thực, xuất hiện các bệnh hiểm nghèo mà các nước nghèo khó có khả năng phòng chống. Chính vì những lý do đó, nhiều quốc gia và các tập đoàn năng lượng trên thế giới trong vài thập kỷ qua đã có chiến lược kết hợp sử dụng tiết kiệm hiệu quả dầu mỏ, đồng thời đầu tư cho nghiên cứu sử dụng các dạng nhiên liệu sạch thay thế một phần xăng dầu khoáng, trong đó có nhiên liệu sinh học (xăng pha cồn ethanol và diesel sinh học).

Braxin là quốc gia sản xuất và sử dụng cồn nhiên liệu lớn nhất thế giới. Hiện có trên 60.000 đồn điền trồng mía với 6,5 triệu hécta và trên 324 nhà máy sản xuất đường, cồn chủ yếu dùng trong nước và xuất khẩu (tương đương với 220.000 thùng dầu/ngày), hằng năm tiết kiệm được trên 2 tỷ USD chi cho việc nhập dầu. Cả nước

có trên 3 triệu ôtô sử dụng hoàn toàn cồn khan làm nhiên liệu và 17 triệu ôtô sử dụng xăng pha 24% cồn. Ngành công nghiệp mía - đường - cồn và các ngành liên quan của Braxin hằng năm có doanh thu khoảng 8,3 tỷ USD, giải quyết việc làm cho trên 1 triệu lao động.. Từ năm 1975, Chính phủ Braxin đã thực thi chương trình mang tên Proalcool mà sau này trở thành mẫu hình được nhiều quốc gia học tập để phát triển nhiên liệu sinh học.

Mỹ là quốc gia tiêu thụ hằng năm 25% năng lượng trên thế giới (trong khi chỉ có 6% trữ lượng dầu mỏ), hơn 60% dầu mỏ phải nhập từ bên ngoài. Sự thâm hụt cán cân thương mại năng lượng lên đến trên 80 tỷ USD. Năm 1998, Tổng thống Mỹ B. Clinton đã ký sắc lệnh 13101 về sử dụng sản phẩm sinh học thay thế một phần dầu mỏ. Năm 2004, Mỹ đã sản xuất trên 13 triệu m^3 cồn.

Trung Quốc là quốc gia sản xuất và sử dụng cồn nhiên liệu lớn thứ 3 sau Braxin và Mỹ. Năm 2004, họ đã đưa vào hoạt động nhà máy sản xuất cồn lớn nhất thế giới công suất 600.000 tấn/năm tại Cát Lâm (mỗi năm tiêu thụ 1,9 triệu tấn ngô làm nguyên liệu), tăng sản lượng cồn ethanol cả nước trên 3,5 triệu m^3. Từ tháng 6.2002, nước này đã quyết định sử dụng xăng pha 10% cồn khan (E-10) ở 5 thành phố và đến cuối năm 2006 sẽ tăng thêm 27 thành phố đông dân khác. Ấn Độ đã sử dụng xăng pha 5% cồn ở 9 bang và 4 tiểu vùng từ ngày 1.1.2003, các bang còn lại sử dụng ở giai đoạn 2, giai đoạn 3 sẽ tăng 10% cồn pha trong xăng. Thái Lan cũng là một trong những quốc gia tích cực đầu tư vào nhiên liệu sinh học. Đến năm 2004, nước này đã sản xuất trên 280.000m^3 cồn, đầu tư thêm 20 nhà máy để năm 2015 có trên 2,5 triệu m^3 cồn dùng làm nhiên liệu.

1.1. Công nghệ sản xuất cồn (ethanol) nhiên liệu

Hiện nay ethanol được sản xuất ở quy mô công nghiệp bằng hai phương pháp, thông qua công nghệ hydrat hóa ethylen, và theo phương pháp sinh học, bằng cách lên men đường hay ngũ cốc với men rượu.

1.1.1. Hydrat hóa ethylen

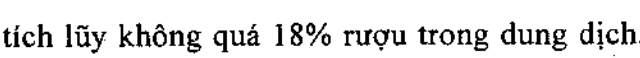
Ethanol được sử dụng như là nguyên liệu công nghiệp và thông thường nó được sản xuất từ các nguyên liệu dầu mỏ, chủ yếu là thông qua phương pháp hydrat hóa ethylen bằng xúc tác acid, được trình bày theo phản ứng hóa học sau:

$$H_2C = CH_2 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH$$

Chất xúc tác thông thường là acid phosphoric hấp phụ trong các chất có độ xốp cao như diatomit hay than củi. Các chất xúc tác rắn, chủ yếu là các loại ôxít kim loại khác nhau.

1.1.2. Lên men

Ethanol để sử dụng trong đồ uống chứa cồn cũng như phần lớn ethanol sử dụng làm nhiên liệu, được sản xuất bằng cách lên men sử dụng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* với phản ứng hóa học tổng quát như sau:



$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

Nấm men có thể tích lũy không quá 18% rượu trong dung dịch, nhưng nồng độ của rượu trong các sản phẩm cuối cùng có thể tăng lên nhờ chưng cất. Để sản xuất ethanol từ các nguyên liệu chứa tinh bột như hạt ngũ cốc thì tinh bột đầu tiên phải được chuyển hóa thành đường. Quá trình đường hóa có thể được thực hiện thông qua việc sử dụng enzyme có sẵn trong hạt nảy mầm, enzyme do vi sinh vật sinh ra trong quá trình lên men hỗn hợp, hoặc dùng enzyme thương phẩm. Công nghệ sản xuất ethanol từ đường mía, sản phẩm giàu glucose hoặc tinh bột đã khá hoàn thiện. Hiện nay, cồn nhiên liệu vẫn được sản xuất chủ yếu từ đường mía (Braxin) và từ tinh bột ngô (Mỹ). Giá thành sản xuất cồn từ hai loại nguyên liệu này là tương đương so với tổng hợp hóa học từ ethylen và có khả năng cạnh tranh, đặc biệt trong thời điểm hiện nay khi mà giá dầu thô không ổn định và ở mức cao. Tuy nhiên, đường mía và tinh bột là những sản phẩm nông nghiệp quan trọng với sản lượng hạn chế. Để đáp ứng nhu cầu về năng lượng, đây không phải là lựa chọn lâu dài (mặc dù hiện tại đường mía và tinh bột vẫn là giải pháp tối ưu cho sản xuất cồn nhiên liệu về mặt giá thành).

1.2. Tinh chế Ethanol

Đối với hỗn hợp ethanol và nước, điểm sôi hỗn hợp (azeotrope) cực đại ở nồng độ 96% ethanol và 4% nước. Vì lý do này, chưng cất phân đoạn hỗn hợp ethanol-nước (chứa ít hơn 96% ethanol) không thể tạo ra ethanol tinh khiết hơn 96%. Vì vậy, ethanol 95% là dung môi phổ biến nhất. Có hai hướng cạnh tranh nhau có thể sử dụng trong sản xuất ethanol tinh khiết. Để phá vỡ điểm sôi hỗn hợp nhằm thực hiện việc chưng cất thì một lượng nhỏ benzen có thể thêm vào, và hỗn hợp lại được chưng cất phân đoạn một lần nữa. Benzen tạo ra điểm sôi hỗn hợp cấp ba với nước và ethanol, do đó có thể lợi dụng điểm sôi này nhằm loại bỏ ethanol ra khỏi nước. Với điểm sôi hỗn hợp cấp hai giữa benzen với ethanol, phần lớn benzen có thể được loại bỏ. Ethanol được tạo ra không chứa nước. Tuy nhiên, một lượng rất nhỏ (cỡ ppm) benzen vẫn còn, vì thế việc sử dụng ethanol đối với người có thể gây tổn thương cho gan. Hướng thứ hai để tạo ethanol tinh khiết là sử dụng sàng phân tử. Một số khoáng chất như zeolit có thể sử dụng để hấp thụ có chọn lọc nước từ dung dịch 96% ethanol. Zeolit tổng hợp trong dạng viên tròn có thể sử dụng. Zeolit đặc biệt có giá trị, vì có khả năng tái sinh zeolit trong hệ khép kín về cơ bản là không giới hạn số

lần, thông qua việc làm khô nó với luồng hơi CO_2 nóng. Ethanol tinh chất được sản xuất theo cách này không có dấu tích của benzen, và có thể sử dụng như là nhiên liệu hay thậm chí khi hòa tan có thể dùng trong công nghiệp thực phẩm.

2. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ETHANOL TỪ LIGNOCELLULOSE

Trong số những nguồn nguyên liệu sinh học có thể sử dụng cho sản xuất ethanol, nguyên liệu cellulose thực sự dồi dào và ít được khai thác. Sản lượng sinh khối thực vật toàn cầu hằng năm vào khoảng 200 tỷ tấn, và 90% trong số đó là lignocellulose. Có khoảng 8 – 20 tỷ tấn trên thực tế có thể sử dụng để sản xuất ethanol. Mặc dù đã có nhiều cố gắng, việc sản xuất ethanol từ nguồn tài nguyên tái sinh này trên quy mô công nghiệp còn gặp nhiều khó khăn. Sinh khối thực vật giàu lignocellulose là nguyên liệu phức tạp hơn nhiều so với tinh bột. Thành phần chủ chốt của chúng bao gồm cellulose, hemicellulose và lignin gắn kết chặt chẽ với nhau bởi những liên kết hydro và liên kết đồng hóa trị. Để có thể sản xuất ethanol, các polymer sinh học này cần được phân huỷ thành đường đơn và sau đó hỗn hợp đường hexose (chủ yếu là glucose) và pentose (chủ yếu là xylose) sẽ được lên men thành ethanol. Việc thủy phân lignocellulose theo con đường hóa học và enzyme đều không đơn giản. Ngoài ra, trong quá trình thủy phân sử dụng acid (một công đoạn không thể thiếu trong các công nghệ hiện có) còn phân hủy một lượng đáng kể các đường tạo thành (tới 60% tùy theo chế độ thủy phân) và sản sinh những chất độc hại như furfuran đối với vi sinh vật trong công đoạn lên men tiếp theo. Bản thân việc lên men đường xylose (chiếm 20 – 30% lượng đường tạo ra) thành ethanol cũng gặp nhiều khó khăn bởi có rất ít các chủng vi sinh vật có khả năng thực hiện công đoạn này một cách hiệu quả. Để sản xuất ethanol nhiên liệu từ nguồn phế phụ phẩm nông nghiệp có được tính cạnh tranh, nhiều giai đoạn công nghệ còn cần được cải thiện.

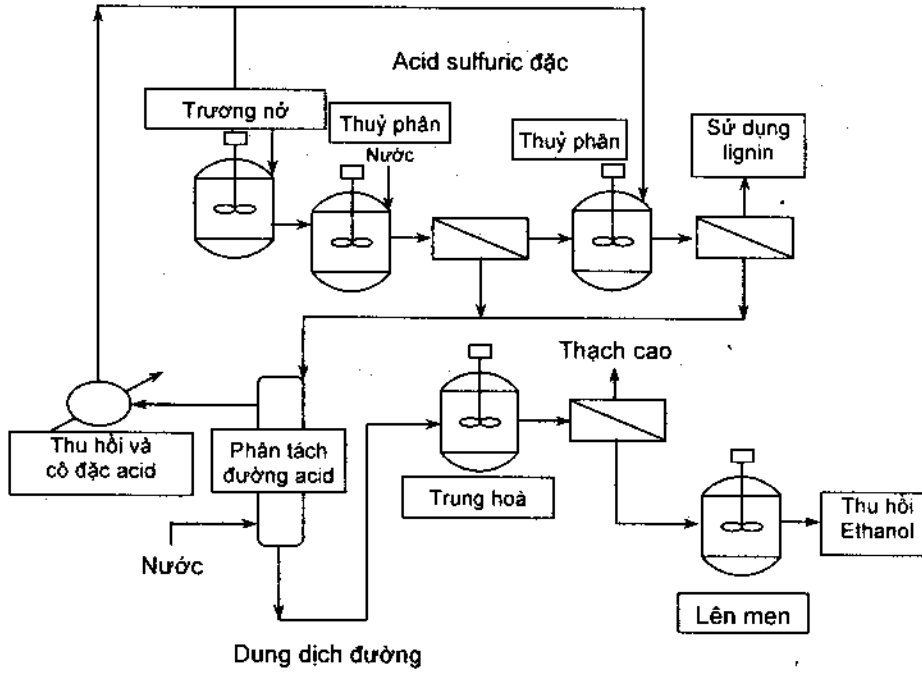
Công đoạn chủ chốt trong sản xuất cồn nhiên liệu từ biomass là thủy phân nguyên liệu thành đường. Hiện nay có hai hướng tiếp cận vấn đề này, đó là thông qua thủy phân bằng acid và thủy phân bằng enzyme. Công nghệ thủy phân bằng acid đã có từ trước Đại chiến Thế giới lần thứ II và được sử dụng rộng rãi trong thời kỳ này. Hiện nay công nghệ thủy phân bằng acid không được nghiên cứu nhiều do đã tương đối ổn định và khó có thể hạ được giá thành. Có hai dạng công nghệ thủy phân bằng acid đó là thủy phân bằng acid đặc và thủy phân bằng acid loãng.

2.1. Thủy phân bằng acid đặc

Công nghệ này dựa trên việc sử dụng acid đặc để phá hủy cấu trúc tinh thể của cellulose sau đó thủy phân bằng acid loãng. Các khâu tách acid khỏi đường, thu hồi

và cô đặc acid là những công đoạn mấu chốt của quy trình. Trong công nghệ này, acid đặc sẽ phá hủy các liên kết hydro giữa các mạch cellulose và chuyển chúng sang trạng thái vô định hình. Sau khi cấu trúc tinh thể bị phá hủy, cellulose sẽ hình thành trạng thái dạng gelatin với acid và trở nên rất mẫn cảm với phản ứng tự thủy phân. Sau khi pha loãng với nước và dưới tác động của nhiệt, cellulose sẽ nhanh chóng bị thủy phân thành glucose.

Năm 1937, người Đức đã xây dựng và đưa vào hoạt động một số nhà máy sản xuất cồn theo công nghệ thủy phân bằng acid đặc sử dụng acid clohydric. Vào năm 1948, người Nhật đã phát triển công nghệ sử dụng acid sulfuric đặc và sản xuất ở quy mô thương mại. Họ đã đưa vào một công nghệ lọc màng mới, khi đó cho phép phân tách acid khỏi dung dịch đường với khả năng thu hồi 80% lượng acid sử dụng. Công nghệ thủy phân bằng acid đặc được tiếp tục phát triển dưới sự tài trợ của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ trong những năm của thập niên 1940 và 1980. Một trong những sơ đồ điển hình của quy trình được trình bày trong hình sau (quy trình của Arkenol – Hoa Kỳ):



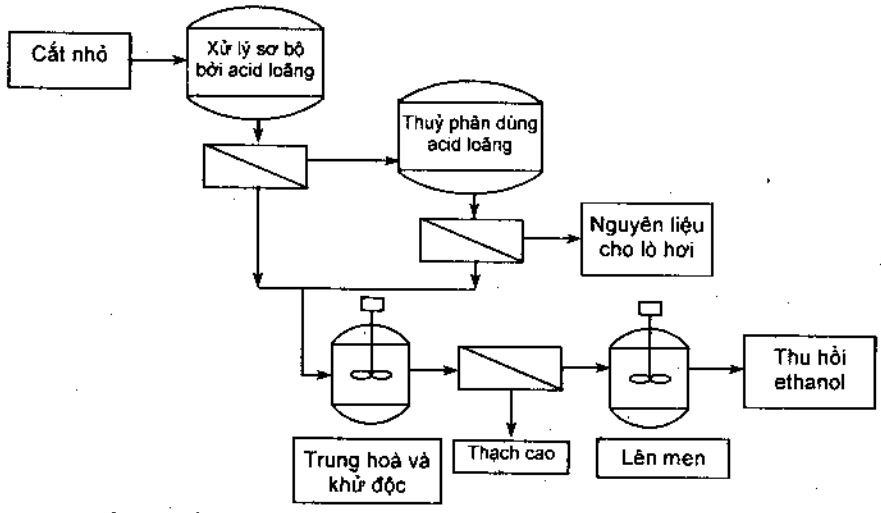
***Hình 6.1.* Sơ đồ hệ thống sản xuất ethanol bằng công nghệ thủy phân dùng acid đặc**

Trong quy trình này, sinh khối thực vật có hàm ẩm 10% được xử lý bằng acid sulfuric nồng độ 70 – 77%. Lượng acid sử dụng so với sinh khối là 1,25 : 1 và nhiệt độ được giữ ở mức dưới 50°C. Sau đó nước được bổ sung để pha loãng acid tới nồng độ 20% – 30% và gia nhiệt tới 100°C, giữ trong 1h để quá trình thủy phân có thể diễn ra. Dịch dạng gel được lấy ra khỏi bể phản ứng và lọc ép để lấy dịch đường và acid. Phần chất rắn còn lại sẽ được tái thủy phân lần 2. Dịch đường và acid sẽ được

phân tách sử dụng cột sắc ký. Công đoạn lên men tiếp theo có thể chuyển hóa được đường thành ethanol với hiệu suất 85% với xylose và 92% với glucose. Arkenol tuyên bố rằng, có thể thu hồi được 97% acid trong quy trình sản xuất của mình. Quy trình sản xuất ethanol sử dụng công nghệ thủy phân dùng acid đặc đã được thương mại hóa, cụ thể là ở Đức, Liên Xô và Nhật. Tuy nhiên quy trình này chỉ thực sự thích hợp trong những thời điểm bắt buộc, khi mà giá trị kinh tế có thể được tạm bỏ qua.

2.2. Thủy phân bằng acid loãng

Quá trình thủy phân được thực hiện thông qua 2 giai đoạn. Giai đoạn đầu được thực hiện ở chế độ tương đối ôn hòa cho việc thủy phân hemicellulose, trong khi đó giai đoạn sau sẽ được thích ứng để thủy phân dạng polymer bền vững hơn nhiều, đó là cellulose. Dịch thủy phân từ mỗi quá trình được thu hồi, trung hòa và lên men tạo ethanol. Công nghệ sản xuất ethanol dựa trên công nghệ thủy phân dùng acid loãng được người Đức phát triển từ trước Đại chiến Thế giới lần thứ I. Công nghệ này đã được thương mại hóa ở Mỹ thông qua một quy trình cải biến với một bước thủy phân. Hiệu suất của công nghệ này chỉ đạt 125 lít cồn/tấn nguyên liệu, tuy nhiên với thời gian thủy phân ngắn hơn rất nhiều. Tất cả các nhà máy sản xuất cồn từ gỗ kể trên đã đóng cửa sau Đại chiến lần thứ I do khả năng cạnh tranh thấp và nhu cầu không còn. Năm 1932, người Đức phát triển công nghệ thủy phân theo nguyên lý "dòng chảy" sử dụng acid sulfuric loãng. Trong công nghệ này acid loãng được bơm qua lớp nguyên liệu và được gọi là công nghệ Scholler. Mặc dù hiệu suất thu hồi đường glucose cao (khoảng 70%), phương pháp vẫn có nhược điểm là nồng độ đường trong dịch thủy phân thấp. Thiết kế Scholler với một số cải tiến cho tới nay vẫn được đánh giá cao và là một trong những phương pháp đơn giản nhất để sản xuất đường từ sinh khối.



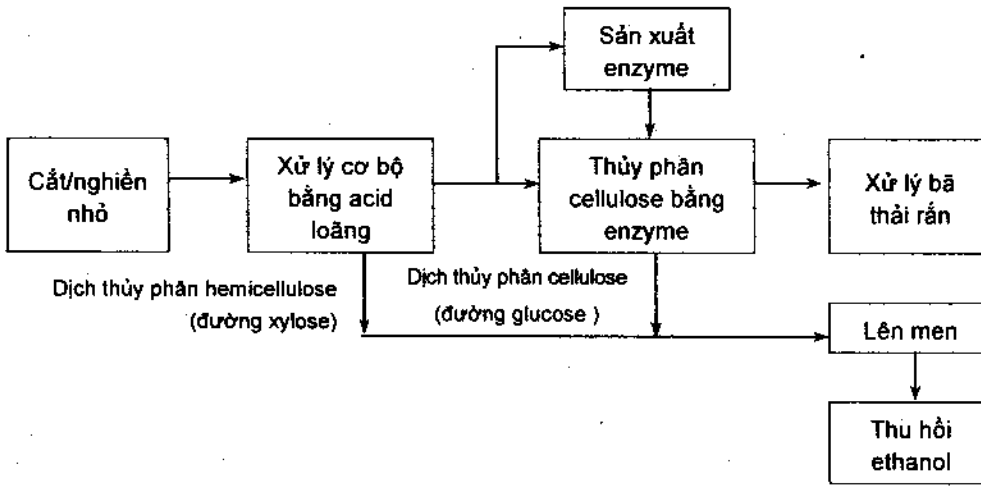
Hình 6.2. **Sơ đồ hệ thống sản xuất ethanol bằng công nghệ thủy phân dùng acid loãng**

Trong giai đoạn thủy phân thứ nhất, nguyên liệu được xử lý bằng dung dịch acid sulfuric 0,7% ở nhiệt độ 190°C với thời gian lưu là 3 phút. Công đoạn tiếp theo được thực hiện ở 215°C với nồng độ acid là 0,4% và thời gian lưu 3 phút. Dịch thủy phân từ mỗi quá trình được thu hồi, trung hòa và lên men tạo ethanol. Cellulose và lignin còn lại ở dạng rắn được sử dụng làm nhiên liệu cho sản xuất hơi và điện.

Công nghệ sản xuất ethanol sử dụng phương pháp thủy phân dùng acid loãng theo nguyên lý Scholler có khá nhiều thành công trong sản xuất công nghiệp. Các nhà máy sản xuất ethanol theo thiết kế này đã nhiều lần đóng và mở cửa lại tại Đức, Nhật và Nga trong suốt 50 năm qua. Tuy nhiên công nghệ acid loãng vẫn không thể tồn tại trong hoàn cảnh cạnh tranh về giá cả.

2.3. Thủy phân bằng enzyme

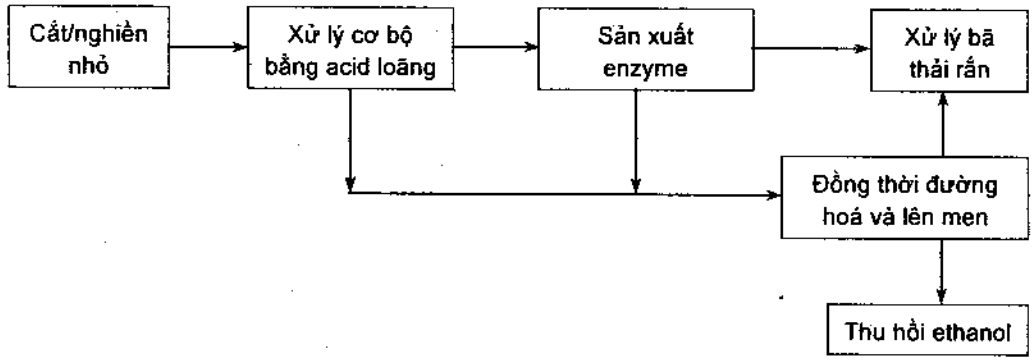
Hiện nay hướng ứng dụng enzyme trong sản xuất ethanol từ sinh khối được nghiên cứu nhiều nhất bởi nó hứa hẹn sẽ đem lại những đột phá về công nghệ. Trong sản xuất ethanol từ sinh khối đã thay thế công đoạn thủy phân dùng acid bằng thủy phân dùng enzyme. Công nghệ SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) sản xuất ethanol có sự phân chia rõ ràng giai đoạn thủy phân và lên men (hình 6.3).



Hình 6.3. **Sơ đồ tóm tắt quy trình công nghệ SHF**

Ngay trong công nghệ sử dụng enzyme, việc xử lý sơ bộ nguyên liệu thực vật là không tránh khỏi. Công đoạn này nhằm đảm bảo khả năng tiếp cận của enzyme tới các liên kết của phân tử cellulose. Có nhiều dạng xử lý sơ bộ nguyên liệu đang được xem xét, trong đó có phương pháp xử lý bằng acid, kiềm, nhiệt độ. Tuy nhiên xử lý bằng acid loãng vẫn được thực hiện nhiều hơn cả. Một trong những cải biến quan trọng trong ứng dụng enzyme là công nghệ kết hợp cả hai quá trình đường hóa và lên men trong cùng một công đoạn, hay còn gọi tắt là SSF (Simultaneous Saccharification

and Fermentation). Công nghệ này đã được đăng ký bản quyền bởi công ty Gulf Oil và trường Đại học Tổng hợp Arkansas. Hướng công nghệ này giúp giảm thiểu số lượng các thiết bị cần thiết bằng việc bỏ qua công đoạn thủy phân riêng biệt. Quan trọng hơn, cách tiếp cận này làm giảm sự ức chế ngược của sản phẩm đối với enzyme. Sự có mặt của glucose trong dung dịch sẽ ức chế hoạt động thủy phân cellobiose của enzyme ß-glucosidase. Trong quy trình SSF, enzyme cellulase và vi sinh vật lên men cồn được sử dụng đồng thời. Lượng đường tạo ra bởi enzyme tức thời được chuyển hóa thành ethanol. So với SHF, SSF có thể làm tăng hiệu suất chuyển hóa cellulose thành ethanol lên 40%. Quy trình SSF gần đây cũng được cải tiến để có thể thực hiện lên men đồng thời nhiều loại đường. Quy trình cải biến này được gọi tắt là SSCF (Simultaneous Saccharification and CoFermentation). Quy trình SSCF có thể được thể hiện trong sơ đồ sau:



***Hình 6.4.* Sơ đồ tóm tắt của quy trình SSCF**

Bản thân quy trình SSF và SSCF cũng còn gặp nhiều khó khăn để có thể được thương mại hóa. Một trong những khó khăn là sự khác nhau trong nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme cellulase (45-50°C) và nhiệt độ thích hợp cho vi sinh vật lên men ethanol (28-35°C). Ngoài ra, một số thành phần của dịch thủy phân cũng như ethanol tạo ra cũng có tác động ức chế lên enzyme cellulose.

2.4. Vi sinh vật trong sản xuất cồn nhiên liệu từ sinh khối

Trong nhóm các loại vi sinh vật sinh ethanol, nấm men *Saccharomyces cerevisiae* vẫn là vi sinh vật có ứng dụng rộng rãi nhất. *S. cerevisiae* có khả năng tích lũy tới 18% ethanol trong các môi trường có thành phần tương đối đơn giản. Nấm men *S. cerevisiae* có thể lên men nhiều đường đơn như glucose, galactose, đường đôi như sucrose, hoặc đường ba như raffinose. Với năng lực lên men cao và là đối tượng được tìm hiểu kỹ nhất, nấm men *S. cerevisiae* là ứng cử viên tiềm năng nhất cho công đoạn chuyển hóa glucose thành ethanol trong sản xuất cồn nhiên liệu từ sinh khối. Một loại vi khuẩn gram âm khá đặc biệt cũng nhận được nhiều sự quan tâm là

Zymomonas mobilis. Loại vi khuẩn này có khả năng lên men đồng hình sinh ethanol và chịu được độ nồng độ cồn tới 120g/l. Vi khuẩn *Zymomonas* là loại vi sinh vật duy nhất sử dụng glucose trong điều kiện yếm khí theo con đường Entner-Doudoroff (ED) trong khi đa số vi sinh vật khác sử dụng con đường Embden-Meyerhof (EM). Con đường ED tạo ra lượng ATP chỉ bằng một nửa so với EM trên cùng một lượng glucose, và do vậy *Zymomonas* tạo ra ít sinh khối hơn và lượng glucose chuyển trực tiếp thành ethanol cũng cao hơn. Hiệu suất sinh ethanol của *Zymomonas* khoảng 5-10% cao hơn so với *S. cerevisiae* trên cùng một lượng glucose lên men. *Z. mobilis* là loại vi sinh vật không gây độc hại cho con người và không đòi hỏi những điều kiện nuôi cấy ngặt nghèo như nhiều vi khuẩn khác. Trong những năm 1970, 1980, một số nhà khoa học còn cho rằng *Z. mobilis* ưu việt hơn so với *S. cerevisiae* trong sản xuất cồn. Tuy nhiên trong thực tế sản xuất, *S. cerevisiae* vẫn là vi sinh vật được lựa chọn. Một trong những khó khăn khi lên men dịch thủy phân sinh khối thực vật là rất ít vi sinh vật có khả năng lên men xylose (chiếm 20-30% lượng đường tạo ra). Cả nấm men *S. cerevisiae* và *Z. mobilis* đều không có khả năng này. Trong số hơn một nghìn loài nấm men được biết chỉ có 4 loài có khả năng lên men xylose ở các mức độ khác nhau. Hiện nay nấm men *Pachysolen tannophilus* đang được sử dụng trong lên men dịch thủy phân hemicellulose (sản phẩm chủ yếu là xylose) để tạo ethanol. Tuy nhiên nấm men *P. tannophilus* không tích lũy được quá 2% ethanol trong canh trường và điều này là hạn chế rất lớn trong sản xuất. Chính vì những lý do đó, hiện nay có nhiều nhóm nghiên cứu đang tập trung vào cải thiện đặc tính chủng giống theo hướng chuyển các gene cần thiết cho khả năng lên men xylose vào *Saccharomyces cerevisiae*. Đã có một số thành tựu nhất định đạt được trong lĩnh vực này, tuy nhiên để tiếp cận được với sản xuất công nghiệp, những chủng giống này còn phải được cải thiện nhiều hơn nữa. Một trong những hướng nghiên cứu cũng được thực hiện khá tích cực là tạo những chủng *E. coli* có khả năng lên men đồng thời nhiều loại đường và phát triển được trên những môi trường có thành phần đơn giản hơn. Nhiều kết quả khả quan đã đạt được, tuy nhiên việc ứng dụng các chủng *E. coli* tái tổ hợp còn vấp phải những khó khăn như: dải pH hoạt động rất hẹp và ở vùng trung tính (pH 6-8), độ an toàn của *E.coli* đối với con người và môi trường, cũng như khả năng sử dụng sinh khối của *E. coli* sau khi lên men ít được nghiên cứu. Tương tự như vậy, cũng có nhiều nghiên cứu trong việc chuyển các operon mã hóa khả năng đồng hóa xylose và các enzyme trong con đường pentose phosphate sang *Z. mobilis*. Những chủng *Z. mobilis* tái tổ hợp có khả năng chuyển hóa cả glucose và xylose ở trạng thái hỗn hợp sang ethanol và điều này rất có ý nghĩa trong lên men dịch thủy phân. *Z. mobilis* cũng có chung nhược điểm như *E.coli* là hoạt động ở pH trung tính và điều này gây cản trở trong việc ngăn chặn dịch lên men khỏi các vi sinh vật khác. Với

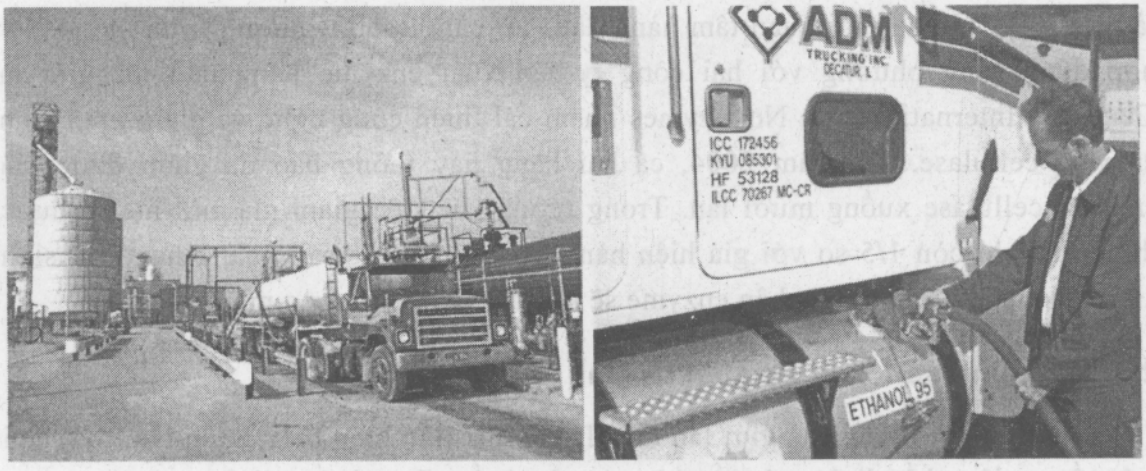
S. cerevisiae, việc đảm bảo chống nhiễm trùng sẽ dễ dàng hơn do nấm men này hoạt động ở pH mang tính acid. Một số loại vi sinh vật khác cũng được nghiên cứu nhằm ứng dụng trong lên men sinh ethanol như *Clostridium thermocellum*, *Neurospora crassa*, *Zygosaccharomyces rouxii*... tuy nhiên những vi sinh vật này có hạn chế là khả năng tích lũy ethanol rất thấp. Trong số những vi sinh vật có khả năng thủy phân nguyên liệu thực vật, nấm mốc *Trichoderma reesei* được quan tâm nhiều hơn cả. Nấm mốc *T. reesei* có khả năng sinh một loạt các enzyme phân hủy lignocellulose thành đường và các cấu thành khác. Hiện nay có nhiều nghiên cứu tập trung vào đánh giá và phát triển khả năng phân hủy một số chất ức chế có trong dịch thủy phân nhằm làm tăng hoạt độ lên men của *S. cerevisiae* và làm giảm chi phí cho các công đoạn khử độc dịch thủy phân. Trong công đoạn sản xuất enzyme, một loạt các gene sinh cellulase của *Erwinia chrysanthemi*, *Acidothermus cellulolyticus* đã được tách dòng và thể hiện. Ngoài ra các vi sinh vật thuộc nhóm sản xuất cellulase truyền thống như *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Aspergillus* cũng đang được sử dụng. Hiện nay giá thành sản xuất ethanol từ phế phụ phẩm nông nghiệp theo phương pháp enzyme còn cao, một trong những nguyên nhân là do giá enzyme sử dụng. Trong một chương trình lớn về sản xuất cồn nhiên liệu từ sinh khối thực vật do Bộ Năng lượng Hoa Kỳ chủ trì, vấn đề giảm giá thành enzyme cellulase là một trong những mối quan tâm hàng đầu. Từ năm 2000, Chương trình này đã ký hợp đồng song phương với hai công ty sản xuất enzyme hàng đầu thế giới là Genencor International và Novozymes nhằm cải thiện công nghệ và giảm giá thành enzyme cellulase. Tới năm 2004, cả hai hãng này thông báo đã giảm được giá enzyme cellulase xuống mười lần. Trong tương lai, việc giảm giá enzyme sẽ được thực hiện chỉ còn 1/5 so với giá hiện hành và khi đó việc sản xuất ethanol từ sinh khối theo con đường thủy phân enzyme sẽ khả thi về mặt thương mại.

2.5. Tình hình sản xuất ethanol từ sinh khối thực vật

Trong Chiến tranh Thế giới lần thứ II, khi mà điều kiện thời chiến làm thay đổi một số ưu tiên nhất định, một số nhà máy sản xuất ethanol từ cellulose đã được xây dựng và đưa vào hoạt động nhằm cung cấp nguồn nhiên liệu thay thế tại nhiều quốc gia và vùng lãnh thổ, trong đó có Đức, Liên Xô, Trung Quốc, Hàn Quốc, Thụy Sỹ, Hoa Kỳ. Sau chiến tranh, sự cạnh tranh giá cả của ethanol sản xuất theo con đường tổng hợp hóa học đã khiến một loạt những nhà máy này phải đóng cửa. Từ 4/2004, nhà máy thử nghiệm sản xuất ethanol nhiên liệu từ lignocellulose đầu tiên được đưa vào hoạt động tại Canada. Mục tiêu của nhà máy là sản xuất được 100 triệu lít ethanol tới năm 2006. Những thành quả này có được là do sự cải thiện của quá trình xử lý nguyên liệu cũng như việc lên men các loại đường pentose. Ethanol từ

cellulose cũng được sản xuất tại một số nước có mặt bằng giá ethonol và nhiên liệu đắt đỏ. Mùa hè năm 2005, nhà máy sản xuất cồn từ mùn cưa bắt đầu được đưa vào hoạt động tại Ornskoldsvik, Thụy Điển. Mặc dù mới ở trạng thái khởi động nhưng triển vọng sản xuất ở đây khá lạc quan. Con số các nhà máy sản xuất cồn nhiên liệu sẽ còn tăng nhanh, đặc biệt từ một số nước đang phát triển và có nhu cầu nhiên liệu cao như Trung Quốc, Ấn Độ.

Như vậy có thể nói, mặc dù việc sản xuất cồn nhiên liệu từ phế phụ phẩm nông nghiệp chưa thật sự cạnh tranh về mặt thương mại ở thời điểm hiện tại nhưng tương lai của ngành này rất to lớn. Sử dụng phế phụ phẩm nông nghiệp cho việc sản xuất cồn không chỉ giải quyết triệt để hơn vấn đề về năng lượng mà không ảnh hưởng tới các nhu cầu lương thực, thực phẩm, mà còn giải quyết được nhiều vấn đề về môi trường và xã hội. Theo những dự đoán tích cực nhất, với sự cải thiện về công nghệ, cồn nhiên liệu từ phế phụ phẩm nông nghiệp sẽ có giá thành thấp hơn so với sản xuất cồn từ mía đường và từ tinh bột. Riêng Bộ Năng lượng Hoa Kỳ đặt mục tiêu tới năm 2020 sẽ ổn định được công nghệ sản xuất cồn từ sinh khối ở mức bằng giá từ nông sản và tới năm 2030 thì việc sản xuất cồn từ phế liệu nông nghiệp sẽ thực sự mang tính thương mại trên diện rộng và không cần sự hỗ trợ của Chính phủ.



Hình 6.5. **Nhà máy sản xuất cồn nhiên liệu (ảnh trái) và tiêu thụ cồn nhiên liệu cho động cơ đốt trong tại Mỹ**

Chương VII
THUỐC TRỪ SÂU VI SINH

1. TẠI SAO PHẢI SỬ DỤNG BIỆN PHÁP SINH HỌC

Trong nền sản xuất nông nghiệp, bên cạnh các yếu tố về "nước, phân, cần, giống", sinh vật hại cây trồng là một vấn đề lớn mà con người phải đối mặt. Có rất nhiều loại sinh vật khác nhau sử dụng cây trồng làm thức ăn, hoặc sống ký sinh trên cây trồng. Do đó, chúng là một trong những nguyên nhân lớn nhất gây thiệt hại nặng nề cho năng suất cây trồng.

Trong cuộc chiến cam go giữa con người với sâu hại, dấu mốc đầu tiên đánh dấu sự thắng lợi của con người, đó là việc sản xuất ra thuốc hóa học. Thuốc hoá học bảo vệ thực vật là những chất độc có nguồn gốc tự nhiên có tác dụng phòng trừ các loại dịch hại cây trồng bao gồm sâu hại, bệnh hại, cỏ dại, nhện hại... Chất độc là chất khi xâm nhập vào cơ thể sinh vật với một lượng nhỏ cũng có thể phá huỷ những chức năng cơ bản trong tế bào và cơ thể, dẫn đến làm chết sinh vật hại.

Thuốc hoá học bảo vệ thực vật có nhiều ưu điểm nổi trội. *Thứ nhất*, thuốc có hiệu quả nhanh trên cơ thể sinh vật hại. *Thứ hai*, thuốc trừ sâu hoá học có hiệu quả tác dụng trong phạm vi rộng, với nhiều loại dịch hại trên cùng một loại cây trồng. Tuy nhiên, đi cùng với những ưu điểm nổi trội đó, thuốc trừ sâu hoá học cũng có nhiều nhược điểm, gây ra những tác hại không nhỏ với môi trường và sức khoẻ con người. Nếu sử dụng thuốc nhiều lần với nồng độ cao sẽ làm cho sâu hại nhờn thuốc, tạo nên tính kháng thuốc ở quần thể sâu hại sau vài thế hệ chọn lọc. Do khả năng tiêu diệt sâu cao, lại có phổ tác dụng rộng, thuốc trừ sâu hóa học làm giảm sút rõ rệt tính đa dạng của các quần thể có ích, một mặt tiêu diệt các sinh vật có ích, mặt khác làm mất cân bằng sinh thái. Hai tiền đề đó dẫn đến hậu quả làm xuất hiện những loại dịch hại mới (do quần thể bạn đầu đột biến chống chịu với thuốc) và làm tái phát dịch hại (quần thể sâu hại phát triển khi đã kháng thuốc và không bị khống chế bởi thiên địch, đồng thời ít có cạnh tranh trong chính quần thể). Không chỉ vậy, thuốc trừ sâu hóa học có thời gian tồn tại lâu dài trong môi trường nên đã gây ô nhiễm lớn đến môi trường đất, nước và không khí. Và quan trọng hơn cả, đó là khi sử dụng liên tục, thuốc trừ sâu sẽ tích luỹ trong đất, đi vào chuỗi thức ăn và khi đạt đến nồng độ sinh

học sẽ gây hại cho sức khoẻ con người, thậm chí nhiều trường hợp dẫn đến tử vong. Chính vì thế mà nảy sinh nhu cầu bức thiết về việc phát triển loại thuốc bảo vệ thực vật mới, đảm bảo phải có tác dụng diệt sâu cao, hiệu lực nhanh chóng; phổ tác dụng rộng, có hiệu quả đối với nhiều loại sâu; không ảnh hưởng đến chất lượng nông sản, không ảnh hưởng đến đất trồng trọt cũng như môi trường không khí; không tạo nên tính kháng thuốc của sâu hại, không làm mất đi những sinh vật có ích, những loài thiên địch và những vi sinh vật có lợi cho con người; lại có hiệu quả kéo dài. Các chế phẩm thuốc trừ sâu bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học ra đời để đáp ứng những nhu cầu đó, dần trở thành biện pháp thay thế một phần thuốc hoá học. Vì những lý do đó, Hội nghị Tư vấn Châu Á – Thái Bình Dương của FAO, năm 1992 đã khẳng định, đấu tranh sinh học là nền tảng của chương trình "Quản lý dịch hại tổng hợp" (IPM) với 3 chiến lược cơ bản là:

- Sử dụng tác nhân sinh học để hạn chế sự phát triển của các quần thể ký sinh. Hướng dẫn áp dụng các loại vi sinh vật đối kháng, các chất sinh học diệt khuẩn vào các vùng sinh thái khác nhau của cây trồng.
- Tăng cường các loại vi sinh vật hữu ích trong đất có khả năng chống các vi sinh vật gây hại cho cây trồng.
- Thúc đẩy khả năng sinh trưởng và tăng sức chống chịu của cây trồng.

2. TÌNH HÌNH SỬ DỤNG THUỐC HOÁ HỌC BẢO VỆ THỰC VẬT

Việt Nam là nước nông nghiệp với hơn 75% dân số sống ở nông thôn. Việt Nam có trên 10 triệu ha canh tác và nông nghiệp vẫn luôn là ngành sản xuất chính, chiếm vị trí quan trọng trong nền kinh tế quốc dân. Mặc dù điều kiện khí hậu, đất đai, sông ngòi rất thuận tiện cho phát triển nông nghiệp, nhưng cũng chính khí hậu nóng, ẩm lại tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các loài sâu bệnh, gây tổn thất hằng năm khoảng 13 – 20% mùa màng. Để khắc phục tình trạng này, mỗi năm Việt Nam phải nhập 25000 tấn thuốc bảo vệ thực vật. Năm 2004, ở Việt Nam, có tới 436 loại hoá chất với 1231 tên thương phẩm khác nhau, trị giá tới khoảng 170 triệu USD.

Việc lạm dụng hoá chất bảo vệ thực vật, nhất là việc sử dụng không đúng quy định về thời gian và liều lượng, thậm chí dùng cả các thuốc bị cấm đã để lại nhiều hậu quả đáng tiếc. Nhiều vụ ngộ độc thực phẩm đã xảy ra. Do vậy, xu hướng sử dụng đấu tranh sinh học ở Việt Nam đang ngày càng được chú ý. Chương trình Quản lý dịch hại tổng hợp đã được tập huấn đến từng hợp tác xã trên phạm vi cả nước và đã thu được hiệu quả khả quan.

3. SỬ DỤNG VI SINH VẬT TRONG ĐẤU TRANH SINH HỌC. THUỐC TRỪ SÂU CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI KHUẨN

Trong số những bệnh côn trùng, bệnh gây ra do vi sinh vật chiếm đến 80-90%, nên có thể nói, vi sinh vật là đối tượng lý tưởng nhất cho việc lợi dụng đấu tranh sinh học tự nhiên ứng dụng trong bảo vệ cây trồng. Có 3 hướng phát triển chủ yếu nhắm đến 3 loại đối tượng chính cho việc phát triển các loại thuốc trừ sâu vi sinh vật, đó chính là thuốc trừ sâu có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm sợi và virus.

Một nhóm lớn các vi khuẩn có đời sống tự nhiên ký sinh trong các cơ thể vật chủ sống, gây chết cho vật chủ bị ký sinh mà trong số đó có các vi khuẩn với vật chủ sâu hại. Có thể liệt kê tên một số vi khuẩn có khả năng diệt sâu hại như sau (theo Nguyễn Lân Dũng, 1981) :

3.1. Một số vi khuẩn sinh bào tử điển hình có khả năng diệt sâu hại

– *Clostridium brevifaciens.*

– *Clotridium malacosomae.*

– *Bacillus cereus.*

– *Bac. thuringiensis.*

– *Bac. thuringiensis var. entomocidus.*

– *Bac. thuringiensis var. galleriae.*

– *Bac. thuringensie var. isralensis (Bti).*

– *Bac. sphaericus (Bs).*

– *Bac. popilliae.*

3.2. Một số vi khuẩn không sinh bào tử điển hình có khả năng diệt sâu hại

– *Serratia marcescens.*

– *Pseudomonas aeruginosa.*

– *P. putida.*

– *Proteus vulgaris.*

– *Proteus mirabilis.*

– Nhiều loài của chi *Aerobacter.*

– Nhiều loài của chi *Cloaca.*

Trong số hàng loạt những vi khuẩn có khả năng tiêu diệt sâu hại đó, *Bac. thuringiensis* (viết tắt Bt) là tác nhân sinh học đầu tiên được nghiên cứu sản xuất thành thuốc trừ sâu vi sinh trên thế giới, đồng thời là sản phẩm thuốc trừ sâu sinh học

nổi tiếng nhất hiện nay. Những thành tựu đạt được của thuốc trừ sâu Bt không chỉ mang lại những lợi ích rõ ràng mà còn hứa hẹn tương lai với nhiều ứng dụng mới nhằm phát triển những biện pháp có hiệu quả hơn nữa trong việc khống chế dịch hại.

4. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CHẾ PHẨM THUỐC TRỪ SÂU BT

Năm 1901, Ishwatari. S, lần đầu tiên phân lập được chủng vi khuẩn gây bệnh cho tằm. Ông đặt tên là *Bacillus sotto*. Đến năm 1911, loài vi khuẩn này được Ernst Berliner phát hiện và đặt tên lại là *Bacillus thuringiensis* khi ông nghiên cứu ra tác nhân gây bệnh trên loài sâu xám ở tỉnh Thuringia, Đức. Đến năm 1938, lần đầu tiên *Bacillus thuringiensis* được sử dụng làm thuốc trừ sâu tại Pháp và đến những thập niên 1950, Bt đã được sử dụng rộng rãi tại Mỹ. Tuy nhiên những sản phẩm đầu tiên không được sử dụng rộng rãi do nhiều hạn chế (dễ bị rửa trôi, dễ bị phân huỷ bởi tia UV, phạm vi sử dụng hẹp). Năm 1956, người ta đã tìm ra hoạt tính trừ sâu của vi khuẩn có liên quan đến tinh thể được tạo ra trong quá trình sinh bào tử. Từ đó, các nghiên cứu được mở rộng cho phép hiểu rõ hơn cơ chế gây độc của vi khuẩn, tạo ra nhiều sản phẩm có áp dụng rộng. Năm 1961, Bt được đăng ký như một loại thuốc trừ sâu an toàn với tổ chức EPA (Environmental Protection Agency). Ngày nay, hàng ngàn biến loài của chủng vi khuẩn này được sử dụng để tạo ra thuốc trừ sâu sinh học đối với nhiều côn trùng gây bệnh khác nhau.

Hình 7.1. **Một số sản phẩm thuốc trừ sâu Bt**

4.1. Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

4.1.1. Các đặc điểm cấu trúc, sinh học của vi khuẩn Bacillus thuringiensis

Bt là trực khuẩn sinh bào tử hiếu khí không bắt buộc, nhuộm Gram dương, kích thước 3-6μm, có phủ tiêm mao không dày, tế bào đứng riêng rẽ và xếp thành từng chuỗi. Quá trình sống có thể chia ra 3 giai đoạn: thể sinh dưỡng, nang bào tử, bào tử và tinh thể.

a) Thể sinh dưỡng

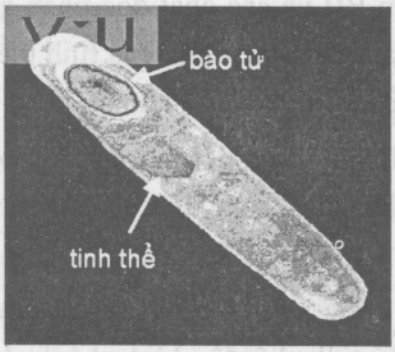
Thể sinh dưỡng dạng que, hai đầu tù, kích thước 1,2 – 1,8μm × 3 – 5μm, bắt màu Gram dương. Lông mọc xung quanh, hơi động hoặc không động. Chúng thường tồn tại 1 cá thể hoặc 2 cá thể liền nhau. Thể sinh dưỡng sinh sản theo kiểu phân chia ngang. Trong thời kỳ sinh sản thường có 2, 4, 8... thể dinh dưỡng liền nhau thành chuỗi. Lúc này vi khuẩn sinh trưởng nhanh, trao đổi chất nhiều, dễ nuôi cấy trên môi trường.

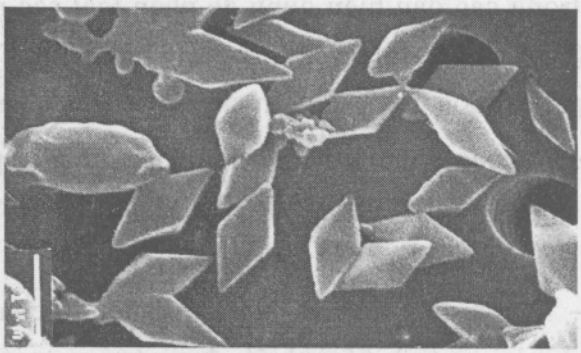
b) Nang bào tử

Khi các thể vi khuẩn già, một đầu nào đó trong cơ thể hình thành bào tử hình bầu dục, còn đầu kia hình thành tinh thể hình thoi. Đó là giai đoạn nang bào tử. Nang bào tử hình trứng dài, to hơn thể sinh dưỡng.

c) Bào tử và tinh thể

Khi nang bào tử phát triển đến một giai đoạn nào đó, chúng sẽ nứt ra, giải phóng bào tử và tinh thể. Kích thước bào tử 0,8-0,9μm × 2μm. Bào tử ở dạng ngủ có thể đề kháng với các điều kiện môi trường bất lợi. Chế phẩm vi khuẩn thường được bảo quản ở dạng bào tử. Tinh thể thường có kích thước thay đổi, khoảng 0,6μm × 2μm; hình thoi, cũng có loại hình tròn, hình bầu dục tuỳ theo loài và loại môi trường. Tinh thể là một loại protein là chất diệt sâu có hiệu quả chủ yếu.





Hình 7.2. **Nang bào tử vỡ giải phóng bào tử và tinh thể độc tố của Bt**

Vi khuẩn Bt nhu cầu dinh dưỡng không cao. Chất dinh dưỡng chủ yếu là protein động thực vật, có thể phát triển bình thường trong nhiều nguồn nitơ, nguồn cacbon và muối vô cơ. Thông thường dùng nguồn cacbon là tinh bột, maltose, glucose. Nguồn nitơ là nitơ hữu cơ như cao thịt bò, peptone, bột men, bột bánh lạc, bột bánh đậu, bột cá, bột ngô... Muối vô cơ thường dùng là K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCO_3$. Vi khuẩn Bt có thể sinh trưởng trong điều kiện nhiệt độ 12 - 40°C, nhiệt độ thích hợp là 27 - 32°C, ở 35 - 40°C chúng sinh trưởng nhanh nhưng chóng lão hoá, nhiệt độ thấp chúng sinh trưởng rất chậm. Vi khuẩn thích hợp với điều kiện kiềm, pH thích hợp là 7,5, ở pH 8,5 vẫn có thể hình thành bào tử, nếu pH = 5 thì không hình thành bào tử. Vi khuẩn là loại hiếu khí, phải có đủ oxy mới sinh trưởng tốt, nhất là khi hình thành bào tử. Nếu không đủ oxy sẽ không hình thành bào tử, hoặc hình thành chậm.

Phản ứng sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn Bt: làm ngưng kết sữa, trong đường glucose, fructose, glycerol, tinh bột, maltose... sẽ hình thành acid; không hình thành indol; có phản ứng dương với methyl đỏ, phản ứng VP dương (ethiryl methyl methanol) ; có tác dụng hoà tan trong môi trường huyết ngựa agar; có thể mọc trên môi trường muối xianat, khử muối nitrate thành muối nitrit, không khử muối sulphat, sản sinh ra enzyme phospholypase, không xuất hiện hạt màu đỏ.

4.1.2. Độc tính và cơ chế gây độc của vi khuẩn Bt

a) Các nhóm chất độc của Bt

Vi khuẩn Bt gây bệnh cho côn trùng qua con đường tiêu hoá. Bào tử nảy mầm dẫn đến sự sinh sản của vi khuẩn trong cơ thể vật chủ làm cho côn trùng chết, song yếu tố chính làm cho côn trùng chết nhanh chóng lại là chất độc do vi khuẩn sinh ra. Các chủng khác nhau thuộc loài *Bacillus thuringiensis* sinh ra hai loại chất độc chính, đó là các chất độc tinh thể (Cry) được mã hóa bởi các gen cry khác nhau (đây cũng là một trong các dấu hiệu dùng để phân loại các nhóm Bt) và các chất độc phân giải tế bào (Cyt) có tác động riêng rẽ và tổ hợp cùng Cry làm tăng tác dụng của tinh thể độc. Nhóm chất độc Cyt bao gồm các ngoại độc tố (sản phẩm tiết của vi khuẩn) α, β, γ.

- Ngoại độc tố α là một loại enzyme phospholipase được tiết ra trước khi bào tử và tinh thể độc được hình thành gây phân hủy mô trong cơ thể côn trùng bị tác động.
- Ngoại độc tố β là loại ngoại độc tố của Bt được nghiên cứu kỹ nhất. Độc tố này có tính bền nhiệt, được tạo ra trước khi tinh thể độc hình thành. Ngoại độc tố β có cấu trúc tương tự như ATP, có tác dụng cạnh tranh với ATP, làm

ức chế hoạt động của ARN-polymerase. Cùng với tinh thể độc, ngoại độc tố này xâm nhập vào huyết tương của côn trùng, đến các cơ quan làm tăng tính độc của vi khuẩn khi đi vào cơ thể côn trùng. Hiệu quả của ngoại độc tố β thể hiện rõ trên đối tượng sâu non của côn trùng chịu tác động, làm ngăn cản quá trình lột xác, hoặc gây ra dị thường trong phát triển. Tác dụng của độc tố này còn phụ thuộc vào liều lượng sử dụng và cách thức gây độc, gây độc qua tiêm cho hiệu quả mạnh hơn là qua đường tiêu hóa.

- Ngoại độc tố γ: Độc tố này cũng là một loại phospholipase tác động lên phospholipid, làm phá hủy mô tế bào.

So với 3 nhóm ngoại độc tố trên, tinh thể độc Cry được tạo ra với lượng lớn hơn nhiều và có hiệu quả chính gây độc cho côn trùng. Tinh thể độc Cry còn được gọi là nội độc tố δ. Tinh thể độc là một protein kết tinh có kích thước khác biệt nhau tùy từng nhóm. Ngoài thành phần protein, tinh thể còn có nhiều nguyên tố khác như Ca, Mg, Fe, Si, Zn hay Al.... Tinh thể độc được bắt đầu tạo ra khi khởi đầu quá trình hình thành bào tử, được dần tích lũy từ chính protein trong tế bào có liên hệ mật thiết với màng bào tử. Khi được kết tinh thành tinh thể có nhiều hình dạng khác nhau, chủ yếu là hình thoi. Tinh thể không hoà tan trong nước, hoặc các chất hữu cơ (chloroform, acetol, ether), nhưng có thể hoà tan trong dung dịch kiềm. Tinh thể có thể ổn định trong các dung dịch có phạm vi pH rộng (4 – 12), có thể bị biến tính trong acid trichloaxetic, chlorua thuỷ ngân. Tuy nhạy cảm với nhiệt độ cao song có tính chịu nhiệt nhất định (ở 65°C có thể giữ được 1 giờ, 80°C có thể giữ được 20 phút).

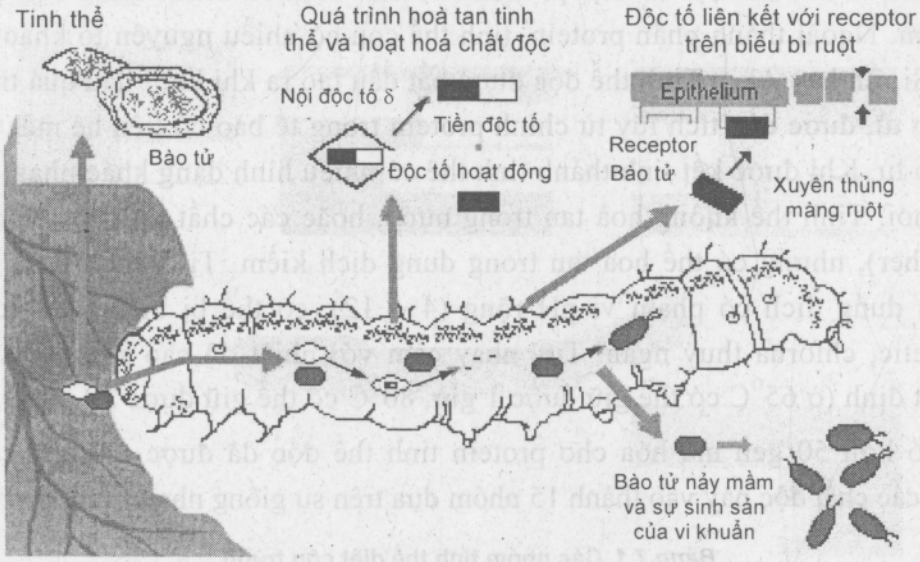
Đã có hơn 50 gen mã hóa cho protein tinh thể độc đã được giải mã cho phép phân loại các chất độc này vào thành 15 nhóm dựa trên sự giống nhau trong trình tự gen.

Bảng 7.1. **Các nhóm tinh thể diệt côn trùng**

Gen	Hình dạng tinh thể	Khối lượng protein tinh thể (kDa)	Đối tượng diệt
Cry I [nhiều nhóm phụ: A(a), A(b), A(c), B, C, D, E, F, G]	Hình thoi	130 – 138	Các ấu trùng bộ cánh vảy (Lepidoptera)
Cry II [nhóm phụ: A, B, C]	Hình khối	69 – 71	Côn trùng bộ cánh vảy (Lepidoptera), bộ hai cánh (Diptera)
Cry III [nhóm phụ: A, B, C]	Hình phẳng hoặc vô định hình	73 – 74	Côn trùng bộ cánh cứng (Coleoptera)
Cry IV [nhóm phụ: A, B, C]	Hình thoi	73 – 134	Côn trùng hai cánh (Diptera)
Cry V – IX	Đa dạng	35 – 129	Nhiều loài

4.1.3. Cơ chế gây độc của tinh thể độc

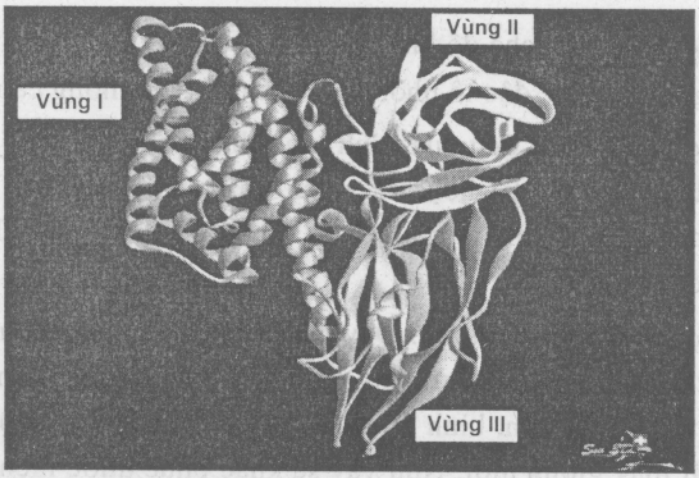
Tinh thể độc cùng với bào tử xâm nhập vào cơ thể sâu bằng con đường tiêu hóa khi sâu ăn phải lá có vi khuẩn. Trong điều kiện bình thường, tinh thể độc không hòa tan. Khi đi vào ruột giữa của sâu, nơi có pH kiềm cao (> 9,5) làm cho tinh thể độc tan ra. Tuy nhiên, dạng hòa tan này chưa phải là dạng hoạt động. Dạng tiền độc tố (có kích thước 135 – 140kDa) này được protease trong ruột giữa của sâu hoạt hóa thành dạng hoạt tính (60 – 66kDa) độc tố δ. Độc tố này liên kết với tế bào biểu mô thành ruột, đâm qua màng tạo thành lỗ xuyên màng, làm mất cân bằng ion nội bào của tế bào biểu mô và làm cho chúng bị phân giải, sâu ngừng ăn và bị chết đói. pH trong ruột bị giảm xuống bằng với pH nội môi trong huyết tương. Độ pH thấp này cho phép các bào tử nảy mầm, xâm chiếm vật chủ và cuối cùng là gây chết.



Hình 7.3. **Cơ chế hoạt động của tinh thể độc tố diệt côn trùng**

Những nghiên cứu gần đây về cấu trúc nội độc tố δ cho thấy, protein này có 3 vùng chức năng:

- Vùng I là một bó gồm 7 chuỗi xoắn α. Một vài chuỗi hoặc tất cả các chuỗi có thể cài vào màng tế bào ruột, tạo ra các lỗ, từ đó các ion có thể qua lại tự do.
- Vùng II chứa 3 dải β không song song tương tự như vùng gắn kháng nguyên của globulin miễn dịch. Vùng này có vai trò gắn với thụ thể trên bề mặt tế bào biểu mô ruột.
- Vùng III có nhiệm vụ bảo vệ độc tố đã được hoạt hoá không bị phân huỷ bởi protease ở ruột.



Hình 7.4. **Nội độc tố δ của *B. thuringiensis***

Với cấu trúc phức tạp như vậy, nội độc tố δ liên kết đặc hiệu với các thụ thể trên màng tế bào biểu mô ruột của sâu, gây ra tác động dây chuyền được nêu ở trên. Chính điều này làm nên tính đặc hiệu rất cao trong hiệu quả tác động của Bt lên sâu hại. Do đó, phổ tác dụng của Bt tương đối hẹp, tùy vào từng loại tinh thể độc mà các chủng Bt có tác dụng với các sâu của nhóm côn trùng chủ yếu thuộc bộ Lepidoptera.

4.1.4. Phương pháp sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu Bt

Bt được sản xuất chủ yếu theo 2 cách: Lên men thường (lên men bề mặt) và lên men chìm có sục khí. Công nghệ lên men xốp đạt hiệu quả không cao nên hiện nay ở nước ta và trên thế giới đều không dùng phương pháp này mà chủ yếu dùng phương pháp lên men chìm

a) Chọn chủng lên men: Tuỳ theo việc phòng trừ sâu hại nào mà nhà sản xuất sử dụng các chủng khác nhau để lên men.

b) Chọn môi trường lên men: Trên cơ sở có các môi trường với các thành phần dinh dưỡng sẵn có, tuỳ thuộc vào chủng Bt cần lên men mà chọn các môi trường phù hợp.

Với phương pháp lên men chìm, tiến hành trong các nồi lên men 500 lít, 1000 lít, 2000 lít. Ngoài môi trường dinh dưỡng ra, người ta phải chú ý tới các thông số khác như chế độ thổi khí, chế độ nhiệt, chế độ nhân chuyển giống... để làm sao hạn chế được các thực khuẩn thể làm phá huỷ các bào tử và tinh thể độc tố Bt.

– *Chế độ thổi khí*: Đây là chỉ tiêu quan trọng cho quá trình hình thành bào tử và tinh thể độc. Ngưỡng thổi khí tốt nhất trong quá trình lên men là 0,5 – 0,6m^3 môi trường/m^3 không khí. Nếu chế độ khí ở mức thấp thì bào tử phát triển

yếu, mật độ thưa, nếu chế độ khí ở mức cao bào tử phát triển nhanh, thời gian lên men ngắn, tinh thể độc tố nhỏ, hiệu quả diệt sâu không cao.

- *Nhiệt độ* có ảnh hưởng đến quá trình hình thành bào tử. Nếu nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp sẽ kéo dài hoặc rút ngắn quá trình lên men, do đó trong quá trình lên men phải điều chỉnh nhiệt độ (nhiệt độ thích hợp nhất là 30^0C, như đã nói ở trên).
- *Các chế độ luân chuyển giống*: Đây là chỉ tiêu làm ảnh hưởng sự hình thành bào tử và tinh thể độc. Nếu sử dụng giống liên tục, sẽ xảy ra hiện tượng nhiễm thực khuẩn thể. Cho nên, bình thường chỉ lên men khoảng 10-15 lần giống cũ thì cần phải thay giống mới. Như vậy sẽ khắc phục được hiện tượng phân đốt, hiện tượng tạo ra ít bào tử, hoặc ít tinh thể độc tố.

Tính ổn định của quá trình lên men được thể hiện ở kết quả lên men thông qua một số chỉ tiêu cơ bản sau: Số lượng bào tử nhiều, độc tố endotoxin cao, kích thước tinh thể độc tố lớn, khối lượng sinh khối thu hồi trong quá trình lên men cao.

Quy trình tổng quát sản xuất chế phẩm Bt

Chủng Bt thuần khiết

↓

Nhân giống cấp 1

↓

Nhân giống cấp 2

↓

(Thời gian lên men:48-72h, pH 7, nhiệt độ 30°C)

↓

Lên men

↓

Lọc và ly tâm

↓

Thu sinh khối

↓

Hoàn thiện sản phẩm

Ở bước hoàn thiện sản phẩm, sản phẩm sẽ được đóng gói, chế thành các dạng chế phẩm khác nhau. Hiệu quả phòng trừ bằng chế phẩm Bt không hoàn toàn quyết định bởi thành phần hoạt tính của chế phẩm mà dạng chế phẩm cũng là một nhân tố

quan trọng. Dạng chế phẩm Bt bao gồm dạng nước, dạng bột, dạng bột thấm nước, dạng nang keo. Mỗi dạng chế phẩm có hiệu quả diệt sâu khác nhau tùy từng thời điểm và đối tượng diệt.

4.1.5. Các hướng phát triển của thuốc trừ sâu Bt

Một trong các biện pháp hiện nay được sử dụng để phát triển thuốc trừ sâu, đó là cải biến các chủng Bt thông qua kỹ thuật gen. Từ những năm của thập niên 1980, các nhà khoa học đã khám phá ra rằng, tinh thể độc được mã hóa bởi các gen nằm trên plasmid của *Bacillus thuringiensis*. Mỗi vi khuẩn có thể có 5 hay 6 plasmid khác nhau mang gen mã hóa cho nhiều loại chất độc. Giữa các chủng Bt có sự trao đổi plasmid thông qua quá trình tương tự như tiếp hợp tạo ra nhiều chủng với tổ hợp các chất độc khác nhau. Bên cạnh đó, Bt còn có các transposon (các yếu tố di truyền vận động) có khả năng mang các gen độc tố đi khắp hệ gen và sang các plasmid khác nhau. Những đặc tính này làm tăng sự đa dạng về độc tố tự nhiên của các chủng Bt, cung cấp cơ sở phong phú cho các nhà nghiên cứu trong việc tạo ra những chủng được cải biến về mặt di truyền có những tổ hợp độc tố mới. Một trong những sản phẩm đầu tiên thuộc nhóm này là sản phẩm thương mại Raven có tác động lên bọ cánh cứng tấn công khoai tây, sâu bướm tấn công các nhóm cây thuộc họ Cà. Chủng Bt này có mang hai protein hoạt động Cry III khác nhau và hai protein Cry I (có ái lực bám khác nhau lên màng tế bào thành ruột giữa của côn trùng). Phương pháp này một mặt mang lại tiềm năng cho các nhà khoa học phát triển các chủng mới có độc lực cao, đồng thời trở thành công cụ chống lại khả năng kháng thuốc ở côn trùng.

Một hướng phát triển đầy triển vọng khác để tăng cường khả năng chống sâu hại của cây trồng dựa trên cơ sở thuốc trừ sâu Bt, đó là chuyển gen trực tiếp mã hóa cho độc tố vào thực vật. Những thành tựu gần đây của kỹ thuật di truyền cho phép việc chuyển các gen tốt vào trong thực vật một cách dễ dàng. Như trên đã trình bày, các tinh thể độc được mã hóa bởi các gen đặc hiệu nằm trên plasmid của vi khuẩn. Sử dụng các công cụ chuyển gen, gen Cry được chuyển vào các đối tượng đích ở các mô thích hợp cho phép lựa chọn mục tiêu biểu hiện độc tính ở trên chính cây trồng. Khi côn trùng ăn phải thực vật được chuyển gen có biểu hiện nội độc tố ở các mô, chúng sẽ bị nhiễm độc và chết. Bằng cách này, những loài côn trùng ăn rễ hoặc ăn sâu vào trong mô của cây không chịu tác dụng của những loại thuốc phun trên bề mặt lá đều có thể bị tiêu diệt. Từ năm 1996, rất nhiều loại cây trồng được chuyển gen từ Bt có khả năng sinh ra nội độc tố δ. Một số loại cây đã được chuyển gen Bt và trồng phổ biến như ngô, bông, khoai tây...Thuật ngữ "cây trồng Bt" trở nên rất phổ biến ở Mỹ.

4.2. Chế phẩm Bti diệt muỗi

Muỗi là vật trung gian truyền nhiều bệnh nguy hiểm như sốt rét, sốt xuất huyết Dangi, viêm não Nhật Bản.... Việc dùng hoá chất diệt muỗi tuy mang lại hiệu quả cao nhưng cũng diệt luôn cả các loài côn trùng khác, gây mất cân bằng sinh thái và làm bùng nổ côn trùng do kháng thuốc. Năm 1978, lần đầu tiên người ta phân lập từ ấu trùng muỗi chết ở Israel một chủng Bt mới có độc lực cao đối với một số côn trùng, đặc biệt là ấu trùng muỗi và đặt tên là *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, gọi tắt là Bti. Ngay lập tức, chủng này được nghiên cứu để tạo chế phẩm diệt muỗi.

4.2.1. Đặc điểm của Bti

Bti là vi khuẩn Gram dương, hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc. Tế bào có kích thước từ 3 – 5μm, phủ lông thưa, có khả năng di động. Cũng giống như các Bt khác, bào tử có dạng hình thoi 1 – 2μm. Trong quá trình hình thành bào tử thì tạo luôn protein tinh thể nằm kề bào tử. Tuy nhiên, đa số các chủng Bt có tinh thể hình que, hình tháp đôi, hoặc hình cầu, còn tất cả các chủng Bti đều chỉ có tinh thể hình cầu. Theo hệ thống phân loại dựa trên 50 typ huyết thanh của Bt thì Bti thuộc typ huyết thanh H14. Năm 1989, Hafte và Whiteley đề nghị phân loại Bti dựa theo lớp gen Cry, thành phần protein tinh thể, typ huyết thanh và hoạt tính diệt côn trùng. Các tinh thể độc của Bti được xác định là Cry4A, Cry4B, Cry11Aa và Cyt1Aa. Tất cả các protein này đều độc với muỗi, tuy nhiên nếu kết hợp giữa Cyt11Aa với các protein Cry4 và Cry11 thì hoạt lực sẽ mạnh hơn.

***Bảng 7.2.* Đặc điểm phân loại *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* theo Hofte và Whiteley**

Lớp gen Cry	Khối lượng protein	Dạng tinh thể	Typ huyết thanh	Đối tượng diệt
Cry4A	135	Hình cầu	H14	Muỗi, ruồi đen
Cry4B	128	Hình cầu	H14	Muỗi, ruồi đen
Cry4C	78	Hình cầu	H14	Muỗi, ruồi đen
Cry4D	67	Hình cầu	H14	Muỗi, ruồi đen
Cyt	28	Hình cầu	H14	Muỗi, ruồi đen

Viện Pasteur cung cấp 2 chủng Bti chuẩn ký hiệu IPS78 và IPS80 để nghiên cứu so sánh với các chủng mới phân lập và dùng trong sản xuất chế phẩm diệt muỗi.

4.2.2. Chế phẩm Bti diệt muỗi

Để sản xuất người ta tiến hành lên men Bti trên môi trường có thành phần (g/l) như sau: bột mì 15, glucose 10, cao nấm men 5, KH_2PO_4 0,1, $MgSO_4$ 0,1, NaCl 3, $FeSO_4$ 3 ở nhiệt độ 30°C trong 38 giờ, thông khí 0,5 v/v/min. Ly tâm, trộn với 2 lần thể tích axeton để kết tủa tinh thể và bào tử. Cho axeton bay hơi, làm khô bằng dòng không khí sạch, nghiền thành bột. Trộn 20kg bột bào tử-tinh thể với 10kg bentonit và 10kg clarcel CBR. Bột được đóng gói trong thùng kín, độ ẩm 6%.

Chế phẩm có hoạt lực diệt ấu trùng, nhiều loài muỗi, thường là sau 24 giờ. Ưu điểm của chế phẩm là: không độc đối với người, vật nuôi; không độc với côn trùng có lợi, động vật thủy sinh; không chứa ngoại độc tố; không tồn lưu tính độc sau khi sử dụng; không xuất hiện muỗi kháng Bti; không gây ô nhiễm môi trường. Chế phẩm được chế tạo theo nhiều dạng khác nhau, dùng để phun vào không khí, phun vào đất, trộn vào cát. Dạng bánh nổi dùng cho ruộng nước, còn dạng bánh vòng có buộc chỉ để gài vào cây bên bờ dòng chảy.

4.1.3. Chế phẩm Bacillus sphaericus diệt muỗi

Ngoài Bti, vi khuẩn *Bacillus sphaericus* (Bs) là loài có hiệu lực diệt ấu trùng muỗi cao đã được nghiên cứu và sản xuất thành chế phẩm thương mại. Tế bào hình que có kích thước trung bình 0,5 – 1μm, Gram dương, hiếu khí, chuyển động được, bào tử hình cầu nằm ở đầu tế bào và phình to hơn kích thước chiều ngang của tế bào, không sử dụng hydrat cacbon. Có khả năng sinh độc tố không đặc trưng và không liên quan đến sự hình thành bào tử.

Vi khuẩn Bs được phân loại dựa theo typ huyết thanh và thể thực khuẩn. Trong số các typ huyết thanh kháng tiêm mao H thì 3 typ H1a, H2 và H5 có khả năng sinh độc tố. 7 loại thể thực khuẩn của *E.coli* (T1 – T7) được sử dụng kết hợp với typ huyết thanh để phân biệt các chủng. Một số chủng đáng chú ý:

- Chủng Bs 1593 do Singer phân lập ở Indonesia năm 1977. Độc tố bền, tăng đột ngột ở giai đoạn hình thành bào tử. Bào tử hình elip hoặc hình trứng.
- Chủng Bs 2362 do Weiser phân lập năm 1984 ở Nigeria từ ruồi trưởng thành Simulium nhưng có khả năng diệt ấu trùng muỗi rất mạnh.
- Chủng Bs 1AB59 do Barjac phân lập năm 1988 ở Ghana. Bào tử hình tròn. Thuộc typ huyết thanh H6.
- Chủng Bs 2297 do Wickremesinghe phân lập năm 1980 ở Srilanka. Bào tử rất to giống như ở vi khuẩn Bt thuộc typ huyết thanh H25.

Chế phẩm Bs có hoạt tính mạnh diệt ấu trùng của các loài muỗi thuộc giống Anopheles, Aedes và Culex nên được sử dụng trong phòng chống sốt rét, sốt xuất huyết Dengue và sốt viêm não Nhật Bản. Phương pháp tạo chế phẩm cũng giống như với Bti. Có thể sử dụng các nguyên liệu địa phương để lên men như mầm malt, máu bò thu từ lò mổ, dịch chiết đậu, protein động vật, phân động vật, chất thải nông nghiệp. Độc tính của Bs phụ thuộc nhiều vào nguồn nitơ sử dụng. Amoni là nguồn nitơ vô cơ thích hợp cho giai đoạn phát triển logarit. Chế phẩm có thể được sản xuất dưới dạng bột, dạng sệt, dạng dịch hoặc dạng bánh. Các dạng bột, sệt và bánh có thể kéo dài thời gian ăn của ấu trùng muỗi. Hoạt lực của chế phẩm có thể bị giảm trong môi trường giàu chất dinh dưỡng, hoặc bức xạ của ánh sáng mặt trời. Khả năng tái sinh nhân lên của bào tử sẽ làm tăng hiệu quả của chế phẩm. Các ấu trùng ăn phải bào tử sẽ bị nhiễm độc và chết. Bào tử trong xác ấu trùng sẽ nảy mầm, nhân lên theo hàm số mũ sẽ lại nhiễm vào ấu trùng mới, khoẻ. Hiệu quả này sẽ được duy trì trong nhiều tháng.

5. THUỐC TRỪ SÂU CÓ NGUỒN GỐC VIRUS

Virus là nhóm sinh vật có đặc điểm ký sinh bắt buộc với một hay một số loại vật chủ nhất định, gây hại, thậm chí làm chết vật chủ ký sinh. Chính đặc tính tự nhiên này đã khiến cho virus trở thành một công cụ đắc lực sử dụng trong công nghệ sản xuất thuốc trừ sâu bảo vệ thực vật chống lại sâu hại. Virus côn trùng thuộc 7 họ bao gồm: *Baculoviridae, Iriviridae, Poxviridae, Reoviridae, Parvoviridae, Picornaviridae và Rhabdoviridae*. Chúng có thể ký sinh và gây bệnh cho côn trùng, hoặc chỉ dùng côn trùng làm vật chủ đầu tiên. Mặt khác do có đích tấn công là các mô khác nhau trong cơ thể côn trùng mà tùy từng nhóm virus có khả năng diệt sâu hại khác nhau. Vì thế, sử dụng trong công nghệ sản xuất thuốc trừ sâu vi sinh, có hai nhóm được quan tâm nhất đó là nhóm Baculovirus thuộc họ *Baculoviridae* và nhóm Cytoplasmis polyhedrosis virus (CPV) thuộc họ *Reoviridae*. Nhóm Baculovirus là đối tượng được sử dụng phổ biến nhất hiện nay do những đặc tính phù hợp trở thành những ưu điểm nổi trội khi được sử dụng làm thuốc trừ sâu như sau:

- Baculovirus chỉ tấn công động vật không xương sống và có tính đặc hiệu đáng kể nên không gây hại cho những côn trùng có ích khác.
- Chúng có cấu trúc với thể bọc bảo vệ, tránh các yếu tố bất lợi của môi trường nên có thể duy trì khả năng sống trong tự nhiên ngoài cơ thể vật chủ.
- Rất thuận lợi khi sản xuất chế phẩm thương mại vì thường có thể đạt nồng độ cao trong mô của ấu trùng (1010 virus/ấu trùng). Chế phẩm có thể giữ hoạt tính trong thời gian rất dài (10 – 15) năm, ngoài cơ thể côn trùng.

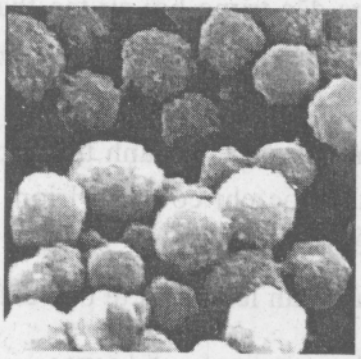
Vì vậy, dưới đây chúng tôi sẽ tập trung chủ yếu vào nhóm Baculovirus với đại diện tiêu biểu nhất của nhóm này.

NHÓM VIRUS CÔN TRÙNG Baculovirus

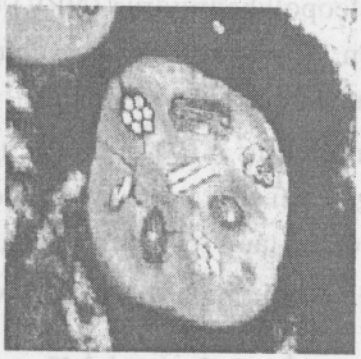
5.1. Đặc điểm cấu trúc và hệ gen

Baculovirus chứa ADN kép, khép kín. Kích thước hệ gen từ 80-180kbp. Người ta đã tìm thấy 120 – 160 khung đọc trên trình tự giải mã bộ gen của virus. Trên hệ gen, ngoài các trình tự mã hóa còn có nhiều trình tự ngắn lặp lại (được gọi là các vùng tương đồng) trải khắp hệ gen. Những vùng này giúp tăng cường khả năng phiên mã sớm của gen, đồng thời hoạt động như những vùng khởi đầu phiên mã. Nhiều gen trong hệ gen của Baculovirus có gen gối nhau, cho phép mã hóa được nhiều gen trong khi chúng có hệ gen với kích thước nhỏ.

Baculovirus có hình que điển hình, có đường kính 30 – 60nm, dài 250 – 300nm. Các virus tập hợp lại trong một thể có dạng đa diện, có kích thước khác nhau tùy các nhóm nhỏ. Dạng thể bọc này được quan sát rất rõ dưới kính hiển vi quang học.



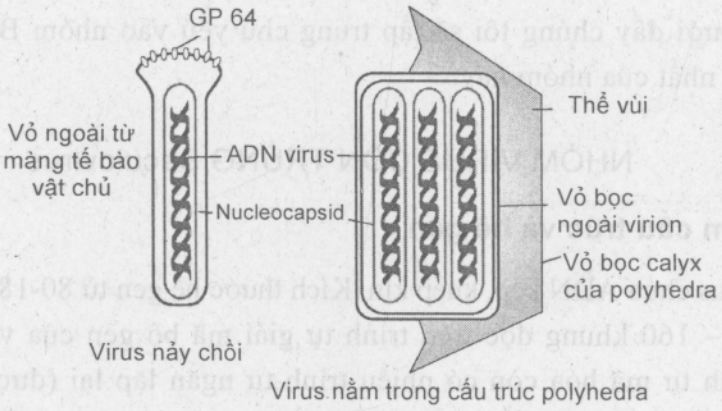
Polyhedra của NPV



Cắt ngang cấu trúc của MBPV

Hình 7.5. **Hình dạng các thể bọc của virus diệt côn trùng**

Các thể bọc này được tạo ra trong giai đoạn muộn trong chu kỳ lây nhiễm của virus và được gói bọc trong lớp giàu protein, giúp cho virus lây nhiễm sang các vật chủ mới và cho phép chúng chống chịu lại điều kiện ngoài tự nhiên, do đó có thể tồn tại trong thời gian dài ngoài cơ thể vật chủ. Ngoài dạng tồn tại này, Baculovirus còn có một dạng hình thái nữa, được thấy khi virus đã lây nhiễm vào cơ thể côn trùng, hoặc được nuôi dưỡng trong môi trường thích hợp. Dạng này được gọi là virus nảy chồi, chỉ mang duy nhất một nucleocapsid và được bao bọc một lớp vỏ là màng tế bào chất của vật chủ. Chính những protein có mặt trên lớp vỏ này như protein GP64 đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong việc giúp virus lây nhiễm khắp cơ thể vật chủ.



Hình 7.6. **Cấu tạo các dạng tồn tại của virus**

– Dựa vào đặc điểm hình thái và thể bọc, *Baculoviridae* được chia làm 3 nhóm:

+ Nhóm A - virus nhân đa diện (nuclear polydehedrosis virus) _NPV.

+ Nhóm B - virus dạng hạt (granulosis virus) _GV.

+ Nhóm C - không tạo thể bọc lây nhiễm.

– Tuy nhiên gần đây, *Baculoviridae* được chia thành hai chi:

+ Nucleopolyhedrovirus (NPV) được đặc trưng bởi sự tạo thành thể bọc hình đa diện. Trong mỗi thể bọc chứa nhiều virion, virus nhân lên và tạo vỏ bọc trong nhân của tế bào ký chủ.

+ Granulovirus (GV) được đặc trưng bởi sự tạo thành thể bọc hình elip, hoặc hình gậy hai đầu tròn. Trong mỗi thể bọc chỉ có một virion. Virus tiến hành nhân lên và tạo vỏ bọc trong nhân tế bào ký chủ.

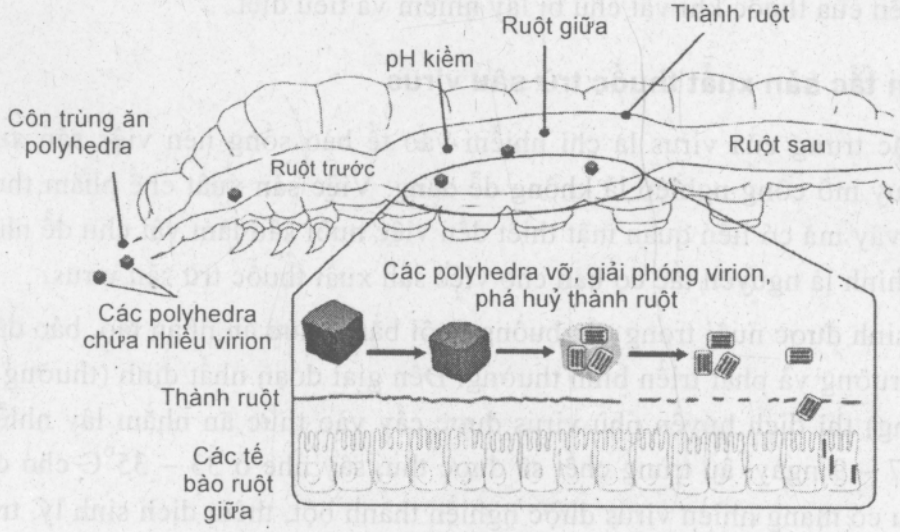
Tuy nhiên có trường hợp ngoại lệ, virus nhân lên trong tế bào chất.

5.2. Chu trình sống và cơ chế lây nhiễm gây độc của NPV

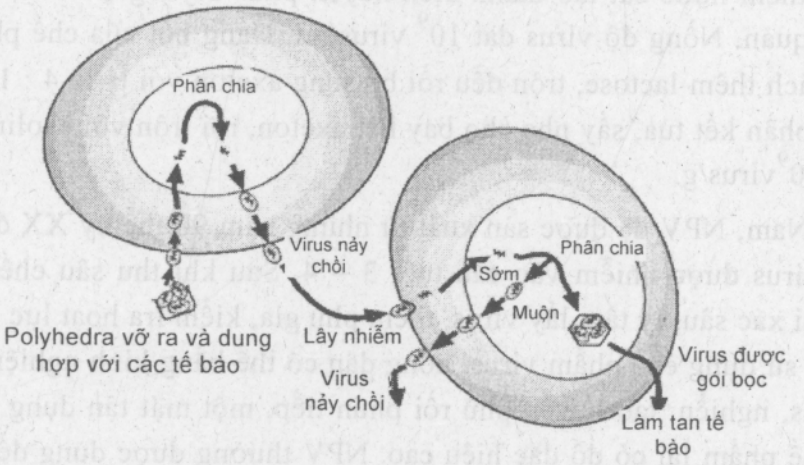
Do đã có rất nhiều nghiên cứu được tiến hành trên Baculovirus, đặc biệt với đối tượng là NPV nên những hiểu biết của các nhà khoa học về đối tượng này đến nay là tương đối rõ ràng. Trong vấn đề đánh giá khả năng gây độc và sử dụng NPV làm thuốc trừ sâu, những hiểu biết về chu trình sống liên quan trực tiếp đến cơ chế gây độc của virus là rất quan trọng. Baculovirus giống như nhiều loại virus khác có chu trình phân chia hai pha. Như đã nói ở trên, virus có hai dạng tồn tại, một dạng virus thể bọc giúp chúng lây nhiễm trong môi trường tự nhiên, từ vật chủ này sang vật chủ khác trong khi dạng còn lại - virus nảy chồi liên quan trực tiếp đến sự lan truyền của virus giữa các tế bào khác nhau trong chính cơ thể vật chủ.

Vật chủ của Baculovirus có đến 600 loài khác nhau thuộc Bộ Diptera, Bộ Hymenoptera, Bộ Lepidoptera và ấu trùng của Bộ Decapoda. Khi vật chủ ăn thức ăn

có chứa virus thể bọc, virus sẽ theo đường tiêu hóa đi vào ruột giữa. Trong môi trường kiềm của ruột giữa, thể bọc sẽ được phá tan ra, giải phóng các virion. Các virion này sẽ vượt qua màng tế bào thành ruột đi vào trong tế bào. Ở đây chúng sử dụng bộ máy của tế bào vật chủ thực hiện các quá trình tự sao chép, phiên mã rồi dịch mã tạo ra các virion mới. Các virion này sẽ nảy chồi, thoát ra khỏi tế bào thành ruột trở thành dạng virus nảy chồi. Do thu nhận được lớp vỏ bọc từ màng tế bào ruột, các virus này có khả năng xâm nhập tiếp vào các tế bào thuộc các mô khác của cơ thể côn trùng.



Hình 7.7. **Sự lây nhiễm NPV vào côn trùng**



Hình 7.8. **Chu trình lây nhiễm của NPV**

Chúng tấn công vào tất cả các loại tế bào khác nhau trong toàn bộ cơ thể vật chủ. Ở mỗi tế bào, một chu trình như vậy lại được tiếp tục, có sự sao chép, phiên mã, dịch

mã hình thành các cấu phần của virus. Tuy nhiên, thay vì tạo ra các virion nảy chồi, các virus mới tạo ra sẽ tập hợp lại với nhau. Vỏ bọc được cấu tạo từ protein polyhedrin đặc biệt, bao bọc các virion lại với nhau, tạo ra cấu trúc thể bọc. Lúc này sẽ xảy ra hiện tượng gây tan tế bào. Vật chủ bị tiêu diệt giải phóng ra hàng loạt thể bọc như vậy. Côn trùng bị chết do NPV thường có biểu hiện treo ngược, vỡ tung, chảy dịch trong có chứa virus. Các virus mới được giải phóng lại tiếp tục tấn công vật chủ mới. Đây chính là một điểm nổi bật nữa khi sử dụng Baculovirus làm thuốc trừ sâu do tính lây truyền cao, đảm bảo tính hiệu quả lâu dài và ảnh hưởng được khuếch đại lên của thuốc khi vật chủ bị lây nhiễm và tiêu diệt.

5.3. Nguyên tắc sản xuất thuốc trừ sâu virus

Điểm đặc trưng của virus là chỉ nhiễm vào tế bào sống nên việc sản xuất chế phẩm trên quy mô công nghiệp là không dễ dàng. Việc sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu virus vì vậy mà có liên quan mật thiết đến việc nuôi sâu làm vật chủ để nhân bản virus. Đây chính là nguyên tắc cơ bản cho việc sản xuất thuốc trừ sâu virus.

Sâu ký sinh được nuôi trong các buồng nuôi bằng thức ăn nhân tạo, bảo đảm cho chúng sinh trưởng và phát triển bình thường. Đến giai đoạn nhất định (thường là giai đoạn ấu trùng) thì dịch huyền phù virus được cấy vào thức ăn nhằm lây nhiễm cho sâu. Sau từ 7 – 9 ngày, ấu trùng chết sẽ được thu, sấy nhẹ ở 33 – 35°C cho đến khi khô. Xác sâu có mang nhiều virus được nghiền thành bột, thêm dịch sinh lý, trộn đều rồi lọc. Ví dụ như với chế phẩm EKS của Nga, sản phẩm lọc được ly tâm lấy cặn chứa virus, thêm nước cất tạo thành dịch huyền phù. Glycogen vô trùng được thêm vào để bảo quản. Nồng độ virus đạt 10^9 virus/ml. Dạng bột của chế phẩm được sản xuất bằng cách thêm lactose, trộn đều rồi bổ sung axeton với tỷ lệ 4 : 1. Để lắng hỗn hợp rồi lấy phần kết tủa, sấy nhẹ cho bay hết axeton, rồi trộn với caolin hay bentonit để có tỷ lệ 10^9virus/g.

Ở Việt Nam, NPV đã được sản xuất từ những năm 90 thế kỷ XX để diệt hại sâu hại bông. Virus được nhiễm vào sâu tuổi 3 – 4. Sau khi thu sâu chết, lọc qua vải mỏng để loại xác sâu, ly tâm lấy virus, thêm phụ gia, kiểm tra hoạt lực rồi đóng chai. Ở nhiều nơi sử dụng chế phẩm virus, nông dân có thể bằng kinh nghiệm nhặt lại sâu chết do virus, nghiền, tạo huyền phù rồi phun tiếp, một mặt tận dụng lại chế phẩm, mặt khác chế phẩm lại có độ đặc hiệu cao. NPV thường được dùng để diệt sâu keo, sâu khoang, sâu róm... Sâu ăn phải virus bò chậm, ngừng ăn, chuyển sang màu đen, treo ngược trên cây. Trong khi đó, GV được dùng để diệt bướm đêm, bướm ngày và nhiều sâu khác. Sâu ăn phải virus bò chậm, bỏ ăn. Sau 1 – 2 tuần thân bị thắt lại, có màu vàng hoặc đen, mềm nhũn.

Để phát huy tính độc cao của virus và những loại thuốc trừ sâu vi sinh khác, đồng thời làm tăng phổ diệt sâu, một số nhà sản xuất còn phối hợp các loại như sử dụng Bt với GV.

Bên cạnh đó, do chế phẩm thuốc trừ sâu virus có một lợi thế về tính đặc hiệu cao song đôi khi, chính đặc điểm này lại hạn chế phổ diệt côn trùng rất hẹp. Việc sử dụng nhiều loài thuốc trừ sâu virus khác nhau là không có hiệu quả về mặt kinh tế. Chính vì thế, các nhà khoa học đang tập trung phát triển, sử dụng kỹ thuật cải biến gen để tạo ra các loại virus mới với phổ vật chủ rộng hơn. Đây chính là một hướng phát triển đầy triển vọng trong việc sản xuất chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh.

6. THUỐC TRỪ SÂU CÓ NGUỒN GỐC TỪ NẤM SỢI

Trong tự nhiên, mặc dù sâu hại sinh sản nhanh chóng nhưng tỷ lệ chết của chúng cũng rất cao, lên đến 95 – 99% do chúng luôn gặp phải những thiên địch. Một trong những loại thiên địch phổ biến, đó chính là nấm sợi. Có hàng trăm chi và vài trăm loài thuộc các lớp nấm khác nhau có khả năng diệt côn trùng. Tuy nhiên chỉ có khoảng 20 loài là được nghiên cứu dùng trong nông nghiệp và gần đây dùng trong y tế để diệt muỗi. So với virus và vi khuẩn, nấm có một số đặc điểm đặc trưng:

- Xâm nhập vào côn trùng không qua đường miệng mà qua tầng cutin, tại khớp nối giữa các đốt.
- Côn trùng thường bị nhiễm ở giai đoạn ấu trùng và không thấy có tác động qua lại với các vi sinh vật khác.
- Nấm sinh trưởng nhanh. Dạng bào tử có thể tồn tại lâu dài trong tự nhiên mà hoạt tính diệt côn trùng hầu như không thay đổi.
- Có tính đặc hiệu cao với một số loài côn trùng nhất định.

Khi bào tử rơi trên bề mặt côn trùng, gặp độ ẩm cao sẽ nảy mầm. Sợi nấm đâm xuyên vào cơ thể côn trùng. Nấm cũng tiết ra các enzyme như protease, chitinase và lipase để giúp cho quá trình phân huỷ da côn trùng, đồng thời tiết độc tố như beaverin, destruxin để hạ gục nhanh côn trùng. Với các chủng không sinh chất độc, côn trùng cũng bị diệt do hệ sợi nấm phát triển rất mạnh và dày đặc bên trong cơ thể, phá huỷ các nội quan. Sợi nấm tiếp tục phát triển cho đến khi toàn bộ nội quan bị phá huỷ, sau đó chui ra, mọc kín bề mặt cơ thể côn trùng, rồi hình thành bào tử. Hàng loạt nấm diệt côn trùng đã được nghiên cứu như *Aschersonia aleryodis*, *Beauveria aranearum*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, *Nomuraea atypicola*, *Nonomura rileyi*, *Nonomura viridulus*, *Paecilomyces javanicus*, *Verticillium lecanii*, *Hirsutella citriformis*, *Hirsutella thompsonii*, *Enthomorphthora* sp...

6.1. *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill

Beauveria bassiana thuộc họ Moniliaceae, bộ Moniliales. Nấm có sợi phân đốt đường kính 3 – 5μm, bào tử trần, không màu, thường hình cầu, đường kính 1,5 – 5,5 × 1,3μm. Trên cơ thể côn trùng, nấm có dạng phấn trắng, khi khô ngả màu vàng sữa. Nấm có khả năng sinh độc tố beauvericin, có bản chất depsipeptid vòng, rất độc đối với côn trùng. *Beauveria bassiana* có khả năng diệt trên 60 loài sâu, ví dụ rày thân, rày lá, sâu đục thân, sâu cuốn lá, bọ xít hại lúa, bọ xít đen, sâu róm thông...

Beauverin là chế phẩm diệt sâu sản xuất từ *Beauveria*, có màu trắng hay ngà, 1g chế phẩm chứa 1,5 – 6 × 10^9 bào tử. Để nâng cao hiệu quả diệt sâu của chế phẩm, đôi khi người ta có thể bổ sung thêm 10% thuốc hoá học. Điều này cho phép giảm 90% hoá chất bảo vệ thực vật cho đồng ruộng. Chế phẩm rất an toàn, không có hại cho động vật máu nóng, không làm bỏng cây.

Sản xuất chế phẩm Beauverin

Beauverin có thể được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy chìm, nuôi cấy bề mặt trên môi trường dịch thể, hoặc môi trường đặc, có hoặc không có khử trùng, thổi khí, khuấy trộn hoặc không.

a) Sản xuất Beauverin bằng phương pháp nuôi cấy chìm

Tất cả các quá trình sản xuất phải đảm bảo vô trùng, bao gồm các bước:

- Giống thạch nghiêng nuôi trên môi trường thạch mạch nha - men bia, hoặc môi trường Sabouraud, lắc 220 vòng/phút. Sau 3 – 4 ngày lấy ra, làm khô lạnh để dùng dần trong 1 năm mà sức sống và độc lực không giảm sút.
- Nhân giống: giống từ thạch nghiêng được cấy vào bình nón, nuôi lắc 25 – 28h ở 25 – 28°C.
- Lên men: Cấy 2 – 10% giống vào nồi lên men. Môi trường lên men giống như môi trường nhân giống, bao gồm 2% nấm men chăn nuôi, 1% tinh bột, 0,2% NaCl, 0,01% $MnCl_2$, 0,05% KCl. Hàm lượng KCl có thể tăng lên từ 0,75 đến 4% nhằm làm cho đính bào tử bền với môi trường bất lợi. pH 5 – 5,6. Nuôi ở 25 – 28°C trong 3 – 4 ngày, vừa khuấy vừa thổi khí. Tuỳ thuộc vào từng chủng mà điều chỉnh lượng khí được thổi là 2 – 2,5 lít không khí/1 lít môi trường/1 phút.
- Trong sản xuất, nếu thiếu vitamin sẽ làm giảm tốc độ sinh trưởng và khả năng hình thành đính bào tử, thường là 10 – 15mg%. Nếu thừa thì sẽ hình thành chủ yếu nội bào tử gonidi thay vì đính bào tử (conidi).

– Cuối giai đoạn lên men, một lượng lớn enzyme được tạo thành để thuỷ phân sợi nấm và thúc đẩy việc tạo thành conidi. Lượng bào tử được tạo thành tuỳ thuộc vào từng chủng và điều kiện nuôi cấy, thường đạt 0,3 – 1,3 × 10^9/ml, trong đó 90 – 92% là conidi, không quá 3 – 5% là gonidi và hoàn toàn không còn sợi.

– Cho dịch nuôi vào máy quay ly tâm để tách nước, thu bào tử dạng sệt có độ ẩm 70 – 80% và lượng bào tử 6 – 8 × 10^9/g, sau đó được đưa đi phun sấy để làm khô.

Bào tử khô có dạng bột mịn, độ ẩm 10% chứa 8.10^9 bào tử/g. Sau khi xác định LD50 thì trộn với chất mang, ví dụ như caolin và chất bám dính. Beauverin cũng có thể được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt trong môi trường dịch thể, hoặc môi trường đặc, có hoặc không khử trùng, có hoặc không khuấy trộn và thổi khí.

b) Phương pháp nuôi cấy trên môi trường lỏng không khử trùng, không khuấy trộn và thổi khí

– Đun sôi môi trường chế từ các nguyên liệu tự nhiên như cháo hạt ngũ cốc, nước chiết khoai tây, cà rốt, bí đỏ, giá đỗ...

– Để nguội xuống 35 – 40°C thì cấy bào tử nấm. Đậy nilon để tránh bụi và tránh nhiễm.

– Nuôi ở nhiệt độ 25 – 28°C, hoặc 28 – 30°C tuỳ chủng. Sau 7 – 10 ngày, từ màng nấm sẽ xuất hiện bào tử. Đến ngày 18 – 25 thì vớt màng nấm đặt lên miếng kính, dựng nghiêng cho róc nước.

– Làm khô bào tử ở nhiệt độ thấp (30 – 32°C), nghiền, rây, trộn với bột talc, hoặc bột than bùn, đôi khi cần thêm chất bám dính.

c) Phương pháp có khử trùng

– Môi trường đặc chế từ các nguyên liệu tự nhiên như khoai tây, cà rốt, vỏ dưa, ngô mảnh, hạt ngũ cốc (gạo, kê), đựng trong các túi nilon khử trùng trong nồi hấp 121°C trong 40 phút.

– Đợi nguội thì cấy bào tử khô, hoặc dịch huyền phù giống.

– Nuôi ở 25 – 28°C. Bào tử sẽ hình thành sau 12 – 15 ngày. Lấy ra, hong khô, nghiền, rây và chế biến như trên.

d) Phương pháp lên men kết hợp

Khi lên men chìm thường tạo nhiều bào tử nội sinh (ginidi) như blastospore. Nội bào tử không bền khi sấy khô. Ví dụ, khi phun sấy có thể làm 90% nội bào tử và 20 – 50% đính bào tử chết. Do đó, nên tạo chế phẩm có chứa đính bào tử. Quy trình thực hiện gồm các bước sau:

– Nuôi nấm làm giống cấy trên hạt ngũ cốc trong bình nón.

– Nhân giống vào bình nón đựng môi trường dịch thể, nuôi 12 – 17h.

– Cấy 2 – 4% giống vào nồi lên men đựng môi trường gồm 6% rỉ đường, 1% cao ngô, 0,05% $MgSO_4$, 0,2% KH_2PO_4. Nuôi ở 25 – 28°C trong 1,5 ngày có thổi khí và khuấy. Dịch lên men đạt 50-100 triệu tế bào/ml.

– Đổ dịch ra khay để nuôi tĩnh, đặt lên giá. Sau 1 ngày bắt đầu xuất hiện màng nấm. Sau 3 – 4 ngày thấy hình thành bào tử đính. Bào tử hình thành ồ ạt ở ngày thứ 5.

– Vớt màng, đặt vào khay khô, đậy khay để tiếp 2 – 3 ngày cho bào tử chín.

– Lấy ra làm khô nhẹ (30 – 32°C), giữ trong túi nilon.

– Xay ở nhiệt độ thấp, rây qua rây.

– Xác định số lượng bào tử. Trộn với caolin sẽ đạt ít nhất 10^9 bào tử/g chế phẩm.

– Khi dùng, cần 1,5 – 2kg cho 1 ha ruộng.

6.2. *Metarhizium anisopliae* (Metchnkoff) Sorokin

Metarhizium thuộc họ Moniliaceae, bộ Moniliales. Bào tử trần, hình trụ, đầu tròn hoặc elip tuỳ chủng, có màu lục nhạt hay oliu, kích thước từ 4,5 – 5,5μm. Nhiệt độ sinh trưởng là 28 – 30°C. Trên 35°C thường không sinh trưởng. Bào tử nảy mầm sau 24h khi gặp độ ẩm thích hợp ở 28 – 30°C. *Metarhizium flavoviridae* Gams và Roszypal có cấu tạo giống *M. anisopliae*, nhưng bào tử có dạng hình trụ. *Metarhizium* có khả năng diệt nhiều loài côn trùng phá hoại mùa màng như bọ rày, bọ xít, bọ rùa, châu chấu, kiến vương hại dừa, bọ đất hại mía, lạc, mối, muỗi.... Chúng có khả năng sinh độc tố destrucin A ($C_{29}H_{47}O_5N_5$) và destrucin B ($C_{30}H_{51}O_7N_5$) rất độc đối với côn trùng. Tuy nhiên, cho dù không sinh ra các loại độc tố thì nấm vẫn có khả năng tiêu diệt côn trùng. Khi bào tử nấm rơi trên cơ thể côn trùng, gặp độ ẩm cao và kéo dài sẽ nảy mầm, đâm xuyên vào cơ thể. Khi côn trùng chết, nấm lại đâm xuyên ra ngoài, lúc đầu là lớp phấn trắng ở khớp nối giữa các đốt, sau phát triển khắp bề mặt cơ thể côn trùng và hình thành bào tử. Bào tử *M. anisopliae* thường có màu lục đậm còn *M. flavoviridae* thường có màu lục nhạt. Bào tử phát tán theo gió hoặc nước để lây sang cá thể khác.

6.2.1. Sản xuất chế phẩm Metarhizium

Về nguyên tắc, việc sản xuất chế phẩm Metarhizium cũng giống như với chế phẩm Beauveria. Có thể sản xuất từ các nguyên liệu tự nhiên rẻ tiền như gạo hoặc các hạt ngũ cốc khác như kê. Gạo lức được hấp thành cơm chín tới, cho vào khay

hoặc túi nilon, thêm 3% $CaCO_3$ để hút nước, làm cho các hạt cơm không dính bết. Nuôi ở 28 – 30°C trong 15 – 20 ngày với độ ẩm 40%, pH 6,0. Giống cấy 3 – 4%. Sau khi lên men có thể đạt 10^9 – 10^{12} bào tử/g. Sau khi lên men, cần hong khô và nghiền ở nhiệt độ thấp, rồi trộn thêm caolin để đạt nồng độ 10^9 bào tử/g. Có thể tiến hành nuôi cấy chìm, sau đó trộn với cám, rồi cho vào bao nilon để tạo thành bào tử đính trong vòng 5 ngày. Chế phẩm được dùng phổ biến để chống lại bọ hại mía ở Braxin, hại lạc ở Miến Điện, hại dừa ở Malaysia, dịch châu chấu ở Châu Phi.....

6.2.2. Dùng Metarhizium để chống mối

Hằng năm, những thiệt hại do mối gây ra cho nhà cửa, kho tàng, cây trồng, đê điều ở khắp nơi trên thế giới lên đến hàng chục tỷ đôla. Đã có nhiều phương pháp diệt mối khác nhau như tìm tổ để đào hoặc phun hoá chất; lây nhiễm chất độc; xông hơi và sốc nhiệt; dùng bả; dùng vi sinh vật. Ngoại trừ phương pháp vi sinh vật, các phương pháp còn lại thường cồng kềnh hoặc độc (như dùng thủy ngân hay asen) ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khoẻ của con người và môi trường. Đối với mối nhà, có thể tiêu diệt bằng cách đặt các hộp chứa gỗ thông ở nơi có mối đi qua để nhử. Khi mối đã đầy trong hộp thì chuyển mối qua một hộp mới hoặc chậu rồi rắc bột bào tử Metarhizium, sau đó để mối tự do về tổ. Mối mang bào tử sẽ lây nhiễm cho các con khác trong tổ.

6.3. *Hirsutella citriformis*

Nấm thuộc bộ Moniliales, họ Stibaceae, gây bệnh cho bọ rày thân, bọ rày lá, và một số côn trùng khác. Sau khi xâm nhập vào cơ thể của ký chủ sẽ phát triển bên trong cơ thể làm côn trùng chết, sau đó mọc ra ngoài tạo thành các sợi dài, lúc đầu màu trắng bẩn, sau đó có màu ghi. Từ các sợi này sẽ hình thành bào tử phát tán. Đa số các loài của chi Hirsutella đều gây bệnh cho côn trùng. *H. thompsonii* cũng gây bệnh cho mối.

6.4. *Nomuraea rileyi* (Farlow Samson)

Nấm thuộc bộ Moniliales, họ Moniliaceae, có bào tử màu lục nhạt. Về màu sắc và hình dáng giống như *M. anisopliae*. Bào tử có hình elip. Nấm gây bệnh cho sâu đục thân, sâu cuốn lá, sâu xanh, sâu keo và sâu phao. Khi bị nhiễm nấm, lúc đầu côn trùng có màu trắng sau đó tạo bào tử sẽ chuyển thành màu lục nhạt.

Chương VIII
TRỢ SINH

Từ trợ sinh (probiotics) là thuật ngữ có nguồn gốc từ tiếng Hy Lạp bao gồm hai từ *pro* có nghĩa là *vì* và *biosis* có nghĩa là *sự sống*, là khái niệm tuy mới xuất hiện trong thời gian gần đây, nhưng đã nhanh chóng thu hút được sự chú ý của nhiều nhà khoa học trên thế giới do tính chất ưu việt của chúng. Probiotic là chế phẩm chứa các vi sinh vật sống đã chọn lọc mà khi đưa vào cơ thể qua đường miệng với lượng đủ lớn sẽ ảnh hưởng có lợi đến sức khỏe của vật chủ. Khái niệm này bắt nguồn từ giả thuyết của nhà bác học Nga, Metchnikoff (1845 – 1916), cho rằng những người nông dân Bulgari luôn sống rất khỏe mạnh là vì họ thường xuyên sử dụng sữa chua có chứa vi khuẩn lactic. Các vi khuẩn này ảnh hưởng tới hệ vi sinh vật đường ruột và làm giảm tác động gây độc của các vi sinh vật gây hại. Các vi sinh vật được lựa chọn làm probiotic là đặc trưng cho mỗi loài, do vậy một chủng được lựa chọn làm probiotic cho loài này có thể không phù hợp với các loài khác.

– Nói chung các vi sinh vật dùng làm probiotic thường phải có các đặc điểm sau đây:

+ Có khả năng bám dính vào niêm mạc đường tiêu hóa của vật chủ.

+ Dễ nuôi cấy.

+ Không sinh chất độc và không gây bệnh cho vật chủ.

+ Có khả năng tồn tại độc lập trong một thời gian dài.

+ Có khả năng sinh các enzyme hoặc các sản phẩm cuối cùng mà vật chủ có thể sử dụng.

+ Chịu được pH thấp ở dạ dày và muối mật ở ruột non.

+ Biểu hiện hiệu quả có lợi đối với vật chủ.

– Cơ chế tác dụng của các vi sinh vật trong probiotic đã được giải thích:

+ Cạnh tranh thức ăn và vị trí bám với các vi sinh vật gây bệnh.

+ Làm bất hoạt các độc tố hoặc các sản phẩm trao đổi chất có hại do các vi sinh vật gây bệnh sinh ra.

+ Tạo ra các chất ức chế sinh trưởng của các vi sinh vật gây bệnh, ví dụ chất kháng sinh, hydroperoxit.

Đã có rất nhiều chế phẩm probiotic dùng cho vật nuôi được đăng ký bản quyền. Hầu hết các chế phẩm này chứa *Lactobacillus* hoặc *Streptococcus*, một số chứa *Bifidobacteria*, nấm men (*Saccharomyces boulardii*) hoặc *Bacillus*. Ảnh hưởng của các chế phẩm probiotic có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua sự điều chỉnh khu hệ vi sinh vật đường ruột. Nhiều chế phẩm loại này rất có lợi cho sức khỏe của con người. Chúng được sản xuất dưới dạng viên nang, bột, hoặc đưa vào sữa chua và nhiều sản phẩm sữa khác.

– Hiệu quả của việc sử dụng chế phẩm bao gồm:

+ Có khả năng kháng ung thư.

+ Kìm hãm vi sinh vật gây bệnh đường tiêu hóa.

+ Cải thiện việc sử dụng lactose ở những người không dung nạp lactose.

+ Làm giảm cholesterol trong huyết thanh.

– Kích thích hệ thống miễn dịch.

– Giảm nhiễm trùng đường niệu (do *Candida*).

– Tăng trọng (5%) ở gia cầm.

– Giảm bệnh nhiễm trùng ở gia cầm.

– Giảm tiêu chảy ở động vật non (do virus rota).

– Giảm tác dụng phụ của chất kháng sinh.

Ngày nay, khái niệm probiotic còn được mở rộng cho môi trường. Người ta đưa các vi sinh vật sống vào môi trường để làm giảm ô nhiễm.

1. PROBIOTIC DÙNG CHO NGƯỜI

1.1. Hệ vi sinh vật đường ruột

Cơ thể người ta chứa đến 10^{14} tế bào vi sinh vật, gấp khoảng 10 lần tổng số tế bào của bản thân cơ thể. Chúng chủ yếu cư trú trong đường tiêu hoá với thành phần loài rất phong phú, thậm chí lên đến 400 loài. Sự tồn tại của hệ vi khuẩn đường ruột phụ thuộc chủ yếu vào chế độ dinh dưỡng của cơ thể. Hầu hết các bệnh đường ruột như tiêu chảy, viêm dạ dày-ruột, viêm và ung thư ruột kết đều bắt nguồn từ sự rối loạn làm mất cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột, làm tăng vi khuẩn gây bệnh và làm giảm vi khuẩn có lợi. Các vi khuẩn có lợi giúp cơ thể tiêu hoá thức ăn tốt hơn, giúp tổng hợp một số vitamin nhóm B, vitamin nhóm K và tiết ra các chất ức chế không cho vi khuẩn có hại sinh trưởng vượt trội. Các vi khuẩn gây bệnh đường ruột bao gồm *Shigella*, *Samonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* và *Enterococcus*...

Bình thường các vi khuẩn trong đường ruột kiềm chế lẫn nhau tạo thế cân bằng. Vì một lý do nào đấy các vi khuẩn có lợi (trong đó có các vi khuẩn tiêu hoá đường bột) chết đi. Vi khuẩn gây bệnh tăng sinh đột ngột vượt quá ngưỡng sẽ đưa đến rối loạn tiêu hoá biểu hiện qua các triệu chứng như tiêu chảy, khó tiêu, chướng bụng...Ví dụ, khi uống thuốc kháng sinh kéo dài có thể làm chết nhiều vi khuẩn có ích, dẫn đến phá huỷ mối cân bằng này. Sử dụng probiotic là biện pháp vừa đơn giản, rẻ tiền vừa có tác dụng cải thiện rõ rệt hệ vi khuẩn đường ruột, khôi phục lại thế cân bằng. Các vi sinh vật probiotic được lựa chọn dùng cho người rất phong phú. Tùy mục tiêu chữa bệnh mà lựa chọn các vi khuẩn khác nhau, bao gồm chủ yếu là vi khuẩn lactic (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhanosus*), *Bifidobacterium* và nấm men *Saccharomyces boulardi*. Thuốc probiotic không chỉ dùng để chữa các bệnh đường tiêu hóa mà còn nhằm vào nhiều mục tiêu khác như giảm lượng mỡ trong máu (cholesterol), cải thiện tình trạng không dung nạp lactose, tăng cường khả năng miễn dịch, chống dị ứng và chống u. Sau đây là một số bằng chứng về tác dụng chữa bệnh của probiotic.

1.2. Các tác dụng trị liệu của probiotic trong một số bệnh đường tiêu hóa ở người

1.2.1. Tăng cường khả năng tiêu hóa lactose và hoạt động của các enzyme khác

Hiện tượng không có khả năng tiêu hóa lactose thường thấy ở người trưởng thành và những người mắc chứng viêm ruột non. Chúng ta biết rõ rằng, đối với những người có tiền sử khó tiêu hóa lactose thì việc tiêu hóa và hấp thụ sữa chua diễn ra tốt hơn nhiều so với sữa thường. Cơ chế của hiện tượng này là trong sữa chua có các vi khuẩn chứa enzyme lactase phân hủy lactose. Enzyme này được giải phóng ra khi vi khuẩn bị dung giải do tác dụng của các acid mật. Về mặt lâm sàng, việc thay thế sữa thường bằng sữa chua hay các sản phẩm đã lên men khác sẽ giúp cho bệnh nhân tiêu hóa tốt hơn, làm giảm tiêu chảy và các triệu chứng khác do không dung nạp lactose. Tình trạng tiêu hóa kém saccarose ở trẻ sơ sinh do thiếu hụt saccarase cũng được khắc phục bằng cách cho uống *Saccharomyces cerevisiae*, nấm men có chứa saccarase.

1.2.2. Tiêu chảy do kháng sinh

Khoảng 20% người dùng thuốc kháng sinh, đặc biệt là clindamycine, cephalosporine và penicilline, bị mắc bệnh tiêu chảy. Bệnh tiêu chảy do kháng sinh có nguyên nhân từ sự mất cân bằng vi sinh vật, làm suy giảm hệ vi sinh vật tự nhiên trong ruột. *Clostridium difficile* và *Kelbsiella oxytoca* là những tác nhân gây bệnh chính, bình thường chúng tồn tại trong ruột nhưng khi hệ vi sinh vật bị mất cân bằng thì chúng tăng lên bất thường và giải phóng các độc tố. Rất nhiều cố gắng nhằm xác định xem chữa trị bằng probiotic có thực sự ngăn ngừa được bệnh tiêu chảy do kháng

sinh hay không. Kết quả cho thấy chủng *S. bolardii* có thể giảm mức độ nguy hiểm của bệnh. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy *S. bolardii* làm giảm đáng kể thời gian bị bệnh. Cơ chế tác dụng của probiotic này hiện vẫn chưa rõ vì nấm men có rất nhiều tác động sinh học trong đường tiêu hóa.

1.2.3. Viêm đường tiêu hóa

Viêm đường tiêu hóa là nguyên nhân chính gây bệnh tiêu chảy cấp tính. Viêm đường tiêu hóa có thể do nhiều tác nhân gây nên như vi khuẩn, virus hoặc ký sinh trùng nhưng nguyên nhân phổ biến nhất ở trẻ em là do nhiễm virus rota. Các virus này xâm nhập vào các tế bào ở đỉnh nhung mao ruột, phá hủy nhung mao, làm mất khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng và chất điện giải. Do hấp thụ chất dinh dưỡng kém, các chất cacbonhydroxit ứ trong lòng ruột, làm tăng áp suất thẩm thấu, kéo nước vào trong lòng ruột, dẫn đến tiêu chảy thẩm thấu, mất nước nghiêm trọng, làm mất cân bằng điện giải, gây hậu quả nghiêm trọng đối với trẻ sơ sinh, trẻ dưới ba tuổi và nhất là trẻ suy dinh dưỡng. Cách chữa thông thường là cung cấp chất điện giải, nhưng không rút ngắn được thời gian tiêu chảy.

Nhiều thử nghiệm cho thấy các sản phẩm lên men có hiệu quả phòng bệnh tiêu chảy tốt ở trẻ em. Cho trẻ sơ sinh uống *Bifidobacterium bifidum* và *Streptococcus thermophilus* có thể làm giảm được nguy cơ mắc tiêu chảy và viêm đường tiêu hóa do virus rota.

1.2.4. Điều trị cấp tính

Uống *Lactobacillus rhamnosus* GG có thể rút xuống một nửa thời gian mắc bệnh. Phương pháp chữa trị này đã được chứng minh rất hiệu quả trong điều trị tiêu chảy cấp tính ở trẻ em Châu Á. Gần đây, cũng đã được chứng minh ở trẻ em Châu Âu. Kết quả của một nghiên cứu cho thấy rằng, sử dụng *L. rhamnosus* đã gây bất hoạt bởi nhiệt cũng có hiệu quả như *L. rhamnosus* sống, tuy nhiên, sử dụng *L.rhamnosus* sống cho hiệu quả cao hơn trong đáp ứng của IgA đặc hiệu với virus rota. Ngoài chủng vi khuẩn trên, *Enterococcuss faecium* SF 68 cũng rút ngắn thời gian mắc tiêu chảy. Có nhiều ý kiến giải thích cơ chế tác dụng của vi khuẩn lactic. *Đầu tiên là* cơ chế cạnh tranh vị trí thụ thể. Vi khuẩn lactic gắn với các thụ thể trên bề mặt đỉnh nhung mao ruột non, nơi mà virus rota vẫn bám, nhờ đó ngăn cản sự dính và xâm nhập của virus rota. *Cơ chế thứ hai* có thể là đáp ứng miễn dịch được tăng cường bởi các vi khuẩn lactic, đưa đến hiệu quả lâm sàng. Trong cơ chế này, các kháng thể IgA tại chỗ được tăng cường để chống lại virus rota. *Cơ chế thứ ba* có liên quan đến việc truyền tín hiệu từ các vi khuẩn lactic đến vật chủ nhằm điều khiển hàng rào tiết và nhu động để loại bỏ các chất độc. Chất nhày của ruột non ức chế virus rota, biểu hiện của các mARN MUC2 và MUC3 tăng lên đáp lại tín hiệu của *Lactobacillus*, nhờ đó bảo vệ tế bào khỏi sự bám dính của vi khuẩn gây bệnh. *Cơ chế*

cuối cùng là các vi khuẩn lactic sản xuất ra các chất như acid và chất kháng virus làm bất hoạt virus.

1.2.5. Nhiễm Helicobacter pylori

H. pylori (tên cũ là *Campylobacter pylori*) là vi khuẩn Gram âm, rất phổ biến trong dạ dày. Khoảng 50% dân số bị nhiễm vi khuẩn này. Sự tồn tại của vi khuẩn này lâu dài trong dạ dày có thể là yếu tố tiềm tàng gây ung thư trong dạ dày. Đã có một số bằng chứng cho thấy các vi khuẩn lactic có thể ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh và làm giảm hoạt tính của urease cần thiết cho *H. pylori* để có thể sống được trong môi trường acid của dạ dày. Ở người, cũng đã có bằng chứng một số chủng probiotic có thể ức chế sự nhiễm và làm giảm nguy cơ tái nhiễm vi khuẩn này. Tỷ lệ bệnh nhân khỏi bệnh do uống kháng sinh là 72%, trong khi do uống vi khuẩn lactic sống là 88% và vi khuẩn chết là 87%. Cơ chế tác dụng hiện còn chưa rõ, đặc biệt là cơ chế của hiện tượng uống vi khuẩn lactic đã chết. Tuy nhiên, giả thuyết được cho là vi khuẩn lactic đã cảm ứng cơ thể vật chủ gây ra những tác động làm giảm sự sống sót của *Helicobacter* và ức chế sự lan truyền của chúng bằng cơ chế cạnh tranh các thụ thể bám glycolipid.

1.2.6. Ung thư ruột kết

Khả năng cải tạo hệ vi sinh vật đường ruột nhờ vi khuẩn lactic và *Bifidobacterium* và làm giảm nguy cơ mắc ung thư một phần là nhờ vào khả năng giảm mức β-glucuronidase và các tác nhân gây ung thư khác. Sự tái phát ung thư ở một số vị trí khác như bàng quang, cũng giảm nhờ *L.casei* Shirota (một chủng có ở Yakult, một loại nước uống chế từ sữa của Nhật. Ước tính có tới 26 triệu người sử dụng nước uống này mỗi ngày). Nhiều báo cáo cho thấy, các vi khuẩn *L. rhamosa* GG, *Bifidobacterium* và *Propiobacterium* sp. có tác dụng làm giảm ung thư ở xoang ruột do độc tố Aflatoxin gây ra.

1.2.7. Một số lưu ý khi điều trị tiêu chảy bằng thuốc probiotic

Probiotic được bào chế ở dạng gói bột hoặc dạng viên nang chứa bột, khi uống vào ruột, bột là các vi sinh vật sẽ hồi sinh và phát huy tác dụng. Do thuốc có nguồn gốc vi sinh vật nên cần lưu ý:

- Bảo quản thuốc nơi mát, tránh nhiệt độ cao.
- Nên uống với nước lã đun sôi để nguội, không nên hòa với nước nóng trên $50^{o}C$, trước khi uống (nếu thuốc chứa nấm men mà hòa vào nước nóng trên $50^{o}C$ thì nấm men sẽ chết, xem như không có tác dụng).

- Nếu thuốc là nấm men (như bioflor) thì không được uống chung với thuốc kháng nấm vì thuốc kháng nấm sẽ diệt nấm men.
- Có thuốc probiotic có thể uống chung với nhiều loại kháng sinh như antibio, antibio philus nhưng không được uống chung với tetracyline vì sẽ cản trở sự hấp thụ của tetracyline qua niêm mạc ruột vào máu làm tetracyline mất tác dụng.
- Luôn nhớ rằng trong điều trị tiêu chảy cấp thì biện pháp hàng đầu, đặc biệt ở trẻ em là bù nước và chất điện giải (dùng thuốc oresol) trước khi nghĩ đến việc dùng thuốc cầm tiêu chảy.
- Dùng chế phẩm probiotic, tức là cấy các vi sinh vật có ích vào ruột. Có một loại thực phẩm cũng có cơ chế tác dụng như thế, đó là sữa chua. Hãy ăn sữa chua mỗi khi bị rối loạn vi khuẩn đường tiêu hóa, hoặc để ngừa tiêu chảy do uống kháng sinh theo lời khuyên của Metchnikoff.

1.3. Kích thích miễn dịch niêm mạc

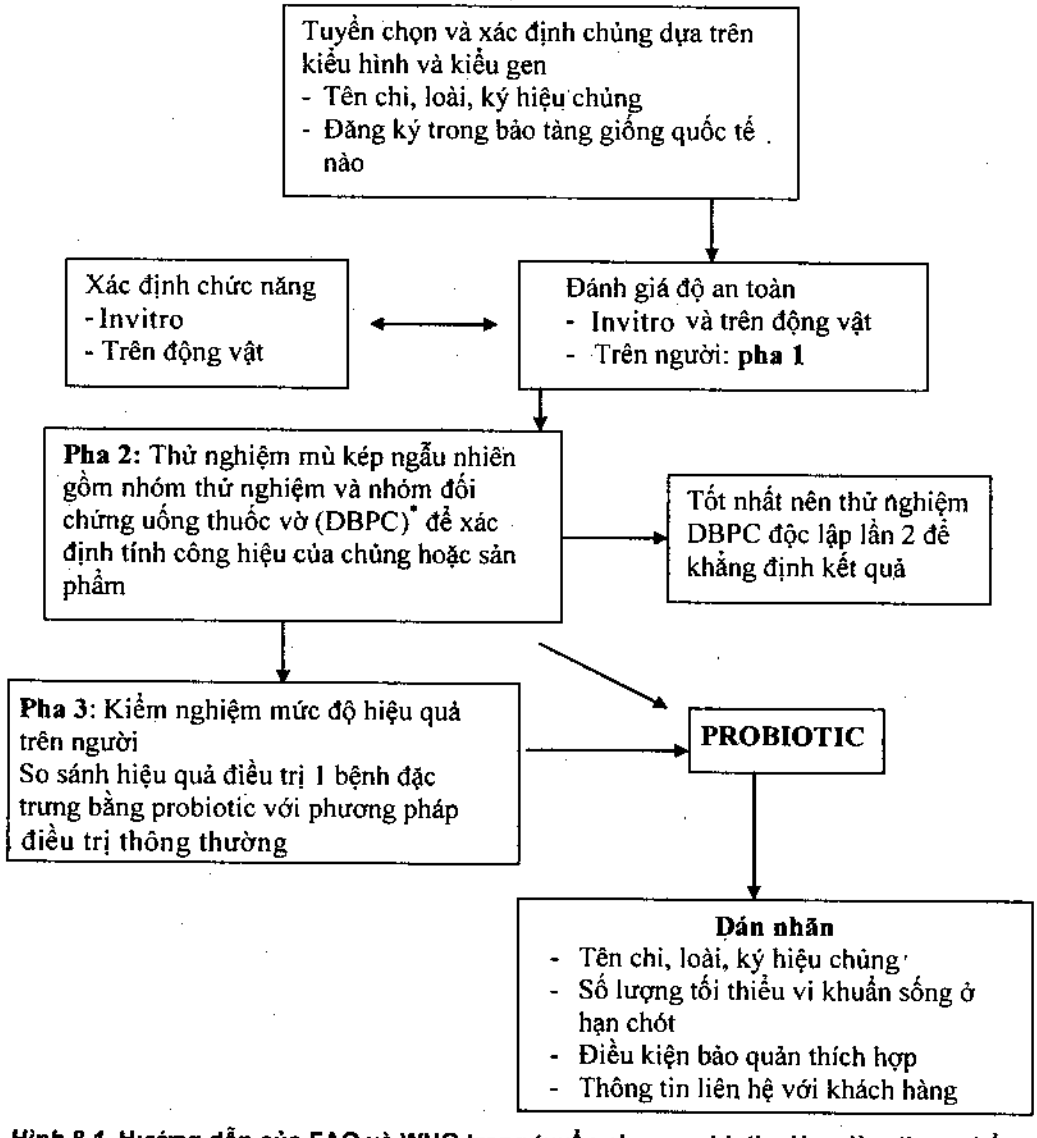
Mặc dù về cơ chế có nhiều điều chưa sáng tỏ, nhưng trên thực tế, việc sử dụng probiotic có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch, nhất là miễn dịch tự nhiên. Đưa vi khuẩn *L. casei* Shirota vào chuột đã làm tăng đáng kể hoạt tính của tế bào giết tự nhiên (NK) ở hạch màng treo ruột (chứ không phải ở mảng Peyer và lách). Nhiều chủng *Lactobacillus* có khả năng hoạt hóa đại thực bào, kích thích hình thành bạch cầu trung tính, kích thích tế bào tua (dendrit) làm tăng khả năng tổng hợp IgA và tăng cường khả năng tổng hợp interferon gamma. Tuy nhiên cần xem xét biểu lượng và thời gian sử dụng để tăng cường tối ưu chứ không ức chế đáp ứng miễn dịch. Việc sử dụng vi khuẩn lactic làm vector mang kháng nguyên cũng đang được thử nghiệm để sản xuất vacxin. Ví dụ: *L. plantarum* NCIMB 8826 đã được dùng để gắn kháng nguyên mảnh C của độc tố uốn ván (đã làm mất tính độc) dùng làm vacxin chống uốn ván.

1.4. Bệnh dị ứng

Ngày nay việc sử dụng probiotic trở nên rất phổ biến. Nhiều bằng chứng cho thấy các vi sinh vật probiotic và kích thích tổng hợp IgA đặc hiệu ở niêm mạc ruột. Probiotic tăng cường chức năng của hàng rào vi sinh vật đường ruột thông qua việc phục hồi khu hệ vi sinh vật thông thường. Probiotic cũng có tác dụng biến đổi các yếu tố tăng trưởng *beta* và sự sản sinh Interleukin 10 cũng như các cytokin kích thích sản xuất kháng thể IgE. Interleukin 10 là chất do tế bào T_H2 sinh ra do tác động lên đại thực bào gây ức chế sự sản sinh cytokin và do đó gián tiếp làm giảm sự sản sinh tế bào cytokin của tế bào T_H1.

1.5. Sức khỏe sinh sản của phụ nữ

Mặc dù các nghiên cứu về probiotic đối với hệ niệu-sinh dục ở phụ nữ đã diễn ra từ lâu, nhưng chỉ gần đây người ta mới nhận ra rằng, việc sử dụng probiotic còn vượt xa hơn chứ không chỉ giới hạn trong chế biến thực phẩm. Bằng chứng là khi cho uống hàng ngày $10^9 - 10^{10}$ vi khuẩn *L. rhamnosa* GR-1 và *L. fermentum* RC-14 sẽ tránh được các bệnh viêm nhiễm âm đạo. Các vi khuẩn này sau khi uống sẽ di chuyển từ trực tràng tới âm đạo và làm giảm coliform tổng số cũng như nấm men *Candida abbicans* trong âm đạo.



Hình 8.1. **Hướng dẫn của FAO và WHO trong tuyển chọn probiotic dùng làm thực phẩm**

* DPBC (Double blind, radomized, placebo-controlled trial) : Phép thử nghiệm mù kép ngẫu nhiên dùng để so sánh kết quả thử nghiệm giữa 2 nhóm: Một nhóm thí nghiệm và một nhóm đối chứng dùng thuốc vờ (placebo). Người đánh giá không biết thử nghiệm áp dụng cho bệnh nhân nào (phép thử mù) và cả bác sĩ điều trị cũng không được biết (phép thử mù kép).

2. PROBIOTIC DÙNG TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

Nuôi trồng thủy sản được phát triển rất mạnh ở các nước Châu Á, Mỹ La tinh và Đông Nam Á. Ở Việt Nam, năm 2002, Chính phủ quyết định thủy sản là ngành kinh tế ưu tiên, trong đó ngành nuôi tôm là ngành mũi nhọn, nhằm tăng kim ngạch xuất khẩu, chuyển đổi cơ cấu kinh tế kém hiệu quả (như muối, cói...), làm giảm áp lực khai thác ven bờ, nâng cao hiệu quả sử dụng đất và tạo công ăn việc làm cho người dân. Năm 2002, Việt Nam đã xuất khẩu trên 2 tỷ USD thủy sản, trong đó tôm chiếm 50%, đứng hàng thứ 5 trên thế giới, và đang phấn đấu đạt 4,5 – 5 tỷ USD vào năm 2010. Năm 2004, sản lượng nuôi trồng thủy sản đạt mức 1,4 triệu tấn/ năm, chiếm 68% tổng sản lượng thủy sản. Diện tích nuôi trồng thủy sản mỗi năm một tăng, tính đến năm 2005 đạt 750 nghìn ha. Tuy nhiên ngành nuôi trồng thủy sản đang gặp khó khăn lớn dẫn đến thất bại ở nhiều cơ sở nuôi trồng, là do ô nhiễm môi trường, dịch bệnh và hệ thống sinh thái đang bị phá hủy.

2.1. Tình trạng ô nhiễm môi trường nước nuôi trồng thủy sản

Với mục tiêu tăng nhanh sản lượng, người ta thường thả với mật độ quá dày, trong khi không có biện pháp xử lý môi trường thích hợp sẽ dẫn đến hiện tượng thối ao, làm giảm lượng oxy hòa tan, làm cho động vật ngạt thở. Các chất độc sinh ra làm cho động vật bị stress và ngộ độc, có thể gây chết cho hàng loạt tôm cá, không những gây thiệt hại cho ngành nuôi trồng thủy sản mà còn gây ô nhiễm môi trường sinh thái. Theo tính toán của Vụ Khoa học, Bộ Thủy sản thì nhu cầu nước ngọt cho nuôi tôm trên cát là 16000 – 27000m^3/ ha trong một vụ. Nếu thay 3 lần/vụ thì khối lượng lên đến 50000m^3. Nếu một cơ sở có 300ha, lượng nước 2 vụ lên đến 15 triệu m^3/năm. Nếu lượng nước này bị ô nhiễm mà không được xử lý thì nguy cơ ô nhiễm môi trường là rất lớn. Nếu nuôi mật độ 40 con/m^3 thì chất thải lỏng và rắn sẽ vượt quá mức tưởng tượng. Cũng theo Bộ Thủy sản, mỗi ha nuôi tôm trên cát thải ra khoảng 8 tấn chất thải rắn/năm do tôm lột vỏ và thải phân, do thức ăn thừa, xác tảo và xác động vật phù du. Cũng theo Bộ Thủy sản chỉ riêng một cơ sở nuôi tôm ở Hà Tĩnh có 800ha nuôi tôm đã thải ra khoảng 6400 tấn chất thải rắn. Nếu không nhìn trước để có giải pháp xử lý kịp thời thì việc nuôi tôm có thể gây thảm họa sinh thái khôn lường.

2.1.1. Độc tính của chất hữu cơ

Các chất hữu cơ trong đầm ao được tích lũy mỗi lúc một tăng sẽ gây ô nhiễm môi trường nước làm giảm lượng oxy hòa tan. Ngưỡng chịu đựng của tôm với hàm lượng O_2 (DO) phải lớn hơn 2,5ppm và lượng CO_2 phải nhỏ hơn 2,0ppm. Nếu quá ngưỡng này sẽ gây ngạt thở và hội chứng stress. Lớp bùn hữu cơ lắng đọng lâu ngày

là môi trường của các vi khuẩn kỵ khí sinh H_2S và khí metan. Lượng khí H_2S không được vượt quá ngưỡng 1,0ppm và thường gây độc ở pH thấp.

2.1.2. Độc tính của amoni

Amoni tồn tại dưới dạng NH_3 hoặc NH_4^+ tùy thuộc vào pH môi trường. Trong môi trường có pH cao thì amoni dễ chuyển thành NH_3, có độc tính cao. NH_3 có độc tính cao hơn NH_4^+ vì NH_3 không mang điện tích nên dễ thấm qua tế bào mang cá, đồng thời có khả năng hòa tan trong chất béo, còn NH_4^+ là ion có kích thước lớn hơn, có thể kết hợp với nước và mang điện tích nên khó thấm qua tế bào mang cá. Chỉ số NH_3 cho phép trong môi trường nuôi tôm, không được nhỏ hơn 3,0ppm. Khi nồng độ NH_3 lên cao sẽ gây độc cấp tính và sẽ làm cho tôm cá chết trong thời gian ngắn. Amoni sẽ chuyển thành nitrite nhờ vi khuẩn oxy hóa amon khi kết hợp với oxy trong nước

$$2NH_3 + 3O_2 \xrightarrow{\text{Vi khuẩn oxy hoá amon}} 2HNO_2 + 2H_2O$$

2.1.3. Độc tính của hợp chất chứa nitơ dạng oxy hóa

Hợp chất chứa nitơ dạng oxy hóa gồm nitrite (NO_2^-) và nitrate (NO_3^-). Nồng độ nitrite cho phép trong nuôi trồng thủy sản là dưới 0,3mg/l. Nếu vượt quá sẽ gây độc. Nitrate được tạo thành nhờ vi khuẩn oxy hóa nitrite:

$$NO_2^- + O_2 \xrightarrow{\text{Vi khuẩn oxy hoá nitrite}} NO_3^-$$

Nồng độ nitrate cho phép trong môi trường nuôi trồng hải sản là < 10mg/l. Ở nồng độ 10mg/l sẽ làm cho tảo phát triển. Khi tảo quá nhiều sẽ kết thành khối nổi lên mặt nước, khi bị phân hủy sẽ gây ô nhiễm nước, làm nước bị đục và thối, giảm nồng độ oxy hòa tan. Khi nồng độ nitrate > 50mg/l sẽ gây sốc nghiêm trọng cho tôm cá.

2.1.4. Vi khuẩn tự dưỡng oxy hóa amoni thành nitrite

Hầu hết vi khuẩn oxy hóa amoni thành nitrite là vi khuẩn hóa tự dưỡng (chemoautotroph) sử dụng nguồn năng lượng là NH_4^+ và nguồn cacbon chủ yếu là CO_2 thông qua chu trình Calvin-Benson. Đây là các vi khuẩn Gram âm, hiếu khí bắt buộc, có hình dạng thay đổi từ dạng cầu, elip tới hình que, gồm các chi:

- *Nitrosomonas* có hình elip hoặc hình que ngắn với loài điển hình là *N. europaea*.
- *Nitrosococcus* có hình cầu với các loài *N. nitrosus* có trong đất, *N. oceanus* có ở biển và *N. mobilus* có ở nước lợ.
- *Nitrosospira*, tế bào dạng xoắn với loài điển hình là *N. briensis* phân bố trong đất.

– *Nitrosolobus*, tế bào xẻ thùy, không có hình dạng ổn định. Loài đại diện là *N.multiformis*, khu trú trong đất.

2.1.5. Vi khuẩn nitrate hóa

Vi khuẩn nitrate hóa điển hình thuộc chi *Nitrobacter*, là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, dùng nitrite làm nguồn năng lượng, CO_2 làm nguồn cacbon, oxy hóa nitrite thành nitrate. Loài điển hình là *N. winnogradski*, hình que, không di động, phân bố trong đất, nước ngọt và nước biển.

2.2 Các vi sinh vật gây bệnh thường gặp ở tôm, cá

2.2.1. Virus

Các bệnh do virus ở tôm đang làm tổn hại nghiêm trọng đến sự ổn định và lợi nhuận của nền công nghiệp nuôi tôm trên toàn thế giới. Hiện nay, người ta biết được có khoảng 20 loại virus là tác nhân gây bệnh ở tôm. Hầu hết các loại này là thành viên của các họ Pavoviridae, Baculoviridae, Picornaviridae, Togaviridae và một số họ virus mới được biết đến. Một số tác nhân virus gây bệnh nghiêm trọng nhất ở tôm hiện nay phải kể đến virus đầu vàng (YHV), virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV), Baculovirus (MBV) và IHHNV (virus nhiễm dưới vỏ gây hoại tử cơ quan tạo máu).

a) YHV-virus gây bệnh đầu vàng (yellow head virus)

YHV lần đầu tiên được phát hiện ở Thái Lan vào năm 1990 ở hồ nuôi tôm sú *P. monodon*. Đó là virus ARN mạch đơn, sợi dương, thuộc họ mới Roniviridae của Bộ Nidovirales. Bệnh đầu vàng được đặc trưng bởi màu vàng sáng ở phần đầu ngực phía lưng tôm và làm cho tôm có màu nhợt. Màu vàng ở vùng đầu ngực là màu vàng của gan tụy nằm phía dưới, được nhìn thấy qua lớp mang của con tôm gần chết. YHV là bệnh phổ biến. Tôm nhiễm YHV sẽ chết trong vòng vài giờ sau khi xuất hiện màu và toàn bộ sản lượng có thể bị mất trắng trong vòng 3 – 5 ngày sau khi thấy xuất hiện dấu hiệu đầu tiên của tôm bị nhiễm. YHV cũng gây bệnh ở *P. vannamei* và *P. stylirostris*.

b) WSSV-virus gây hội chứng đốm trắng (white spot syndrome virus)

Hội chứng đốm trắng (WSSV) là một trong những bệnh dịch nghiêm trọng nhất ở tôm. Virus này được phát hiện ra vào năm 1982 ở giống tôm *P. japonicus* ở phía Đông bắc Đài Loan. Từ đó, WSSV đã gây chết và làm tổn hại đến nền công nghiệp tôm trên toàn thế giới. WSSV thuộc chi Whispovirus, họ Nimaviridae, là virus hình que hay elip, có đuôi, chứa genom ADN kép với kích thước khoảng 300kb. WSSV gây bệnh ở hầu hết các giống tôm như *P. monodon*, *P. japonicus*,... WSSV nhiễm

vào hầu hết các mô bắt nguồn từ ngoại bì và trung bì, gồm biểu bì dưới cuticun, vảy, cơ quan lympho, tuyến anten, mô tuần hoàn, mô liên kết, buồng trứng, dây tủy bụng. Dấu hiệu cơ bản của bệnh này là sự xuất hiện các đốm trắng có đường kính từ 0,5 – 2,0mm trên vỏ tôm và biểu bì. Ngoài ra, tôm khi mắc bệnh này còn có các triệu chứng như giảm tiêu thụ thức ăn, lớp cuticun lỏng ra và bạc màu từ đỏ tươi sang hồng. Tỷ lệ tôm chết lên đến 100% sau 6 – 7 ngày nhiễm bệnh.

c) MBV-Monodon Baculovirus

MBV lần đầu tiên được phát hiện ở giống tôm *P. monodon*. Đây là loại virus có cấu trúc nhân nhiều mặt (NPV) thuộc họ Baculoviridae, có genom ADN kép vòng với kích thước 80 – 100.10^5Da nằm trong hạt hình que và được bao gói trong vỏ protein. Hiện nay, MBV đã được phát hiện thấy trong các giống tôm *P. monodon*, *P. morguiensis*,... Mặc dù MBV là tác nhân gây bệnh phổ biến nhưng không phải là tác nhân nguy hiểm cao nhất đối với *P. monodon*. Tuy nhiên, đôi khi tỷ lệ gây chết của virus này ở ấu trùng tôm lên tới hơn 90% và ở giai đoạn non (juvenile) tới 70%. Cơ quan đích của MBV là gan tụy và ruột trước. Tôm bị nhiễm MBV giảm sinh trưởng đáng kể, gan tụy trở nên trắng đục thay vì màu xanh xám bình thường. Tôm thường bị nhiễm MBV cùng với các bệnh khác như IHHNV, HPV, WSSV và các bệnh do vi khuẩn gây ra. Dấu hiệu của tôm bị nhiễm MBV là sự xuất hiện các nhân phình to.

d) IHHNV-Bệnh do virus nhiễm dưới vỏ gây hoại tử cơ quan tạo máu

IHHNV lần đầu tiên được phát hiện ở giai đoạn nhộng của giống tôm *P. sytlirostris* ở Hawaii vào năm 1981. Sau đó, virus này đã được phát hiện ở một số loài tôm khác trên khắp thế giới. IHHNV thuộc họ Parvoviridae, là virus nhỏ, 20 mặt, không có vỏ bọc và chứa genom ADN đơn, thẳng với kích thước xấp xỉ 4,1kb. Tác động của virus này biến đổi ở nhiều loài tôm. Virus thường xâm nhập vào tế bào biểu mô dưới vỏ. Ví dụ, tôm *P. vannamei* và *P. monodon* bị nhiễm IHHNV không bị chết, tuy nhiên, chúng lại gây nên một loại bệnh được gọi là hội chứng biến dạng còi cọc (RDS), dẫn đến giảm sản lượng kinh tế.

2.2.2. Vi khuẩn

Các bệnh do vi khuẩn gây nên có thể làm chết hàng loạt tôm, giảm sinh trưởng hoặc gây chết lác đác. *Vibrio* spp. là những tác nhân vi khuẩn gây bệnh quan trọng nhất ở tôm. Chúng là các vi khuẩn ở nước, phân bố rộng khắp ở thủy vực nước ngọt, nước lợ và nước mặn. Hiện nay có hơn 20 loài đã được nhận biết, trong đó có một số loài là tác nhân gây bệnh ở người (như *V.cholerae*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus*) và nhiều loài gây bệnh ở các động vật thủy sinh trong đó có tôm (như

V. harveyi, *V. spendidus*, *V. penaecida*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*). *Vibrio* spp. được tìm thấy nhiều nhất ở nơi ấp trứng và hồ nuôi.

Mặc dù hầu hết *Vibrio* spp. được xem là những tác nhân cơ hội, nhưng một số loài như *V.harveyi* lại là tác nhân gây bệnh chính. Đây là một loài vi khuẩn phát sáng, được tìm thấy ở các thủy vực nước mặn và duyên hải, trên bề mặt và trong ruột non của các sinh vật biển và đầm lầy, cũng như ở tôm. Vi khuẩn này có thể gây chết hàng loạt ở các bể ấp trứng tôm ở Châu Á. Những báo cáo gần đây cho thấy, trong các thiệt hại đối với nền công nghiệp nuôi tôm có liên quan đến các bệnh vi khuẩn thì thiệt hại do bệnh vi khuẩn phát sáng là nghiêm trọng nhất. Bệnh vi khuẩn phát sáng cũng gây nên tổn thất kinh tế nặng nề đối với ngành nuôi tôm ở nhiều nước như Philipin, Việt Nam, Ấn Độ, Indonesia, Thái Lan, Đài Loan,... Ấu trùng tôm sống, chết và thậm chí cả nước của vùng bị nhiễm bệnh đều phát ra ánh sáng lờ mờ. Các đặc điểm khác của bệnh này là tôm trở nên trắng đục toàn thân, yếu ớt, bơi rối loạn và chán ăn, cuối cùng là chết.

2.2.3. Nấm

Có khoảng 500 loài nấm đã được phân lập từ môi trường biển và cửa sông, một vài loài trong số này là những tác nhân gây bệnh cơ hội ở tôm. Tôm thường bị nhiễm nấm ở giai đoạn ấu trùng và các tác nhân chủ yếu là nấm *Lagenidium callinectes* và *Sirolpidium* spp. Các giai đoạn protozoea và ấu trùng (mysis) thường bị nhiễm với các triệu chứng như lờ đờ và chết. Bào tử và hệ sợi nấm được quan sát thấy trong các mô bị nhiễm, đặc biệt là mang và phần phụ. Bệnh nấm ấu trùng là một vấn đề lớn ở nhiều bể ấp trứng tôm ở Ấn Độ. Fusariosis và bệnh mang đen gây ra do *Fusarium* spp. có thể nhiễm ở tất cả các giai đoạn phát triển của tôm sú. Bệnh này có thể dẫn tới tỷ lệ chết rất cao (90%). Bệnh thường xuất hiện ở những hồ nuôi có chất lượng nước kém.

2.2.4. Các bệnh do ký sinh trùng

Một số ký sinh trùng, đặc biệt là các động vật nguyên sinh, có thể gây nhiễm ở các giai đoạn phát triển khác nhau của tôm. Chúng có thể sống hội sinh trong vỏ, phần đầu ngực, chi trước, các phần phụ khác và cơ quan bên trong. Khi bị nhiễm ở mức độ cao, các động vật nguyên sinh này có thể gây tắc mang (mang biến thành màu nâu), dẫn đến biếng ăn, giảm vận động và sinh trưởng, tăng khả năng nhiễm các tác nhân gây bệnh cơ hội. Các nguyên sinh động vật như *Zoothamnium*, *Epistylis*, *Vorticella*, *Anophrys*, *Acineta* sp, *Lagenophrys* và *Ephelota* có thể là các tác nhân ký sinh bên ngoài. Các động vật có lông nhung (ciliates) như *Paranophrys* spp. và *Parauronema* sp. có thể gây chết ở giai đoạn ấu trùng và nhộng tôm. Chúng đi vào

trong cơ thể tôm qua vết thương và xâm nhập vào mang và cơ quan tuần hoàn, gây chết hàng loạt, nguy hiểm hơn, chúng còn kết hợp với các ký sinh trùng có lông roi khác như *Leptomonas* sp. Các microsporidia như *Agmasoma* sp, *Microsporidium* sp có thể xâm nhập vào cơ, tim, hệ thần kinh, mang hoặc gan tụy. Bệnh phổ biến do bọn này gây ra là bệnh tôm bông (cotton shrimp disease). Tôm mắc bệnh này có màu mờ đục ở các mô bị nhiễm và thân trở nên cong queo. Mặc dù không gây chết nhưng biểu hiện khi nhiễm bệnh làm giảm giá trị thương phẩm của tôm.

2.2.5. Các giải pháp khắc phục

– Tăng cường sử dụng thức ăn probiotic trong nuôi trồng thủy sản.

– Phòng bệnh bằng probiotic.

– Kích thích tăng trưởng nhưng không dùng chất kháng sinh.

2.3. Vai trò của vi sinh vật probiotic trong nuôi trồng thủy sản

UN FAO ước tính tới năm 2020 thì một nửa nhu cầu thủy sản của thế giới sẽ được đáp ứng nhờ nuôi trồng thủy sản, vì nguồn cá tự nhiên sẽ bị khai thác quá tải và sẽ giảm. Ngành nuôi tôm đang phát triển rộng khắp trên toàn thế giới. Đây là một ngành công nghiệp mạnh với giá trị tương ứng khoảng 10 triệu USD. Tôm sú là loài được nuôi phổ biến nhất. Tuy nhiên, ở hầu khắp trên thế giới, ngành công nghiệp nuôi tôm đang vấp phải khó khăn lớn do dịch bệnh, chủ yếu do vi khuẩn (đặc biệt là *Virio harveyi*) và virus gây ra. Khi phát hiện bệnh, nông dân thường sử dụng các hợp chất kháng khuẩn để rải xuống hồ nuôi hoặc cho thêm vào thức ăn. Rất nhiều nông dân đã sử dụng các kháng sinh với số lượng lớn như là thuốc phòng bệnh, thậm chí ngay cả khi chưa xác định được tác nhân gây bệnh. Khoảng 20 năm trước đây, kháng sinh dùng với một lượng rất lớn, hằng năm lượng kháng sinh sản xuất ra lên tới 27 ngàn tấn, 90% số lượng này bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Việc sử dụng kháng sinh như vậy đã tạo ra những dòng vi khuẩn kháng kháng sinh. Các vi khuẩn này có thể truyền gen kháng thuốc cho vi khuẩn gây bệnh ở người, dẫn đến nguy cơ không thể dùng kháng sinh để chữa bệnh cho người. Loài người đã phải tốn hàng tỷ đô la để nghiên cứu và tìm ra những loại kháng sinh mới thay thế kháng sinh cũ đã mất tác dụng diệt khuẩn. Nhiều tác nhân gây bệnh dường như đột biến thành dạng nguy hiểm hơn rất nhiều so với những dạng đã xuất hiện cách đây hàng chục năm, và do đó cho dù tôm không bị stress bởi chất lượng nước trong hồ nuôi thì cũng không chịu nổi sự tấn công của các loại bệnh dịch. Như vậy, có vẻ như cách làm của nông dân đã làm cho vấn đề ngày càng trở nên trầm trọng.

Lời giải cho vấn đề nằm ở lĩnh vực sinh thái vi sinh vật chứ không phải ở lĩnh vực dược học (tìm ra các kháng sinh hay vacxin mới). Nông dân nuôi tôm cần phải học cách chung sống nhờ vào một quần xã phức tạp các vi sinh vật và điều khiển chúng. Phương pháp sử dụng các vi khuẩn có lợi, tức là các vi khuẩn probiotic, để loại trừ các vi khuẩn có hại bằng quá trình cạnh tranh tốt hơn nhiều so với phương pháp sử dụng kháng sinh. Ngày nay kháng sinh đã bị hạn chế sử dụng làm chất kích thích sinh trưởng và phòng bệnh trong chăn nuôi và nuôi trồng thuỷ sản. Bắt đầu từ năm 2006, Cộng đồng Châu Âu đã cấm sử dụng tất cả các loại kháng sinh làm thức ăn bổ sung trong chăn nuôi và nuôi trồng thuỷ sản (NTTS).

Lịch sử dùng probiotic trong NTTS còn rất mới mẻ. Yasuda và Taga, lần đầu tiên sử dụng vi khuẩn như một nguồn thực phẩm và như một tác nhân sinh học để khống chế bệnh của cá vào năm 1980. Vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* được dùng như một probiotic cho tôm ở Ecuador vào năm 1992, nhờ vậy sản lượng tôm đã tăng 35% trong khi toàn bộ lượng dùng kháng sinh giảm 94% trong thời gian từ 1991 đến 1995. Nauy giảm lượng kháng sinh trong NTTS từ 50 tấn vào năm 1987 xuống còn 746,5kg năm 1997, nhưng sản lượng cá vẫn tăng từ 50 ngàn tấn lên 350 ngàn tấn. Ngày nay việc sử dụng probiotic trong nuôi tôm ở Mexico cũng trở phổ biến. FAO cũng coi việc nghiên cứu probiotic cùng với các chất kích thích miễn dịch (immunostimulant), các chất nâng cao khả năng miễn dịch (immune enhancers) như một trong các biện pháp chủ yếu để cải thiện chất lượng môi trường nuôi thuỷ sản.

Xu hướng sử dụng probiotic trong nuôi trồng thủy sản đang ngày càng tăng lên do các kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng làm tăng năng suất và ngăn ngừa bệnh của chúng. Đã có rất nhiều báo cáo về những lợi ích của việc sử dụng probiotic trong nuôi trồng thủy sản đem lại. Các trại nuôi tôm ở Indonesia sử dụng các chế phẩm như Mutibacter, Enviro star, Super NB... với mục đích phân giải các hợp chất hữu cơ từ phân và thức ăn thừa (Supryadi, 2000). Theo Boyd (1995), sử dụng probiotic có thể giúp ngăn ngừa mùi vị, giảm thành phần tảo lục, tảo lam, giảm nitrate, nitrite, ammonia, và phosphate; tăng oxygen hoà tan và nâng cao khả năng phân huỷ chất hữu cơ (Boyd, 1995). Các dòng chọn lọc *Bacillus* spp. đã được sử dụng qua thực nghiệm để kiềm chế sự lây nhiễm của các loài Vibrio (Moriarty, 1998; Rengpipat và ctv, 1998). Những người nuôi tôm sú ở Philippin sử dụng vi khuẩn và men như là thức ăn cho tôm (Primavera và ctv, 1993). Scholz (1999) đã cho thấy các loại *S. cerevisiae* và *Phaffia rhodozyma* giúp nâng cao sức đề kháng chống bệnh do Vibrio. Có 3 cách sử dụng probiotic trong nuôi trồng thuỷ sản: Đưa trực tiếp vào nước để vi khuẩn probiotic khu trú trước trong nước, trộn probiotic vào thức ăn, nuôi bằng thức ăn sống (rotifier, artemia) với probiotic.

Bảng 8.1. **Probiotic và các thức ăn phụ gia được dùng trong nuôi trồng thủy sản**

Các động vật nuôi	Chủng probiotic	Thử nghiệm với	Kết quả
Cá hồi	*Tetraselmis suecica*	*A.salmonicida* *A. hydrophila* *Lactobacillus spp* *S. liquefaciens* *V. anguillarum* *V. salmonicida* *Yersinia ruckeri* typ I	Phòng bệnh rất tốt
Tôm hùm	CA2	-	Cho năng suất cao
Cá hồi	*L.plantarum* *V.anguillarum*	*V.salmonicida*	*Lactobacillus* xâm nhập vào thành ruột non Không thể chống được bệnh
Sò	*Vibrio* spp *Pseudomonas* sp	*V.anguillarum*	Kiểm soát bệnh tốt
Tôm sú	*Bacillus* S11	*V.harveyi*	Cho năng suất cao Kiểm soát bệnh tốt
Tôm sú	*Lactobacillus* spp.	*V.harveyi*	Năng suất cao Kiểm soát bệnh tốt

2.4. Cơ chế tác động của probiotic

Đã có nhiều nghiên cứu giải thích cơ chế tác động của probiotic, song vẫn còn có nhiều ý kiến khác nhau. Sau đây là tóm tắt những kiểu tác động của probiotic được nhiều nhà khoa học chấp nhận

2.4.1. Probiotic sản sinh các chất ức chế

Sự có mặt của các vi khuẩn sinh các chất ức chế trong ruột của vật chủ, trên bề mặt hoặc trong môi trường nuôi đã tạo ra một hàng rào ngăn chặn sự sinh sôi của các tác nhân gây bệnh cơ hội. Các chất diệt khuẩn hay ức chế hoạt động của vi khuẩn gây bệnh do vi khuẩn probiotic sinh ra có thể tác động đơn độc hoặc phối hợp với nhau, bao gồm: các chất kháng sinh, bacteriocin, siderophores, lysozym, protease, hydro peroxit và các acid hữu cơ (làm biến đổi giá trị pH). Ngoài ra gần đây, amoni và diaxetyl cũng được đưa thêm vào danh sách này. Các nhà vi sinh học đã đưa ra các bằng chứng sau: *Lactobacillus* sp. có thể sản sinh bacterocin là chất ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn khác (chủ yếu là vi khuẩn gram dương). Các vi khuẩn biển sản sinh enzyme phân giải vi khuẩn chống lại *Vibrio parahaemolyticus*. *Alteromonas* sp. dòng B-10-31, phân lập từ nước biển gần bờ biển của Nhật Bản sản sinh monastatin có tác dụng ức chế hoạt tính protease của *Aermonas hydrophila* và *V. anguillarum*.

2.4.2. Cạnh tranh hoá chất/năng lượng với những vi khuẩn khác

Tất cả các vi khuẩn đều cần Fe để tăng trưởng. Siderophore là chất có khối lượng phân tử thấp (<1500), có khả năng gắn với các ion sắt. Siderophore có thể hòa tan sắt

kết tủa thành dạng dễ sử dụng cho vi sinh vật, do đó nó là một công cụ thu lượm sắt rất quan trọng đối với các vi sinh vật. Các vi sinh vật vô hại sinh siderophore có thể được sử dụng như probiotic để cạnh tranh sắt với các vi khuẩn gây hại. Bản thân vi khuẩn có hại bị loại bỏ thì cũng có nghĩa là loại bỏ được đối thủ cạnh tranh các chất dinh dưỡng và năng lượng dùng cho vi khuẩn probiotic và cho vật chủ. Sử dụng *Pseudomonas fluorescens* như probiotic trong nuôi cá hồi nước ngọt và cá hồi đại dương có tác dụng hạn chế *A. salmonicida* theo cơ chế này.

2.4.3. Cạnh tranh vị trí bám dính với vi khuẩn có hại

Vi khuẩn probiotic có thể ngăn cản sự khu trú của các vi khuẩn gây bệnh bằng cách tranh giành vị trí bám trên thành ruột hay trên bề mặt các mô khác. Vi khuẩn bám dính trên niêm mạc ruột nhờ cơ chế đặc trưng (dựa vào chất bám dính (adhesin) của vi khuẩn và các phần tử thụ thể của thượng bì ruột) và cơ chế không đặc trưng (dựa vào những yếu tố hoá lý học). Người ta đã chứng minh được khả năng bám dính và phát triển trên bề mặt, hoặc bên trong ruột,. hoặc niêm mạc ngoài của chủng *Carnobacterium* K1 làm cho chủng này cạnh tranh vượt trội và ngăn cản được sự lan rộng của các vi khuẩn gây bệnh ở cá như *V. anguillarum* và *A. hydrophila*.

2.4.4. Tăng cường đáp ứng miễn dịch

Kháng nguyên của probiotic kích thích tế bào niêm mạc ruột sản sinh kháng thể chống lại tác nhân gây bệnh. Chất ức chế của probiotic tiếp tục nâng cao hiệu quả của kháng thể của vật chủ. Trong thực nghiệm, người ta thấy động vật thí nghiệm được bổ sung vi khuẩn lactic đã tăng khả năng chống lại bệnh truyền nhiễm đường ruột khá rõ rệt. Tôm không có khả năng tạo kháng thể vì không có đáp ứng miễn dịch thể dịch. Probiotic có tác dụng tăng cường đáp ứng miễn dịch tự nhiên.

2.4.5. Cải thiện chất lượng nước

Việc xử lý nước nuôi thuỷ sản bằng probiotic đã cho thấy tác dụng giảm được chất hữu cơ trong nước ao nuôi, giảm hàm lượng BOD (Biochemical Oxygen Demand: nhu cầu oxy sinh hoá) và giảm độc do amoni, nitrite và hydro sulfua, khống chế được vi khuẩn gây bệnh. Ngoài các kiểu tác động trên, vi khuẩn probiotic còn góp thêm enzyme cho con vật chủ cũng như cung cấp các nguyên tố đa vi lượng cho vật chủ, giúp chúng sử dụng thức ăn hiệu quả hơn và tăng trưởng tốt hơn. Tuy nhiên cũng cần lưu ý rằng, trong mối tương tác với vi tảo thì vi khuẩn probiotic đôi khi lại ức chế sự phát triển của vi tảo, đặc biệt là tảo đỏ. Trong số 41 dòng vi khuẩn thử nghiệm có tới 23 dòng ức chế sinh trưởng của tảo đơn bào *Pavlova lutheri* ở mức độ khác nhau. Vi khuẩn probiotic hạn chế sự phát triển của tảo là điều không mong muốn trong nuôi ấu trùng bằng kỹ thuật nước xanh (green-water technique), tức là kỹ thuật bổ sung thêm tảo đơn bào làm thức ăn cho ấu trùng.

2.4.6. Chọn lọc các chủng vi khuẩn làm probiotic

Từ trước đến nay, việc tuyển chọn các vi khuẩn probiotic thường là theo kinh nghiệm chứ ít có căn cứ khoa học. Rất nhiều thất bại trong nghiên cứu probiotic có nguyên nhân từ việc lựa chọn các chủng vi sinh vật không thích hợp. Thực ra, các bước tuyển chọn không thay đổi nhưng các chủng bước này cần phải được áp dụng thích hợp đối với các vật chủ khác nhau và các môi trường khác nhau. Các tiêu chí tuyển chọn chủ yếu được xác định căn cứ trên khía cạnh an toàn sinh học, phương pháp sản xuất và chế biến, phương thức xử lý với probiotic và vị trí trong cơ thể, nơi các vi sinh vật probiotic sẽ hoạt động.

a) Thông tin cơ sở

Hai bước đầu tiên của quá trình tuyển chọn vi khuẩn probiotic tiềm năng là thu thập các tài liệu có sẵn và các số liệu thực tiễn tại nơi ấp trứng.

b) Thu thập các vi khuẩn probiotic tiềm năng

Để sử dụng trong thực tiễn thì việc xác định vi khuẩn probiotic tiềm năng không phải là mục tiêu quan trọng mặc dù việc xác định này cũng cần phải được thực hiện một cách hợp lý nhằm đảm bảo chất lượng sản xuất và được ghi nhận bản quyền để đảm bảo quyền thương mại. Mục tiêu quan trọng là xác định khả năng tồn tại của chủng probiotic tiềm năng đó, tính kháng kháng sinh và khả năng cạnh tranh vượt trội với các chủng khác.

c) Đánh giá khả năng cạnh tranh vượt trội của chủng probiotic tiềm năng với các chủng gây bệnh

Đây có lẽ là một bước quan trọng trong quá trình tuyển chọn. Khả năng này dựa trên khả năng tồn tại của chủng probiotic trong ấu trùng vật chủ, hoặc trong môi trường của nó, khả năng bám dính trên bề mặt vật chủ, khả năng xâm nhiễm vào vật chủ và khả năng ngăn chặn sự xâm nhập và lan truyền của các chủng gây bệnh tiềm ẩn. Nếu thiếu một trong các khả năng trên thì chủng probiotic tiềm năng sẽ không còn là tiềm năng nữa và khó có thể mang lại lợi ích cho vật chủ. Bằng cách quan sát sự sinh trưởng của chủng probiotic đang được lựa chọn trong môi trường tương tự như môi trường nuôi ấu trùng, có thể giúp dự đoán được khả năng sống sót của chủng đó.

d) Đánh giá tính gây bệnh của chủng được lựa chọn

Bước tiếp theo là đánh giá khả năng gây bệnh cho ấu trùng. Thông thường người ta sử dụng phương pháp "tắm" với ấu trùng, ngoài ra có một phương pháp khác có thể chấp nhận được là gây nhiễm nhộng hoặc "tắm" với *Artemia nauplii*. Nếu kết quả khả quan và nếu có sự tương xứng tốt giữa tỷ lệ chết trong thử nghiệm ở *Artemia nauplii* và tỷ lệ chết ở ấu trùng tôm thì *Artemia* nauplii có thể đem áp dụng thực tế để kiểm tra tính gây bệnh của các chủng probiotic đang được lựa chọn. Tuy nhiên, cần

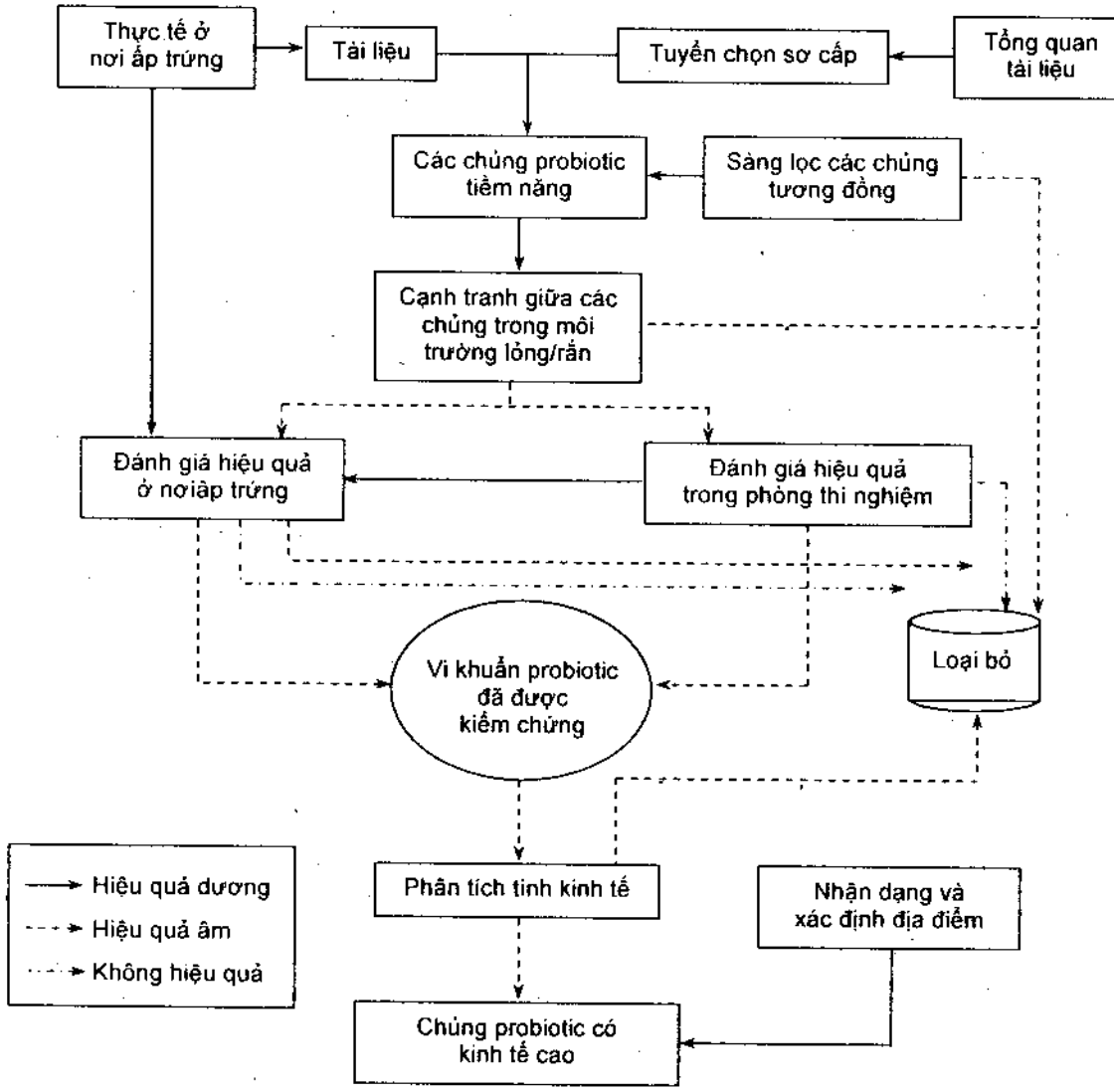
phải hiểu rằng, không thử nghiệm nào có thể thay thế được thử nghiệm thật ngay trên sinh vật đích đang quan tâm.

e) Đánh giá chủng probiotic với ấu trùng tôm

Thử nghiệm này có thể được thực hiện trong môi trường ấp trứng thật nhưng có khuyến cáo cho rằng nên thực hiện trước hết ở phòng thí nghiệm. Một kết quả tốt không chỉ là tỷ lệ ấu trùng sống cao mà còn là các đặc điểm cải thiện khác ở ấu trùng như sinh trưởng nhanh, đạt khối lượng cao hơn, kháng stress tốt hơn và giảm tỷ lệ nhiễm các vi khuẩn có hại.

f) Đánh giá tính kinh tế

Cuối cùng cần phải phân tích về mặt kinh tế xem liệu việc sử dụng probiotic đó đáng để đầu tư không.



Hình 8.2. **Sơ đồ tuyển chọn các chủng vi sinh vật probiotic**

2.5. Probiotic cải thiện chất lượng nước, chống ô nhiễm môi trường nuôi trồng thủy sản

Trong quá trình nuôi trồng thủy sản, nước trong các hồ nuôi thường bị ô nhiễm nặng. Để cải thiện chất lượng nước và chống ô nhiễm cho các thủy vực nuôi trồng thủy sản, có nhiều biện pháp khác nhau, tuy nhiên hiện nay người ta đang rất quan tâm đến việc sử dụng probiotic. Probiotic phổ biến nhất là các vi khuẩn sống (thường được bổ sung thêm dịch chiết nấm men với các enzyme ngoại bào). Một số hãng chỉ bán dịch enzyme ngoại bào mà không có vi khuẩn sống. Dịch chiết từ các sản phẩm thực vật cũng được sử dụng như là các probiotic, phổ biến nhất là dịch chiết từ hạt cam, quít và cây Yucca (*Yucca schidigera*). Các tác động của probiotic đối với các hồ nuôi trồng thủy sản là: tăng cường phân hủy các chất hữu cơ, giảm nồng độ nitơ và phospho, kích thích sinh trưởng của tảo, kiểm soát amoni, nitrite, hydro sunfua, giảm nguy cơ mắc bệnh và tăng năng suất tôm, cá.

Các vi khuẩn sống

Hiện nay người ta sử dụng hai dạng chế phẩm vi sinh vật sống làm probiotic. Một dạng chứa bào tử, hoặc các phần khác của một, hoặc nhiều loài chứa trong một môi trường có chất bảo quản để kìm hãm sinh trưởng. Môi trường có thể được pha chế ở dạng chất lỏng, hoặc hạt bao các mầm vi khuẩn. Sau khi đưa vào hồ nuôi, các mầm vi khuẩn này sẽ nhân lên nhanh chóng. Loại chế phẩm thứ hai là vi khuẩn được nuôi trong môi trường dinh dưỡng. Ban đầu, vi khuẩn được rải xuống hồ nuôi 2 đến 4 tuần một lần. Hiện nay, hầu hết các nhà cung cấp sản phẩm đều khuyên rằng, chế phẩm loại này nên được bón thường xuyên hơn, thậm chí là hằng ngày. Các loài thuộc *Bacillus* được sử dụng phổ biến nhất, ngoài ra các loài thuộc *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas*, *Rhodopseudomonas*, và các vi khuẩn lưu huỳnh quang hợp cũng được sử dụng làm chế phẩm vi khuẩn sống.

Kiểu tác động của các mầm vi khuẩn là làm tăng cường các quá trình tự nhiên như phân hủy chất hữu cơ, nitrate hóa, loại amoni, phản nitrate hóa, oxy hóa sunfua, và phân hủy các chất độc. Các hồ nuôi đã có sẵn một hệ vi sinh vật tự nhiên có khả năng kiểm soát và biến đổi toàn bộ các chất hữu cơ tồn tại trong một hệ sinh thái tự nhiên. Các quần thể vi khuẩn phản ứng với sự có mặt của các cơ chất. Ví dụ, khi trong hồ xuất hiện amoni thì các vi khuẩn nitrate hóa tự nhiên sẽ oxy hóa amoni thành nitrate. Nếu lượng amoni tăng thì quần thể vi khuẩn nitrate hóa sẽ phản ứng lại sự tăng cơ chất của nó bằng cách tăng số lượng (kích thước quần thể). Khi lượng amoni giảm thì kích thước quần thể này lại giảm xuống. Tốc độ nitrate hóa rất nhạy cảm với nồng độ amoni nhưng nó cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác trong hồ như nhiệt độ, nồng độ oxy hòa tan và pH. Nếu quá trình nitrate hóa không tăng tương ứng với lượng amoni tăng thì nguyên nhân là một trong số các yếu tố môi trường không được thỏa mãn chứ không phải do có ít vi khuẩn nitrate hóa.

Chương IX
XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG BIỆN PHÁP SINH HỌC

Hoạt động công-nông nghiệp và sinh hoạt hằng ngày của con người thải ra các chất thải lỏng. Dựa theo nguồn gốc phát sinh, nước thải được phân loại thành hai nhóm là nước thải sinh hoạt và nước thải sản xuất.

- Nước thải sinh hoạt là nước thải ra từ hoạt động sinh hoạt hằng ngày của con người, từ các hộ gia đình, bệnh viện, khách sạn, cơ quan, trường học, ...Thành phần chủ yếu là các chất hữu cơ dễ bị phân hủy sinh học.
- Nước thải sản xuất là nước thải ra từ hoạt động sản xuất, từ các khu công nghiệp, tiểu thủ công nghiệp, giao thông vận tải,...Thành phần nước thải loại này phức tạp tùy thuộc vào đặc điểm từng ngành sản xuất.

Lượng chất thải lỏng qua, hoặc không qua xử lý sẽ qua cống, rãnh, đường ống chảy vào các thủy vực tự nhiên như nước ngầm, sông, hồ và các đại dương. Theo lý thuyết, chất thải sẽ biến mất khi chúng chảy vào các thủy vực tự nhiên như vậy. Câu cách ngôn "hòa loãng là cách giải quyết ô nhiễm" có phần nào đúng trong trường hợp này. Thật may mắn, sự tự làm sạch thực sự là khả năng vốn có của nước tự nhiên. Khả năng này dựa trên các chu trình sinh địa hoá và mối quan hệ giữa các quần thể vi sinh vật tự nhiên. Chu trình sinh địa hóa là quá trình biến đổi dạng của các nguyên tố hóa học nhờ quá trình sinh học, làm cho các nguyên tố tuần hoàn theo một chu trình toàn cầu giữa các quyển: khí quyển, thủy quyển và thạch quyển. Các chất dinh dưỡng hữu cơ trong nước được trao đổi và khoáng hóa nhờ một hệ vi sinh vật tự dưỡng bản địa trong nước. Khoáng hóa là một quá trình biến đổi các chất hữu cơ thành chất vô cơ được thực hiện chủ yếu nhờ vi sinh vật. Trên thực tế, tự nhiên có thể chấp nhận một lượng nhỏ chất thải thô mà không gây ra một sự suy giảm chất lượng nước nghiêm trọng nào. Đó là nhờ hoạt động của các quần thể vi khuẩn phân giải các chất hữu cơ trong tự nhiên.

Tuy nhiên khi nước bị ô nhiễm bởi nồng độ các chất hữu cơ quá cao thì chúng sẽ đòi hỏi một lượng oxy rất cao. Ngược lại, nhu cầu oxy cao cũng biểu thị sự có mặt của một lượng quá tải cacbon hữu cơ trong nước. Lượng oxy hòa tan trong nước trung bình hiếm khi vượt quá 8mg/l, do tính hòa tan của oxy thấp. Trên thực tế nồng độ này có thể thấp hơn do hoạt động của vi khuẩn dị dưỡng. Do đó, việc tăng thêm

chất thải có hàm lượng hữu cơ cao vào hệ sinh thái nước có thể dẫn đến sự thiếu hụt oxy. Tình trạng kiệt quệ lượng oxy hòa tan trong nước là hậu quả tất yếu của lượng nước thải quá tải vào các nguồn nước tự nhiên. Việc mất oxy trong nước có thể giết chết những sinh vật hiếu khí, bao gồm cả các vi sinh vật, cá và các động vật không xương sống. Sự phân hủy xác sinh vật trong nước cũng cần thêm oxy. Sự lên men vật chất làm tăng mùi, vị và màu sắc chất độc hại, nguồn nước sẽ bị nhiễm bẩn và hôi thối.

1. ĐÁNH GIÁ ĐỘ Ô NHIỄM

Độ nhiễm bẩn của nước thải được đánh giá thông qua một số chỉ tiêu cơ bản như nhu cầu oxy sinh hóa (BOD), nhu cầu oxy hóa học (COD), chất rắn tổng số, chất rắn huyền phù,...

– *Nhu cầu oxy sinh hóa* (BOD-Biochemical Oxygen Demand) là một chỉ tiêu được sử dụng rộng rãi nhằm đo chất lượng nước. BOD là lượng oxy hòa tan mà vi sinh vật đòi hỏi cho quá trình phân giải hiếu khí các chất hữu cơ có mặt trong nước thải. Mức độ ô nhiễm nguồn nước được phản ánh qua chỉ số BOD. Nước càng nhiều chất hữu cơ dễ bị oxy hóa, tức càng ô nhiễm thì BOD càng cao. Vì thế, phương pháp BOD được sử dụng rộng rãi để theo dõi chất lượng nước và quá trình phân hủy sinh học chất thải. Nó được thiết kế để xác định lượng oxy tiêu thụ bởi vi sinh vật trong quá trình oxy hóa vật chất hữu cơ trong mẫu. Đơn vị tính BOD thường được sử dụng là mgO_2/l.

– *Nhu cầu oxy hóa học* (COD-Chemical Oxygen Demand) là lượng oxy cần để oxy hóa bằng con đường hóa học các chất hữu cơ và vô cơ có mặt trong nước. Để xác định chỉ tiêu này người ta thường sử dụng tác nhân oxy hóa mạnh là kalibicromat ($K_2Cr_2O_7$), hoặc kalipermanganat ($KMnO_4$). COD càng lớn thì mức độ ô nhiễm hữu cơ của nước thải càng cao.

– *Chất rắn tổng số* (TS-Total solid) là toàn bộ lượng chất rắn ở dạng hòa tan và lơ lửng có trong nước thải. TS được tính bằng khối lượng chất khô còn lại khi bốc hơi hết nước trong nước thải.

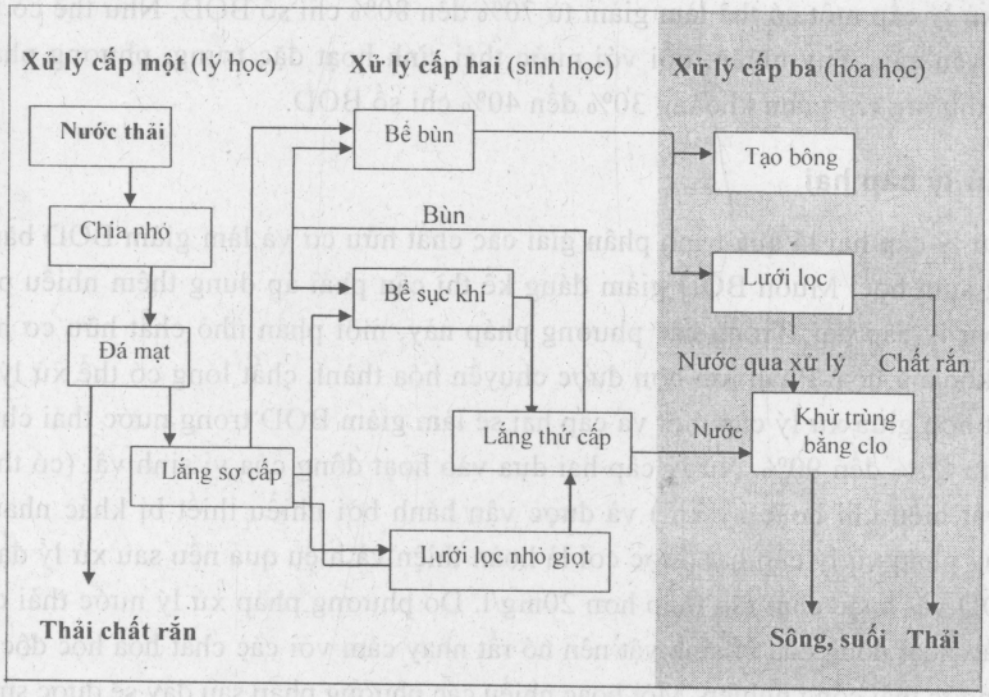
– *Chất rắn huyền phù* (SS-Suspended Solids) là lượng vật chất có kích thước nhỏ lơ lửng trong nước được xác định bằng cách lọc qua giấy lọc tiêu chuẩn, sấy ở 103 – 105^oC đến khối lượng không đổi rồi đem cân.

2. XỬ LÝ NƯỚC THẢI

Việc duy trì chất lượng một nguồn nước đạt yêu cầu, có nghĩa là nguồn nước đó không được chứa quá nhiều các chất dinh dưỡng hữu cơ và vô cơ, hoặc các chất độc

hại, hay các chất làm mất mỹ quan. Lượng oxy, nhiệt độ, độ muối, độ đục và pH không được thay đổi quá ngưỡng khiến cho nguồn nước đó không còn khả năng nuôi sống cá và mất đi mục đích giải trí của nó. Chúng không được trở thành phương tiện truyền bệnh (qua phân). Mục đích của việc xử lý nước thải là loại bỏ các chất hữu cơ, tác nhân gây bệnh cho người và các chất hóa học độc hại.

Các phương pháp xử lý nước thải hiện đại đều nhằm mục đích giảm lượng chất hữu cơ trong nước thải để nhu cầu oxy của nó ít hơn trước khi nó đi vào một thủy vực nào đó. Các phương pháp này đều kết hợp các phương tiện lý học, hóa học và vi sinh vật học. Hầu hết các nước phát triển hiện nay đều có hệ thống xử lý nước thải. Nước thải được xử lý qua ba bước. Xử lý *cấp một* nhờ các phương pháp phân tách lý học nhằm giảm nhu cầu oxy. Xử lý *cấp hai* nhờ quá trình phân hủy sinh học của các vi sinh vật để giảm tiếp nồng độ chất hữu cơ trong nước thải. Xử lý *cấp ba* sử dụng các phương pháp hóa học để loại bỏ các hợp chất vô cơ.



Hình 9.1. **Sơ đồ các công đoạn trong xử lý nước thải. Vi sinh vật phân hủy chất thải ở giai đoạn thứ hai.**

2.1. Xử lý cấp một

Xử lý cấp một là loại bỏ những chất rắn bằng phương pháp vật lý gồm ba bước:

– Loại bỏ những chất rắn có kích thước lớn như lốp xe, chai lọ, vỏ hộp.

– Sàng lọc các vật chất có kích thước nhỏ như đá, sỏi.

– Sa lắng để loại các chất rắn dạng hạt nhỏ như giấy, phân. Các chất rắn lắng ở đáy bể sẽ được phân giải bằng phương pháp kỵ khí trong bể phân giải bùn (sludge digester), hoặc được dùng làm phân bón.

Chỉ có một phần trăm rất thấp những chất hữu cơ lơ lửng hoặc hòa tan là thực sự bị khoáng hóa trong quá trình xử lý chất thải lỏng. Phần lớn những chất này bị loại bỏ bằng cách làm lắng. Trong phương pháp này, vấn đề xử lý nước thải lỏng vô hình chung lại trở thành xử lý chất thải cứng, vấn đề mà hiện nay vẫn chưa được giải quyết. Tuy nhiên, sự thay thế trên lại rất quan trọng và cần thiết vì nếu không nước thải có chỉ số BOD cao sẽ đi vào hệ sinh thái nước tự nhiên vốn có hàm lượng oxy hòa tan thấp, gây ra những tác động tiêu cực. Phần chất lỏng còn lại của nước thải có chứa cả những chất dinh dưỡng hòa tan và chất hữu cơ có thể được xử lý tiếp, hoặc thậm chí có thể thải ra môi trường ngay sau lần xử lý cấp một. Do chất thải lỏng có nhiều dạng khác nhau và có thể chứa nhiều chất rắn, ít chất hữu cơ hòa tan, phương pháp xử lý cấp một có thể làm giảm từ 70% đến 80% chỉ số BOD. Như thế có thể coi là đạt yêu cầu. Tuy nhiên, đối với nước thải sinh hoạt đặc trưng, phương pháp này thông thường chỉ giảm khoảng 30% đến 40% chỉ số BOD.

2.2. Xử lý cấp hai

Xử lý cấp hai là quá trình phân giải các chất hữu cơ và làm giảm BOD bằng con đường sinh học. Muốn BOD giảm đáng kể thì cần phải áp dụng thêm nhiều phương pháp xử lý cấp hai. Trong các phương pháp này, một phần nhỏ chất hữu cơ hòa tan được khoáng hóa. Phần lớn hơn được chuyển hóa thành chất lỏng có thể xử lý được. Sự kết hợp giữa xử lý cấp một và cấp hai sẽ làm giảm BOD trong nước thải chưa qua xử lý từ 80% đến 90%. Xử lý cấp hai dựa vào hoạt động của vi sinh vật (có thể là vi sinh vật hiếu khí hoặc kỵ khí) và được vận hành bởi nhiều thiết bị khác nhau. Một phương pháp xử lý cấp hai được coi là hoàn thiện và hiệu quả nếu sau xử lý đạt nồng độ BOD và/ hoặc chất rắn thấp hơn 20mg/l. Do phương pháp xử lý nước thải cấp hai dựa vào hoạt động của vi sinh vật nên nó rất nhạy cảm với các chất hóa học độc hại có trong nước thải công nghiệp. Một hoặc nhiều các phương pháp sau đây sẽ được sử dụng:

2.2.1. Hồ oxy hóa

Hồ oxy hóa còn được gọi là hồ ổn định. Chúng được áp dụng vào phương pháp xử lý nước thải cấp hai dạng đơn giản tại nông thôn hoặc ở những nhà máy công nghiệp. Các vi khuẩn dị dưỡng sẽ phân hủy những chất thải hữu cơ trong hồ và sản sinh ra những sản phẩm tế bào, hoặc khoáng chất có thể kích thích sự tăng trưởng của tảo. Các quần thể tảo sẽ sinh ra oxy để bù lại lượng oxy đã mất do vi khuẩn dị dưỡng. Điều này cho phép tiếp tục quá trình phân hủy chất hữu cơ. Sự oxy hóa đạt

được dựa vào sự khuếch tán của oxy và quang hợp của tảo. Bởi vậy những hồ này cần đủ nông trên diện tích lớn để đảm bảo đủ ánh sáng cho quá trình quang hợp của tảo. Thông thường các hồ này có chiều sâu dưới 3m. Do sự oxy hóa diễn ra không hoàn toàn nên sinh ra mùi khó chịu. Hoạt động của hồ oxy hóa bị ảnh hưởng lớn vào sự thay đổi của thời tiết theo mùa. Bởi vậy, hồ oxy hóa chỉ sử dụng được ở những vùng có khí hậu ấm áp. Vi khuẩn và tế bào tảo được hình thành trong quá trình phân hủy chất thải sẽ lắng xuống đáy hồ. Kết quả là hồ sẽ bị đầy. Hồ oxy hóa nhìn chung có chi phí thấp, nhưng xem ra kém hiệu quả. Chúng đòi hỏi dung tích chứa lớn và thời gian duy trì dài. Sự phân hủy các chất hữu cơ trong hồ tương đối chậm. Thời gian xử lý nước thải sinh hoạt có thể kéo dài một tuần. Nước thải có chứa sản phẩm oxy hóa thường được loại bỏ định kỳ. Sau đó hồ lại được đổ đầy nước thải chưa xử lý.

2.2.2. Lưới lọc trích-ly

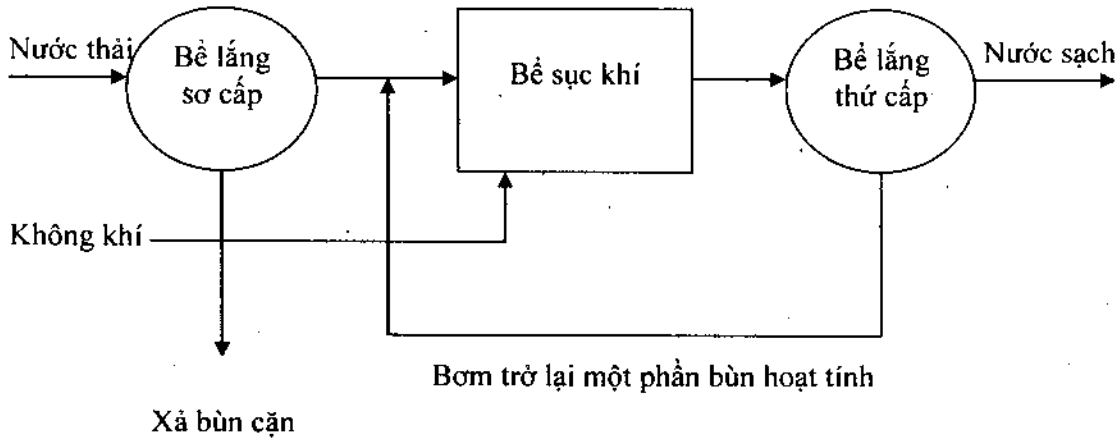
Hệ thống lọc trích-ly là phương pháp xử lý nước thải hiếu khí tương đối đơn giản và ít tốn kém. Nước thải sẽ được rải đều bởi một thùng tưới xoay vòng được treo trên một giàn lọc xốp. Nước thải sẽ ngấm qua giàn xốp. Chất thải được thu gom ở dưới đáy. Chất liệu xốp được phủ bởi lớp sinh khối vi khuẩn dày đặc và nhày. Lớp vi khuẩn này chủ yếu là *Zooglea ramigera* và một số vi khuẩn tạo nhày tương tự. *Zooglea ramigera* là một loại vi khuẩn nhày Gram âm tạo ra một khối lớn gọi là keo tụ. Đám keo tụ kích thích sự sinh trưởng của quần xã vi sinh vật, bao gồm vi khuẩn, nấm, động vật nguyên sinh và những vi sinh vật khác. Quần xã vi sinh vật này hấp thụ và khoáng hóa những chất dinh dưỡng hòa tan trong nước thải, làm giảm BOD trong nước thải. Sự thông khí xảy ra bị động như một kết quả tất yếu của sự chuyển dịch không khí qua giàn xốp. Nước thải có thể được chuyển qua hai hoặc nhiều hơn lưới lọc nhỏ giọt, hoặc quay vòng vài lần qua cùng một lưới lọc để giảm BOD đến một mức độ tương đối. Nước thải từ lưới lọc tiếp tục được làm sạch bằng cách cho sinh khối bị bỏ đi lắng xuống trước khi thải ra ngoài.

Ngoài tính đơn giản và kinh tế, điểm bất lợi của phương pháp này là nếu chất dinh dưỡng trong nước thải quá nhiều thì sẽ sản sinh ra rất nhiều vi sinh vật nhày. Từ đó sẽ cản trở sự thông khí và giảm tỷ lệ lọc. Do đó phải thay lưới lọc định kỳ. Ngoài ra, nhiệt độ quá thấp vào mùa đông cũng làm giảm mạnh tính hiệu quả của hệ thống thiết bị ngoài trời này.

2.2.3. Bùn hoạt tính

Phương pháp xử lý nước thải bằng bể bùn hoạt tính hiếu khí được sử dụng rất rộng rãi. Nước thải được lắng xuống, sau đó nó được đưa vào bể sục khí cùng với hỗn hợp chất hữu cơ hòa tan. Tại đây vi sinh vật thực hiện phân hủy chất hữu cơ trong nước thải. Sự thông khí được tạo ra trong quá trình bơm và/ hoặc khuấy trộn. Sau đó, nước thải cùng với sản phẩm phân giải hiếu khí sẽ được chuyển từ bể sục khí

sang bể lắng để loại bỏ các chất rắn sinh học. Từ bể lắng, một phần bùn hoạt tính được hồi lưu về bể hiếu khí để tăng cường hoạt tính của vi sinh vật. Trong quá trình lắng, một quần thể vi khuẩn dị dưỡng phát triển rất mạnh. Hỗn hợp cơ chất hữu cơ trong nước thải cho phép chúng sinh trưởng cả ở dạng huyền phù và dạng khối hay dạng keo tụ. Có rất ít nấm sợi, động vật nguyên sinh và nấm men. Động vật nguyên sinh là vật ăn vi khuẩn chủ yếu.



***Hình 9.2.* Sơ đồ hệ thống bùn hoạt tính**

Phương pháp bùn hoạt tính có thể làm giảm từ 10 – 15% chỉ số BOD trong nước thải chưa qua xử lý. Phương pháp này cũng làm giảm đáng kể các tác nhân gây bệnh đường tiêu hóa nhờ tác động kết hợp của sự cạnh tranh, vật dữ - con mồi, hấp thụ và lắng. Một số tác nhân gây bệnh như *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* và enterovirus giảm đi tới 90 – 99% trong nước thải đã qua xử lý so với trước khi xử lý. Các enterovirus được loại bỏ nhờ sự hấp thụ các hạt virus lên lớp bùn lắng.

2.2.4. Bể tự hoại

Bể tự hoại là hệ thống xử lý kỵ khí đơn giản nhất, thường được sử dụng rộng rãi ở khu vực nông thôn, cho hộ gia đình, nơi thiếu hệ thống xử lý nước thải chung. Bể tự hoại hoạt động như một bể lắng chủ yếu là nước thải từ nhà vệ sinh. Bên trong bể tự hoại, các thành phần hữu cơ của nước thải được trải qua sự phân hủy kỵ khí sơ cấp. Bùn tích tụ được lưu trong điều kiện kỵ khí. Nó được phân hủy bởi các vi sinh vật kỵ khí thành các acid hữu cơ và hydro sunfua. Các chất rắn cặn bã lắng xuống đáy bể. Nước thải đã được làm sạch sẽ thấm vào đất. Xử lý tự hoại không phải là phương pháp tiêu diệt các tác nhân gây bệnh đáng tin cậy. Vì vậy cần đặt bể xa giếng nước ăn.

2.2.5. Bể kỵ khí

Các bể kỵ khí là những bể lên men lớn được thiết kế cho quá trình hoạt động liên tục trong điều kiện kỵ khí. Bể kỵ khí lớn chỉ sử dụng cho quá trình lắng đọng bùn

trong nước thải và xử lý loại nước thải công nghiệp có BOD rất cao. Bể có chứa hàm lượng lớn các chất hữu cơ lơ lửng, trong đó có một phần lớn là sinh khối vi khuẩn. Số lượng vi khuẩn trong mỗi ml có thể lên tới $10^9 - 10^{10}$. Một quần xã vi khuẩn phức tạp sẽ hoạt động phân giải kỵ khí các chất hữu cơ trong bể.

Phân giải kỵ khí chất thải là một quá trình hai bước. Đầu tiên, chất hữu cơ, bao gồm cả sinh khối của vi sinh vật được chuyển thành các acid béo, CO_2 và H_2. Ở bước tiếp theo, metan được sinh ra. Những sản phẩm cuối cùng trong bể kỵ khí là một hỗn hợp khí, xấp xỉ 70% là metan và 30% là cacbon dioxit, sinh khối vi sinh vật và các chất cặn bã không thể phân hủy sinh học. Khí được sử dụng để vận hành máy bơm hoặc/và cung cấp nhiệt để duy trì nhiệt độ cho bể. Nếu được tinh sạch, khí có thể được đem bán. Vì vậy, ngoài chức năng loại bỏ rác thải, bể kỵ khí còn tạo ra nguồn nhiên liệu thiết thực. Bể kỵ khí sinh ra một lượng bùn nhỏ hơn so với trong nước thải ban đầu. Sản phẩm này vẫn tạo ra mùi thối và ô nhiễm nước. Vì vậy, cần được đặt ở những nơi xa nguồn nước ăn.

Sau đây là một vài dạng công trình xử lý kỵ khí điển hình.

a) Bể metan cổ điển. Được dùng để xử lý cặn lắng (từ bể lắng) và bùn hoạt tính dư của trạm xử lý nước thải. Hầu hết các trạm xử lý nước thải thành phố đều sử dụng hệ thống này.

b) Bể lọc kỵ khí (Anaerobic Filter). Trong công trình này, quá trình xử lý được thực hiện qua vật liệu lọc có bám các vi khuẩn kỵ khí. Các chất hữu cơ trong nước thải bị các vi khuẩn này phân giải nhưng bản thân chúng không bị rửa trôi.

c) Bể xử lý kỵ khí với dòng chảy ngược qua lớp đệm bùn hoạt tính (UASB-Upflow Anaerobic Sludge Blanket). Nước thải đi từ dưới lên qua lớp đệm bùn được cấu tạo từ các đám bông, hoặc hạt sinh khối sẽ diễn ra quá trình phân giải. Khí sinh học (chủ yếu là metan và CO_2) sinh ra sẽ tích tụ ở chính giữa phần trên của bể, sẽ gây hiện tượng tuần hoàn, nhờ đó duy trì đệm bùn sinh học kể trên. Khí tự do được hút vào vòm thu khí đặt ở đỉnh bể phản ứng. Nước thải đã xử lý cùng với một phần bùn và nước trong được tách ở trên. Phần bùn lắng được dẫn trở lại đệm bùn. Bể giữ đệm bùn trong hệ thống treo do dòng nước thải dâng lên. Vận tốc của dòng nước thải chảy ngược lên khoảng 0,6 – 0,9m/h. Gần đây UASB được cải tiến thành UAFP, tức là phương pháp lọc kỵ khí chảy ngược (Upflow anaerobic filter process), theo đó người ta lắp các giá thể nhân tạo, hoặc các bản có bề mặt tiếp xúc lớn cho vi khuẩn bám với mật độ cao. Nhờ đó hiệu quả xử lý cao hơn.

2.3. Xử lý cấp ba

Bất kỳ quá trình loại bỏ chất ô nhiễm còn lại sau khi xử lý cấp hai đều được xem là xử lý cấp ba. Xử lý cấp ba có thể gồm các công đoạn sau đây:

- Dùng chất keo tụ hóa học để lắng các hạt rắn.
- Tiến hành lọc cuối cùng để loại các chất rắn đem đốt lấy tro, trộn xi măng và chất màu đúc gạch lót hè đường hoặc phơi khô làm phân bón.
- Loại bỏ hoặc làm giảm lượng phosphate và nitrate.
- Tẩy trùng để diệt vi khuẩn gây bệnh trước khi đưa vào thủy vực.

Xử lý cấp ba giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm hữu cơ không thể phân hủy sinh học và các chất khoáng, đặc biệt là nitơ và phospho hòa tan. Tuy nhiên, người ta vẫn cần áp dụng các phương pháp xử lý cấp hai để xử lý những chất thải có thể phân hủy sinh học được, bởi vì không cần thiết phải chi phí tốn kém để xử lý những chất này ở giai đoạn xử lý cấp ba. Lưới lọc cacbon hoạt tính thường được sử dụng để loại bỏ những chất thải còn lại sau lần xử lý cấp hai.

Nước thải có chứa phosphate và các dạng muối nitơ có thể gây ra tình trạng ứ thừa chất dinh dưỡng trong hệ sinh thái nước. Việc tăng thêm chất dinh dưỡng đột ngột do thải nước thải hoặc phế phẩm nông nghiệp có thể làm cho tảo phát triển bùng nổ. Những tác động khác nhau như che khuất ánh sáng, việc lấy những chất vi dinh dưỡng và sự có mặt của chất hóa học độc hại có thể làm quần thể tảo chết. Sau đó, sinh khối tảo chết này bị nhóm vi sinh vật dị dưỡng phân hủy và qua đó lấy đi oxy cung cấp cho nguồn nước. Điều này sẽ làm cho cá chết nhiều do ngạt thở, hoặc do nước bị nhiễm khuẩn. Đáng ngại hơn là, nếu hiện tượng này không được xử lý thì nó sẽ kéo theo nhiều thay đổi không mong muốn khác do sự ứ thừa chất dinh dưỡng. Trong đó có cả sự thay đổi trong hình dạng của mảng tảo, nước đục và tảo bị mất màu, quần thể cá cũng có thể chuyển từ dạng loài có giá trị sang dạng dễ thích nghi với môi trường hơn nhưng lại ít quan trọng hơn. Để tránh hiện tượng ứ thừa chất dinh dưỡng, ta có thể loại bỏ phosphate bằng phương pháp kết tủa. Phương pháp này đã áp dụng ở lần xử lý cấp một và hai, hoặc trong những thiết bị riêng biệt để chúng có thể được lặp lại nhiều lần.

2.4. Tẩy trùng

Công đoạn cuối cùng trong quy trình xử lý nước thải là tẩy trùng. Công đoạn này nhằm tiêu diệt những vi khuẩn gây bệnh đường ruột và những virus khác mà những lần xử lý trước không diệt hết. Phương pháp tẩy trùng thường được tiến hành nhờ khử trùng bằng clo, với việc sử dụng khí clo hoặc hipoclorua ($Ca(ClO)_2$ hoặc NaClO). Khí clo khi tác dụng với nước sẽ tạo ra acid hipoclorua và acid hidrocloric, những chất tẩy thực sự. Còn hipoclorit là một chất oxy hóa mạnh nên nó có khả năng chống khuẩn.

Chương X
PHỤC HỒI SINH HỌC

1. THẾ NÀO LÀ PHỤC HỒI SINH HỌC

Bioremediation bắt nguồn từ *bio* là sự sống, *remedy* là sửa chữa hoặc điều trị. Thuật ngữ này cho đến nay chưa được dịch thống nhất ra Tiếng Việt. Tùy tác giả mà có tên gọi khác nhau như *hồi cứu* hay *phục hồi sinh học*, *bồi hoàn sinh học*, *điều trị sinh học* hoặc *liệu pháp sinh học*. Đây là công nghệ sử dụng các tác nhân sinh học để khôi phục lại đất hoặc nước đã bị ô nhiễm bởi các chất độc hại đối với sức khỏe con người và môi trường sống. Nói cách khác, đây là quá trình sử dụng hệ thống sinh học mà chủ yếu là các vi sinh vật tự nhiên, hoặc chọn lọc bằng cải biến di truyền, để xúc tác cho phản ứng phân hủy, hoặc biến đổi các chất độc hại ra khỏi môi trường. Về thực chất, đây là việc làm sạch để đưa môi trường trở lại trạng thái ban đầu, hoặc chí ít là biến những chất độc hại thành các chất ít độc hại hơn, hoặc làm giảm nồng độ của chúng đến mức an toàn. Trong lúc chưa tìm được từ thích hợp, chúng ta tạm gọi là *phục hồi sinh học*. Các phương pháp phục hồi sinh học bao gồm:

- Theo dõi và giám sát quá trình phân hủy sinh học tự nhiên (tự phục hồi).
- Cải thiện điều kiện môi trường. Ví dụ, cung cấp chất dinh dưỡng, hoặc tạo độ thoáng khí cho các sinh vật hoạt động.
- Chủ động cấy các vi sinh vật đã tuyển chọn có hoạt tính mạnh để thúc đẩy việc phân giải chất độc.

Nếu quá trình phân hủy triệt để thì sẽ cho ra sản phẩm cuối cùng là khí cacbonic và nước. Ví dụ, đối với công nghệ cũ, nếu đất bị nhiễm chất độc thì người ta phải cho vào lò đốt, nhưng với phương pháp phục hồi sinh học thì có thể tiến hành xử lý ngay tại chỗ với chi phí thấp. Tuy nhiên, không phải bất kỳ chất liệu nào cũng có thể xử lý được bằng phương pháp này. Ngoài ra còn phụ thuộc vào điều kiện nơi xử lý và thời gian cần cho xử lý.

1.1. Khả năng phân hủy sinh học

Cơ sở của phục hồi sinh học là quá trình phân hủy sinh học tự nhiên, làm giảm nồng độ chất ô nhiễm và oxy hóa hoàn toàn một số chất hữu cơ thành CO_2, H_2O, NO_3^- và các thành phần vô cơ khác có thể tích lũy trong môi trường. Vi sinh vật đặc

biệt thích hợp cho phục hồi sinh học vì chúng có kiểu trao đổi chất rất đa dạng nên có khả năng chuyển hóa các chất gây ô nhiễm như dầu, hydrocacbon chứa gốc clo. Khả năng vi sinh vật phân giải các chất hữu cơ gây ô nhiễm phụ thuộc vào cấu trúc của chúng và đặc biệt là vào quy mô cần phân giải. Một số chất hữu cơ rất dễ bị phân giải, trong khi nhiều chất khác lại rất khó, hoặc không thể phân giải bằng con đường sinh học. Các hydrocacbon có khối lượng phân tử thấp đến trung bình là các chất dễ bị phân giải sinh học. Các hợp chất sinh học lạ, đặc biệt là halocacbon, có xu hướng để kháng lại sự phân giải và một số chất, ví dụ, dioxin là các chất "cứng đầu" còn khó bị phân giải hơn nhiều. Thông thường, các hợp chất phân nhánh và hợp chất nhiều vòng khó phân giải hơn so với các phân tử chuỗi thẳng và phân tử chỉ có một nhân thơm đơn giản. Nhìn chung, các chất bị halogen hóa càng nhiều thì tốc độ phân hủy sinh học càng chậm. Ngoài ra, tricloetan (TCE), một loại dung môi phổ biến và biphenyl polyclorit (PCB), chất có khối lượng phân tử cao được dùng trong nhiều loại thuốc trừ sâu chứa gốc clo, khó bị phân hủy sinh học hơn.

1.2. Phục hồi sinh học trong xử lý ô nhiễm dầu

Dầu mỏ đóng vai trò rất quan trọng trong nền kinh tế của mọi quốc gia nên việc thăm dò, khai thác và vận chuyển dầu mỏ luôn diễn ra rất sôi động. Điều đó kéo theo nguy cơ ô nhiễm dầu. Hằng năm thất thoát dầu ra môi trường lên đến gần 5 triệu tấn. Sau đây là một vài ví dụ điển hình:

- Chiến tranh Vùng Vịnh năm 1991 đã làm cho 0,82 triệu tấn dầu thải ra môi trường.
- Năm 1979, một vụ nổ giếng dầu ở Mexico làm cho mỗi ngày tràn 10 – 30 ngàn thùng dầu ra vịnh trong nhiều tháng.
- Năm 1989 tàu Exon Valdez đã làm tràn 41 triệu m^3 dầu ra vịnh Alaska, làm ảnh hưởng đến đời sống của nhiều loài động vật như chim, cá voi, cá hồi, đại bàng đầu trọc,... trong một thời gian dài.
- Năm 2002, tàu Prestige của Hy Lạp bị gãy làm đôi, làm tràn ra mỗi ngày 125 tấn dầu và dải dầu kéo dài đến 250km dọc bờ biển Tây Ban Nha.
- Việt Nam là nước sản xuất dầu không lớn nhưng tình trạng ô nhiễm dầu cũng khá nghiêm trọng. Mỗi năm có khoảng 5 – 6 vụ tai nạn tràn dầu.
- Năm 1994, tàu chở dầu của Malaysia gặp sự cố làm tràn 1890 tấn dầu diezen và 100 tấn mazut làm cho hàng chục km^2 ruộng lúa và diện tích nuôi trồng thủy sản ở Cần Giờ và Nhà Bè – Thành phố Hồ Chí Minh bị ô nhiễm nặng.
- Năm 2005, tại cảng Cát Lái cũng xảy ra sự cố làm tràn hơn 100 tấn dầu.

Những sự cố tràn dầu liên tục xảy ra khiến việc tìm giải pháp xử lý tối ưu trở nên cấp thiết hơn bao giờ hết.

1.2.1. Các hydrocacbon dầu thô

Khả năng phân giải hydrocacbon dầu thô phụ thuộc vào cấu trúc và khối lượng phân tử của chúng. Các alkan mạch ngắn là chất độc đối với nhiều loại vi sinh vật và chúng rất khó bị phân hủy. Các n-alkan có độ dài trung bình ($C_{10} - C_{24}$) dễ bị phân giải nhất. Các alkan có mạch càng dài thì khả năng phân giải sinh học càng giảm. Khi độ dài tăng và khối lượng phân tử đạt đến 500 thì chúng không còn là nguồn cacbon cho vi sinh vật được nữa. Khả năng phân giải các hydrocacbon dầu mỏ có thể sắp xếp theo thứ tự giảm dần sau đây: n-alkan > alkan mạch thẳng phân nhánh > alken phân nhánh > n-alkyl chứa vòng thơm phân tử lượng thấp > hợp chất một vòng thơm > alkan vòng > hợp chất thơm đa nhân > asphalten. Các vi sinh vật phân giải được alkan là nhờ chúng tiết các enzyme monooxygenase và dioxygenase tấn công trước tiên vào nhóm metyl ở đầu chuỗi để tạo rượu bậc một, sau đó rượu này bị oxy hóa thành aldehyt rồi thành acid béo. Acid béo lại bị oxy hóa tiếp nhờ chu trình β-oxy hóa: Phân tử acid béo bị mất đi hai nguyên tử cacbon để tạo thành axetyl-CoA và một phân tử acid mới. Axetyl CoA đi vào chu trình Crebs để tạo năng lượng, thải ra CO_2, còn phân tử acid béo kia tiếp tục chu trình β-oxy hóa của mình. Đối với hydrocacbon mạch nhánh, quá trình phân giải có thể theo sơ đồ sau:

Hydrocacbon mạch nhánh → Rượu bậc 2 → Xeton → Este → Rượu bậc 1 + acid béo → β-oxy hóa
↓ ↑
Aldehyt → acid béo

Như vậy hydrocacbon sẽ được phân giải đến sản phẩm cuối cùng là CO_2 và nước. Các hợp chất vòng thơm, đặc biệt là hydrocacbon đa nhân thường khó bị phân giải hơn so với alkan, thậm chí có một số chất rất khó hoặc không thể bị phân giải. Điều này có thể là do khối phân giải hydrocacbon vòng thơm đa nhân muốn hoạt động được cần có mặt chất cảm ứng là chất thơm với khối lượng phân tử thấp.

Cả hydrocacbon thơm đa nhân và đơn nhân đều bị dioxygenase oxy hóa để tạo thành catechol. Vòng thơm đã hydroxyl hóa bị phân cắt (mở vòng) và chuyển hóa thành các acid formic, pyruvic và axetaldehyt. Cấu trúc vòng thơm mật độ cao cũng có thể bị dihydroxyl hóa để mở một vòng. Vòng này sẽ bị phân giải thành acid pyruvic. Tiếp đó là vòng thứ hai cũng bị phân giải theo cách như vậy. Một số hợp chất thơm như benzen, toluen có thể bị phân hủy trong điều kiện kỵ khí nhưng với tốc độ chậm. Tuy nhiên, điều này lại rất có ý nghĩa trong phục hồi sinh học ở tầng ngậm nước. Các hydrocacbon vòng no thường không phải là nguồn cacbon duy nhất

của vi sinh vật trừ khi chúng có mạch bên là mạch béo đủ dài và có thể bị phân giải bởi hai hay nhiều chủng vi sinh vật cùng hợp tác với nhau.

1.2.2. Các vi sinh vật phân giải dầu mỏ

Các vi sinh vật có khả năng phân giải dầu mỏ phân bố khá rộng rãi trong đất và chiếm chừng 1% tổng các vi sinh vật đất. Tuy nhiên, khi bị nhiễm dầu thì số lượng của chúng sẽ tăng lên đến 10%. Các vi khuẩn thường được sử dụng để loại bỏ dầu trong đất là *Pseudomonas putida, Burkhoderia cepacia* (loại trừ chủng bệnh cho người và thối rễ ở thực vật) và *Acinetobacter sp.* Đối với xử lý ô nhiễm dầu trên biển thường dùng các loài *Sphingomonas pancimobilis, Acinetobacter baumanmi, Chryseomonas luteola, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aureofaciens*. Một số nấm men *Candida* cũng có khả năng phân giải dầu mạnh.

1.2.3. Halocacbon

Halocacbon là hợp chất cacbon chứa halogen, có thể loại bỏ được halogen nhờ enzyme do vi sinh vật sinh ra. Ví dụ, một số vi khuẩn khử sulphat có thể chuyển hóa tetracloroetan thành TCE và cis-1,2 dicloeten khi tách halogen khỏi halocacbon trong điều kiện kỵ khí. Tương tự như vậy, tetracloeten (percloeten) qua nhiều bước loại bỏ clo để tạo thành vinyl clorua và sau đó thành etan. Một số vi khuẩn sinh metan hỗ sinh sống trên môi trường axetat cũng tiến hành đồng giải percloeten nhờ loại bỏ clo. Nhiều dung môi chứa gốc halogen cũng bị phân giải sinh học. Ví dụ, TCE, một halocacbon gây ô nhiễm phổ biến bị phân hủy trong điều kiện kỵ khí bởi nhóm vi khuẩn sinh metan. Monooxygenase chuyển hóa TCE thành TCE epoxit, sau đó tự thủy phân thành các sản phẩm phân cực (các acid formic, glyoxilic, dicloroaxetic) được vi sinh vật sử dụng.

Đối với clobenzen và các vòng thơm halogen khác, khả năng phân hủy sinh học hiếu khí thường giảm theo số lượng nhóm thế halogen, tuy nhiên vòng thơm có cùng số nhóm thế halogen bị loại clo dễ dàng trong điều kiện kỵ khí. Khi các nhóm halogen lần lượt bị loại thì các sản phẩm tạo ra càng giảm khả năng bị tách halogen tiếp, và monoclobenzen không bị loại clo trong điều kiện kỵ khí. Hexaclobenzen bị loại clo hóa tương đối nhanh thành 1,3,5-triclobenzen, nhưng loại clo tiếp diclo- và monoclobenzen diễn ra chậm và không hoàn toàn. Trái lại, mono- và diclobenzen bị phân hủy hiếu khí tương đối dễ dàng bởi nhiều chủng *Pseudomonas* và *Alcaligenes* nhờ sử dụng dioxygenase để tạo thành các clocatechol. Phân hủy sinh học hiếu khí triclo- và tetraclobenzen khó hơn, nhưng người ta cũng đã phân lập được một số chủng *Pseudomonas* có khả năng. Mặc dù có sự đề kháng tương đối với phân hủy sinh học nhưng một số vi sinh vật cũng có thể biến đổi các PCB theo một cách tương

tự. Phân hủy PCB được thực hiện bởi các nấm mục trắng *Phanerochaete*, *Acinetobacter* và *Alcaligenes* trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí bởi quá trình tách halogen. Sự phân hủy các PCB thường là đồng trao đổi chất và được tăng cường nhờ thêm vào các chất giả clorin hóa như diclobiphenyl. Sự phân hủy một số chất như PCB được tìm thấy rộng rãi trong đất, nước và trầm tích. Các chất giống PCB thể hiện độ mẫn cảm khác nhau với sự phân hủy sinh học tùy theo mức độ thay thế clo và vị trí của các nguyên tử clo. PCB clorin hóa càng nhiều thì càng dễ bị loại clo hơn chất ít clorin hóa hơn. Các nguyên tử clo ở vị trí meta và para dễ bị loại hơn ở vị trí octo.

Nhiều công trình ngoài thực địa và trong phòng thí nghiệm cho thấy có 50 và 85% phân hủy sinh học hỗn hợp PCB (Aroclor 1242 và 1248) được thực hiện. Căn cứ theo mức độ phục hồi mục tiêu thì điều đó có nghĩa là khả năng phục hồi sinh học đất ô nhiễm PCB trong điều kiện hiếu khí là có thể thực hiện ở nồng độ từ 500 đến 1000ppm. Theo thuật ngữ các hỗn hợp Aroclor thương mại thì rõ ràng hiện nay chỉ có Aroclor 1221, 1242 và 1248 đáng phân hủy hiếu khí trực tiếp. Aroclor 1245 và 1260 có quá nhiều gốc clo nên không thích hợp với phân hủy hiếu khí. Do các sản phẩm của quá trình loại clo kỵ khí dễ dàng bị phân hủy bởi các chủng hiếu khí nên một quá trình hai pha kỵ khí/hiếu khí có thể phân hủy một lượng lớn PCB. Do đó, bằng cách sử dụng kết hợp cả hai hệ thống kỵ khí và hiếu khí, giờ đây người ta có thể đoán trước được khả năng phân hủy một lượng lớn các Aroclor có ít gốc clo (1242, 1248) cũng như các Aroclor có nhiều gốc clo (1254, 1260).

1.2.4. Chlorophenol

Nhiều vi sinh vật có khả năng phân hủy clorophenol cả trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Pentaclophenol bị biến đổi thành tetraclohydroquinon dưới tác dụng của monooxygenase bằng cách loại oxy hóa clo ở vị trí para thành hydroxyl phenol. Tiếp theo bước loại clo bậc thang tạo thành 2,5-diclohydroquinon là mở vòng. Trong điều kiện kỵ khí, pentaclophenol bị loại clo hóa từng bước tạo thành phenol. Phenol có thể được sử dụng trong trao đổi chất kỵ khí tạo thành metan và CO_2.

1.2.5. Chất thơm chứa nitơ

Các chất vòng thơm có nhóm thế nitro rất khó phân hủy sinh học, và các hợp chất có nhiều nhóm nitro có xu hướng kháng phân hủy sinh học. Phân hủy sinh học các hợp chất vòng thơm nitro diễn ra chậm và thường dẫn đến hình thành các chất bã liên kết, hoặc polyme trong đất và trầm tích. Các hợp chất vòng thơm nitro dễ bị biến đổi trong điều kiện khử hơn trong điều kiện oxy hóa. Dưới điều kiện kỵ khí và vi hiếu khí, các nhóm nitro của TNT có thể bị khử lần lượt từng nhóm một thành nhóm

amino, nhưng càng về sau, sự khử càng chậm hơn và không hoàn toàn. Nếu các điều kiện khử thay đổi từ kỵ khí thành hiếu khí thì thay vì phân cắt vòng, các chất trung gian của quá trình khử tạo thành các sản phẩm rất phức tạp và gây đột biến.

2. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ PHỤC HỒI SINH HỌC

Ngày nay kỹ thuật phục hồi sinh học đã được ứng dụng rộng rãi, tuy nhiên không có một công thức chung cho tất cả các trường hợp cần xử lý. Nhu cầu xử lý có thể ở môi trường rắn (đất, trầm tích, bùn), môi trường lỏng (nước ngầm, nước thải công nghiệp), hoặc môi trường khí (khí thải công nghiệp, khí thoát ra từ đất). Trong mỗi trường hợp cần phải có sự điều tra, nghiên cứu và đưa ra giải pháp thích hợp như: (a) - Địa điểm tiến hành xử lý, tại chỗ (*in situ*) hay mang đi nơi khác (*exsitu*) ; (b) - Phương thức xử lý bao gồm:

- *Lò phản ứng sinh học* (bioremediator). Sử dụng quần xã vi sinh vật tại chỗ cũng như bổ sung thêm các vi sinh vật hữu hiệu, kiểm soát chặt chẽ điều kiện môi trường và dinh dưỡng. Biện pháp này thường cho hiệu quả cao nhưng tốn kém.
- *Xử lý đất* bao gồm làm đất (landfarming), vun đống (biopiling). Sử dụng vi sinh vật có sẵn bổ sung thêm chất dinh dưỡng.
- *Tạo độ thông thoáng (*bioventing). Kết hợp quá trình bay hơi và phân hủy sinh học. Tuy vậy, khi bay hơi có thể gây ô nhiễm không khí.
- *Phục hồi bằng thực vật* (phytoremediation). Sử dụng cây xanh và vi khuẩn nốt sần cây họ đậu để xử lý ô nhiễm.

Hai giải pháp được quan tâm nhất là kích thích sinh học (biostimulation) và tăng cường sinh học (bioaugmentation).

2.1. Kích thích sinh học

Khi phân giải tự nhiên diễn ra chậm thì cần phải tăng số lượng các vi sinh vật bản địa có khả năng phân hủy chất độc bằng cách tạo điều kiện thích hợp cho chúng sinh trưởng, ví dụ, bổ sung dinh dưỡng khoáng, tạo pH, nhiệt độ, độ ẩm, độ thoáng khí thích hợp. Các chất dinh dưỡng được cung cấp dưới dạng phân bón. Ở vùng đất mặt thì dùng phân bón nông nghiệp, còn vùng nước nhiễm dầu thì dùng phân bón ưa dầu (olephilic). Đa số vi sinh vật phân giải chất độc trong điều kiện hiếu khí. Nồng độ hydrocacbon cần phân giải càng cao thì nhu cầu oxy càng lớn trong khi oxy khuếch tán trong đất rất kém, do vậy cần phải cày xới đất, tạo thêm dung dịch H_2O_2 loãng (100ppm) nếu thấy cần thiết. Trong nhiều trường hợp, cần kết hợp giữa kỵ khí và hiếu khí. Ví dụ, để phân hủy PCB, giai đoạn đầu khối lượng phân tử lớn bị loại clo trở thành phân tử có khối lượng thấp hơn, sau đó trong điều kiện hiếu khí, các phân tử này sẽ phân hủy tiếp thành CO_2, nước và ion clo.

2.2. Tăng cường sinh học

Khi quần thể các vi sinh vật bản địa không có khả năng phân hủy các chất hữu cơ lạ, hoặc hỗn hợp phức tạp gồm nhiều chất, hoặc do số lượng của chúng quá ít thì lúc đó người ta nghĩ đến việc bổ sung một cách thận trọng các chủng vi sinh vật để chọn lọc, có khả năng phân hủy, đặc biệt là đối với các chất khó phân hủy.

- Nấm mục trắng *Phanerichaete* được dùng để phân hủy các chất hữu cơ phức tạp như thuốc trừ sâu (DDT), thuốc nổ (TNT), các chất thơm đa vòng như benzopyren và nhựa, như polyetylen.
- *Pseudomonas* và các loài tương tự được dùng để phân hủy TCE khỏi nước ngầm.
- *Burkholderia cepacia* G4 do có khả năng sử dụng nhiều nguồn cacbon khác nhau nên được dùng để phân hủy TCE nhiễm trong nước ngầm.

2.3. Xử lý tràn dầu trong môi trường nước

Ở môi trường nước, nhất là nước biển, việc xử lý tràn dầu rất phức tạp. Thường lúc đầu dùng phương pháp vật lý để thu gom (bằng phao quây, bơm hút hoặc tấm thấm), sau đó xử lý tiếp bằng biện pháp sinh học. Cần phải phân tích tình trạng ô nhiễm, loại dầu, số lượng, quần thể vi sinh vật, để từ đó tính toán lượng chất dinh dưỡng cần thiết và quyết định xem có cần bổ sung vi sinh vật hay không. Ở Israel, người ta phát triển công nghệ bón phân dạng polyme có bổ sung các chủng vi sinh vật. Đây là loại phân bón đặc biệt chứa nguồn nitơ, phospho mà chỉ có các vi sinh vật bổ sung mới sử dụng được, do đó không sợ cạnh tranh dinh dưỡng với các vi sinh vật bản địa.

Ở môi trường đất, cần phải phân tích các dữ liệu về loại dầu, tổng lượng dầu, địa điểm, loại đất, độ tơi xốp, pH, nhiệt độ, độ sâu ngấm dầu để từ đó quyết định dùng biện pháp kích thích hay tăng cường sinh học. Ngày nay trên thị trường đã có nhiều chế phẩm vi sinh vật để xử lý ô nhiễm dầu. Ví dụ, chế phẩm oilzapper của Ấn Độ chứa 5 chủng vi khuẩn có thể phân hủy hầu hết các hợp chất dầu mỏ. Chế phẩm Enretech 1 và 2 của Úc vừa là chất thấm dầu vừa phân hủy sinh học dầu. Vi sinh vật được tẩm vào các sợi bông tái chế. Mỹ có chế phẩm EC.2100P, HTP để xử lý nhiễm dầu trên đất.

2.4. Đất ô nhiễm kim loại nặng

Trong nhiều trường hợp, mục tiêu của phục hồi sinh học là đạt được sự phân hủy chất gây ô nhiễm đến mức độ an toàn. Tuy nhiên, đối với kim loại nặng thì nhiều loại vi khuẩn lưu huỳnh có khả năng hấp thụ kim loại nặng mà không biến đổi chúng. Đây cũng là nguyên lý của phương pháp phục hồi nhờ thực vật. Một số cây như cải

dầu (*Brassica juncea*), cỏ phấn hương (nhiều loài Ambrosia), rau ngổ có khả năng tích lũy kim loại nặng. Cây cải dầu có thể tích lũy đến 40% kim loại nặng trong sinh khối của chúng. Ở Đại học Osaka (Nhật Bản) người ta đã tạo được chủng vi khuẩn nốt sần ở cây họ đậu chứa protein có khả năng gắn kim loại (MBP). Phương pháp dùng thực vật đã được ứng dụng ở nhiều vùng bị ô nhiễm, như Chenobưn (Nga), nơi bị ô nhiễm nặng sau vụ nổ lò phản ứng hạt nhân. Khi cây tích lũy kim loại nặng, người ta thu cây đem đốt thành tro, và kim loại thu được có thể được tái sử dụng.

Đối với nước ô nhiễm kim loại nặng như sắt, kẽm, đồng, mangan, niken, cadimi,... có thể xử lý bằng cách sử dụng vi khuẩn khử sulphat ở điều kiện kỵ khí để chuyển thành dạng kim loại sulphua. Ví dụ, để loại bỏ asen trong nước thải hầm mỏ hoặc xí nghiệp luyện kim, người ta cho nước thải chảy qua cột có chất mang là phân gia súc, bã rơm trồng nấm, có hoặc không bổ sung vi khuẩn khư sulphat đều thu được kết quả mong muốn.

Lời kết

Phục hồi sinh học là giải pháp xử lý ô nhiễm vừa có hiệu quả, vừa có giá thành thấp so với các phương pháp khác. Tính khả thi và thành công của giải pháp này phụ thuộc vào 3 yếu tố:

- Tính chất của chất gây ô nhiễm (khả năng phân hủy sinh học được của chất gây ô nhiễm.
- Quần xã vi sinh vật (enzyme trao đổi chất gây ô nhiễm).
- Môi trường (những tính chất thúc đẩy hoặc kìm hãm sinh trưởng và quá trình trao đổi chất gây ô nhiễm của vi sinh vật).

Tùy thuộc vào yếu tố trên mà đưa ra quyết định tự phục hồi hay bổ sung thêm chất dinh dưỡng để kích thích quần thể vi sinh vật bản địa, hoặc phải cho thêm các vi sinh vật đã tuyển chọn để tăng cường khả năng phân hủy mạnh chất gây ô nhiễm.

Chương XI
BẢO TÀNG GIỐNG VI SINH VẬT

Trong công nghệ sinh học, chủng giống đóng một vai trò rất quan trọng. Để đảm bảo hoạt động sản xuất và nghiên cứu, các chủng giống phải được bảo quản và lưu giữ ở trạng thái sống và với hoạt tính không thay đổi. Một số nhà máy lưu giữ chủng giống của riêng họ tại ngay cơ sở của mình. Những bảo tàng giống như vậy lưu giữ chủng khởi động, trong đó có cả những chủng biến đổi gen nhằm tăng hoạt lực, hoặc đem lại những đặc tính mới như khả năng tạo hương, khả năng chống chịu bacteriophage. Tuy nhiên, kỹ thuật bảo tồn vi sinh vật ngày càng trở nên phức tạp. Nhu cầu ngày càng cao về vai trò xác định pháp lý, an toàn sinh học, tác động tới đa dạng sinh học thiên nhiên, yêu cầu xử lý số liệu và tin học đã dẫn tới việc hình thành các cơ sở riêng biệt cho việc bảo tồn và lưu giữ các chủng vi sinh vật.

1. CÁC HOẠT ĐỘNG CỦA BẢO TÀNG GIỐNG

Bảo tàng giống hiện đang được cơ quan nghiên cứu, giảng dạy, các ngành công nghiệp, nông nghiệp và y tế sử dụng như một nguồn cung cấp các chủng giống và chuẩn so sánh phục vụ công việc của mình. Bảo tàng giống lưu trữ vi sinh vật, dòng tế bào, vật liệu sinh học cũng như những thông tin liên quan tới chúng. Tùy theo bảo tàng, người sử dụng có thể yêu cầu được cung cấp chủng giống, phương pháp nuôi cấy, thông tin liên quan tới nguồn gốc, khả năng ứng dụng cũng như ý nghĩa khoa học của chủng. Các bảo tàng giống khác nhau cũng khác nhau về độ chuyên biệt trong chủng loại và ứng dụng của chủng giống mà họ lưu trữ. Các bảo tàng giống có thể là của tư nhân hoặc nhà nước, hoạt động vì lợi nhuận hoặc phi lợi nhuận. Thông thường, việc nhân chủng giống sẽ cần một mức lệ phí nhất định, tuy nhiên, trong một số ít trường hợp, giống có thể được cung cấp miễn phí.

1.1. Chủng chuẩn, cựu chuẩn, chủng xác định, chủng đại diện, chủng tham khảo

Sự nhất quán trong tên loài là rất cần thiết trong khoa học sự sống. Ví dụ, loài *Saccharomyces kluyveri* Phaff, Miller & Shifrine là một loài vi sinh vật cụ thể, một loài nấm men rất gần với nấm men đang sử dụng trong lên men và sản xuất bánh mỳ.

Nấm men này được đặt tên loài "*klyuveri*" bởi các tác giả Phaff, Miller và Shifrine. Loài này thuộc về chi *Saccharomyces*. Khi loài được miêu tả, các tác giả sẽ phải cung cấp một chủng gọi là *chủng chuẩn* cho loài đó. *Chủng chuẩn* phải có đầy đủ những đặc điểm giống như trong miêu tả loài, và tốt hơn nữa nếu nó mang tính đại diện cho đa số các chủng thuộc loài liên quan. Mặc dù người ta thường xuyên sử dụng thuật ngữ "chủng chuẩn", trên thực tế nếu nghiêm ngặt hơn, chỉ có tiêu bản gốc là chủng chuẩn, còn những giống cấy từ đó phải gọi là "cựu chuẩn", tức là được lấy từ mẫu chuẩn (hay nguyên là chuẩn). Mặc dù tiêu bản gốc thường được bảo quản ở dạng tiêu bản soi kính, tiêu bản sấy khô, vật mẫu, tóm lại là tiêu bản chết, chủng cựu chuẩn có thể được sử dụng ở dạng sống trong nghiên cứu và sản xuất. Chủng cựu chuẩn dạng sống của *Saccharomyces kluyveri* được bảo quản trong các bảo tàng giống khác nhau trên thế giới và có thể được các nhà khoa học sử dụng khi cần thiết. Chủng chuẩn có thể được thay cách gọi phụ thuộc vào bản chất của mẫu chuẩn. Ví dụ tân chuẩn (neotype) là chủng được công nhận thay thế chủng chuẩn trước đó đã bị hỏng hoặc mất. Chủng tân chuẩn phải có đầy đủ các đặc tính của miêu tả chuẩn, bất cứ một khác biệt nào cũng cần được giải thích.

Chủng xác định là chủng được phân loại theo một tác giả nhất định với một tên loài nhất định. *Chủng đại diện* và *chủng tham khảo* là chủng được tạm coi là đại diện cho một loài nào đó khi sử dụng trong nghiên cứu về phân loại, hoặc nghiên cứu về đặc tính. Các quy định về việc đặt tên vi khuẩn, nấm (trong đó có nấm men) cũng như các quy định về chủng chuẩn được đưa ra trong Luật Danh pháp Quốc tế cho Vi khuẩn (International Code of Nomenclature of Bacteria) và Luật Danh pháp Thực vật (Code of Botanical Nomenclature). Các bảo tàng giống lớn trên thế giới hiện đang lưu trữ và cung cấp hàng nghìn chủng chuẩn và chủng đại diện.

Chủng chuẩn, chủng cựu chuẩn, chủng xác định được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu phân loại cũng như trong quản lý chất lượng các hệ thống, kit định tên vi sinh vật. *Chủng đại diện, chủng tham khảo* thường được sử dụng trong các nghiên cứu kiểm định vật liệu, phục vụ đối chứng dương trong dịch tễ học. Trong kiểm định vật liệu, các chủng giống được sử dụng để đánh giá độ bền của vật liệu đối với tác động phá hủy của các loại vi sinh vật khác nhau; để xác định khả năng phát triển của vi sinh vật trên sản phẩm. Chủng tham khảo còn được sử dụng trong kiểm tra hoạt tính của kháng sinh, trong kiểm tra chất lượng kit kiểm định vi sinh. Một số cơ quan nghiên cứu và kiểm định có uy tín còn đưa ra công thức kiểm định với yêu cầu sử dụng một bộ những chủng tham khảo nhất định cho mỗi ứng dụng quan tâm.

1.2. Các phương pháp bảo quản

Các phương pháp bảo quản dài hạn vi sinh vật bao gồm bảo quản trong nitơ lỏng, đông khô, lạnh sâu (−80°C). Ngoài ra, còn có một số phương pháp phụ trợ khác

như bảo quản trong nước cất, trong silicagel, trong parafin, trong giấy thấm, trong đất khô, hoặc ở −20°C. Tùy theo điều kiện bảo quản, các chất bảo vệ có thể được sử dụng nhằm nâng cao khả năng sống sót của tế bào.

Bảo quản trong hơi nitơ lỏng (−130°C hoặc thấp hơn) là phương pháp bảo quản tốt nhất đối với hầu hết các vi sinh vật. Thông thường, các ống nút xoáy vô khuẩn được dùng để chứa tế bào vi sinh vật và chất bảo vệ. Chất bảo vệ thường được dùng là 10% glycerol, đôi khi là 5% dimethyl sulphoxide (DMSO) tùy theo đặc tính của chủng giống. Việc đưa chủng giống vào nitơ lỏng được thực hiện theo một chương trình nhiệt nhất định. Đầu tiên, mẫu được đưa từ 5°C tới −40°C với tốc độ 1°C/phút, sau đó tới −90°C với tốc độ 10°C/phút. Cuối cùng mẫu làm lạnh được đưa vào hơi nitơ lỏng (−130°C tới − 196°C). Nhiệt độ −196°C là nhiệt độ của nitơ lỏng. Các bình chứa nitơ lỏng làm bằng vật liệu không gỉ với các kích thước khác nhau có thể mua từ các nhà cung cấp. Các ống bảo quản có thể được đặt trên các giá, trong các hộp hoặc thùng. Điều quan trọng cần lưu ý là các ký hiệu ghi trên ống phải chịu được điều kiện nitơ lỏng trong một thời gian dài.

Đông khô được thực hiện trong điều kiện điều khiển về nhiệt độ và độ chân không nhằm loại nước khỏi mẫu vật mà không ảnh hưởng tới sức sống của chủng giống. Trong phương pháp đông khô, các chất bảo vệ cũng được sử dụng. Thông thường nhất, mẫu được bảo vệ bằng dung dịch 20% sữa gầy, hoặc dung dịch sucrose và huyết thanh bò. Một số vi khuẩn phân lập từ thiên nhiên và vi sinh vật khó nuôi cấy có thể được bảo quản tốt hơn khi sử dụng dung dịch bảo quản chứa 5% dextran và 5% trehalose. Có nhiều loại thiết bị đông khô khác nhau trên thị trường. Một kỹ thuật thông dụng là đưa mẫu vật về −70°C sử dụng tủ lạnh sâu trong 1h, sau đó đưa về −130°C trong ít nhất 15 phút sử dụng nitơ lỏng. Sau đó mẫu được đưa vào thiết bị đông khô ở −30°C trong vài giờ liền. Tiếp theo mẫu được đưa về 0°C và giữ trong vài giờ kế tiếp. Chân không được thiết lập trong quá trình đông khô. Ống được hàn kín sau khi quá trình đông khô kết thúc. Các ống thủy tinh có thể được hàn kín tuyệt đối, hoặc sử dụng nút cao su với kẹp kim loại. Tuy nhiên, chỉ phương pháp hàn kín mới đảm bảo điều kiện không oxy tuyệt đối trong quá trình bảo quản lâu dài. Các sản phẩm đông khô sau đó cần được bảo quản ở nhiệt độ 5°C trong điều kiện khô ráo.

Rất nhiều bảo tàng giống nhỏ sử dụng tủ lạnh sâu để bảo quản vi sinh vật ở nhiệt độ −70°C tới −80°C. Mẫu vật trong dung dịch bảo quản (thường là 10% glycerol) thông thường được đưa thẳng vào thiết bị lạnh sâu, tuy nhiên một số mẫu có thể đòi hỏi được làm lạnh theo chương trình. Mẫu có thể được chứa trong ống nhựa nút xoáy, hoặc đĩa đa giếng. Nhiều loại vi sinh vật, như một số nấm men, có thể bảo quản trong giấy thấm bão hòa 10% glycerol, một số ít vi sinh vật có thể bảo quản

trên giấy lọc ở dạng khô tại nhiệt độ phòng. Một số vi sinh vật cũng có thể bảo quản ở nhiệt độ −10°C tới −20°C bằng tủ lạnh gia dụng, tuy nhiên, đây là nhiệt độ nguy hiểm cho rất nhiều loại vi sinh vật khác.

Bảo quản vi sinh vật trong silicagel, là một phương pháp tương đối thuận tiện. Phương pháp này có thể sử dụng cho vi khuẩn hoặc nấm mốc sinh các dạng bào tử bền vững. Để bảo quản, các hạt silicagel vô trùng được làm khô kỹ lưỡng trong lò sấy. Sau đó nhỏ vài giọt huyền phù tế bào đậm đặc trong sữa gầy 5% và đặt ngay vào trong khay đá (phản ứng sẽ sinh nhiệt). Các ống được đóng nút và bảo quản trong tủ đá thông thường. Một phương pháp tương tự sử dụng đất vô trùng thay cho silicagel, tuy nhiên cần phải đảm bảo chắc chắn là đất đã được thanh trùng kỹ lưỡng (thông thường cần thanh trùng đất vài ba lần mới có thể diệt hết các dạng bào tử). Những phương pháp này có thể xếp vào phương pháp bảo quản trung hạn hơn là bảo quản dài hạn. Bảo quản dịch loãng huyền phù bào tử, hoặc tế bào trong nước cất ở 5°C cũng đem lại kết quả bảo quản trung hạn tương đối tốt đối với nhiều loại vi sinh vật. Bảo quản trên thạch, dưới parafin lỏng là phương pháp bảo quản trung hạn đã được khảo sát kỹ lưỡng. Kỹ thuật này tuy nhiên không tiết kiệm về diện tích và mất khá nhiều công sức. Bảo quản trên thạch nghiêng không có parafin là phương pháp không an toàn bởi thời hạn bảo quản ngắn và rất dễ bị bọ bụi (mite) xâm nhập.

Có thể đưa ra một số nguyên tắc chung khi bảo quản lạnh. Nhìn chung, đông khô và bảo quản trong silicagel (hay trong đất), bảo quản ở −70°C thích hợp với việc bảo quản vi khuẩn và nấm sinh sản bằng bào tử đính (conidia) hoặc bào tử nang (ascospore). Các loại nấm sản sinh động bào tử (zoospore) không thể bảo quản bằng các phương pháp này và thích hợp nhất đối với chúng là bảo quản bằng nitơ lỏng hay bảo quản trong parafin. Tương tự như vậy, bảo quản bằng nitơ lỏng và parafin là phương pháp thích hợp nhất đối với đa số nấm thuộc lớp nấm đảm. Bào tử vi khuẩn bền vững hơn so với tế bào sinh dưỡng khi đông khô. Vi khuẩn gram dương nhìn chung bền hơn so với vi khuẩn gram âm. Các loại vi khuẩn dạng sợi như tảo lục, hay dạng xoắn dài như *Spirillum* hay *Borrelia* cần được bảo quản trong nitơ lỏng. Chúng không bảo quản được bằng phương pháp đông khô. Tương tự như vậy, các loại nấm chỉ phát triển ở dạng sợi cũng khó có thể bảo quản bằng đông khô. Tế bào kích thước lớn thông thường khó bảo quản hơn tế bào kích thước nhỏ. Vi khuẩn và nấm men trong giai đoạn cuối của pha logarit, hoặc đầu của pha ổn định thường được sử dụng cho bảo quản. Tế bào giai đoạn này có vẻ bền hơn đối với tác động của đông lạnh và đông khô. Vi khuẩn kỵ khí phát triển trong điều kiện khí chứa 80% nitơ, 10% cacbonic và 10% hydro cần phải được đưa càng nhanh càng tốt về trạng thái đông lạnh để tránh các tác động hủy hoại của oxy.

Trong phương pháp đông khô, lượng tế bào ban đầu lớn hơn sẽ đem lại số lượng tế bào sống sót lớn hơn. Nồng độ tế bào lớn cũng làm giảm lượng nước cần thiết phải loại bỏ khi đông khô. Với vi khuẩn, mật độ ban đầu thích hợp nhất là khoảng 10^6 tới 10^8 tế bào/ml, điều kiện tương tự có thể áp dụng cho nấm và nấm men.

Có thể xác định một cách sơ bộ kỹ thuật bảo quản đối với chủng giống quan tâm bằng cách tìm hiểu thông tin trong catalog của những bảo tàng giống lớn. Nếu những sưu tập này có cung cấp giống quan tâm ở trạng thái ống đông khô thì có thể thử nghiệm bảo quản đông khô đối với chúng. Trong trường hợp giống chỉ được cung cấp dạng ống thạch thì có lẽ phương pháp bảo quản trong nitơ lỏng sẽ thích hợp hơn.

1.3. Khôi phục chủng bảo quản

Các yếu tố ảnh hưởng tới sức sống của tế bào trong điều kiện bảo quản cũng sẽ ảnh hưởng tới quá trình phục hồi chúng từ trạng thái bảo quản sang trạng thái hoạt động. Những yếu tố này bao gồm kích thước tế bào, độ tuổi sinh lý, mật độ tế bào và loại chất bảo quản.

Có khá nhiều loại chất hóa học khác nhau được sử dụng nhằm bảo vệ tế bào trong quá trình bảo quản. Những chất bảo vệ tốt có tác dụng làm mất nước của tế bào, giảm kích thước và số lượng các tinh thể đá tạo ra trong quá trình làm lạnh, làm giảm nhiệt độ đóng băng, bảo vệ cấu trúc màng, trung hòa các thay đổi pH. Chất bảo vệ trong quá trình đông khô phải hình thành một khối rắn, xốp sau đông khô và giúp làm ẩm tế bào trở lại một cách dễ dàng khi khôi phục chủng.

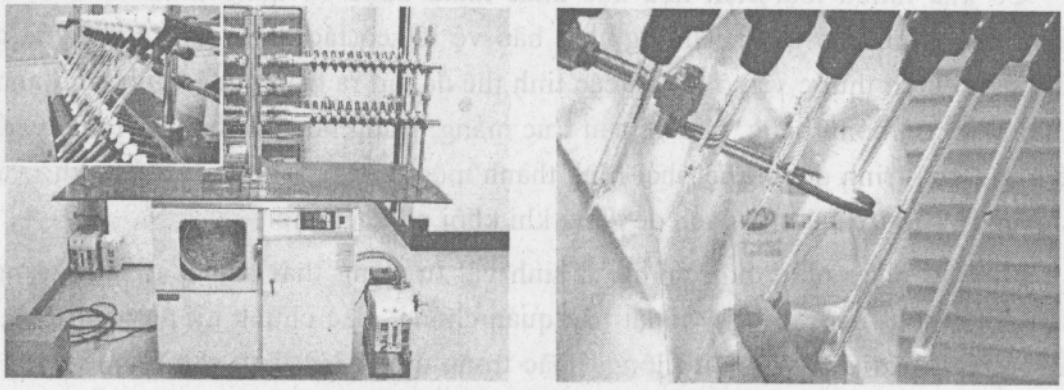
Phương pháp phục hồi chủng vi sinh vật từ trạng thái bất hoạt sang trạng thái hoạt động phụ thuộc vào kỹ thuật bảo quản chúng. Các chủng giống nấm men, hoặc nấm mốc bảo quản trong nitơ lỏng, hoặc trong điều kiện lạnh sâu có thể được phục hồi bằng cách ngâm các ống trong bể ổn nhiệt ở 35°C tới 55°C cho tới lúc tan đá hoàn toàn. Chủng giống sau đó được chuyển tức thời lên môi trường nuôi cấy thích hợp. Đặc biệt lưu ý không để các chủng giống ở nhiệt độ cao quá lâu. Đối với các chủng nấm men hay nấm mốc, giống sau đông khô cần được hoạt hóa bằng cách bổ sung nước cất và giữ ở 5°C, hoặc nhiệt độ phòng trong 2 giờ (nếu để qua đêm có thể sẽ quá lâu) và sau đó chuyển sang môi trường nuôi cấy thích hợp. Nấm mốc bảo quản trên giấy thấm ở dạng khô có thể sẽ cần phải làm ẩm lại bằng nước cất trước khi cấy lên môi trường. Hạt silicagel chứa nấm mốc và nấm men hay vi khuẩn có thể đặt trực tiếp lên môi trường nuôi cấy. Tương tự như vậy, nấm mốc bảo quản trên ống thạch nghiêng, hoặc trong nước cất có thể được cấy trực tiếp lên môi trường.

Trái lại với nấm men và nấm mốc, các chủng vi khuẩn đông khô không đòi hỏi làm ẩm khi hoạt hóa. Chúng có thể được hồi phục bằng cách cấy trực tiếp lên môi

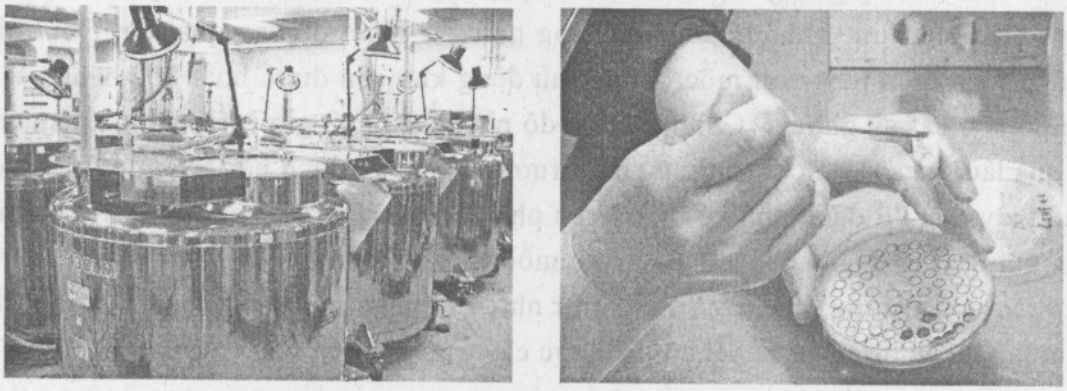
trường. Thông thường, thời gian nuôi cấy để hoạt hóa sẽ dài hơn so với bình thường, tuy nhiên sau những lần chuyển giống tiếp theo, chủng giống sẽ phát triển nhanh chóng trở lại.

1.4. Các tác nhân bất lợi trong quá trình bảo quản

Rất khó để có thể đảm bảo tuyệt đối sức sống của chủng giống trong quá trình bảo quản, bởi có khá nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng tới sức sống của chúng. Độ ẩm cao có thể là nguyên nhân làm mất sức sống của chủng giống. Để đảm bảo điều kiện tối ưu cho quá trình bảo quản, cần phải tìm được biện pháp thích hợp để khống chế độ ẩm của mẫu trong dải cho phép. Thông thường, độ ẩm 1 – 3% là thích hợp cho bảo quản. Một yếu tố nguy hiểm nữa là sự có mặt của oxy. Các gốc tự do có thể phá hủy tế bào khi bảo quản đông khô. Để hạn chế oxy, mẫu có thể được bảo quản trong điều kiện chân không, hoặc trong khí trơ. Sự giảm dần số lượng tế bào sống trong mẫu đông khô là hiện tượng khá phổ biến. Với những chủng không thể đông khô, hoặc những chủng mà số lượng tế bào sống giảm dần hằng năm, phương pháp bảo quản trong nitơ lỏng có thể sẽ là giải pháp tối ưu.



Hình 11.1. **Bảo quản chủng giống bằng phương pháp đông khô**
Hình trái – Thiết bị đông khô; *Hình phải* – Hàn ống đông khô bằng đèn khò.



Hình 11.2. **Bảo quản chủng giống trong nitơ lỏng**
Hình trái – Bồn chứa nitơ lỏng và chủng giống;
Hình phải – Chuẩn bị giống nấm mốc cho bảo quản trong nitơ lỏng.

1.5. Giảm thiểu sự bất ổn định về đặc tính di truyền và đặc tính thể hiện

Sự biến đổi về yếu tố di truyền có thể xảy ra trong quá trình chuẩn bị mẫu, bảo quản và hoạt hóa. Có hai cơ chế dẫn tới sự biến đổi di truyền, đó là: biến đổi ADN mới và chọn lọc những đột biến cũ. Để đảm bảo sự ổn định về đặc tính di truyền và kiểu hình, cần phải tối ưu hóa phương pháp bảo quản, môi trường nuôi cấy cũng như chiến lược bảo quản. Nhìn chung, bảo quản trong nitơ lỏng ảnh hưởng ít nhất tới ADN và do vậy đây là phương pháp thích hợp nhất để duy trì các đặc điểm di truyền. Bảo tồn các đặc tính kiểu hình còn phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy. Rất nhiều vi sinh vật, đặc biệt là các vi sinh vật gây bệnh có thể đòi hỏi phải được đưa vào cá thể chủ để duy trì những đặc tính gây bệnh mà chúng có. Trong nhiều trường hợp, các mẫu phẩm thiên nhiên sau khi đã được thanh trùng bằng nhiệt, hoặc bằng phóng xạ, hoặc phương pháp khác có thể sử dụng làm môi trường để duy trì đặc tính kiểu hình. Việc bảo quản và duy trì các chủng đột biến phụ thuộc nhiều vào thành phần môi trường. Trong nhiều trường hợp, các đột biến quan tâm phải được sàng lọc lại thông qua các kỹ thuật chọn lọc. Nếu điều kiện không cho phép, chủng cần được lưu giữ trên môi trường giàu dinh dưỡng nhằm tránh hiện tượng chọn lọc những tập hợp tế bào đột biến ngược. Và cuối cùng, việc bảo quản đồng thời nhiều ống giống gốc của cùng một chủng sẽ hạn chế việc cấy truyền từ mẫu gốc. Việc cấy truyền thường xuyên cũng làm tăng nguy cơ tạp nhiễm và đột biến.

2. CÁC BẢO TÀNG GIỐNG CHỦ CHỐT

Có rất nhiều bảo tàng giống trên thế giới. Đa số chúng được đặt tại các trường đại học, viện bảo tàng, các phòng thí nghiệm quốc gia. Phần lớn các bảo tàng giống tồn tại dựa trên cơ sở hoạt động của một vài nhà nghiên cứu. Một số bảo tàng khác thì ngược lại, họ có định hướng quảng bá dịch vụ và cung cấp giống trên quy mô toàn cầu. Những bảo tàng giống này hoạt động tuân thủ các quy định về GLP (Good Laboratory Practices), GMP (Good Manufacturing Practices), ISO 9000, hoặc một trong những quy định đó tùy theo điều kiện cụ thể. Danh sách một số bảo tàng giống lớn trên thế giới và một vài bảo tàng giống quan trọng ở Việt Nam được trình bày trong bảng sau.

Bảng 11.1. **Tên một số bảo tàng giống lớn trên thế giới và bảo tàng giống quan trọng tại Việt Nam**

Tên viết tắt	Địa chỉ	Hoạt động
Trên thế giới		
ATCC	American Type Culture Collection P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA http://www.atcc.org/	Cung cấp giống vi sinh vật, ADN, virus, sản phẩm sinh học...
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands http://www.cbs.knaw.nl/	Giống chuẩn phục vụ nghiên cứu
NRRL	National Center for Agricultural Utilization Research, 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604, USA. http://nrrl.ncaur.usda.gov/	Giống chuẩn phục vụ nghiên cứu
JCM	Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, 2 – 1 Hirosawa, Wako, Saitama 351 – 0198, Japan http://www.jcm.riken.jp/	Giống chuẩn phục vụ nghiên cứu
Tại Việt Nam		
CNTP	Viện Công nghiệp Thực phẩm, 301 – Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội	Chủng công nghiệp, chủng phục vụ sản xuất, nghiên cứu
VTCC	Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên,	Giống chuẩn phục vụ nghiên cứu

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Robert W. Bauman. *Microbiology*. Benjamin Cummings, 2004.
2. Ronald M. Atlas. *Microorganisms in our World*. Mosby, 1995.
3. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne. *Kuby Immunology*. W.H. Freeman and Company, 2000.
4. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, 2000.
5. Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, 2000.

MỤC LỤC

Chương IV

ỨNG DỤNG VI SINH VẬT TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM

Chương V

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT ACID HỮU CƠ

Chương VI

CỒN NHIÊN LIỆU TỪ LIGNOCELLULOSE

Chương VII

THUỐC TRỪ SÂU VI SINH

Chương VIII

TRỢ SINH

Chương IX

XỬ LÝ NƯỚC THẢI BẰNG BIỆN PHÁP SINH HỌC

Chương X

PHỤC HỒI SINH HỌC

Chương XI

BẢO TÀNG GIỐNG VI SINH VẬT

Chịu trách nhiệm xuất bản :
Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO

Chịu trách nhiệm nội dung :
Chủ tịch HĐQT kiêm Giám đốc Công ty CP Sách ĐH - DN
TRẦN NHẬT TÂN

Biên tập và sửa bản in :
NGUYỄN HỒNG ÁNH

Trình bày bìa :
HOÀNG MẠNH DỨA

Chế bản :
HỒNG THỦY

CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Tập năm: CÔNG NGHỆ VI SINH VÀ MÔI TRƯỜNG
Mã số : 7K665M6 – DAI

In 1000 cuốn, khổ 19 x 27 cm. Tại Công ty Cổ phần in Anh Việt
Số đăng ký KHXB: 251 - 2006/ CXB/ 26 - 510/GD
In xong nộp lưu chiểu Quý IV năm 2006.

CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC – DẠY NGHỀ
HEVOBCO
Địa chỉ : 25 Hàn Thuyên, Hà Nội
Website : www.hevobco.com.vn

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

1.	Đất ngập nước	GS. TS. Lê Văn Khoa
2.	Động vật học có xương sống	GS. TS. Lê Vũ Khôi
3.	Sinh thái học côn trùng	PGS. TS. Phạm Bình Quyền
4.	Cơ sở hoá sinh	PGS. TS. Trịnh Lê Hùng
5.	Tài nguyên nước Việt Nam	Nguyễn Thanh Sơn
6.	Virut học	PGS. TS. Phạm Văn Ty
7.	Bộ sách về công nghệ sinh học	
	Tập một : Sinh học phân tử và tế bào - Cơ sở khoa học của công nghệ sinh học	PGS. TS. Nguyễn Như Hiền
	Tập hai : Công nghệ tế bào thực vật và động vật	GS. TS. Vũ Văn Vụ GS. TS. Nguyễn Mộng Hùng
	Tập ba : Enzym và ứng dụng	GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu PGS.TS. Phan Tuấn Nghĩa
	Tập bốn : Công nghệ di truyền	TS. Trịnh Đình Đạt
	Tập năm : Công nghệ vi sinh và môi trường	PGS. TS. Phạm Văn Ty TS. Vũ Nguyên Thành
8.	Cơ sở lý thuyết và kỹ thuật sản xuất thực phẩm	TS. Nguyễn Xuân Phương TSKH. Nguyễn Văn Thoa
9.	Di truyền học	Đỗ Lê Thăng
10.	Sinh học tế bào	PGS. TS. Nguyễn Như Hiền
11.	Sinh học phân tử tế bào và ứng dụng	TS. Võ Thị Thương Lan
12.	Giống vật nuôi	TS. Văn Lệ Hằng

Bạn đọc có thể tìm mua tại các Công ty sách – Thiết bị trường học ở địa phương hoặc các Cửa hàng sách của Nhà xuất bản Giáo dục:

– *Tại Hà Nội* : 25 Hàn Thuyên, 187B Giảng Võ, 237 Tây Sơn, 23 Tràng Tiền ;

– *Tại Đà Nẵng* : 15 Nguyễn Chí Thanh, 62 Nguyễn Chí Thanh ;

– *Tại Thành phố Hồ Chí Minh* : 104 Mai Thị Lựu – Quận 1,
Cửa hàng 451B – 453 Hai Bà Trưng, 240 Trần Bình

– *Tại Cần Thơ* : Số 5/5, đường 30/4 ;

– *Website* : www.nxbgd.com.vn

công nghệ sinh học t5
1 007022 800105
25.000 VNĐ

8 934980 693087

Giá: 25.000Đ